Genomische, enzymatische und biotechnologische Charakterisierung einer Pilzsammlung aus Vietnam

Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften Dr. rer. nat.: Doctor rerum naturalium des Fachbereiches Biologie der Fakultät Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

Sophie Charlotte Brandt

geb. 14.06.1988 in Lahnstein

Hamburg, September 2018

1. Prüfer: Prof. Dr. Wilhelm Schäfer

Fachbereich Molekulare Phytopathologie, Fakultät der Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie, Universität Hamburg.

2. Prüfer: Prof. Dr. Wolfgang Streit

Fachbereich Mikrobiologie und Biotechnologie, Fakultät der Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie, Universität Hamburg.

Vorsitzende der Prüfungskommission: Prof. Dr. Julia Kehr

Datum der Disputation: 06. November 2018

Diese Arbeit entstand in der Zeit von September 2014 bis September 2018 in der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg im Fachbereich Molekulare Phytopathologie unter der Leitung von Prof. Dr. Wilhelm Schäfer. Diese Arbeit wurde gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) in dem Projekt: NEMBO – New Enzymes and Metabolites for Bioeconomy (03A0150B).

Für Ute und Hjalmar Sebastian Brandt

Inhaltsverzeichnis

A	bbildun	gs- und Tabellenverzeichnis
A	OKUrzui	igsverzeichnis
1	Einl	eitung1
	1.1	Das Reich der Pilze und die Abteilung Ascomycota1
	1.2	Vietnam und seine Artenvielfalt
	1.3	Phyto- und humanpathogene Pilze
	1.4	Pilze und deren Enzyme in der Biotechnologie
	1.4.1	Cellulasen
	1.4.2	2 Xylanasen
	1.4.3	3 Chitinasen
	1.4.4	10 Lipasen
	1.5	Die Klassifizierung von Enzymen in CAZyme Familien
	1.5.1	CAZyme in der Biotechnologie
	1.6	Zielsetzung der Arbeit
2	Erg	ebnisse
	21	Charakterisierung der Pilzsammlung 15
	2.1	Isolation der Pilze aus unterschiedlichen Habitaten
	2.1.2	 Phylogenetische Einordnung in das Reich der Pilze
	2.2	Enzymatische Analyse von Isolaten aus der Pilzsammlung
	2.2.1	Qualitativer enzymatischer Aktivitätstest mit der Disc Diffusion Methode 18
	2.2.2	2 Quantitativer Aktivitätstest ausgewählter Pilzisolate in Flüssigmedien
	2.3	Test der Pilzisolate auf ihre antifungale Wirkung gegen phyto- und
		humanpathogene Pilze25
	2.4	Auswahl der drei Pilzisolate für weitere Untersuchungen
	2.5	Das Pilzisolat Fsh102 – Aspergillus sydowii
	2.5.	I Identifizierung der aktiven Cellulasen des Pilzisolates Fsh102 mittels
		Zymogramm und LC/MS-MS
	2.5.2	2 Klonierung der Gene Endo1, Endo2, Exo1 und Exo2 von Fsh102 mit
		und ohne Signalpeptid
	2.5.3	Heterologe Expression von Endo1, Endo2, Exo1 und Exo2 von Fsh102
		im prokaryotischen System E. coli
	2.5.4	Identifizierung aktiver Xylanasen von Fsh102 mittels Zymogramm und
		LC/MS-MS
	2.5.5	5 Klonierung der Xylanase I und Xylanase II von Fsh102 mit und ohne
		Signalpeptid als His6-Tag Fusionsprotein

2.5.6 H	Ieterologe Expression der Xylanase I und der Xylanase II von Fsh102	
iı	m prokaryotischen System E. coli	35
2.5.7 R	Reinigung der heterolog exprimierten Xylanasen I und Xylanase II über	
A	Affinitätschromatographie	36
2.5.7.1	Aktivitätsbestimmung der reinen Xylanase I und Xylanase II	38
2.5.8 C	Charakterisierung der Xylanasen	38
2.5.8.1	Nachweis von Reaktionsprodukten der Xylanase I und Xylanase II	
	mittels Dünnschichtchromatographie	39
2.5.8.2	2 Substratspektrum und Aktivität bei aufsteigenden Xylankonzentration	onen
	der Xylanase I und der Xylanase II	40
2.5.8.3	3 Temperatur- und pH-Wert-Abhängigkeit	41
2.5.8.4	4 Temperaturstabilität	43
2.5.8.5	5 pH-Stabilität	43
2.5.8.0	5 Inhibitionen der Xylanase I und Xylanase II durch Salze und	
	Lösungsmittel	45
2.5.	8.6.1 Inhibitionen der Xylanase I durch Salze und Lösungsmittel	45
2.5.	8.6.2 Inhibitionen der Xylanase II durch Salze und Lösungsmittel	46
2.5.9 N	Autation der active site Aminosäuren	47
2.5.9.1	1 3D-Struktur der Xylanase I und der Xylanase II basierend auf	
	Homologiemodellen	48
2.6 Iden	ntifizierung und Charakterisierung der Pilzisolate FW16.1 und FW57	49
2.6.1 L	De novo Sequenzierung von FW16.1 und FW57	50
2.6.2 A	Aktivitätstest von FW16.1 und FW57 mit verschiedenen Substraten	50
2.6.3	CAZyme Analyse der Pilzisolate FW16.1 und FW57	51
2.6.3.1	CAZyme Analyse des Isolats FW16.1	52
2.6.3.2	2 CAZyme Analyse des Isolats FW57	55
3 Dicknee	ion	57
5 DISKUSSI		
3.1 Die	Pilzsammlung aus Vietnam und deren antifungales Potential	57
3.2 Die	Pilzsammlung aus Vietnam und deren enzymatisches Potential	58
3.2.1 C	Chitinasen in der Pilzsammlung	60
3.2.2	Cellulasen in der Pilzsammlung	61
3.2.3 X	Kylanasen in der Pilzsammlung	62
3.2.4 L	ipasen in der Pilzsammlung	63
3.3 Die	unterschiedlichen Habitate und high performance degrader	64
3.4 Das	Pilzisolat Fsh102 als high producer von Xylanasen und Cellulasen	66
3.4.1 Io	dentifikation zweier Xylanasen aus dem Pilzisolat Fsh102	67
3.4.2 E	Die Charakterisierung der Xylanasen aus A. sydowii auf ihre	
b	iotechnologische Anwendbarkeit	70
3.4.3 Io	dentifizierung der vier Cellulasen aus dem Pilzisolat Fsh102	75
3.5 Enz	zymatische Aktivität des Pilzisolate FW16.1 und FW57 und deren CAZy	yme
Ana	alyse bei Verwendung verschiedener Substrate	77

3.5.1	Enzymaktivität der Pilzisolate FW16.1 und FW57 bei unterschiedlichen	-
	Substraten	78
3.5.2	CAZyme Analyse der Pilzisolate FW16.1 und FW57	79
3.5.	2.1 Die substratspezifische CAZyme Analyse des Pilzisolates FW16.1	
	und deren biotechnologische Anwendung	80
3.5.	2.2 Die substratspezifische CAZyme Analyse des Pilzisolates FW57	
	und deren biotechnologische Anwendung	85
4 Mater	rial und Methoden	89
4.1 N	Aaterial und Hersteller	89
4.1.1	Allgemeine Chemikalien	89
4.1.2	Enzyme	89
4.1.3	Medien und Puffer	89
4.1.4	Synthetische Oligonukleotide	91
4.1.5	Synthetische Gene	94
4.1.6	Kommerzielle Kits	94
4.1.7	Vektoren	94
4.1.8	Sequenzierung	95
4.2 A	Auftragsarbeiten	95
4.2.1	Einlagerung der Pilzsammlung bei der DSMZ Braunschweig	
4.2.2	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie - Kopplung	
4.2.3	Genomsequenzierung	
4.2.4	Erstellung eines phylogenetischen Baumes	96
4.2.5	CAZyme Analyse	96
12 1	Vermandete Organismen	06
4.5	Pilgiaelete der Sommlung aus Vietnem	90
4.3.1	Philippine der Sammung aus vietnam	90
4.3.2	Phyto- und numanpathogene Phze	97
4.5.5	Daktenenstamme	90
4.4 N	Aethoden der Mikrobiologie	98
4.4.1	Isolation der Pilzisolate aus ihren Ursprungshabitaten	98
4.4.2	Anzucht der Pilzisolate	98
4.4.3	Anzucht des Pilzisolates FW57	99
4.4.4	Herstellung von Konidien	99
4.4.5	Dual Culture Methode zum Test auf antifungale Wirkung von Pilzen	
	gegen pflanzenpathogene Pilze	100
4.4.6	Overlay Methode zum Test auf antifungale Wirkung von Pilzen gegen	
	humanpathogene Pilze	100
4.4.7	Plattenbasierter qualitativer Enzymaktivitätstest - Disc Diffusion Methode	. 100
4.4.8	Quantitativer Enzymtest im Flüssigmedium	101
4.4.9	Charakterisierung der Xylanasen	103
4.4.10	Bestimmung der Proteinkonzentration	103

4.:	5 1	Methoden der Molekularbiologie	
	4.5.1	Isolation genomischer DNA	
	4.5.2	Isolation der RNA	
	4.5.3	cDNA - Synthese	
	4.5.4	Isolation der Plasmid DNA aus E. coli	
	4.5.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	
	4.5.6	Zielgerichtete Mutagenese	
	4.5.7	Transformation von Plasmiden in E. coli	
4.	6 I	Biochemische Methoden	
	4.6.1	Gelelektrophorese	
	4.6.2	Photometrische Quantifizierung von DNA / RNA	
	4.6.3	Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE	
	4.6.4	Proteinfärbung im SDS-PAGE Gel mit Coomassie Brilliant Blue .	110
	4.6.5	Zymogramm	111
	4.6.6	Expression der Proteine	
	4.6.7	Aufreinigung von Proteinen über Affinitätschromatographie	113
	4.6.8	Immunologischer Nachweis von Proteinen im Western-Blot	
	4.6.9	Dünnschichtchromatographie	
4.'	7]	Bioinformatische Methoden	115
	4.7.1	ITS Sequenzierung der Pilzsammlung	115
	4.7.2	Datenbanken	116
	4.7.3	BLAST Ring Image Generator (BRIG)	116
	4.7.4	Homologiemodelle	116
	4.7.5	Bioinformatische Programme	116
5	Zusa	mmenfassung	
6	Absti	ract	
7	Liter	aturverzeichnis	
8	Anha	ng	XII
Danl	csagui	ng	XLIV
Eide	sstattl	iche Erklärung	XLVI

Abbildungen

Abbildung 1: Aufbau der Cellulose Mikrofibrille mit kristallinen und amorphen
Regionen7
Abbildung 2: Zusammengeklappter phylogenetischer Baum nach Bestimmen der
ITS-Sequenzen17
Abbildung 3: Beispiele der Disc Diffusion Methode zur Bestimmung der
Enzymaktivität19
Abbildung 4: Spinnendiagramm zur Darstellung der Enzymaktivitäten basierend auf
der Disc Diffusion Methode in Korrelation mit den unterschiedlichen Habitaten 20
Abbildung 5: Venn-Diagramm der Enzymaktivitäten
Abbildung 6: Farbliche Darstellung der Enzymaktivitäten aus dem quantitativen
Enzymaktivitätstest in Korrelation mit dem phylogenetischen Baum24
Abbildung 7: Test auf die antifungale Wirkung des Pilzisolates SF32 gegen die
pflanzenpathogenen Pilze F. oxysporum, B. sorokiniana, S. nodorum und M. oryzae
mittels der Dual Culture Methode und gegen den humanpathogenen Pilz
C. albincans mittels der Overlay Methode
Abbildung 8: Phänotyp von drei Pilzisolaten, die für die weitere Charakterisierung
ausgewählt wurden
Abbildung 9: Zymogramm der Cellulaseaktivität
Abbildung 10: Expression der Endo- und Exocellulasen ohne Signalpeptid in E. coli
BL21 und Detektion über Western-Blot
Abbildung 11: Zymogramm der Xylanaseaktivität
Abbildung 12: Elektrophoretische Auftrennung der Expression von Xylanase I und
Xylanase II in E. coli BL21 in der löslichen Fraktion und unlöslichen Fraktion36
Abbildung 13: Elektrophoretische Auftrennung verschiedener Proteinfraktionen mit den
heterolog exprimierten Xylanase I und Xylanase II
Abbildung 14: Dünnschichtchromatographie der Reaktionsprodukte von der Xylanase I
und der Xylanase II auf einer Silicagel Platte
Abbildung 15: Das Substratspektrum und die Aktivität bei aufsteigenden
Xylankonzentration der Xylanase I und der Xylanase II41
Abbildung 16: Temperaturabhängigkeit und Pufferabhängigkeit der Xylanase I und der
Xylanase II

Abbildung 17: Temperaturstabilität von Xylanase I und Xylanase II und Pufferstabilität
von Xylanase I und Xylanase II bei einem pH-Wert von 4,8 und einem pH-Wert
von 9
Abbildung 18: Aktivitätstest der Xylanase I und der Xylanase II in Anwesenheit von
Salzen und Lösungsmitteln46
Abbildung 19: Spezifische Aktivität der Einzel- und Doppelmutanten der Xylanase I
und der Xylanase II
Abbildung 20: Homologiemodelle der Xylanase I und der Xylanase II mit Vergrößerung
des aktiven Zentrum
Abbildung 21: Spezifische Aktivität von FW16.1 und FW57 induziert mit
unterschiedlichen Substraten51
Abbildung 22: CAZyme Analyse des Pilzisolates FW16.1 abgebildet auf die neun
Scaffolds des Genoms von FW16.154
Abbildung 23: CAZyme Analyse des Pilzisolates FW57 abgebildet auf die sechs
Scaffolds des Genoms von FW5756
Abbildung 24: Genregion ITS 1 und Genregion ITS 2 116
Abbildung 25: Phylogenetischer Baum der ITS Sequenzen der Pilzsammlung XIII
Abbildung 26: Phylogenetischer Baum der ITS Sequenzen der Gattungen Aspergillus,
Penicillium und TalaromycesXV
Abbildung 27: Test auf antifungale Wirkung der Pilzsammlung gegen die
phytopathogenen Pilze F. oxysporum und F. oxysporum f. sp. cubense mittels
Dual Culture MethodeXXIII
Abbildung 28: Test auf antifungale Wirkung der Pilzsammlung gegen die
phytopathogenen Pilze M. oryzae und B. sorokiniana mittels Dual Culture
MethodeXXIV
Abbildung 29: Test auf antifungale Wirkung der Pilzsammlung gegen die
phytopathogenen Pilze S. nodorum und C. heterostrophus mittels
Dual Culture Methode XXV
Abbildung 30: Verifizierung der Xylanase I und der Xylanase II mittels
Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-KopplungXXXVII

Tabellen

Tabelle 1: Die Anzahl von Pilzisolaten geordnet nach Habitaten 16
Tabelle 2: Spezifische Enzymaktivitäten in U/mg der gemessenen Isolate auf die
Enzyme Cellulase, Chitinase, Xylanase und Lipase21
Tabelle 3: Pilzisolate der Pilzsammlung mit antifungaler Wirkung gegen verschiedene
phytopathogene Pilze (F. oxysporum, F. oxysporum f. sp. cubense, M. oryzae,
B. sorokiniana, S. nodorum, C. heterostrophus) und gegen den humanpathogenen
Pilz C. albicans
Tabelle 4: Die über ein Zymogramm und LC/MS-MS identifizierten Cellulasen im
Genom von A. sydowii
Tabelle 5: Klonierte Konstrukte aus Vektor pET28b und den Genen Endo2, Exo1 und
Exo2 mit Signalpeptid (+SP) und ohne Signalpeptid (-SP) mit den jeweilig
verwendeten Primern
Tabelle 6: Die über ein Zymogramm und LC/MS-MS identifizierten Xylanasen im
Genom von A. sydowii
Tabelle 7: Spezifische Aktivität der Reinigung der Xylanase I und der Xylanase II
über eine Affinitätschromatographie
Tabelle 8: CAZyme Analyse der Genome der Pilzisolate FW16.1 und FW5752
Tabelle 9: Bestimmung der ITS Sequenz der gesamten Pilzsammlung
Tabelle 10: Überprüfung des Einbaus von Fragmenten in den Vektor pET28b91
Tabelle 11: Oligonukleotide zur Klonierung von Xylanasen aus dem Pilzisolat Fsh102 91
Tabelle 12: Oligonukleotide zur Klonierung von Cellulasen aus dem Pilzisolat Fsh102 93
Tabelle 13: Kommerzielle Kits94
Tabelle 14: Verwendete Plasmide zur Klonierung und Expression in Escherichia coli95
Tabelle 15: Geographische Koordinaten und die Daten der Sammlung der
Pilzkollektion97
Tabelle 16: Die verwendeten phyto- und humanpathogenen Pilze für die Inhibitionstests
und ihre Wirtspflanzen97
Tabelle 17: Verwendete Escherichia coli Stämme, ihre Genotypen und deren
Bezugsquelle
Tabelle 18: Medien zur Testung von Enzymaktivitäten
Tabelle 19: Lösungen von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE

Tabelle 20: Die Pilzisolate mit zugehörigen DSMZ ID Nummern und die Genbank
NummernXVI
Tabelle 21: Die getesteten Pilzisolate auf die Enzymaktivitäten der Cellulase,
Xylanase, Lipase und Chitinase mittels des quantitativen Aktivitätstests im
FlüssigmediumXXI
Tabelle 22: Enzyme des Pilzisolates Fsh102 induziert mit CMC XXVI
Tabelle 23: Enzyme des Pilzisolates Fsh102 induziert mit Xylan
Tabelle 24: Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit untersuchten Gene der
Cellulasen und XylanasenXXXV
Tabelle 25: Proteingehalt, Volumen und Enzymaktivität der Reinigung von
Xylanase I mittels AffinitätschromatographieXXXVIII
Tabelle 26: Proteingehalt, Volumen und Enzymaktivität der Reinigung von
Xylanase II mittels Affinitätschromatographie.
Tabelle 27: CAZyme Analyse der Pilzisolate FW16.1 (F. solani) und
FW57 (H. fuscoatra)XXXIX

Abkürzungsverzeichnis

AA	Auxiliary Activities (Oxidoreduktase)
AAs	Amino acids (Aminosäuren)
ATG	Kodon für Methionin
A. sydowii	Aspergillus sydowii
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
B. sorokiniana	Bipolaris sorokiniana
BRIG	Blast Ring Image Generator
C. albicans	Candida albicans
CAZyme	Carbohydrate Active Enzymes (Kohlenhydrat aktive Enzyme)
CBM	Carbohydrate Binding Module (Kohlenhydrat bindendes Modul)
cDNA	Complementary (komplementäre) DNA
CE	Carbohydrate Esterase (Kohlenhydrat Esterase)
CMC	Carboxylmethylcellulose
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNS	3,5-Dinitrosalicylsäure
E. coli	Escherichia coli
EC-Nummern	Enzyme Commission Numbers
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FC	Krabbenschalen
FF	Früchte
F. graminearum	Fusarium graminearum
FH	Heiße Quellen
Fi	Insektenkörper
FL	Ölhaltiges Habitat
F. oxysporum	Fusarium oxysporum
F. oxysporum f. sp. cubense	Fusarium oxysporum forma specialis cubense
FR	Reisstroh
Fsh	Garnelenschalen
F. solani	Fusarium solani

FW	Mangrovenwald
GAA	Kodon für Glutaminsäure
GH	Glycoside Hydrolase (Glykosidhydrolase)
gDNA	Genomische Desoxyribonukleinsäure
GT	Glycosyltransferase (Glykosyltransferasen)
H ₂ O	Doppeldestilliertes Wasser
His ₆ -Tag	N-terminaler Polyhistidin-Tag (6xHis)
H. fuscoatra	Humicola fuscoatra
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITS	Internal transcribed spacer
kDa	Kilodalton
LB	Lysogeny Broth
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LF	Lösliche Fraktion
LMPO	Lytic Polysaccharide Monooxygenases
М	Molar
mbp	Mega Basenpaare
MM	Mandels Medium Agar
M. oryzae	Magnaporthe oryzae
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
nrLSU	Large subunit (ribosomale DNA)
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PDA	Potato Dextrose Agar (Kartoffelextrakt-Dextrose-Agar)
PDB	Protein Data Base
PL	Polysaccharide Lyases (Polysaccharid Lyasen)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
p-NPP	para-Nitrophenylpalmitat
Primer	Oligonukleotide
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
Scaffold	Chromosomenskelett, Chromatingerüst

SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	$Natrium dode cylsulf at {\-Polya crylamid-Gelelekrophorese}$
SF	Bodenoberfläche
SOC	Super Optimal Broth with Catabolic Repression
SmF	Submerged fermentation (Submersfermentation)
S. nodorum	Sorokiniana nodorum
Sp.	Species (Art)
SSF	Solid-state fermentation (Festphasenfermentation)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Units
UF	Unlösliche Fraktion
v/v	Volumen pro Volumen
v/w	Volumen pro Gewicht
YPD	Yeast Peptone Dextrose (Hefeextrakt-Pepton-Dextrose)

1 Einleitung

1.1 Das Reich der Pilze und die Abteilung Ascomycota

Pilze weisen eine große Biodiversität mit unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften und Habitaten auf. Von aquatischen Einzellern, den Töpfchenpilzen (Chytridiomycota), bis hin zum größten Organismus der Welt, *Armillaria* sp. [Ferguson et al. 2003], findet man bei Pilzen alle morphologischen Unterschiede. Insgesamt schätzt man die Anzahl verschiedener Arten auf ca. 5.1 Millionen, von denen nur bis zu 5% klassifiziert und beschrieben wurden [Blackwell 2011; Mueller und Bills 2004]. Pilze und im Speziellen die filamentösen Pilze gelten im ökologischen Stoffkreislauf als wichtig Destruenten von organischem Material. Neben ihrer zersetzenden Fähigkeit von totem organischem Material, sind sie die Nahrungsquelle vieler Insekten, Schnecken und Kleinsäuger.

Pilze sind in vielen Habitaten verbreitet, sie kommen in unterschiedlichen Ökosystemen, wie Bodenreich, auf abgestorbenen Baumresten, in salzhaltigen Gewässern dem [Hyde et al. 1998; Pang et al. 2011; Shearer et al. 2007], im Süßwasser [Wong et al. 1998; Goh und Hyde 1996], auf Pflanzen und Tieren [Gomez-Polo et al. 2017; Mcmullen et al. 1997; Saikkonen et al. 2004], bis hin zur Luft [Bauer et al. 2008; Elbert et al. 2007; Fröhlich-Nowoisky et al. 2009] vor. Das Reich der Pilze beinhaltet Saprovoren, Pilze die sich von totem organischem Material ernähren, Phyto- und Humanpathogene, wie Fusarium graminearum [McMullen et al. 1997] und Candida albicans, sowie Parasiten und Symbionten [Harley und Smith 1983]. Während pilzliche Parasiten ihren Wirt am Leben lassen, sind phytopathogene Pilze dazu fähig, ihren Wirt zu töten und richten damit großen wirtschaftlichen Schaden [Goswami und Kistler 2004]. Saprophyten bilden die größte Gruppe im Reich der Pilze und befinden sich hauptsächlich an und in der Bodenoberfläche. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Biotransformation und dem Abbau von Biomasse durch die Sekretion von extrazellulären Enzymen wie Cellulasen, spielen sie eine wichtige Rolle im Ökosystem [Knežević et al. 2013; Sigoillot et al. 2012].

Das Reich der Pilze ist untergliedert in sieben Phyla (Stämme): die *Ascomycota* bilden das größte Phylum mit ca. 64000 Arten. Die weiteren Phyla untergliedern sich in die *Basidiomycota* mit ca. 32500 Arten, die *Glomeromycetes*, die *Microsporidia*, die *Neocallimastigomycota*, die *Blastocladiomycete* und die *Chytridiomycota* [Moore et al. 2011]. *Ascomycota* und *Basidiomycota* werden zusammenfasst zu dem

Unterreich *Dikarya* und kommen in vielen Lebensräumen und Ökosystemen vor [Hibbett et al. 2007; James et al. 2006]. Das Unterreich *Dikarya* zeichnet sich durch die Fähigkeit der Ausbildung einer dikaryotischen Hyphe aus. Die sexuelle Entwicklung der *Ascomycota* findet im Ascus statt, wo sie Ascosporen bilden im Gegensatz zu den *Basidiomycota*, die als Sporangium Basidien (Ständer) zur Differenzierung der Basidiosporen ausbilden. Innerhalb der *Ascomycota* gibt es die Unterabteilung der *Pezizomycota* und die beinhaltet die bisher am meisten untersuchten Taxa wie *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* und *Cladosporium* [Alexopoulos et al. 1996; Kirk et al. 2008; Moretti 2009; Spatafora et al. 2006]. Sie gelten als gute Zersetzer von organischem Material und sind für die Biotechnologie von großem Interesse. Sie werden u.a. für die Produktion von Pharmazeutika und anderen Chemikalien sowie zur Anwendung in der Nahrung- und Futterindustrie genutzt [Chambergo und Valencia 2016; Singh et al. 2016; Ward et al. 2005]. Die *Ascomycota* sind weltweit verbreitet und kommen je nach Habitat in unterschiedlicher Diversität vor [Hawksworth 1991; Schweigkofler 2006].

1.2 Vietnam und seine Artenvielfalt

Ascomycota haben ein großes Potential im Hinblick auf deren inhibitorische Wirkung gegen Phyto- und Humanpathogene und deren Produktion von Biomasse abbauenden Enzymen. Aufgrund dessen ist die Suche nach neuen Pilzisolaten von Interesse für die Bioökonomie. Um eine breit gefächerte Auswahl an Pilzisolaten der verschiedensten Gattungen zu finden, bieten vor allem die tropischen und subtropischen Länder, aufgrund der verschiedenen Ökosysteme und der großen Artenvielfalt eine gute Möglichkeit, um unerforschte Pilzspezies zu identifizieren. Das tropische Land Vietnam ist eins der 25 Länder, die weltweit die meiste Biomasse produzieren [Collen et al. 2014]. Es besitzt zahlreiche unterschiedliche Ökosysteme vom Tropischen Regenwald über Wattlandschaft bis hin zu Dünen, Höhlenökosystemen und Salzwasserseeökosystemen. Man schätzt die Zahl der Arten von terrestrischen vaskulären Pflanzen, Pilzen und Seegras auf ca. 16.500, wobei davon etwa 30% endemisch sind [Ministry of Natural Resources and Environment 2011]. Im Gegensatz zu den gemäßigten Breiten bietet Vietnam somit eine diversere Artenvielfalt [Blackburn und Gaston 1996; Gaston 2000]. Die Diversität der Pilze in Vietnam gilt als weitgehend unerforscht. Jedoch weiß man, dass 10% der Pflanzen sowie 180 Vertebraten als endemisch gelten, so dass es auch eine hohe Anzahl endemischer Pilzspezies geben könnte [De Queiroz et al. 2013]. Aufgrund der hohen Diversität von Pilzen ist zu vermuten,

dass eine Pilzsammlung aus diesen tropischen Breiten ein großes bioökonomisches Potential aufweist.

1.3 Phyto- und humanpathogene Pilze

Phyto- und humanpathogene Pilze sorgen weltweit für große Ernteeinbußen und ausgeprägte Krankheitsbilder beim Menschen. Die Suche nach neuen Wirkstoffen mit antifungaler Wirkung hat für die Agrarwirtschaft und die Humanmedizin besondere Wichtigkeit. Phytopathogene Pilze befallen weltweit viele verschiedene Pflanzenarten und erzeugen somit einen erheblichen wirtschaftlichen Schaden. Fusarium graminearum, der Haupterreger der Ährenbleiche beim Weizen (Triticum aestivum) und bei der Gerste (Hordeum vulgare) sowie der Kolbenfäule beim Mais (Zea mays), ist ein Beispiel für die Dringlichkeit der Suche nach neuen wirkungsvollen Fungiziden [Goswami und Kistler 2004; Mcmullen et al. 1997]. Weitere phytopathogene Pilze, die Getreide befallen und zu großen Ernteeinbußen führen, sind die Phytopathogene Fusarium oxysporum, Erreger der Fusarium-Welke bei vielen verschiedenen Wirtspflanzen, Bipolaris sorokiniana, Erreger des common root rot beim Weizen (Triticum aestivum), Stagonospora nodorum, Erreger der Blatt- und Spelzenbräune des Weizens (Triticum aestivum) und Cochliobolus heterostrophus, Erreger des southern leaf blight beim Mais (Zea mays). Gerade Vietnam als tropisches Land, dessen Landwirtschaft zu großen Teilen aus dem Anbau von Reis (Oryza sativa) [Sarnklong et al. 2010] und verschiedenen Bananensorten (Musa spp.) besteht, hat mit phytopathogenen Pilzen zu kämpfen [Food and Agriculture Organization of the United Nations 2007; Hanson 1963]. In Vietnam sind vor allem Fusarium oxysporum f. sp. cubense, Haupterreger der Panamakrankheit verschiedener Bananenpflanzen (Musa spp.), und Magnaporthe oryzae, Haupterreger des blast disease des Reises (Oryza sativa), verbreitet [Le et al. 2010; Mostert et al. 2017]. Einige Pilze wurden schon als Produzenten von Metaboliten, die als Fungizid eingesetzt werden können, beschrieben. Das bekannteste Beispiel dafür ist das Strobilurin, isoliert aus der Gattung der Strobilurus, welches bis heute in vielen kommerziellen Fungiziden verwendet wird [Anke et al. 1977; Generaldirektion Gesundheit und Lebensmittelsicherheit der Europäischen Kommission 2016]. Strobilurin hemmt die Zellatmung beim Pilz, indem es den Elektronentransport in der mitochondrialen Atmungskette unterbricht [Becker et al. 1981]. Das natürlich isolierte Strobilurin wurde in den letzten Jahren weiterentwickelt und verbessert, um natürliche Resistenzen, die sich durch den Gebrauch von Ein-Wirkstoff-Fungiziden entwickelt haben, zu umgehen [Ishii et al. 2001]. Dennoch ist die Suche nach effektiveren und wirkungsstärkeren Fungiziden ein großes Forschungsfeld und von großem bioökonomischen Interesse.

Neben den phytopathogenen Pilzen ist die Suche nach neuen Wirkstoffen gegen humanpathogene Pilze ein großer Schwerpunkt der Forschung. Candida albicans, der Haupterreger der Candidose, zählt zu den Hefepilzen und kommt durch seine optimale Wachstumstemperatur bei 37°C oft beim Menschen vor. Er gilt als der meist verbreitete Erreger bei Pilzinfektionen beim Menschen [Richards et al. 2000]. Er verursacht sowohl bei gesunden sowie bei immunsupprimierten Menschen Infektionen im Genitalbereich und Magen-Darm-Trakt als systemische Candidose tödlich und kann sein [Achkar und Fries 2010; Brown et al. 2012; Kumamoto 2011; Mayer 2013]. Obwohl es durch die intensive Forschung der letzten Jahre viele Medikamente zur Bekämpfung von C. albicans gibt, ist die Suche nach neuen effizienteren Wirkstoffen ein großer Forschungsschwerpunkt und von großem Interesse für die Humanmedizin. Pilze als potenzielle Produzenten von antifungalen Wirkstoffen rücken dabei in den Fokus und können ein großes Potential bieten.

1.4 Pilze und deren Enzyme in der Biotechnologie

Neben dem Interesse, Pilze zu finden, die phyto- und humanpathogene Pilze inhibieren, werden Pilze in vielen Bereichen der modernen Biotechnologie verwendet, um teure und chemische industrielle Prozesse zu beschleunigen und kostengünstiger zu gestalten [Chambergo und Valencia 2016; Kirk et al. 2008]. Pilze, als exzellente Destruenten, produzieren eine Vielzahl von Enzymen, die für biotechnologische Prozesse eingesetzt werden können. Durch ihre Fähigkeit bei hohen Temperaturen und extremen pH-Werten zu wachsen sind deren produzierten Enzyme von besonderem Interesse. Gerade im Bereich der Produktion von erneuerbarer Energie kommen sie vielseitig zum Einsatz. Lignocellulytische Biomasse ist die reichste erneuerbare Energiequelle mit einer geschätzten jährlichen Produktion von 10-50 Billionen Tonnen [Claassen et al. 1999; Kim et al. 2002]. Sie besteht im Wesentlichen aus drei verschiedenen Polymeren, Cellulose, Hemicellulose und Lignin [Lee 1997]. Diese komplexe Biomasse kann für unterschiedliche Prozesse eingesetzt werden, um aus ihr Energie zu gewinnen. Ein großes Anwendungsgebiet ist die Produktion des Second Generation Bioethanol [Gamage et al. 2010], wobei Abfallprodukte des Getreides, wie Stängel, Hülsen und andere nicht nahrungstechnisch relevanten Getreidebestandteile, verwendet werden. Lignocellulytische Biomasse wird verwendet, um

Einleitung

das Problem der Konkurrenz zur Nahrungs- und Futterindustrie, die bei dem First Generation Bioethanol entstand, zu umgehen. Bei dem Gebrauch von lignocellulytischer Biomasse müssen die verwertbaren Zucker allerdings vorher durch eine Vorbehandlung (pre-treatment) aus der Biomasse gelöst werden [Alvira et al. 2010]. Dies geschieht am effizientesten mit unterschiedlichen hydrolytischen Enzymen, produziert von Pilzen und Bakterien. Die energieeffiziente Hydrolyse von Biomasse in ihre einzelnen Bestandteile, den Monosacchariden ist aufgrund des komplexen Aufbaus der Pflanzenzellwand weiterhin eine Herausforderung für die Biotechnologie [Buckeridge und de Souza 2014; Gupta et al. 2016]. Die kostenintensive Depolymerisation der Cellulose und dem weiteren Abbau von Hemicellulose in seine Monosaccharide ist eine biotechnologische Herausforderung [Gupta et al. 2016; Kubicek und Kubicek 2016; Payne et al. 2015]. Dabei ist die Auswahl von hydrolytischen Enzymen die synergistisch die Biomasse abbauen, von großer Bedeutung [Payne et al. 2015]. Die Pflanzenzellwand besteht neben Strukturproteinen und Lignin, aus einer verzweigten Mixtur aus Cellulose, Pektin und Hemicellulose [Buckeridge 2010; Heredia et al. 1995; Kooiman 1961; Tiné et al. 2006]. Durch die Interaktion und die chemische Organisation von Cellulose und Hemicellulose mit Lignin und weiteren monomerischen Bestandteilen ist die Zersetzung der Pflanzenzellwand erschwert [Tavares und Buckeridge 2015]. Trichoderma ressei ist in der Biotechnologie der bekannteste und am meisten erforschte Ascomycet der letzten Jahre und wird aufgrund seiner nützlichen Enzymaktivitäten von Cellulasen und Xylanasen industriell eingesetzt [Nevalainen et al. 1994]. Penicillium verruculosum und Myceliophthora thermophila wurden ebenso als hervorragende Produzenden von Cellulase und Hemicellulase beschrieben [Gusakov 2011]. Um Pilze und deren Enzyme sowie Metabolite industriell zu produzieren wurden verschiedene Verfahren entwickelt. Die Produktion von Enzymen kann im Festmedium mit der Festphasenfermentation (solid-state fermantation, SSF) [Pandey 1992; Pandey et al. 2000] oder im Flüssigmedium mit der Submersfermentation (sub-merged fermentation, SmF) [Acuña-Argüelles et al. 1995; Crestini et al. 1996; Vidyalakshmi et al. 2009] erfolgen.

Pilze produzieren, neben Enzymen, die die lignocellulytische Biomasse abbauenden, weitere Enzyme, die für die Biotechnologie von Interesse sind. Beispielsweise werden in asiatischen Ländern werden neben Atomkraft, Erdöl und Kohle hauptsächlich Chitin und Makroalgen zur Energiegewinnung genutzt. Der Anteil des Abfallprodukts Chitin in Schalentieren beträgt ca. 75% des Gesamtgewichts von Schalentieren. Dessen enzymatischer Abbau zur Energiegewinnung ist daher von wirtschaftlichem Interesse [Wang und Chang 1997]. Das

gilt gerade für Ländern mit breitem Küstengebiet und der damit verbundenen hohen Produktion an Schalentieren, ist das energetisch verwertbare Abfallprodukt von Interesse. Das Spektrum der Anwendung von Chitin, Chitosan und deren weiteren Bestandteilen reicht von der Kosmetikindustrie über die Medizin bis hin zur Nahrungsmittelindustrie [Aam et al. 2010; Agulló et al. 2003; Kuk et al. 2005; Manigandan et al. 2018; Shen et al. 2009]. Pilze wurden bereits beschrieben als gute Produzenten von Chitinasen [Cruz et al. 1992; Duo-Chuan 2006; Seidl 2008].

Pilze produzieren, neben den Biomasse abbauenden Enzymen, auch andere für die Biotechnologie interessante Enzyme. Lipasen, die für die Katalyse von Triacylglycerol zu Glycerol und Fettsäuren genutzt werden, sind bekannt als die führenden Biokatalysatoren in verschiedensten Verfahren der Industrie [Ray 2015]. Die meisten industriell genutzten Lipasen stammen aus Pilzen [Houde et al. 2004]. Diese werden vor allem in der Nahrungsmittelindustrie, bei der Produktion von Chemikalien sowie in Detergenzien eingesetzt [Aaslyng et al. 2007; Houde et al. 2004;]. Pilzliche Lipasen sind aufgrund ihrer Substratspezifität, ihrer Stabilität bei extremen Temperaturen, pH-Werten und organischen Lösungsmittel von großem Interesse in der Biotechnologie [Liese 2001]. Aufgrund der biotechnologischen Anwendbarkeit von Cellulasen, Xylanasen, Chitinasen und Lipasen werden deren Eigenschaften und spezifischen Anwendungsgebiete in den folgenden Absätzen weiter erläutert.

1.4.1 Cellulasen

Cellulose ist das weltweit häufigste Biopolymer und Hauptbestandteil der Pflanzenzellwand. Sie setzt sich aus mehreren Glukose-Molekülen zusammen, welche durch eine β -1,4-glycosylische Verbindung verknüpft sind. Diese Celluloseketten sind weiter zu Cellulose Mikrofibrillen gebunden. Innerhalb dieser Mikrofibrillen gibt es kristalline nicht lösliche Bereich und amorphe lösliche Bereiche (Abbildung 1). Mikrokristalline Cellulose ist nicht wasserlöslich und kann in der Nahrungsmittelindustrie als Bindemittel eingesetzt werden [Nsor-Atindana et al. 2017]. Nicht kristalline Cellulose wird unter anderem in der Pharmaindustrie eingesetzt, um Tabletten herzustellen [Pawar et al. 2018]. Der Cellulosegehalt in organischem Material unterscheidet sich je nach Pflanzenart. Während der Cellulosegehalt in Bäumen bei ca. 80-90% liegt, haben Tomatenblätter einen Gehalt von nur knapp 10% [Suhas et al. 2016]. Cellulasen spalten die Cellulose hydrolytisch in die einzelnen Glukose-Moleküle und bauen so die Zellwand von Pflanzen ab. Die Cellulasen sind in drei Gruppen unterteilt, welche miteinander bei dem Abbau der Pflanzenzellwand agieren [Henrissat 1994; Lynd et al. 2002; Zhang et al. 2006]. Die Endo-(1,4)- β -D-Glucanasen (EC 3.2.1.4), auch Endocellulase genannt, spaltet die Cellulose an der β -1,4-glycosylischen Verknüpfung in unterschiedlich lange Polysaccharidketten. Die Exo-(1,4)- β -D-Glucanasen (EC 3.2.1.91), auch Exocellulase oder Cellobiohydrolase genannt, spaltet am reduzierten oder nicht reduzierten Ende der Polysaccharidketten die Cellulose in β -Cellobiose. Die Exocellulase ist außerdem in der Lage, die kristalline Struktur von mikrokristalliner Cellulose abzubauen [Teeri 1997]. Die β -Glucosidase (EC 3.2.1.21) spaltet die Disaccharide β-Cellobiose in Glukose. Cellulasen kommen in breit gefächerten Sparten der Industrie zum Einsatz.



Abbildung 1: Aufbau der Cellulose Mikrofibrille mit kristallinen und amorphen Regionen. Die Abbildung wurde modifiziert von Béguin und Aubert [1994].

In der Papier- und Zellstoffindustrie werden Cellulasen zum biomechanischen Aufschluss von pflanzlichem Rohmaterial verwendet, um im Gegensatz zur rein mechanischen Verarbeitung Energie zu sparen [Kuhad et al. 2011; Bhat 2000]. In der Textilindustrie werden Cellulasen unter anderem dazu benötigt, um biostoning bei Jeans durchzuführen. Die Cellulasen brechen dabei beim Waschvorgang die Enden der Baumwollfaser auf und verleihen somit der Jeans die verwaschene Farbe [Kuhad et al. 2011; Belghith et al. 2001]. Am Bekanntesten ist die Anwendung von Cellulasen in der Produktion von Bioethanol. Dabei werden Cellulasen vor allem zur Vorbehandlung des lignocellulytischen Materials und zur Biokonversion zu kleineren Zuckern verwendet [Alvira et al. 2010; Saravanakumar und Kathiresan 2014; Hendriks und Zeeman 2009]. Um den Produktionsvorgang kostengünstiger und effizienter zu gestalten, werden bereits leistungsstarke thermophile Cellulasen mit Protein-Engineering mutiert [Bommarius et al. 2014]. Weitere Anwendungsbereiche der Cellulasen sind die Wein- und Brauereiindustrie [Chakraborty et al. 2016], die Nahrungsmittel- und Futterindustrie [De Carvalho et al. 2008; Dhiman et al. 2002], die Agrarindustrie [Bhat 2000], Oliven- und Carotinoid-Extraktion [Cinar 2005; Ranalli et al. 2003] sowie die Waschmittelindustrie [Kirk et al. 2002; Kuhad et al. 2011]. Cellulasen werden dabei nicht immer alleinig

eingesetzt, im Hinblick auf den Abbau der Pflanzenzellwand oder der komplexen Biomasse sind weitere Enzyme wie verschiedene Hemicellulasen, wie die beispielsweise Xylanasen, notwendig.

1.4.2 Xylanasen

Xylan, das Substrat der Xylanasen (EC 3.2.1.8), ist neben der Cellulose ein weit verbreitetes Polysaccharid. Xylan, bestehend aus D-Xylose-Ketten und verknüpft durch β-1,4-glykosidische Bindungen, bilden den höchsten Bestandteil der Hemicellulose. Hemicellulose besteht aus einem strukturellen Komplex verschiedener Kohlenhydrate wie Glucomannan, Galactoglucomannan Xylan, Xyloglucan, und Arabinogalactan [Timell 1965; Shallom und Shoham 2003]. Zusammen mit Cellulose (1,4-β-Glucan) und Lignin bilden diese drei Bestandteile die komplexe Struktur der Pflanzenzellwand. Je nach Ursprung des Xylans ist die Verzeigung des β-D-Xylopyranose Rückgrats verschieden und daher in vier Subkategorien unterteilt: Homoxylan, Arabinoxylan, Glucoronxylan und Arabinoglucoronxylan [Ebringerová und Heinze 2000; Gírio et al. 2010; Gröndahl et al. 2003; Hilpmann et al. 2016; Naidu et al. 2018; Niño-Medina et al. 2010; Zhang et al. 2014]. Die Struktur des Xylans ist demnach je nach Pflanzenart unterschiedlich.

Für den kompletten Abbau von Xylan sind viele Enzyme wichtig: Endo-1,4-β-Xylanasen (EC 3.2.1.8), β-D-Xylosidasen (EC 3.2.1.37), α-L-Arabinofuranosidasen (EC 3.2.1.55), (EC 3.4.1.139) α-Glucuronidasen Acetylxylan-Esterasen (EC 3.1.1.72 und Ferulasäure-Esterasen (EC 3.1.1.73). Die Endo-1,4-β-Xylanase (EC 3.2.1.8) hydrolysiert das Xylanrückgrat zu kleineren Xylooligosacchariden. Der nächste Schritt des Abbaus ist die Spaltung der kleineren Oligosaccharide zu β-D-Xylose durch das Enzym β-D-Xylosidase (EC 3.2.1.37). Erst nachdem die Endo-1,4- β -Xylanasen (EC 3.2.1.8) und die β -D-Xylosidase (EC 3.2.1.37) das Xylan abgebaut haben, können andere lignocellulytische Enzyme wie Lignin-Peroxidasen (EC 1.11.1.14), Mangan-Peroxidasen (EC 1.11.1.13) und Laccasen (EC 1.10.3.2) anfangen, das Pflanzenmaterial abzubauen [Chandra et al. 2007]. Endo-1,4-β-Xylanasen sind für die Biotechnologie von großer Bedeutung. Aufgrund ihrer Eigenschaft langkettige Hemicellulose in kurzkettige Polymere zu spalten und so organisches Material abzubauen, finden sie, neben der Bioethanolproduktion, in allen Bereichen der Biotechnologie Anwendung [Beg et al. 2001]. In der Zellstoff- und Papierindustrie werden Xylanasen eingesetzt, um den Zellstoffe zu bleichen und so die chemische Vorbehandlung des Papieres zu reduzieren [Walia et al. 2017]. In der Nahrungsmittel- und Futterindustrie werden Xylanasen eingesetzt, um das Volumen der

Einleitung

Backwaren zu erhöhen [Sultan et al. 2008] und Fruchtsäfte aufzuhellen [Nagar et al. 2012]. Xylanasen sowie Cellulasen werden für den Abbau von Biomasse sowie von organischem Abfall benötigt. Ein weiteres für den Abbau von organischem Abfall interessantes Enzym ist die Chitinase.

1.4.3 Chitinasen

Chitin ist neben der Cellulose und des Xylans eines der weit verbreiteten Polysaccharide in Es der Natur. setzt sich aus unverzweigten Homopolymeren der 1,4-B-N-Acetyl-D-Glucosamine zusammen [Muzzarelli 1977]. Chitin gilt als einer der wichtigsten nachwachsenden Rohstoffe unserer Zeit. Es ist Hauptbestandteil des Exoskeletts von Krustentieren, hauptsächlich Garnelen und Krabben, Insekten und anderen Tieren wie Würmern und Arthropoden, Bakterien sowie der pilzlichen Zellwand [Duo-Chuan 2006; Zargar et al. 2015]. Chitin und das deacetylierte Chitosan haben ein breit gefächertes in Anwendungsgebiet und kommen der Biotechnologie, Landwirtschaft und Nahrungsmittelindustrie zum Einsatz [Aider 2010; Ondruschka et al. 2008]. Chitin kommt als α -Chitin oder als β -Chitin in der Natur vor. Während α -Chitin aus dem Exoskelett von Krebstieren (Crustacea), hauptsächlich aus Garnelen- und Krabbenschalen und Insekten wird. kann das β-Chitin aus Tintenfischen extrahiert isoliert werden [Campana-Filho al. 2007; Kumirska et al. 2010]. Chitinasen (EC 3.2.1.14) sind Chitin abbauende Enzyme, die hydrolytisch die β -1,4-Verzweigung des Chitins in 1,4-β-*N*-Acetyl-D-Glucosamin spalten. Je nach Organismus haben Chitinasen eine andere Rolle. Während sie in Pilzen eine autolytische und nährende Funktion haben [Adams 2004], so haben sie in *Trichoderma harzianum* eine mycoparasitische Wirkung [Haran et al. 1996]. In Pflanzen werden Chitinasen als Abwehrmechanismus gegen phytopathogenen Pilzen produziert [Chérif 1990; Collinge et al. 1993; Lorito 1993; Ordentlich et al. 1988]. In Bakterien wird das gespaltene Chitin als Kohlenwasserstoff- und Nährstoffquelle verwendet [Bhattacharya et al. 2007]. Durch die weite Verbreitung von Chitinasen und ihre diversen Funktionen in unterschiedlichen Lebewesen, sind Chitinasen in der Biotechnologie gefragt. Obwohl in den letzten Jahren viele Chitinasen identifiziert wurden, sind nur wenige kommerziell erhältlich [Stoykov et al. 2015]. Chitinasen finden industrielle Anwendung in der Produktion von N-Acetyl-D-Glucosamin und Chito-Oligoscchariden durch den Abbau von Chitin [Kuk et al. 2005; Ramírez-Coutiño et al. 2006]. Ein Hauptanwendungsgebiet der durch Chitinasen produzierten Mono- und Oligosaccharide ist die Humanmedizin. Aufgrund der tumorinhibitorischen Eigenschaften von *N*-Acetyl-D-Glucosamin und

9

Chito-Oligosacchariden werden sie in der Krebstherapie eingesetzt [Aam et al. 2010; Shen et al. 2009]. Des Weiteren werden Chitinasen in der Agrarindustrie zur Bekämpfung von mikrobiellen Phytopathogenen oder als Insektizid verwendet [Kramer und Muthukrishnan 1997; Roberts und Selitrennikoff 1988]. Die Gattung Trichoderma ist bekannt für ihre Fähigkeit, die Resistenz gegen Krankheitserreger bei Pflanzen durch verschiedenste Mechanismen zu erhöhen [Hasan 2012]. Es stellte sich heraus, dass Chitosan die Formation von Callose anregt und somit die Pflanzenabwehr bei der Sojabohne und der Petersilienzellen fördert [Conrath et al. 1989; Köhle et al. 1985]. Chitinasen werden verwendet, um aus Abfallprodukten wie Garnelen- und Krabbenschalen, energieeffiziente Produkte herzustellen, die in unterschiedlichen Sparten der Biotechnologie sowie der Humanmedizin zum Einsatz kommen.

1.4.4 Lipasen

Neben dem Abbau von Biomasse und organischen Abfallprodukten durch die bereits erwähnten hydrolytischen Enzyme Cellulase, Xylanase und Chitinase ist die Verwendung von Lipasen in der Industrie von großer Bedeutung. Lipasen (EC 3.1.1.3) katalysieren die Hydrolyse von Triglyceriden zu Diglyceriden, Monoglyceriden, Glycerol und freien Fettsäuren. Neben dieser Funktion katalysieren sie die Hydrolyse und Transesterifikation von Estern sowie deren Synthese. Lipasen werden vor allem in der Waschmittelindustrie, Nahrungs- und Kosmetikindustrie sowie der pharmazeutischen Industrie eingesetzt [Cherif et al. 2011; Hasan et al. 2006; Su et al. 2010; Treichel et al. 2010]. Eine wichtige Anwendungen finden Lipasen in der Waschmittelindustrie. Durch den Gebrauch von Lipasen kann, die durch Detergenzien verursachte Umweltbelastung, verringert werden. Durch den Einsatz von Lipasen wird durch die Verwendung niedriger Temperaturen, weniger Energie verbraucht und es werden weniger Chemikalien sparsamer verwendet [Hasan et al. 2006; Houde et al. 2004]. Ein anderes Anwendungsgebiet der Lipasen ist die Biodieselproduktion [Hwang et al 2014]. Die kommerziellen Lipasen stammen hauptsächlich von den Ascomycota Gattungen Aspergillus sp., Penicillium sp., Mucor sp. und Rhizopus sp. und wurden aufgrund ihrer Anzuchtsbedingungen, Temperatur- und pH-Stabilität für die industrielle Nutzung ausgewählt [Cihangir und Sarikaya 2004; Treichel et al. 2010].

1.5 Die Klassifizierung von Enzymen in CAZyme Familien

Für den Abbau von organischer Biomasse sind aufgrund ihrer vielseitigen und verketteten Struktur viele Enzyme verantwortlich, die einzeln aber auch miteinander agieren. Diese werden als Kohlenhydrat aktiven Enzyme (carbohydrate active enzymes, CAZyme) zusammengefasst. Sie spielen bei der Modifikation von Kohlenwasserstoffverbindungen bezüglich des Auf- und Abbaus der Oligo- und Polysacchariden, bei der Synthese, dem Metabolismus oder dem Transportes von Kohlenhydraten eine Rolle [Lombard et al. 2014]. Es werden fortwährend neue Mitglieder der verschiedenen CAZyme Familien gefunden. Aufgrund ihrer Sequenzhomologie werden diese zu bereits bestehenden Gruppen und deren weiter untergliederten Familien zugeordnet. Im Gegensatz zur Klassifizierung in das EC-Nummern System [Webb 1992], welche die enzymatische Reaktion klassifiziert, basiert die Klassifizierung der CAZyme auf ihrer Sequenzhomologie und der damit verlinkten Spezifizierung sowie ihrer 3D-Struktur. CAZyme sind bezüglich ihrer Sequenzhomologien in Gruppen unterteilt. Man unterscheidet die CAZyme in Glykosidhydrolasen (Glycoside Hydrolases, GH), Glykosyltransferasen (Glycosyltransferases, GT), Polysaccharid Lyasen (Polysaccharide Lyases, PL), die Kohlenhydrat Esterasen (Carbohydrate Esterases, CE) und die Oxidoreduktasen (Auxiliary Activities, AA). Des Weiteren zählt zu den CAZymen das Carbohydrate-Binding-Module (Kohlenhydrat bindendes Modul, CBM). Die CAZyme sind in einer Datenbank unter der URL http://www.cazy.org/ zusammengefasst [Cantarel et al. 2009; Lombard et al. 2014]. Die einzelnen Gruppen der CAZyme sind weiter unterteilt in verschiedene Familien. Die größte und am besten untersuchte Gruppe der CAZyme bildet die Gruppe der Glykosidhydrolasen (GH) mit 153 Familien. Sie können die Hydrolyse von O-, N- und S-verlinkten Glykosiden katalysieren. Einige Glykosidhydrolasen katalysieren die Reaktion als Inverting Glykosidhydrolasen und andere als *Retaining* Glykosidhydrolasen [Koshland 1953]. Der Mechanismus der Inverting Glykosidhydrolasen basiert auf einem Ein-Schritt Single-Displacement Mechanismus. Die Hydrolyse der Retaining Glykosidhydrolasen auf *Double-Displacement* beruht einem Mechanismus, dem klassischen Koshland-Haltemechanismus (Koshland retaining mechanism). Dabei agiert im ersten Schritt des Koshland-Haltemechanismus, dem Glykosylierungs Schritt, agiert ein Rest als Nukleophil und bindet so das Substrat. Im zweiten Schritt, dem Deglykosylierungs Schritt, wird das im ersten Schritt gebildete glykosylische Intermediat gebunden, wobei der zweite Rest als Base agiert und das Substrat somit abgespalten wird.

Cellulasen, Hemicellulasen und Xylanasen sind den Glykosidhydrolasen zugeordnet und in verschiedene Familien unterteilt. Die Xylanasen sind aufgrund von Sequenzhomologien in zehn verschiedenen GH Familien eingeteilt. Die Familien GH5, GH7, GH8, GH10, GH11 eine unterschiedliche und GH43 weisen katalytische Domäne mit einer Endo-1,4-β-Xylanaseaktivität auf, die Familien GH16, GH52 und GH63 besitzen neben einer Xylanasedomäne von Familie GH10 oder GH11 noch eine Glykosidasedomäne. Die Enzyme der Familie GH26 sind als Endo-1,3-β-Xylanasen klassifiziert. Die Enzyme der GH Gruppen GH10 und GH11 sind beides Retaining Glykosidhydrolasen und unterliegen damit dem Koshland-Haltemechanismus [Withers et al. 1986; Gebler et al. 1992]. Die Familie GH10 beinhaltet einige Endo- β -1,3-Xylanasen sowie Endo- β -1,4-Xylanasen und bilden eine $(\alpha/\beta)_8$ TIM barrel fold in ihrer 3D-Struktur [Henrissat et al. 1995]. Die Familie GH11 sind Endo-β-1,4-Xylanasen und bilden in ihrer Tertiärstruktur eine jelly roll fold [Wakarchuk et al. 1994]. Das aktive Zentrum beider GH Gruppen ist bekannt [Tull et al. 1991; MacLeod et al. 1994; Miao et al. 1994].

Die zweitgrößte Gruppe der CAZyme sind die Glykosyltransferasen (GT), die unterteilt sind in 105 Familien in der CAZyme Datenbank. Dabei handelt es sich um Enzyme, die Monosaccharideinheiten eines aktivierten Kohlenhydrats auf ein Akzeptormolekül, meistens einen Alkohol, übertragen [Lairson et al. 2008]. Die katalytische Wirkung der Glykosyltransferasen beruht auf dem Donor-Akzeptor-Prinzip. Eine weitere Gruppe sind die Polysaccharid Lyasen (PL) welche in 28 verschiedene Familien unterteilt sind. Sie spalten Uronsäure-Polysaccharide um einen Hexenuronsäure-Rest und ein neues reduziertes Ende zu generieren [Garron und Cygler 2010; Lombard et al. 2010]. Die Kohlenhydrat Esterasen (CE) katalysieren die Deacetylierung von substituierten Sacchariden [Biely 2012]. Sie bilden in der CAZyme Datenbank eine kleine Gruppe mit 16 Familien. Die kleinste und bisher am wenigsten erforschte Gruppe der CAZyme bildet die Oxidoreduktasen (AA) mit 15 Familien. Sie ist zusammengesetzt aus Lytic Polysaccharide Mono-Oxygenases (LPMO) und Lignin abbauenden Enzymen [Horn et al. 2012; Levasseur et al. 2013]. Obwohl die Lignin abbauenden Enzyme nicht an Kohlenwasserstoff agieren, wurden sie aufgrund der Struktur der Pflanzenzellwand und deren Assoziation von Lignin und Kohlenwasserstoff in die CAZyme Datenbank aufgenommen. Die LMPOs wurden eingegliedert in die AA Familien AA9, AA10 und AA11 [Cantarel et al. 2009; Levasseur et al. 2013; Lombard et al. 2014]. Einige Enzyme der Oxireduktasen Familie der Pilze A. oryzae, M. thermophilia und N. crassa wurden bereits identifiziert und ihre aktive Rolle beim Abbau

von Cellulose beschrieben [Beeson et al. 2012; Hemsworth et al. 2014; Morgenstern et al. 2014; Vu et al. 2014]. Enzyme der AA Familie AA9 wirken synergistisch mit Cellulasen beim kompletten Abbau von kristalliner Cellulose [Hu et al. 2014]. Vaaje-Kolstad et al. [2010] beschrieb, dass ein AA10 Enzyme (ehemals CBM33) von S. marcescens eine verstärkende Wirkung auf die katalytische Aktivität in Kombination mit einer Chitinase hat. Die Familie der Oxidoreduktasen birgt ein großes Potential im Hinblick auf ihre Rolle bei dem Abbau von Biomasse und wird für die Biotechnologie immer interessanter.

Neben den bereits erwähnten Gruppen enthält die Klassifizierung der CAZyme ein Modul, das Carbohydrate-Binding-Module (CBM) [Boraston et al. 1998; Boraston et al. 1999]. Die CBMs bestehen aus einer fortlaufenden Aminosäure-Kette mit einer Kohlenhydrat bindenden Aktivität. CBMs haben keine eigene katalytische Funktion und gehören deshalb nicht zu den Enzymklassen der CAZyme. Sie fusionieren mit verschiedenen Familien der CAZyme, um deren hydrolytische Funktion zu intensivieren [Georgelis et al. 2011]. Dabei binden die CBMs an das abzubauende Polysaccharid und bringen das hydrolytische Enzym in die Nähe des Substrats [Teeri et al. 1998; Tomme et al. 1995a; Tomme et al. 1995b, Tomme et al. 1998; Srisodsuk et al. 1997]. Damit wird die Enzymkonzentration an der Oberfläche des Substrates erhöht und so die Hydrolyse beschleunigt [Bolam et al. 1998]. CBMs sind in drei Klassen (Typ A-C) unterteilt, welche durch die Struktur und den Polymerisationsgrad ihrer Zielliganden definiert werden. Dies ist ausschlaggebend für die Region innerhalb eines Polysaccharid, die gebunden werden soll [Armenta et al. 2017; Boraston et al. 2004; Gilbert et al. 2013]. Die CBMs des Typ A binden an der Oberfläche von kristalline Polysaccharide wie Cellulose oder Chitin. Aufgrund ihrer unabhängigen Faltungseinheiten, ihrer günstigen chemischen und physikalischen Eigenschaften und der einfachen Kontrolle ihrer Bindungsspezifizierung werden sie in vielen industriellen Prozessen eingesetzt wie unter anderem dem bioprocessing [Boraston et al. 2001; Levy und Shoseyov 2002; Rodriguez et al. 2004; Shoseyov et al. 2006].

1.5.1 CAZyme in der Biotechnologie

CAZyme sind in den meisten prokaryotischen und eukaryotischen Organismen zu finden, die Verteilung und Zusammensetzung ist jedoch unterschiedlich. In Bakterien existiert eine andere Konstellation der CAZyme Familien als in Pilzen [Munir et al. 2014; Zhao et al. 2013]. Vor allem in Pilzen weisen die CAZyme eine hohe Diversität auf [Cantarel et al. 2009; Murphy et al. 2011]. Die Anzahl und Zusammensetzung der CAZyme

variiert jedoch innerhalb der Pilzspezies. So produziert, der als sehr effizienter Zersetzer bekannte Ascomycet Trichoderma reesei nur 200 GH Familien im Gegensatz zu Aspergillus oryzae mit 285 GH Familien [Martinez et al. 2008]. Zhao et al. [2013] verglichen 103 unterschiedliche Pilze im Hinblick auf deren CAZyme. Dabei ergab sich, dass die Familien der Glykosidhydrolasen und der Kohlenhydrat Esterasen die meist verbreiteten Gruppen im Reich der Pilze sind. Außerdem zeigte er, dass pflanzenpathogene Pilze eine höhere Anzahl an unterschiedlichen Enzymen der CAZyme produzieren als saprophytische Pilze, Tierpathogene oder Pilze, die für ihre hohe enzymatische Aktivität beim Abbau von pflanzlicher Biomasse bekannt sind. Demnach korreliert die Anzahl der CAZyme nicht mit der Fähigkeit der Degradation von Biomasse. Die Identifikation von CAZyme in den unterschiedlichen Organismen ist von großer Bedeutung für den optimalen Gebrauch in der Biotechnologie. Es wird vermutet, dass CAZyme als Gen-Cluster vorliegen können, um so optimal zusammen zu agieren und das Substrat abbauen zu können. Gen-Cluster bestehen meist aus zwei oder mehr funktionell ähnlichen Genen, die im Genom hintereinander reguliert sind. Im Phylum der Bacteroidetes bilden die Kohlenhydrat aktiven Enzyme oft so genannte CAZyme Cluster, auch bekannt als Polysaccharide-Utilization-Loci (PULs) [Terrapon et al. 2018]. Diese wurden bisher ausschließlich bei Bacteroidetes gefunden. Bakterien sowie Pilze bilden neben sekretierten Enzymen, die synergistisch pflanzliche und tierische Biomasse abbauen können, auch Multi-Protein-Komplexe, die Cellulosome. Cellulosome werden nur von einigen anaeroben Bakterien und Pilzen gebildet. Das bekannteste Cellulosom wird von C. thermoscellum produziert [Bayer et al. 1998; Bayer et al. 2004]. Die Cellulosome beinhalten Enzyme aus verschiedenen CAZyme Familien, wie Cellulasen und Hemicellulasen, um den Abbau des organischen Materials zu beschleunigen. Um die sekretierten hydrolytischen Enzyme im Hinblick auf verschiedene industrielle Prozesse effizient zu nutzen, ist die Analyse der sekretierten CAZyme ein essentieller Forschungsansatz.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war das bioökonomische Potential einer Pilzsammlung aus tropischen Regionen aufzuzeigen. Die Untersuchung umfasste die taxonomische Einordung der Pilzisolate, den Test auf deren inhibitorische Wirkung gegen phyto- und humanpathogene Pilze, die enzymatische Charakterisierung, sowie die Genomsequenzierung und die Analyse von Kohlenhydrat aktiven Enzymen.

Ergebnisse

2 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte eine Pilzsammlung aus Vietnam charakterisiert und auf ihre enzymatischen und antifungalen Aktivitäten getestet werden. Eine Pilzsammlung von 295 Pilzisolaten wurde in neun verschiedenen Habitaten in Vietnam gesammelt. Es wurden 211 Pilzisolate aufgrund ihres unterschiedlichen Phänotyps ausgewählt und durch die anschließende ITS Sequenzierung phylogenetisch eingeordnet. Der Inhibitionstest nach der Dual Culture Methode für sechs phytopathogene Pilze und der Inhibitionstest nach der Overlay Methode gegen Candida albicans, ermöglichte den Test auf antifungale Aktivität der Pilzsammlung. Ein enzymatischer Plattentest nach der Disc Diffusion Methode ergab eine Vorauswahl für die quantitative Aktivitätsbestimmung der Enzyme im Flüssigmedium. Durch die quantitative enzymatische Aktivitätsbestimmung wurden 69 Pilzisolate mit einer oder mehreren Enzymaktivitäten identifiziert. Es wurden drei Pilze aufgrund ihrer hohen Enzymaktivität für weitere Untersuchungen ausgewählt. Aus dem Pilzisolat Fsh102, Aspergillus sydowii, wurden zwei nicht redundante Endo-1,4-β-Xylanasen (EC 3.2.1.8) heterolog in den E. coli Stamm BL21 (DE3) exprimiert, gereinigt und charakterisiert. Des Weiteren wurden vom selben Pilzisolat zwei Endocellulasen (EC 3.2.1.4) und zwei Exocellulasen (EC 3.2.1.91) identifiziert und in E. coli BL21 (DE3) exprimiert. Als Referenz Genom diente dazu das sequenzierte Genom von Aspergillus sydowii CBS 593.65 von JGI. Die Pilzisolate FW57 und FW16.1 wurden de novo sequenziert und mit unterschiedlichen Substraten auf ihre CAZyme analysiert.

2.1 Charakterisierung der Pilzsammlung

Die Charakterisierung der Pilzsammlung unterteilt sich in die Isolation der Pilze aus den unterschiedlichen Habitaten in Vietnam sowie die phänotypische und phylogenetische Charakterisierung der Sammlung.

2.1.1 Isolation der Pilze aus unterschiedlichen Habitaten

Die Isolation der Pilzproben erfolgte aus neun unterschiedlichen Habitaten in Vietnam. Es wurden insgesamt 295 potentielle *Ascomycota* gesammelt (Tabelle 1, 4.4.1). Siebzig Proben wurden im Mangrovenwald, 55 auf der Bodenoberfläche, 44 auf Reisstroh, 24 aus ölhaltigen Habitaten, 12 aus heißen Quellen, 27 von Garnelenschalen, 13 von Krabbenschalen, 47 von Insektenkörpern und 3 von der Oberfläche von Früchten isoliert (Tabelle 1). Jedes Habitat

liegt an einem anderen Ort in Vietnam. Es sind je Habitat unterschiedlich viele Isolate in der

Ursprungssammlung (4.4.1) vorhanden.

Habitate	Pilzisolate	Phänotyp.	DNA	ITS	Enzym	Enzymtest in
		Unterschiede	Isolation	Sequenzierung	Plattentest	Flüssigmedium
Mangrovenwald	70	38	37	36	36	17
Bodenoberfläche	55	42	32	29	29	6
Reisstroh	44	26	23	19	19	3
Ölhaltiges Habitat	24	18	16	17	17	7
Heiße Quellen	12	9	8	5	5	4
Garnelenschalen	27	25	21	16	16	11
Krabbenschalen	13	11	11	9	9	1
Insektenkörper	47	38	33	31	31	18
Früchte	3	2	2	2	2	2
Σ	295	211	183	164	164	69

Tabelle 1: Die Anzahl von Pilzisolaten geordnet nach Habitaten. Die Spalten enthalten die Anzahl der im Folgenden weiter charakterisierten Pilzisolate über die gesammelten Pilzisolate, die phänotypischen Unterschiede, die DNA Isolation, die ITS (*internal spacer sequence*, 2.1.2) Sequenzierung, den Enzym Plattentest (2.2.1) und die im Flüssigmedium (2.2.2) getesteten Isolate.

Die einzelnen Sammelstellen sind über ganz Vietnam verteilt (4.4.1). Die Pilzisolate vom Mangrovenwald und auf Insektenkörpern wurden in der Nähe des Mekongdelta im Süden Vietnams gesammelt. Die Habitate Frucht, Garnelenschalen, Krabbenschalen und Reisstroh wurden in Meeresnähe gesammelt, während die Proben aus den Habitaten Bodenoberfläche, Ölhaltiges Habitat und Heiße Quellen im Norden um Hanoi gesammelt wurden. Alle Pilzisolate wurden in Form von Konidien (4.4.4) langfristig gesichert (4.4.4).

Von allen Proben wurden Reinisolate gewonnen (4.4.2, 4.4.3). Die Reinisolate wurden zur phänotypischen Charakterisierung auf Agar (4.1.3) angezogen. Die Auswertung nach fünf bis sieben Tagen ergab, dass von den 295 gesammelten Isolaten 211 einen unterschiedlichen Phänotyp in Hinblick auf ihr Wachstum aufweisen. Von Isolaten mit gleichem Phänotyp wurde jeweils einer ausgewählt und weiter untersucht. Alle ausgewählten Pilzisolate, bei denen ein phänotypischer Unterschied zu sehen war, wurden zur langfristigen Aufbewahrung bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig, Deutschland, hinterlegt und mit Einlagerungsnummer versehen.

2.1.2 Phylogenetische Einordnung in das Reich der Pilze

Die DNA wurde von den 211 ausgewählten Pilzisolaten (2.1.1, Tabelle 1) isoliert (4.5.1). Die Amplifikation der ITS Sequenz (4.5.5) erfolgt mit den Primern ITS1 [F] und ITS4 [R] (4.1.4) unter Verwendung der Q5 DNA Polymerase (4.5.5) bei einer Annealing Temperatur von 58°C. Die DNA Fragmente von einer Größe zwischen 500 und 1500 bp wurden gelelektrophoretisch überprüft. Nach erfolgreicher Amplifikation der ITS Marker Sequenz (4.5.5) wurde die Sequenz des codogenen (5'-3') und nicht codogenen (3'-5') Strangs bestimmt (4.1.8). Beide Sequenzen wurden mit der Software SeqMan (4.7.5) annotiert und der phylogenetische Baum berechnet (4.2.4, Anhang I.I und I.II). Von den 211 ausgewählten Pilzisolaten zeigten 164 eine enzymatische Aktivität (2.2). Nur diese wurden in den phylogenetischen Baum eingerechnet.

Durch die hohe Anzahl der Pilzsequenzen und die daraus folgende Anzahl an Referenzsequenzen wurde der Baum zusammengeklappt (Abbildung 2). Die über 150 Referenzsequenzen wurden aus den Datenbanken Mycobank und TrichOKEY 2 (4.2.4) verwendet, um die Pilzisolate den Gattungen zuzuordnen. Alle im Baum eingerechneten ITS Sequenzen sind in der Genbank (NCBI) mit den Nummern MG098597 – MG098778 hinterlegt (Anhang II).



Abbildung 2: Zusammengeklappter phylogenetischer Baum nach Bestimmen der ITS-Sequenzen. (A) Baum aller zugeordneter *Ascomycota* und (B) Aufschlüsselung der Gattungen *Aspergillus, Penicillium* und *Talaromyces*. Die Verteilung der Habitate ist farblich kodiert in der Legende angegeben. Der Baum wurde nach den Kriterien des Maximum Likelihood (ML) und des Maximum Parsimony (MP) (4.2.4) errechnet.

Der zusammengeklappte Baum wurde mit den unterschiedlichen Habitaten farblich kodiert, um den Vergleich zwischen Gattung und Habitat ersichtlicher zu machen. Die *Sektion Aspergillus* hat die höchste Prävalenz, mit 69 Isolaten, was etwa 42% der Gesamtkollektion der im Baum eingerechneten *Ascomycota* ausmacht. Die zweihäufigsten vertretenen Gattungen sind *Penicillium* und *Trichoderma* mit jeweils 12% und *Fusarium* mit 8,5%. Die Gattungen *Gongronella* und *Taifanglania* sind in der gesamten Sammlung nur mit jeweils einer Spezies vertreten. Nahezu alle Gattungen der Sammlung sind in den Habitaten Mangrovenwald und Bodenoberfläche gefunden worden. Im Habitat der Krabbenschalen treten nur fünf Arten aus den vier Gattungen bzw. Untergattungen *Penicillium* Sektion *Lanata-Divaricata & Stolkia, Fusarium, Cunninghamella* und *Lasiodiplodia* auf. Die Gattungen *Cunninghamella* und *Lasiodiplodia* sind in der gesamten Sammlung nur drei bzw. zweimal vertreten. Das Habitat der Insektenkörper weist zehn verschiedene Gattungen auf. Die Gattung *Trichoderma* ist nicht im marinen Habitat (Garnelenschalen/Krabbenschalen) vertreten. Die Gattung *Humicola* ist nur mit vier Arten vertreten, wobei davon drei Spezies an der Bodenoberfläche und eine Art im Mangrovenwald isoliert wurden. Die drei Gattungen mit der höchsten Anzahl an Isolaten *Trichoderma* (20 Isolate), *Aspergillus* Sektion *Flavi* (27 Isolate) und *Penicillium* Sektion *Lanata divaricata & Stolkiae* (20 Isolate) sind nicht im Habitat Heiße Quellen zu finden. Die Gattung *Aspergillus* ist in allen gesammelten Habitaten vertreten.

2.2 Enzymatische Analyse von Isolaten aus der Pilzsammlung

Die mittels phylogenetischer Analyse (2.1.2) klassifizierten 164 Isolaten wurden nun auf sekretierte Enzymaktivitäten untersucht. Zunächst wurde mit der quantitativen plattenbasierten *Disc Diffusion* Methode (4.4.7) Isolate mit im Vergleich erhöhter Enzymaktivität ausgewählt. In einem anschließenden quantitativen Test in Flüssigmedien wurde die relative Aktivität (U/mg) der Enzyme dieser selektierten Pilzisolate bestimmt (4.4.8).

2.2.1 Qualitativer enzymatischer Aktivitätstest mit der Disc Diffusion Methode

Insgesamt wurden die 211 Pilzisolate (2.1.1) auf Aktivität der vier Enzyme Cellulase, Xylanase, Chitinase und Lipase mit der Disc Diffusion Methode (4.4.7) getestet. Hierbei wird die Aktivität durch eine Vorkultivierung des Pilzisolates im Medium mit Substrat induziert und anschließend auf einer Mineral Salz Agarplatte, welche das jeweilige Substrat enthält inkubiert. Die Aktivität der in das Medium sekretierten Enzyme wird als Ring um die Inokulationsstelle sichtbar (Abbildung 3). Quantitativ konnten so 63 Pilzisolate mit Cellulaseaktivitäten, 30 Pilzisolate mit Xylanaseaktivitäten, 38 Pilzisolate mit Chitinaseaktivitäten und 11 Pilzisolate mit Lipaseaktivität identifiziert werden. Von diesen wiesen 39 Isolate Aktivität bei zwei oder mehreren Enzymklassen auf.

Der Durchmesser der durch den reduzierten Zucker bzw. durch die Bildung der Calciumsalze beim Lipasetest (4.4.7), entstandene Kreise um das Myzel wurde gemessen und ab 1 cm wurde eine hohe Aktivität festgelegt (Abbildung 3). Ein sichtbarer Durchmesser ab 2 mm bis 1 cm wurde als mittlere Aktivität definiert. Ein Kreis von weniger als 2 mm wurde als geringe Aktivität definiert.

Insgesamt wies die Hälfte der mit der *Disc Diffusion* Methode (4.4.7) gemessenen Pilzisolate eine hohe Enzymaktivität auf. Die ausgewählten Isolate gehören hauptsächlichen den Gattungen *Talaromyces, Aspergillus* Sektion *Fumigati, Aspergillus* Sektion *Nidulans, Penicillium* Sektion *Citrina, Penicillium* Sektion *Lanata-divaricata & Stolkiae, Aspergillus* Sektion *Flavi, Fusarium* und *Trichoderma* an. Die Hälfte der im Mangrovenwald gesammelten Isolate zeigte eine mittlere bis hohe Enzymaktivität bei den getesteten Enzymen auf. Nur ein Viertel der Individuen vom Habitat Reisstroh wies eine hohe Enzymaktivität bei den getesteten Enzymen auf (Tabelle 1). Es wurden 78 Pilzisolate mit hoher enzymatischer Aktivität zur quantitativen Enzymbestimmung (2.2.2) ausgewählt (Tabelle 1).



Abbildung 3: Beispiele der *Disc Diffusion* Methode zur Bestimmung der Enzymaktivität. (A) Bestimmung der Cellulaseaktivität mit CMC (FW 16.1, *Fusarium solani*), (B) Bestimmung der Xylanaseaktivität mit Xylan (Fsh102, *Aspergillus sydowii*), (C) Bestimmung der Chitinaseaktivität mit Chitin (FW57, *Humicola fuscoatra*), (D) Bestimmung der Lipaseaktivität mit Tween 20 und CaCl₂ (SF11.4, *Aspergillus* sp.). Der Pfeil zeigt den Ring um die Inokulationsstelle, welcher durch Abbau des jeweiligen Substrates entsteht. Der Durchmesser ist proportional zu der Enzymaktivität. Ein Durchmesser über 1 cm wurde als hohe Aktivität definiert, ein Durchmesser zwischen 1 cm und 2 mm als mittlere Aktivität und ein Durchmesser von 2 mm bis nicht sichtbar galt als geringe Aktivität.

Die Enzymaktivitäten, bestimmt mit der *Disc Diffusion* Methode, wurden mit den Habitaten korreliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt. Jedes ausgewählte Pilzisolat besitzt mindestens eine geringe bis hohe Aktivität bei den untersuchten Enzymen auf. Die meisten Stämme mit hoher Cellulaseaktivität stammen aus den Habitaten Mangrovenwald, Reisstroh und Bodenoberfläche. Es wurde eine geringe Anzahl an Stämmen mit hoher Cellulaseaktivität findet man in den Habitaten Bodenfläche, heiße Quellen, Ölhaltiges Habitat und Garnelen- und Krabbenschalen. Die meisten Individuen mit hoher tis mittlerer Chitinaseaktivität sind in den Habitaten Garnelenschalen (17 Isolate),

Krabbenschalen (6 Isolate) und Insektenkörper zu finden (26 Isolate) zu finden. Eine erhöhte Chitinaseaktivität zeigen auch Individuen in den Habitaten Bodenoberfläche, Ölhaltiges Habitat, Heiße Quellen, Reisstroh und Mangrovenwald. Eine geringe Anzahl an Stämmen mit hoher Lipaseaktivität wurden in den Habitaten Ölhaltiges Habitat und Garnelenschalen gefunden. Eine geringe Lipaseaktivität ist weit verbreitet in allen Habitaten mit einer Höchstanzahl von 18 Individuen im Habitat Bodenoberfläche und Garnelenschalen (10 Isolate). Pilzisolate mit Xylanaseaktivität sind ähnlich verbreitet wie die mit Cellulaseaktivität. Xylanase aktive Isolate sind mit den meisten Isolaten im Mangrovenwald, Reisstroh und Bodenoberfläche (bis zu 35 Isolate) vorhanden. Xylanaseaktivität ist auch in einigen Individuen von Garnelenschalen und Insektenkörper zu finden. Allerdings weisen nur wenige Isolate der Sammlung eine hohe Xylanaseaktivität auf. Diese ist dann in den Habitaten Mangrovenwald, Reisstroh und Insektenkörper und Garnelenschalen vorhanden.



Abbildung 4: Spinnendiagramm zur Darstellung der Enzymaktivitäten basierend auf der *Disc Diffusion* Methode in Korrelation mit den unterschiedlichen Habitaten. Rote Linie: hohe Aktivität, blaue Linie: mittlere Aktivität, graue gestrichelte Linie: geringe Aktivität. Die mit Zahlen beschrifteten Ringe geben die Anzahl an Individuen an.

2.2.2 Quantitativer Aktivitätstest ausgewählter Pilzisolate in Flüssigmedien

Die mit der *Disc Diffusion* Methode (4.4.7) ausgewählten 69 Pilzisolate (2.2.1) wurden quantitativ auf Enzymaktivitäten im Flüssigmedium getestet (4.4.8). Dabei zeigten über 85% Individuen (59 von 69) eine hohe Aktivität bei mindestens einer der untersuchten Enzymaktivitäten (Tabelle 2). In Abbildung 5 ist die überlappende Umsetzung der verschiedenen Substrate, welche schon bei der *Disc Diffusion* Methode (2.2.1) sichtbar wurde, dargestellt.

Tabelle 2: Spezifische Enzymaktivitäten in U/mg der gemessenen Isolate auf die Enzyme Cellulase, Chitinase, Xylanase und Lipase. Die vollständige Tabelle mit den Standardabweichungen befindet sich im Anhang III.

Isolat	Cellulaseaktivität	Chitinaseaktivität	Xylanaseaktivität	Lipaseaktivität
	(U/mg)	(U/mg)	(U/mg)	U/mg)
FF1	0,016	0,13	0,45	
FH3		0,04		
FH4		0,06		
FH101	0,02	0,05		
Fi1	0,01	,		
Fi4	0,02		0,41	
Fi5	0,02			
Fi6	0,02			
Fi7	0,01			
Fi10	0,01		0,63	
Fi10.2		0,03		
Fi12	0,02			
Fi14	0,06			
Fi19	0,01			
Fi21		0,04	0,58	
Fi22		0,04		
Fi23	0,01			
Fi24	0,01	0,02		
Fi34		0,03		
Fi39	0,01	0,04		
Fi43	0,02	0,04		
FL2		0,03		
FL6.1	0,01	0,06	0,52	0,037
FL10	0,02	0,04	0,69	
FL15	0,01			
FL18		0,04		0,11
FL100	0,05	0,03	1,03	
FL101	0,03	0,04		
FR1	0,01		0,97	
FR27			0,30	
Fsh6		0,10		0,15
Fsh13	0,06			
Fsh15	0,02			
Fsh17	0,02		0,74	
Fsh20	0,02		0,56	
Fsh21	0,00		0,64	
Fsh101	0,03	0,13	0,44	0,08
Fsh102	0,03	0,03	0,61	0,27
Fsh200	0,01	0,03	0,71	
Fsh201	0,02	0,05	0,63	
Fsh21	0,00		0,64	
FW2.1	0,02			
FW5	0,01			
FW16.1	0,05			
FW16.2	0,02			
FW24		0,02	0,46	
FW27	0,02			
Ergebnisse

FW30			0,66	
FW33			0,58	
FW35	0,02	0,16		
FW36	0,01	0,04	0,4	
FW43	0,02			
FW49	0,00		0,64	
FW57		0,11		0,06
FW63		0,00		
SF7	0,00	0,08		
SF14	0,06			
SF19.1	0,02	0,03	0,57	
SF25	0,00		0,41	
SF31	0,09		0,23	

Innerhalb der Sammlung konnten 18 Pilzisolate identifiziert werden, die nur auf Cellulose als kohlenstoffhaltigem Substrat wachsen konnten, drei Isolate wuchsen ausschließlich auf Nährmedium mit Xylan. Neun Pilzstämme wuchsen auf Xylan und in cellulosehaltigem Medium (4.4.7). In der Pilzsammlung konnten sieben Isolate nur auf chitinhaltigem Substrat wachsen, sieben Isolate wuchsen auf Chitin und auf CMC. In der gesamten Sammlung gibt es sieben Pilzisolate die jeweils Xylan, CMC und Chitin als primäre Kohlenstoffquelle abbauen können. Drei Isolate wurden positiv auf alle vier Substrate getestet. Eine Übersicht über die Enzymaktivitäten ist in einem Venn-Diagramm in Abbildung 5 dargestellt.



Abbildung 5: Venn-Diagramm der Enzymaktivitäten. Gelb: Chitinaseaktivität, Blau: Cellulaseaktivität, Grün: Xylanaseaktivität, Rot: Lipaseaktivität. Die Zahlen geben die Anzahl der Isolate mit den entsprechenden Enzymaktivitäten an.

Korreliert man die Ergebnisse des Flüssigtests (59 Isolate) mit den unterschiedlichen Taxa des Pilzreiches (Abbildung 6) sieht man, dass die meisten Pilzstämme mit Cellulaseaktivität (44 Pilzisolate) vom Taxon *Aspergillus* kommen. Nur zwei Isolate der Gattung *Trichoderma* weisen eine hohe Cellulaseaktivität auf. Die besten Zersetzer von CMC, Xylan, Chitin und Tween 20 findet man in den Gattungen *Penicillium* (Sektion *Citrina*) und *Aspergillus* (Sektion *Nidulans*), welche oft mehr als eine untersuchte Enzymaktivität besitzt, wie die Isolate Fsh101 und Fsh102. Die höchste Chitinaseaktivität haben die Stämme FW35 (*Aspergillus* Sektion *Fumigati* sp.), Fsh101 (*Aspergillus* Sektion *Nidulans* sp.) und FF1 (*Aspergillus* Sektion *Flavi* sp.) mit ~ 0,13 U/mg (Tabelle 2). FW57 hat eine

Chitinaseaktivität von 0,1 U/mg und zählt zu der unerforschten Gattung Humicola. Insgesamt hat die Pilzsammlung sechs Pilzisolate mit Lipaseaktivität, wobei Fsh102 (Aspergillus Sektion Nidulans sp.) die höchste Aktivität mit 0,27 U/mg aufweist. Die Stämme Fsh13 (Fusarium sp.) und FW16.1 (Fusarium sp.) haben eine hohe Cellulaseaktivität, wohingegen das Pilzisolat SF31 (Aspergillus Sektion Terrei sp.) mit 0,095 U/mg die höchste Cellulaseaktivität der gesamten Pilzsammlung aufweist. Die höchste Xylanaseaktivität haben die Isolate FR1 (Aspergillus Sektion Flavi sp.) und FL100 ~ 1 U/mg. Isolat (Penicillium Sektion Citrina sp.) mit Das Fsh102 (Aspergillus Sektion Nidulans sp.) hat eine Xylanaseaktivität von 0,6 U/mg und ist einer von drei Pilzisolaten, die bei allen getesteten Enzymen eine Aktivität aufweisen.

Ergebnisse



Abbildung 6: Farbliche Darstellung der Enzymaktivitäten aus dem qualitativen Enzymaktivitätstest (4.4.8) in Korrelation mit dem phylogenetischen Baum (2.1.2). Farbverlauf der Aktivitäten von blau (geringe Aktivität) bis rot (hohe Aktivität). Die Werte wurden für jede getestete Aktivität berechnet und von hoher bis niedriger Aktivität wie folgt definiert: Chitinaseaktivität: 0,15 U/mg, 0,05 U/mg; 0,00 U/mg; Lipaseaktivität: 0,27 U/mg; 0,12 U/mg; 0,04 U/mg; Cellulaseaktivität: 0,09 U/mg; 0,02 U/mg; 0,00 U/mg; Xylanaseaktivität: 1,03 U/mg; 0,58 U/mg; 0,23 U/mg.

2.3 Test der Pilzisolate auf ihre antifungale Wirkung gegen phyto- und humanpathogene Pilze

Insgesamt wurden 295 Pilzisolate (4.3.1) in einem vorläufingem Sceening auf ihre antifungale Eigenschaft gegen sieben phytopathogene Pilze, Fusarium graminearum, Fusarium oxysporum, Fusarium oxysporum f. sp. cubense, Bipolaris sorokiniana, Stagonospora nodorum, Magnaporthe oryzae und Cochliobolus heterostrophus (4.3.2) und gegen einen humanpathogenen Pilz, Candida albicans (4.3.2), getestet. Die Inhibierung gegen phytopathogenen Pilze wurde mittels der Dual Culture Methode getestet (4.4.5), die Inhibierung gegen Candida albicans wurde mit der Overlay Methode getestet (4.4.6). Es wurden 15 Pilzisolate mit einer Wuchsreduktion gegen unterschiedliche phytopathogene Pilze identifiziert (Tabelle 3). Es haben acht Pilzsisolate (SF14, SF22.3, SF31, Fsh16.1, Fsh24, Fi8, Fi21) eine allgemeine inhibitorische Wirkung gegen jeweils einen phytopathogenen Pilz. Vier Pilzisolate (Fsh8, FL7, FW16, FH101) weisen eine allgemeine inhibitorische Wirkung gegen jeweils zwei phytopathogene Pilze auf. Das Pilzisolat Fsh15 zeigte eine allgemeine inhibitorische Wirkung gegen *F*. oxysporum, F. oxysporum f. sp. cubense und gegen M. oryzae. Die Abbildungen zu den Plattentests sind im Anhang IV zu finden. Es wurde kein Pilzisolat identifiziert, welches eine antifungale Wirkung gegen F. graminearum aufweist.

Tabelle 3: Pilzisolate der Pilzsammlung mit antifungaler Wirkung gegen verschiedene phytopathogene Pilze (F. oxysporum, F. oxysporum f. sp. cubense, M. oryzae, B. sorokiniana, S. nodorum, C. heterostrophus) und gegen den humanpathogenen Pilz C. albicans. Die Inhibition gegen die phytopathogenen Pilze wurden mittels Dual Culture Methode (4.4.5) und die Inhibition gegen C albicans wurde mittels Overlay Methode (4.4.6) bestimmt. Die Plattentests wurden n=1 durchgeführt. Das Symbol + zeigt die Inhibition an. Bei keinem Symbol wurde keine Inhibition detektiert.

	<i>F</i> .	<i>F</i> .	М.	В.	<i>S</i> .	С.	С.
	oxysporum	oxysporum f.	oryzae	sorokiniana	nodorum	heterostrophus	albicans
		sp. cubense					
SF14		+					
SF22.3				+			
SF31				+			
SF32	+		+	+	+		+
Fsh8	+	+					
Fsh15	+	+	+				
Fsh16.1			+				
Fsh24			+				
FL7			+	+			
Fi8		+					
Fi21	+						
FW16		+			+		
FW57				+			
FH4						+	
FH101					+	+	

Das Pilzisolat SF32 zeigte eine allgemeine antifungale Wirkung gegenüber fast allen getesteten phyto- und humanpathogenen Pilzen, *F. oxysporum*, *B. sorokiniana*, *S. nodorum*, *M. oryzae* und *C. albicans* (Tabelle 3, Abbildung 7). SF32, phylogenetisch identifiziert (4.1.8) als *Acrophialophora levis*, ist das einzige Pilzisolat in der Pilzsammlung, welches eine inhibitorische Wirkung gegen den humanpathogenen Pilz *C. albicans* zeigt.



Abbildung 7: Test auf die antifungale Wirkung des Pilzisolates SF32 gegen die pflanzenpathogenen Pilze F. oxysporum, B. sorokiniana, S. nodorum und M. oryzae mittels der Dual Culture Methode und gegen den humanpathogenen Pilz C. albincans mittels der Overlay Methode A) Inhibitionstest von F. oxysporum gegen SF32 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von F. oxysporum (rechts) nach 7 dpi. B) Inhibitionstest von B. sorokiniana gegen SF32 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von B. sorokiniana (rechts) nach 7 dpi C) Inhibitionstest von S. nodorum gegen SF32 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von S. nodorum (rechts) nach 8 dpi. D) Inhibitionstest von M. oryzae gegen SF32 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von M. oryzae (rechts) nach 5 dpi. E) Inhibitionstest von C. albicans gegen SF32 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von C. albicans (rechts) nach 1 dpi. Die Anzucht der Dual Culture Methode und der Overlay Methode erfolgte n=1.

2.4 Auswahl der drei Pilzisolate für weitere Untersuchungen

Nach Klassifizierung der Pilzsammlung und enzymatischen Aktivitätstests wurden drei Pilzisolate zur weiteren Bearbeitung ausgewählt (Abbildung 8). Fsh102, *Aspergillus sydowii* wurde aufgrund seiner hohen Xylanase- und Cellulaseaktivität ausgesucht (2.2.2). Das Isolat weist Aktivitäten bei allen vier getesteten Enzymen auf (4.4.8). Bisher ist kein Isolat von *Aspergillus sydowii* aus Vietnam bekannt, andere Isolate von dieser Art sind kaum

untersucht. Das Isolat FW57, welches durch die DSMZ Braunschweig als *Humicola fuscoatra* identifiziert wurde (4.2.1), weist eine hohe Chitinaseaktivität auf (0,11 U/mg). *H. fuscoatra* ist ein weitgehend unerforschter Ascomycet. Das Genom von *H. fuscoatra* wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht sequenziert. Das Isolat FW16.1, durch die DSMZ Braunschweig als *Fusarium solani* identifiziert (4.2.1), wurde ausgewählt wegen seiner hohen Cellulaseaktivität (0,06 U/mg) und der es noch nicht eingehend erforscht ist. Für alle drei Isolate wurde bei der Genbank (NCBI) ein *Bioproject* (PRJNA413482) erstellt mit den untergeordneten *Biosamples* für jedes Isolat, in dem die Genom von FW57 wurde mit der Nummer SAMN08024727, das Genom von FW57 wurde mit der Nummer SAMN07749915 und das Genom von FW16.1 wurde mit der Nummer SAMN07749916 hinterlegt und ist öffentlich zugänglich.



Fsh102 - Aspergillus sydowii FW57 - Humicola fuscoatra FW16.1- Fusarium solani

Abbildung 8: Phänotyp von drei Pilzisolaten, die für die weitere Charakterisierung ausgewählt wurden. (A) *A. sydowii* auf PDA Medium (B) *H. fuscoatra* auf Mandels Medium (C) *F. solani* auf PDA Medium.

2.5 Das Pilzisolat Fsh102 – Aspergillus sydowii

Bei Fsh102 konnten jeweils zwei Endocellulasen (EC 3.2.1.4), zwei Exocellulasen (EC 3.2.1.91) und zwei Endo-1,4- β -Xylanasen (EC 3.2.1.8) mittels Zymogramm (4.6.5) und LC/MS-MS identifiziert werden. Nach Klonierung der vier Cellulasen und der beiden Xylanasen wurden diese in *E. coli* heterolog exprimiert.

2.5.1 Identifizierung der aktiven Cellulasen des Pilzisolates Fsh102 mittels Zymogramm und LC/MS-MS

Die Identifizierung der zwei Endocellulasen (EC 3.2.1.4) und der zwei Exocellulasen (EC 3.2.1.91) erfolgte mit einem Zymogramm (4.6.5) und einer LC/MS-MS Analyse (4.2.2). Der konzentrierte Überstand (4.6.5) von zwei Tage alten Kulturen (4.4.2) in CMC Medium

(4.4.7) wurde auf das Zymogramm (4.6.5) aufgetragen. Nach der Färbung des Gels mit Kongorot (4.6.5) wurden die Spuren mit positiven Reaktionen (Abbildung 9), die als Banden sichtbar waren, in ihrer kompletten Länge ausgeschnitten und mit Hilfe der LC/MS-MS (4.2.2) analysiert.



Abbildung 9: Zymogramm der Cellulaseaktivität. Gesamtextrakt, aufgetrennt über eine 12,5% (w/v) SDS-PAGE mit 1% (w/v) CMC. Die Cellulose im Gel wurde mit 0,1% (w/v) Kongorot angefärbt. Bahn 1: Der Gesamtüberstand des Pilzisolates Fsh102 nach 24 h Inkubation in 1% (w/v) CMC Medium. Die hellen Bereiche (Pfeile) zeigen verminderten CMC Gehalt. M: *Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland). Die Molekulargewichte des Standards sind rechts in kDa angegeben

Die aus der Analyse resultierenden Peptide wurden mittels des Referenzgenoms von A. sydowii (4.7.2) entsprechenden Proteinen zugeordnet. Die vollständigen Ergebnisse der LC/MS-MS Analyse sind im Anhang V aufgelistet. Die Annotation der Cellulasen erfolgte mit *BLASTp* (4.7.5). Es wurden neben zwei Endo- β -1,4-Glucanasen (Endocellulasen) und drei 1,4-β-Glucan-Cellobiohydrolyase (Exocellulasen) außerdem noch eine Endo-1,3- β -Glucanase, eine Glucan-Endo-1,6-β-Glucosidase und zwei Glucan-Endo-1,3-β-Glucosidasen gefunden (Anhang V).

Es wurde mit den beiden Endocellulasen Endo1 (Aspsy1|91872|gm1.8417_g), Endo2 (Aspsy1|56986|fgenesh1_pm.3_#_949) sowie mit den zwei Exocellulasen Exo1 (Aspsy1|59845|fgenesh1_pm.9_#_81) und Exo2 (Aspsy1|41148|fgenesh1_kg.2_#_928_# _Locus359v1rpkm531.30) weiter gearbeitet (Tabelle 4).

Tabelle 4: Die über ein Zymogramm und LC/MS-MS identifizierten Cellulasen im Genom von *A. sydowii.* Angegeben sind die Aminosäureanzahl (AAs), das Molekulargewicht (MW), die Anzahl der Glykosylierungsstellen (O-Glykosylierung und N-Glykosylierung), die Länge des Signalpeptids (SP), die Familie der Glykosidhydrolasen (GH) sowie die Identifikation mit der Proteindatenbank von *A. sydowii* vom JGI (*Joint Genome Institut*, 4.7.2).

Bezeichnung	AAs	MW	0-	N-	SP	GH	Identifikation (4.7.2)
		(kDa)	Glykosylierung	Glykosylierung	Länge	Gruppe	
Endo1	328	36,1	2	2	17	5	Aspsy1 91872 gm1.8417_
Endo2	450	47,4	10	2	21	7	g Aspsy1 56986 fgenesh1_p m.3 # 949
Exo1	462	49,2	8	1	17	7	Aspsy1 59845 fgenesh1_p m.9_#_81
Exo2	453	48,7	13	1	16	7	Aspsy1 41148 fgenesh1_k g.2_#_928_#_Locus359v 1rpkm531.30

Alle vier Cellulasen wurden durch den BLASTp (4.7.5) eingeordnet. Endol (Tabelle 4) hat ein Molekulargewicht von 36,1 kDa und weist zu Endo-β-1,4-Glucanase B von A. ustus (KIA75750.1) 80% identische Aminosäuren auf. Endo2 (Tabelle 4) hat ein Molekulargewicht von 47,3 kDa besitzt zur Endo-1,4-β-Glucanase von A. nidulans (AAM54071.1) 71% identische Aminosäuren. Exo1 (Tabelle 4) hat ein Molekulargewicht von 49,2 kDa und weist zur 1,4-β-D-Glucan-Cellobiohydrolyase von A. nidulans (AAM54069.1) 89% identische Aminosäuren auf. Exo2 (Tabelle 4) hat ein Molekulargewicht von 48,7 kDa und besitzt zur 1,4-beta-D-Glucan-Cellobiohydrolyase von A. ochraceoroseus (KKK24942.1) 79% identische Aminosäuren. Endo1 gehört der Glykosidhydrolasen (GH) Gruppe GH5 an. Endo2, Exo1 und Exo2 gehören der GH Gruppe GH7 an. Die Ermittlung des Signalpeptids, welches für die Sekretion des Proteins innerhalb der Zelle wichtig ist, erfolgte über das Programm SignalP 4.1 (4.7.5). Das Signalpeptid aller Enzyme ist zwischen 16 und 21 Aminosäuren lang (Tabelle 4) und befindet sich am N-terminalen Ende des Proteins. Die Anzahl der O-Glykosylierungen liegen zwischen zwei und dreizehn, während ein oder zwei N-Glykolysierungen vorhanden sind (Tabelle 4). Die genauen Positionen der Glykosylierungen sind in Anhang VII aufgelistet.

2.5.2 Klonierung der Gene Endo1, Endo2, Exo1 und Exo2 von Fsh102 mit und ohne Signalpeptid

Zur Klonierung der Cellulasen wurde RNA aus dem Myzel von *A. sydowii* isoliert (4.5.2), welches im induzierenden Medium mit CMC (4.4.7) angezogen wurde, verwendet, um Introns zu vermeiden. Zur cDNA Synthese (4.5.3) wurden *random hexamer* Primer (4.5.3) verwendet. Zur Amplifikation (4.5.5) aus der cDNA von *A. sydowii* des Genes Endo1 wurden die Primer Endo1_G [F] und Endo1_G [R] und zur Amplifikation des Genes Endo2 wurden die Primer Endo2_G [F] und Endo2_G [R] (4.1.4, Tabelle 5) verwendet. Für die

Amplifikation (4.5.5) des Vektors pET28b (4.1.7) wurde zur Klonierung der Endo1 die Primer Endo1_V [F] und Endo1_V [R] und für die Klonierung der Endo2 die Primer Endo2_V [F] und Endo2_V [R] (4.1.4) eingesetzt. Zur Amplifikation (4.5.5) aus der cDNA (4.5.3) von *A. sydowii* des Genes Exo1 wurden die Primer Exo1_G [F] und Exo1_G [R], zur Amplifikation des Genes Exo2 wurden die Primer Exo2_G [F] und Exo2_G [R] (4.1.4, Tabelle 5) verwendet. Der Vektor pET28b (4.1.7) wurde für die Klonierung der Exo1 mit den Primern Exo1_V [F] und Exo1_V [R] und für die Exo2 die Primer Exo2_V [F] und Exo2_V [R] (4.1.4, Tabelle 6) amplifiziert. Ein Aliquot der jeweiligen PCR Produkte wurde mittels Gelelektrophorese (4.6.1) überprüft. Für die Endo1 wurde eine Größe von 987 bp erwartet was in etwa 1000 bp auf dem Gel entsprach, für die Endo2 wurde eine Größe von 1353 bp erwartet, für die Exo1 wurde eine Größe von 1398 bp erwartet und für Exo2 wurde eine Größe von 1363 bp erwartet. Alle drei Größen entsprachen den auf dem Gel detektierten Banden. Die PCR Produkte wurden mit *Dpn*I verdaut (4.5.5), um die parentale DNA abzubauen.

Die jeweils amplifizierten Vektorfragmente von pET28b und die amplifizierten zugehörenden DNA Fragmente der Gene Endo1, Endo2, Exo1 und Exo2 wurden in *10-\beta-Competent E. coli* Zellen (4.3.3) transformiert (4.5.7) und ausplattiert. Die auf dem Selektionsmedium (4.3.3) gewachsenen Kolonien wurden vermehrt (4.5.7) und die Plasmide isoliert (4.5.4). Zur Überprüfung des Einbaus des Inserts im Vektor wurden die Primer pET28b [F] und pET28b [R] (4.1.4) verwendet. Die positive Klone Endo1+SP, Endo2+SP, Exo1+SP und Exo2+SP mit Insert wurden mit diesen Primern pET28b [F] und pET28b [R] sequenziert (4.1.8) und *in silico* mit dem Programm Geneious (4.7.5) auf Fehler in ihrer Sequenz auf.

Die Konstrukte Endo2+SP, Exo1+SP und Exo2+SP wurden auch ohne Signalpeptid (2.5.1) amplifiziert. Zur Amplifikation des Gens Endo2-SP wurden die Primer Endo2_w/o_SP [F] und Endo2_w/o_SP [R] (4.1.4, Tabelle 5), für das Konstrukt Exo1-SP die Primer Exo1_w/o_SP [F] und Exo1_w/o_SP [R] (4.1.4, Tabelle 5) und für das Konstrukt Exo2-SP die Primer Exo2_w/o_SP [F] und Exo2_w/o_SP [R] (4.1.4, Tabelle 5) verwendet. Dabei wurden die Konstrukte mit Signalpeptid, Endo2+SP, Exo1+SP und Exo2+SP (Tabelle 5) als Template für die PCR (4.5.5) verwendet. Bei der Amplifikation wurde der komplette Vektor sowie das Gen ohne Signalpeptid amplifiziert. Das Konstrukt Endo1-SP_syn wurde synthetisch hergestellt (4.1.5). Die amplifizierten Konstrukte Endo2-SP, Exo1-SP, Exo2-SP und das synthetisch hergestellt Konstrukt von Endo1-SP_syn (Tabelle 5) wurden in

10-β-Competent E. coli Zellen (4.3.3) transformiert (4.5.7). Nach Wachstum der Kolonien auf Selektionsmedium (4.3.3) wurden die Bakterien vermehrt (4.5.7) und die Plasmide isoliert (4.5.4). Mit den Primern pET28b [F] und pET28b [R] (4.1.4) wurden die Kolonien auf Einbau des Inserts überprüft. Anschließend wurden die positiven Klone sequenziert, um die Sequenz *in silico* zu überprüfen (4.7.5). Der im Konstrukt eingebaute N-terminale Polyhistidin-Tag (His₆-Tag) ist als Fusion vorhanden.

Tabelle 5: Klonierte Konstrukte aus Vektor pET28b und den Genen Endo2, Exo1 und Exo2 mit Signalpeptid (+SP) und ohne Signalpeptid (-SP) mit den jeweilig verwendeten Primern (4.1.4). Das Konstrukt Endo1 ohne Signalpeptid wurde synthetisch (syn) bei der Firma Biocat (4.1.5) hergestellt.

Gen	Primer für Konstrukt mit	Konstrukt mit	Primer für Konstrukt	Konstrukt ohne
	Signalpeptid	Signalpeptid	ohne Signalpeptid	Signalpeptid
Endo1	Endo1_G [F] und [R]	Endo1+SP	-	Endo1-SP_syn
	Endo1_V [F] und [R]			
Endo2	Endo2_G [F] und [R]	Endo2+SP	Endo2_w/o_SP [F]	Endo2-SP
	Endo2_V [F] und [R]		Endo2_w/o_SP [R]	
Exo1	Exo1_G [F] und [R]	Exo1+SP	Exo1_w/o_SP [F]	Exo1-SP
	Exo1_V [F] und [R]		Exo1_w/o_SP [R]	
Exo2	Exo2_G [F] und [R]	Exo2+SP	Exo2_w/o_SP [F]	Exo2-SP
	Exo2_V [F] und [R]		$Exo2_w/o_SP[R]$	

2.5.3 Heterologe Expression von Endo1, Endo2, Exo1 und Exo2 von Fsh102 im prokaryotischen System *E. coli*

Die Konstrukte Endo1+SP, Endo2+SP, Exo1+SP und Exo2+SP (2.5.2) wurden in die *E. coli* Stämmen BL21 (DE3), *Rosetta-gami*TM 2 (DE3) und *OverExpress*TM *C41* (DE3) (4.3.3) transformiert (4.5.7) und die einklonierten Endo- und Exocellulasen bei drei Temperaturen (22°C, 28°C und 37°C) exprimiert. Proben wurden zu den drei Zeitpunkten T₁: 1 h, T₂: 4 h und T₃ 16 h genommen. Nach dem Aufschluss der Zellen (4.6.6) und anschließender Auftrennung der löslichen (LF) und der unlöslichen (UF) Fraktion über eine SDS-PAGE (4.6.3) war eine Bande der Endo1 bei einem Molekulargewicht bei etwa 36 kDa, der Endo2 bei einem Molekulargewicht bei etwa 52 kDa, der Exo1 bei einem Molekulargewicht bei Fraktion (UF) sichtbar. Die detektierten Molekulargewicht entsprachen den Erwartungen. In der löslichen Fraktion (LF) konnte keine Bande detektiert werden.

Die Konstrukte ohne Signalpeptid Endo1-SP_syn, Endo2-SP, Exo1-SP und Exo2-SP (Tabelle 5) wurden in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert (4.5.7) und, wie oben beschrieben, exprimiert. Aufgrund des fehlenden Signalpeptids haben die exprimierten Proteine Endo1 (38,4 kDa), Endo2 (49,1 kDa), Exo1 (51,1 kDa) und Exo2 (50,7 kDa) geringere Molekulargewichte als mit Signalpeptid. Nach dem Aufschluss der Zellen (4.6.6) und dem

Auftrennen der Proteine über eine SDS-PAGE (4.6.3) wurden Banden mit den erwarteten Molekulargewichten in der unlöslichen Fraktion (UF) detektiert (Abbildung 10 A). Mit einem immunologischen Nachweis mit Hilfe eines His₆-Tag spezifischen Antiserums und mit alkalischer Phosphatase gekoppeltem sekundärem Antiserum (4.6.8) der Proteine im Western-Blot (4.6.8) konnten die Proteine aus der unlöslichen Fraktion bei dem berechneten Molekulargewicht auf der Membran über NBT/BCIP Substratumsetzung (4.6.8) nachgewiesen werden (Abbildung 10 B).



Abbildung 10: Expression der Endo- und Exocellulasen ohne Signalpeptid in *E. coli* BL21 (A) aufgetrennt auf einer 12,5% (w/v) SDS-PAGE mit *Coomassie Brilliant Blue*-Färbung und (B) Detektion über Western-Blot, mit dem Antiserum RGS-His Antibody (detektiert wurde über alkalische Phosphatase gekoppteltem anti-Maus Antiserum und NBT/BCIP Substratumsetzung). Bahn 1: Endo 1 (38,4 kDa), Bahn 2: Endo2 (49,1 kDa), Bahn 3: Exo1 (51,1 kDa), Bahn 4: Exo2 (50,7 kDa). M: *Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland). Die Molekulargewichte des Standards sind rechts in kDa angegeben.

2.5.4 Identifizierung aktiver Xylanasen von Fsh102 mittels Zymogramm und LC/MS-MS

Die Identifizierung der in dieser Arbeit untersuchten Endo-1,4- β -Xylanasen erfolgte mittels Zymogramm (4.6.5) und LC/MS-MS Analyse (4.2.2). Fsh102 wurde unter induzierten Bedingungen mit Xylan angezogen und der Überstand mit den sekretierte Enzymen konzentriert (4.4.8). Der Überstand wurde auf ein Zymogramm mit 0,5 (w/v) Xylan (4.6.5) aufgetragen. Nach der Färbung des Gels mit 0,1% (w/v) Kongorot (4.6.5) waren vier Banden mit abgebautem Xylan auf dem Gel zu erkennen (Abbildung 11). Es wurden je Anzuchtszeit (24 h, 48 h und 72 h) vier identische Aktivitätspunkte bei Molekulargewichten zwischen 25 und 80 kDa sichtbar (Abbildung 11, Pfeile a-d). Die Banden a bis d jedes Zeitpunktes wurden gewählt und mittels LC/MS-MS (4.2.2) analysiert. Die Proteine wurden mittels des Referenzproteoms von *A sydowii* der JGI Datenbank (4.7.2) identifiziert und diese dann mit *BLASTp* (4.7.5) annotiert. Die identifizierten Proteine der vier Zeitpunkte sind identisch und

sind im Anhang VI aufgelistet. Es konnten zwei redundante Endo-1,4- β -Xylanasen (Xylanase I: Aspsy1168372|estExt_Genewise1.C_1_t 60491 und Xylanase II: Aspsy1 63902|estExt_fgen esh1_pg.C_1_t20379) und eine Exo-1,4- β -Xylanase (Aspsy1 84747|gm1.1430_g) identifiziert werden (Tabelle 6).



Abbildung 11: Zymogramm der Xylanaseaktivität, aufgetrennt über eine 12,5% (w/v) SDS-PAGE mit 1% (w/v) Xylan. Das Xylan im Gel wurde mit 0,1% (w/v) Kongorot angefärbt. Bahn 1: Der Gesamtüberstand des Pilzisolates Fsh102 nach 24 h Inkubation in 1% (w/v) Xylan Medium. Die Bereiche mit Xylanaseaktivität (a-d) bleiben ungefärbt. M: *Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland). Die Molekulargewichte des Standards sind links in kDa angegeben.

In dieser Arbeit wurden die zwei nicht redundanten Endo-1,4-β-Xylanasen weiter analysiert. Die Xylanase I (Tabelle 6) hat ein Molekulargewicht von 35,4 kDa und hat zur Xylanase von *Aspergillus nidulans* FGSC A4 XYN1 (XP_661217) 83% identische Aminosäuren. Xylanase II (Tabelle 6) hat ein Molekulargewicht von 23,5 kDa hat zur Xylanase von *Aspergillus nidulans* FGSC A4 xlnC (Q00177.1) 69% identische Aminosäuren. Xylanase I ist Mitglied der Glykosidhydrolasen (GH) Gruppe GH11, Xylanase II ist Mitglied der GH Gruppe GH10.

Tabelle 6: Die über ein Zymogramm und LC/MS-MS identifizierten Xylanasen im Genom von *A. sydowii*. Angegeben sind die Aminosäureanzahl (AAs), das Molekulargewicht (MW), die Glykosylierung (O-Glykosylierung und N-Glykosylierung), die Länge des Signalpeptids (SP), die Familie der Glykosidhydrolasen (GH) sowie deren Identifikation mit der Proteindatenbank von *A. sydowii* vom JGI (4.7.2).

Bezeichnung	AAs	MW	0-	N-	Länge	GH	Identifikation (4.7.2)
		(kDa)	Glykosylierung	Glykosylierung	SP	Gruppe	
Xylanase I	220	23,5	2	1	19	11	Aspsy1
							168372 estExt_Genewi
							se1.C_1_t60491
Xylanase II	328	35,4	2	2	21	10	Aspsy1
							63902 estExt_fgenesh1
							_pg.C_1_t20379

Das Signalpeptid, als Signal für den Transportmechanismus des Proteins innerhalb der Zelle, der Xylanase I eine Länge von 19 Aminosäuren, das der Xylanase II 21 Aminosäuren. Beide Signalpeptide befinden sich am N-Terminus. Die Ermittlung des Signalpeptids erfolgte über das Programm SignalP 4 (4.7.5).

Die Proteine Xylanase I und Xylanase II wurden auf Glykosylierung getestet (4.7.5). Die Xylanase I ist an einer Aminosäure N-glykosyliert und an zwei Aminosäuren O-glykosyliert. Die Xylanase II ist an zwei Aminosäuren N-glykosyliert und an zwei Aminosäuren O-glykosyliert. Die genauen Positionen der Aminosäuren befinden sich im Anhang VII.

2.5.5 Klonierung der Xylanase I und Xylanase II von Fsh102 mit und ohne Signalpeptid als His6-Tag Fusionsprotein

Um beide Xylanasen mit Signalpeptid (2.5.4) in den Vektor pET28b (4.1.7) zu klonieren, wurde zunächst aus dem Pilzisolat A. sydowii RNA aus Myzel isoliert (4.5.2), welches im induzierendem Medium mit 1% (w/v) Xylan (4.4.7) gewachsen war, um Introns zu vermeiden. Die cDNA wurde mit den Primern random hexamer (4.5.3) synthetisiert. Das Gen der Xylanase I wurde mit den Primern X102_1_G [F] und X102_1_G [R] und das Gen der Xylanase II wurde mit den Primern X102_2_G [F] und X102_2_G [R] (4.1.4) amplifiziert (4.5.5). Für die Amplifikation (4.5.5) des Vektors pET28b (4.1.7) wurde für die Klonierung der Xylanase I die Primer X102_1_V [F] und X102_1_V [R] und für die Klonierung der Xylanase II die Primer X102_2_V [F] und X102_2_V [R] (4.1.4) verwendet. Ein Aliquot der PCR-Produkte wurde mittels Gelelektrophorese (4.6.1) überprüft. Für das Amplifikat des Vektors pET28b wurde eine Größe von 5355 bp erwartet, was den etwa 6000 bp auf dem Gel entsprach. Für die Xylanase I wurde ein Amplifikat mit einer Größe von 660 bp erwartet, was den etwa 700 bp auf dem Gel entsprach, für die Xylanase II wurde eine Größe von 984 bp erwartet, was der detektierten Bande von etwa 1000 bp auf dem Gel entsprach. Die PCR-Produkte wurden mit DpnI verdaut (4.5.5), um die restliche DNA, welche durch den Organismus produziert wurde, abzubauen. Der im Konstrukt eingebaute N-terminale His6-Tag ist als Fusion vorhanden und diente der anschließenden Affinitätschromatographie (2.5.7).

Das Amplifikat des Vektors pET28b und die jeweils amplifizierten DNA Fragmente der Gene Xylanase I und Xylanase II wurden in *10-\beta-competent E. coli* Zellen (4.3.3) transformiert (4.5.7). Von den auf dem Selektionsmedium (4.3.3) entstandenen Kolonien wurden die Bakterien vermehrt (4.5.7) und die Plasmide isoliert (4.5.1). Mit den Primern pET28b [F] und pET28b [R] (4.1.4) wurde überprüft, ob das Insert im Vektor vorhanden

war. Die positiven Klone Xyl_I+SP und Xyl_II+SP mit Insert wurden unter Verwendung der Primer pET28b [F] und pET28b [R] sequenziert (4.1.8) und *in silico* mit dem Programm Geneious (4.7.5) auf Fehler in ihrer Sequenz kontrolliert. Beide Konstrukte wiesen keine Introns und keine Fehler in ihrer Sequenz auf.

Die Konstrukte Xyl_I+SP und Xyl_II+SP wurden auch ohne Signalpeptid (2.5.4) amplifiziert. Zur Amplifikation des Konstrukts Xyl_I-SP wurden die Primer Xyl1_w/o_SP [F] und Xyl1_w/o_SP [R] und für das Konstrukt Xyl_II-SP die Primer Xyl2_w/o_SP [F] und Xyl2_w/o_SP [R] verwendet (4.1.4). Dabei wurden die Konstrukte Xyl_I+SP und Xyl_II+SP als Template für die PCR (4.5.5) verwendet. Bei der Amplifikation wurde der komplette Vektor sowie das Gen ohne Signalpeptid amplifiziert. Die amplifizierten Fragmente Xyl_I-SP und Xyl_II-SP wurden in $10-\beta$ -competent E. coli Zellen (4.3.3) transformiert (4.5.7). Die auf dem Selektionsmedium (4.3.3) gewachsenen Bakterien wurden vermehrt (4.5.7) und die Plasmide isoliert (4.5.4). Durch Sequenzierung (4.1.8) der isolierten Plasmide mit den Primern pET28b [F] und pET28b [R] (4.1.4) wurde die Sequenz auf den Einbau des Inserts ohne Signalpeptid überprüft. Die Konstrukte wurden erfolgreich ohne Signalpeptid kloniert.

2.5.6 Heterologe Expression der Xylanase I und der Xylanase II von Fsh102 im prokaryotischen System *E. coli*

Die Konstrukte Xyl_I+SP und Xyl_II+SP (2.5.5) wurden in die *E. coli* Stämme BL21 (DE3), *Rosetta-gami*TM 2 (DE3) und *OverExpress*TM *C41* (DE3) (4.3.3) transformiert (4.5.7) und diese bei drei Temperaturen (22°C, 28°C und 37°C) exprimiert (4.6.6). Proben wurden zu drei Zeitpunkten (T₁:1 h, T₂: 4 h, und T₃: 16 h) genommen. Nach Aufschluss der Zellen (4.6.6) und anschließender SDS-PAGE (4.6.3) war eine Bande bei der Expression der Xylanase I mit einem Molekulargewicht von etwa 28 kDa und eine Bande bei Expression der Xylanase II mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa in der unlöslichen Fraktion (UF) sichtbar. In der löslichen Fraktion (LF) konnte keine Bande detektiert werden.

Die Konstrukte ohne Signalpeptid Xyl_I-SP und Xyl_II-SP wurden in BL21 (DE3) *E. coli* Zellen (4.3.3) transformiert (4.5.7) und wie oben beschrieben exprimiert (4.6.6). Aufgrund des fehlenden Signalpeptids hat das exprimierte Protein der Xylanase I ein berechnetes Molekulargewicht von 25,5 kDa. Das exprimierte Protein der Xylanase II hat ein berechnetes Molekulargewicht von 37.1 kDa. Die Expression der Xylanasen ohne Signalpeptid wurde, wie bei den anderen *E. coli* Stämmen beschrieben, exprimiert (4.6.6). Nach dem Aufschluss der Zellen (4.6.6) und dem Auftragen auf eine SDS-PAGE (4.6.3) wurde eine Bande mit einem Molekulargewicht, das der Xylanase I entspricht, bei etwa 25 kDa (Abbildung 12 A) und eine Bande mit einem Molekulargewicht, das der Xylanase II entspricht, bei etwa 40 kDa (Abbildung 12 B) in der unlöslichen Fraktion (UF) sowie in der löslichen Fraktion (LF) detektiert. Eine deutliche Bande mit dem entsprechenden Molekulargewicht ist bei Proben des Zeitpunktes T3, nicht aber bei Proben des Zeitpunktes T0 detektierbar. In der T0 Probe ist bei Xylanase I und bei der Xylanase II in beiden Fraktionen (UF und LF) eine schwache Bande mit dem entsprechenden Molekulargewicht zu sehen.



Abbildung 12: Elektrophoretische Auftrennung der Expression von (A) Xylanase I und (B) Xylanase II in *E. coli* BL21 in der löslichen Fraktion (LF) und unlöslichen Fraktion (UF). Das berechnete Molekulargewicht der Xylanase I beträgt 25,5 kDa ohne Signalpeptid. Das berechnete Molekulargewicht der Xylanase II beträgt 37,1 kDa ohne Signalpeptid. Die Proteine wurden mit *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt.

Bahn 1: Expression bei 37°C, Bahn 2: Expression bei 28°C, Bahn 3: Expression bei 22°C, T_0 : Zeitpunkt 0, T_3 : 16 h nach Induktion der Expression mit IPTG. M: *Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland). Die Molekulargewichte des Standards sind links in kDa angegeben.

Die stärksten Banden bei etwa 25 kDa (Xylanase I, Abbildung 12 A) bzw. 37 kDa (Xylanase II, Abbildung 12 B) wurden bei Expression in der löslichen Fraktion (LF) bei 22°C nach 16 h) erhalten.

2.5.7 Reinigung der heterolog exprimierten Xylanasen I und Xylanase II über Affinitätschromatographie

Die Reinigung der beiden in *E. coli* BL21 heterolog exprimierten Xylanasen I und II ohne Signalpeptid (2.5.6) erfolgte über eine Affinitätschromatographie mit Ni-NTA Agarose (4.6.7) unter nativen Bedingungen. Dabei wurde der Rohextrakt des jeweils bei 22°C 16 h exprimierten Proteins (4.6.6) einer 500 mL Kultur auf die Säule gegeben, um das Protein mittels His₆-Tags an die Säule zu binden. Der Durchfluss wurde aufgefangen (=Durchfluss). Es folgte ein Waschschritt, um die Proteine ohne His₆-Tag von der Säule zu eliminieren. Der Durchfluss des Waschschrittes (=Waschschritt) wurde aufgefangen. Danach folgte die Elution 1, bei der mit 3,5 mL Elutionspuffer das Protein von der Säule gewaschen wurde (=Elution 1). Eine zweite Elution löste mit erhöhter Stringenz die mit der Elution 1 nicht eluierten Proteine zur Regeneration der Säule (=Elution 2). Proteine aus Aliquots der heterologen Expression der Zeitpunkte T₀ und T₁ der löslichen (LF) und unlöslichen Fraktion (UF, 2.5.6) sowie der Reinigungsschritte (Rohextrakt, Durchfluss, Waschritt und Elution 1) wurden mit Hilfe der SDS-PAGE (4.6.3) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Hilfe von *Coomassie Brillant Blau* (4.6.3) im Gel sichtbar gemacht (Abbildung 13). Die Xylanase I ist mit einem berechneten Molekulargewicht von 25,5 kDa (Abbildung 13 A) und die Xylanase II mit einem berechneten Molekulargewicht von 37,1 kDa (Abbildung 13 B) im SDS-PAGE jeweils als Bande aus der Elution 1 sichtbar.



Abbildung 13: Elektrophoretische Auftrennung verschiedener Proteinfraktionen mit den heterolog exprimierten (A) Xylanase I und (B) Xylanase II. Die Enzyme wurden über eine Ni-NTA Säule gereinigt und über eine 12,5% (w/v) SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Färbung wurde *Coomassie Brilliant Blue* verwendet. Das berechnete Molekulargewicht der Xylanase I ohne Signalpeptid beträgt 25,5 kDa. Das berechnete Molekulargewicht der Xylanase II ohne Signalpeptid beträgt 37,1 kDa.

Die Banden der Proteine Xylanase I und Xylanase II aus der Elution 1 (Abbildung 13) wurden ausgeschnitten und mittels LC/MS-MS (4.2.2) überprüft. Die in der SDS-PAGE (4.6.3) sichtbaren Banden der Xylanase I und Xylanase II entsprechen den beiden Enzymen Xylanase I und Xylanase II. Die Verifizierung durch die LC/MS-MS befindet sich im Anhang VIII.

Bahn 1: UF der Expression T₀, Bahn 2: LF der Expression T₀ bei 22°C, Bahn 3: UF der Expression T₁ bei 22°C nach 16 h nach Induktion mit IPTG, Bahn 4: LF der Expression T₁ bei 22°C nach 16 h Induktion mit IPTG, Bahn 5: Extrakt der LF nach 16 h bei 22°C, Bahn 6: Durchfluss des der LF, Bahn 7: Durchfluss des Waschschrittes, Bahn 8: Elution 1 des Proteins . M: *Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland). UF=unlösliche Fraktion, lösliche Fraktion=LF Die Molekulargewichte des Standards sind rechts in kDa angegeben

2.5.7.1 Aktivitätsbestimmung der reinen Xylanase I und Xylanase II

Von den Reinigungsschritten (4.6.7) wurde der Proteingehalt (4.4.10) und die spezifische Aktivität (4.4.8) mit der DNS Methode (4.4.8) analysiert (Tabelle 7). Die spezifische Aktivität des Rohextraktes der Xylanase I beträgt 33,70 U/mg. Das eluierte reine Protein Xylanase I hat eine spezifische Aktivität von 181,14 U/mg, was einer Ausbeute an reinem Protein von 55% aus dem Rohextrakt und einen Reinigungsquotienten von 5,41 entspricht. Der Rohextrakt der Xylanase II weist mit 57,09 U/mg eine doppelt so hohe spezifische Aktivität wie die Xylanase I auf. Die spezifische Aktivität der reinen eluierten Xylanase II beträgt 106,08 U/mg was einer Ausbeute von 27% des Gesamtextraktes entspricht. Der Reinigungsquotient der reinen Xylanase II beträgt 1,96. Bei der Reinigung der Xylanase II geht also mehr Enzym verloren als bei der Aufreinigung von Xylanase I.

Tabelle 7: Spezifische Aktivität der Reinigung der Xylanase I und der Xylanase II über eine Affinitätschromatographie. Die Proteinmenge (mg), die spezifische Aktivität (U/mg), der Reinigungsquotient (*fold*) sowie die Ausbeute (%) sind für jeden Reinigungsschritt aufgeführt.

	Xylanase I					Xylanase II			
	Protein Aktivität		tein Aktivität Reinigung Aust		Protein	rotein Aktivität	Reinigung	Ausbeute	
	(mg)	(U/mg)	(fold)	(%)	(mg)	(U/mg)	(fold)	(%)	
Rohextrakt	17,49	33,70	1	100	35,74	57,09	1	100	
Durchfluss	13,32	12,04	0,36	28	25,17	33,40	0,59	41	
Waschschritt	0,90	59,15	1,71	8	4,56	81,41	1,42	18	
Elution 1	1,78	181,14	5,41	55	5,19	106,08	1,96	27	
Elution 2	0,08	121,20	3,65	2	0,18	121,51	2,13	1	

Die Werte sind aus den Mittelwerten von drei Reinigungen berechnet. Die Gesamtaktivität (U), der Proteingehalt (mg/mL), das Gesamt-Volumen (mL) unter Angabe der berechneten Standardabweichungen sind im Anhang IX aufgeführt.

2.5.8 Charakterisierung der Xylanasen

Die reinen Proteine Xylanase I und Xylanase II (2.5.7) wurden charakterisiert. Dabei wurde mittels Dünnschichtchromatographie ermittelt, welche Oligosaccharide des Xylans durch Hydrolyse präferiert abgebaut werden. Die Aktivität beider Xylanasen wurden auf die Umsetzungsrate von Xylan und das Substratspektrum, die Puffer- und Temperaturstabilität sowie die Puffer- und Temperaturabhängigkeit untersucht. Außerdem wurde die Inhibition der Xylanase I und Xylanase II in Anwesenheit unterschiedlicher Salze und Lösungsmittel untersucht.

2.5.8.1 Nachweis von Reaktionsprodukten der Xylanase I und Xylanase II mittels Dünnschichtchromatographie

Zur Untersuchung, welche Reaktionsprodukte bei der Hydrolyse von Xylan durch die reine Xylanase I und Xylanase II (2.5.7) entstehen, wurde eine Dünnschichtchromatographie (4.6.9) verwendet. Die reine Xylanase I und Xylanase II (2.5.7) wurden mit dem Polysaccharid Xylan (0,1% w/v) bei 30°C inkubiert. Nach 0 Minuten, 15 Minuten, 1 h und 17 h Inkubationszeit wurden die hydrolytischen Reaktionsprodukte der Xylanase I und Xylanase II (4.6.9) sowie dem Monomer Xylose und den Oligosacchariden, Xylobiose, Xylotriose, Xylotetraose, Xylopentose und Xylohexose als Standard auf eine Silicagel Platte aufgetragen, laufen gelassen und entwickelt (Abbildung 14). Ohne Inkubation wurde kein Zucker umgesetzt und es ist lediglich das Substrat Xylan nachweisbar (Abbildung 14, Bahn 8). Bei der hydrolytischen Reaktion der Xylanase I entstehen hauptsächlich die Oligosaccharide Xylobiose, Xylotriose und Xylopentose (Abbildung 14 A, Bahn 9, 10, 11) nach 15 Minuten, 1 h und 17 h. Nach 17 h ist das Monomer Xylose nachweisbar (Abbildung 14 A Bahn 11). Die Xylotetraose wird bei allen drei getesteten Zeitpunkten nicht nachgewiesen. Bei der Hydrolyse von Xylan durch die Xylanase II entstehen hauptsächlich das Monomer Xylose sowie die Oligosaccharide Xylobiose und Xylohexose bei allen drei Zeitpunkten (Abbildung 14 B, Bahn 9, 10, 11). Die Xylotriose ist nach 15 Minuten und nach 1 h nachweisbar, nach 17 h ist sie nicht mehr nachweisbar.



Abbildung 14: Dünnschichtchromatographie der Reaktionsprodukte von der (A) Xylanase I und der (B) Xylanase II auf einer Silicagel Platte, mit 40 Minuten Laufzeit in organischem Laufmittel. Die Platte wurde 40 Minuten mit 0,2% (w/v) Oricin bei 80°C inkubiert. Die Zucker sind als dunkle Punkte zu sehen.

(A) Bahn 1: Xylan, Bahn 2: Xylose, Bahn 3: Xylobiose, Bahn 4: Xylotriose, Bahn 5: Xylohexose, Bahn
6: Xylopentose, Bahn 7: Xylotetrose, Bahn 8: Xylanase I + Xylan nach 0 h Inkubation, Bahn 9: Xylanase I + Xylan nach 0,25 h Inkubation, Bahn10: Xylanase I + Xylan nach 1 h Inkubation, Bahn 11; Xylanase I + Xylan nach 17 h Inkubation

(B) Bahn 1: Xylan, Bahn 2: Xylose, Bahn 3: Xylobiose, Bahn 4: Xylotriose, Bahn 5: Xylotetrose, Bahn 6: Xylopentose, Bahn 7: Xylohexose, Bahn 8: Xylanase I + Xylan nach 0 h Inkubation, Bahn 9:

Xylanase I + Xylan nach 0,25 h Inkubation, Bahn 10: Xylanase I + nach 1 h Inkubation, Bahn 11; Xylanase I + Xylan nach 17 h Inkubation

2.5.8.2 Substratspektrum und Aktivität bei aufsteigenden Xylankonzentrationen der Xylanase I und der Xylanase II

Die Xylanase I und Xylanase II (2.5.7) wurden auf ihr Substratspektrum mit der DNS Methode (4.4.8) und unterschiedlichen Substraten (4.4.9) untersucht. Neben den Oligosacchariden Xylobiose, Xylotriose, Xylotetraose, Xylopentose und Xylohexose wurde Arabinan, Arabinoxylan, und Xylan aus Buchenholz als Substrate verwendet. Um ein erweitertes Substratspektrum zu testen, wurden zusätzlich zu den oben genannten Substraten CMC, Galactan und Stärke verwendet. Beide Xylanasen haben die höchste Aktivität bei dem Substrat Xylotriose auf im Gegensatz zur Xylanase II weist eine Aktivität von 10% bei dem Substrat Xylotriose auf im Gegensatz zur Xylanase I. Die Xylanase I wird erst aktiv bei einer Länge von Pentameren, der Xylopentose. Die Aktivitäten beider Xylanasen liegt bei 10% bei den Substraten CMC, Galactan und Stärke im Vergleich zu ihrem natürlichen Substrat Xylan aus Buchenholz. Die Xylanase I und Xylanase II haben ein ähnliches Substratspektrum. Während jedoch die Xylanase I Xylotriose umsetzen kann, setzt die Xylanase II dieses Substrat nicht um (Abbildung 15 A).

Mittels DNS Methode (4.4.8) wurde mit aufsteigenden Xylankonzentrationen von 0,1% bis 3% (w/v) ermittelt, dass die spezifische Aktivität der beiden Xylanasen mit erhöhter Xylankonzentration steigt (Abbildung 15 B). Die Aktivität der Xylanase I ist bei einer Xylankonzentration von 3% fast doppelt so hoch wie die Aktivität der Xylanase II bei gleicher Xylankonzentration.



Abbildung 15: Das Substratspektrum (A) und die Aktivität bei aufsteigenden Xylankonzentration (B) der Xylanase I und der Xylanase II. Die spezifischen Aktivitäten (%) wurden mittels DNS Methode bestimmt. Die Messungen erfolgten in Triplikaten. (A) Alle Aktivitäten von Xylanase I und Xylanase II wurden jeweils auf die Aktivität bei pH 4,8 gemessen und auf das natürliche Substrat Xylan aus Buchenholz = 100% bezogen. Die spezifische Aktivität wurde mit Xylobiose, Xylotriose, Xylotetraose, Xylopentose, Xylohexose, Arabinan, Arabinoxylan, CMC, Galactan und Stärke bestimmt (B) Die spezifische Aktivität wurde bei Xylankonzentrationen zwischen 0,1% und 3% (w/v) bestimmt und auf die Aktivität bei 0,1% Xylan = 100% bezogen.

2.5.8.3 Temperatur- und pH-Wert-Abhängigkeit

Die Xylanase I und die Xylanase II wurden auf ihre Temperatur- und pH-Wert-Abhängigkeit mit der DNS Methode (4.4.8) untersucht. Zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit wurden die hydrolytischen Reaktionen 15 Minuten bei 10°C, 30°C, 50°C, 70°C und 90°C untersucht (Abbildung 16 A). Alle Werte wurden auf die Aktivität der Xylanase I bei 30°C = 100% bezogen. Bei einer Temperatur von 10°C hat die Xylanase I eine Aktivität von 60%, die Xylanase II eine Aktivität von 70%. Die Aktivität der Xylanase I steigt bei einer Temperatur von 30°C auf etwa 100% an. Die Xylanase II weist bei 30°C eine Aktivität von etwa 100% auf (Abbildung 16 A). Beide Xylanasen erreichen ihr Aktivitätsoptimum bei 50°C mit etwa 110% (Xylanase I) und 175% (Xylanase II). Bei 70°C sinkt die Aktivität beider Xylanasen auf unter 50%. Bei 90°C hat die Xylanase I eine Aktivität von etwa 30%, die Aktivität der Xylanase II liegt bei etwa 20%.

Zur Bestimmung der pH-Wertabhängigkeit beider Xylanasen wurden Puffer im pH-Bereich von 2,5 bis 10 gewählt. Für die pH-Werte 2,5 bis 3 wurde ein Glycin-HCl-Puffer verwendet, bei einem pH-Wert von 3 bis 6 ein Citrat-Puffer, bei den pH-Werten von 6 bis 8 ein Natriumphosphat-Puffer und bei den pH-Werten von 8 bis 10 ein Glycin-NaOH-Puffer

(4.1.3, 4.4.8). Die Aktivitäten von Xylanase I und Xylanase II wurden jeweils auf die Aktivität von Xylanase I und Xylanase II bei einem pH von 4.8 = 100% bezogen. Die Xylanase I hat bei einem pH-Wert von 2,5 40% und bei einem pH-Wert von 3 60% Aktivität (Abbildung 16 B). Die Aktivität der Xylanase I steigt mit zunehmenden pH-Wert und erreicht bei einem pH-Wert von 6 eine Aktivität von 75%. Ab einem pH-Wert von 8 fällt die Aktivität der Xylanase I um die Hälfte, dann sinkt sie weiter ab auf etwa 10% bei einem pH-Wert von 10. Die Xylanase II hat eine sehr geringe Aktivität (10% bis 40%) bei niedrigen pH-Werten (2,5 – 3,5), aber steigt dann sehr stark an bei einem pH-Wert von 4 auf fast 60% Aktivität bis zu ihrem Optimum bei 120% Aktivität der Xylanase II bei einem pH-Wert von 7,5 (Abbildung 16 B). Wie auch bei der Xylanase I fällt die Aktivität der Xylanase II bei einem pH-Wert von 8, bleibt aber bis zu einem pH-Wert von 10 noch bei 60% Aktivität. Während die Xylanase I ihr optimalen pH-Wert bei 4,5 hat, hat die Xylanase II ihren optimalen pH-Wert bei 7,5.



Abbildung 16: Temperaturabhängigkeit (A) und Pufferabhängigkeit (B) der Xylanase I und der Xylanase II. Die spezifische Aktivität wurde mit der DNS Methode bestimmt. (A) Die spezifische Aktivität wurde bei den Temperaturen 10° C, 30° C, 50° C, 70° C und 90° C bestimmt. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten. Alle Aktivitäten der Xylanase I und der Xylanase II wurden jeweils auf die Aktivität bei pH 4,8 = 100% bezogen (B) Die Pufferabhängigkeit wurde bei Puffern zwischen einem pH-Wert von 2,5 und 10 gemessen. Für die pH-Wert von 2,5 bis 3 wurde der Glycin-HCL-Puffer benutzt, für die pH-Werte von 3 bis 6 der Citrat-Puffer, für die pH-Werte von 6 bis 8 wurde der Natriumphosphat-Puffer verwendet und für die pH-Werte von 8,5 bis 10 wurde der Glycin-NaOH-Puffer verwendet. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten und die Standardabweichungen wurden berechnet. Alle Aktivitäten der Xylanase I und der Xylanase I und der Xylanase II wurden jeweils auf die pH 4,8 = 100% bezogen.

Ergebnisse

2.5.8.4 Temperaturstabilität

Es wurde die Aktivität der beiden Xylanasen bei Temperaturen von 4°C, 30°C, 50°C und 70°C nach 15 Minuten, 30 Minuten, 1 h, 2 h, 24 h, 72 h, 144 h und 192 h Inkubation gemessen. Die Aktivität wurde auf 15 Minuten bei 30°C = 100% bezogen. Die Aktivität der Xylanase I liegt bei 50°C sowie bei 70°C nach 15 Minuten nur noch bei 10 bis 20% (Abbildung 17 A). Die Aktivität der Xylanase I bleibt bei 4° und bei 30°C über die gemessenen 192 h stabil bei 80 - 100%. Die Aktivität geht bei 50°C und 70°C nach 15 Minuten zurück auf etwa 20%. Die Aktivitäten der Xylanase II sind für 30 Minuten bei allen vier getesteten Temperaturen stabil und betragen zwischen 80% und 100% (Abbildung 17 B). Nach 1 h sinkt die Aktivität der Xylanase II bei 70°C auf unter 10%. Nach 24 h hat die Xylanase II noch 80% Aktivität bei 4°C und 30°C aber nur noch 40% Aktivität bei 50°C. Nach 72 h hat die Xylanase II nur noch eine Aktivität von unter 20% bei 50°C. Die Aktivität bei 4°C und 30°C bleibt stabil bis sie nach 144 h auf 20% abfällt. Dort bleibt sie stabil bis nach 192 h. Die Xylanase II ist stabil bei 50°C für 2 h und bei 70°C für 1 h, bei 4°C und 30°C ist sie stabil bis zu 72 h.

2.5.8.5 pH-Stabilität

Beide Xylanasen wurden auch auf ihre Aktivität bei zwei verschiedenen pH-Werten, pH 4,8 und pH 9, über einen Zeitraum von 192 h untersucht. Bei einem pH-Wert von 4,8 nimmt die Aktivität der Xylanase I und der Xylanase II mit der Zeit stetig ab bis sie von ihren anfänglichen 100% nach 15 Minuten nur noch 20% Aktivität nach 192 h aufweist (Abbildung 17 C). Die Aktivität der Xylanase I und Xylanase II ist einem pH-Wert von 9 generell geringer als bei einem pH-Wert von 4,5 (Abbildung 15 B) aber bleibt bis zu 72 h stabil (Abbildung 17 D). Die Xylanase II verliert nach 144 h zwei Drittel ihrer Aktivität und bleibt bis 192 h stabil bei 20% Aktivität. Die Xylanase I bleibt bis zu 192 h stabil bei einem pH-Wert von 9.



Abbildung 17: Temperaturstabilität von (A) Xylanase I und (B) Xylanase II und Pufferstabilität von Xylanase I und Xylanase II bei (C) einem pH-Wert von 4,8 (D) und einem pH-Wert von 9, über einen Zeitraum von 192 h. Die spezifische Aktivität wurde mit der DNS Methode bestimmt. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten. (A) Spezifische Aktivität der Xylanase I wurde bei 4°C, 30°C, 50°C und 70°C über 192 h bestimmt. Die spezifische Aktivität der Xylanase I wurde nauf die Aktivität bei 30°Cund 15 Minuten = 100% bezogen. (B) Spezifische Aktivität der Xylanase II wurde bei 4°C, 30°C, 50°C und 70°C über 192 h bestimmt. Die spezifische Aktivität der Xylanase II wurde nauf die Aktivität bei 30°Cund 15 Minuten = 100% bezogen. (C) Spezifische Aktivität der Xylanase I und Xylanase I und Xylanase II mit einem Citrat Puffer bei pH 4,8 über einen Zeitraum von 192 h. Die spezifische Aktivität der Xylanase I und der Xylanase II wurden auf die Aktivität der Xylanase I und der Xylanase II wurden auf die Aktivität der Xylanase I und Xylanase II wurden auf die Aktivität der Xylanase I und der Xylanase II wurden auf die Aktivität der Xylanase II mit einem Citrat Puffer bei pH 9 über einen Zeitraum von 192 h. Die spezifische Aktivität der Xylanase II wurde auf die Aktivität der Xylanase I und Xylanase II mit einem Citrat Puffer bei pH 9 über einen Zeitraum von 192 h. Die spezifische Aktivität der Xylanase II wurde auf die Aktivität der Xylanase I und Xylanase II mit einem Citrat Puffer bei pH 9 über einen Zeitraum von 192 h. Die spezifische Aktivität der Xylanase I und einem Zitrat Puffer bei pH 9 über einen Zeitraum von 192 h. Die spezifische Aktivität der Xylanase I und Xylanase II wurde auf die Aktivität bei 30°C und 15 Minuten bei pH 4,8 = 100% bezogen.

Ergebnisse

2.5.8.6 Inhibitionen der Xylanase I und Xylanase II durch Salze und Lösungsmittel

Um die Inhibition von Salzen und Lösungsmitteln auf die Xylanase I und die Xylanase II zu testen, wurde die spezifische Aktivität mittels DNS Methode (4.4.8) gemessen. Es wurden folgende Substanzen verwendet: 5% und 30% (v/v) Acetonitril (ACN), 5% und 30% (v/v) Ethanol (EtOH), 5% und 30% (v/v) Methanol (MeOH), 5% und 30% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO), 10 mM und 1000 mM (w/v) Natriumchlorid (NaCl), 5 mM und 100 mM (w/v) Magnesiumchlorid (MgCl₂), 5 mM (w/v) Magnachlorid (MnCl₂), 10 mM und 50 mM (w/v) Dithiothreitol (DTT), 2 mM und 50 mM (w/v) Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 0,25% und 5% (v/v) Tween 20, 0,25% und 5% (v/v) Triton X 100 und 1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS). Die Aktivität wurde auf die Aktivität bei einem pH-Wert von 4,8 und 0,1% Xylan = 100% ohne Zusätze bezogen.

2.5.8.6.1 Inhibitionen der Xylanase I durch Salze und Lösungsmittel

Das organische Lösungsmittel ACN hat bei geringer Konzentration von 5% eine aktivierende Wirkung auf die Aktivität der Xylanase I (Abbildung 18 A). Erhöht man die Konzentration von ACN auf 30% so sinkt die Aktivität der Xylanase I von 110% bei 5% ACN auf 10%. DMSO in einer geringen Konzentration hat einen geringen Einfluss auf die Aktivität, sie verringert sich auf 80%. Erhöht man die Konzentration von DMSO auf 30% so sinkt die Aktivität der Xylanase I auf 30%. Ein ähnliches Aktivitätsmuster haben die getesteten Alkohole EtOH und MeOH. Die Xylanase I hat in Anwesenheit einer geringen Konzentration beider Alkohole eine Aktivität von etwa 80%. Erhöht man die Konzentration auf 30% des jeweiligen Alkohols, so sinkt die Aktivität der Xylanase I um die Hälfte auf 40%. Versetzt man die hydrolytische Reaktion mit geringen Konzentrationen von NaCl und MgCl₂ wird die Aktivität der Xylanase I nicht beeinträchtigt, wohingegen höhere Konzentrationen dieser Salze zu einem Aktivitätsverlust von etwa 30% führen. Die Aktivität der Xylanase I weist bei 100 mM MnCl2 etwa 50% auf. Bei Zusatz von 2 mM des Komplexbildners EDTA ist die Xylanase I noch zu 70% aktiv, bei einer Konzentration von 50 mM weist sie weniger als 10% Aktivität auf (Abbildung 18 A). Die getesteten nichtionischen Tenside, Tween 20 und Triton X 100, sowie DTT haben in den getesteten Konzentrationen keine Auswirkung auf die Aktivität der Xylanase I. SDS (1%) inhibiert die Aktivität der Xylanase komplett.



Abbildung 18: Aktivitätstest der (A) Xylanase I und (B) der Xylanase II in Anwesenheit von Salzen und Lösungsmitteln. Mit der DNS Methode wurde die spezifische Aktivität (%) der Xylanase I und Xylanase II in Anwesenheit von 5% und 30% ACN, 5% und 30% EtOH, 5% und 30% MeOH, 5% und 30% DMSO, 10 mM und 1000 mM NaCl, 5 mM und 100 mM MgCl₂, 10 mM und 50 mM DTT, 2 mM und 50 mM EDTA, 0,25% und 5% Tween 20, 0,25% und 5% Triton X 100 und 1% SDS bestimmt. Die Messungen erfolgten in Triplikaten.

2.5.8.6.2 Inhibitionen der Xylanase II durch Salze und Lösungsmittel

Die Xylanase II wird im Gegensatz zur Xylanase I stärker durch organische Lösungsmittel und durch die getesteten Salze inhibiert (Abbildung 17 B). Bei 5% ACN hat die Xylanase II eine erhöhte Aktivität von 115%, bei 30% ACN noch 10% Aktivität. Das organische Lösungsmittel DMSO hat bei den getesteten Konzentrationen von 5% und 30% keine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität von der Xylanase II. In Anwesenheit von den Alkoholen EtOH und MeOH liegt die Aktivität der Xylanase bei unter 40% bei beiden getesteten Konzentrationen. Die Aktivität der Xylanase II wird von 10 mM und 100 mM NaCl nicht beeinflusst. Bei der Präsenz von 5 mM MgCl₂ hingegen hat die Xylanase II nur eine Aktivität von 40%, bei 100 mM MgCl₂ nur noch 20% Aktivität. Bei dem Salz MnCl₂ liegt die Aktivität der Xylanase II nur noch bei 10% im Vergleich zu der Aktivität ohne Salz. DTT hat wie bei der Xylanase I keine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität der Xylanase II. Die Xylanase II weist eine erhöhte Aktivität von 110% bei 2 mM EDTA auf, aber 0% Aktivität bei einer Konzentration von 50 mM EDTA. Die Aktivität der Xylanase II in Präsenz von den nichtionischen Tensiden Tween 20 und Triton X 100 liegt bei unter 50%. Keine Aktivität der Xylanase II wurde festgestellt bei 1% SDS (Abbildung 17 B).

Ergebnisse

2.5.9 Mutation der *active site* Aminosäuren

Das aktive Zentrum der Glykosidhydrolasen (GH) Gruppen 10 und 11 ist weitgehend erforscht [Tull et al. 1991; MacLeod et al. 1994; Miao et al. 1994]. Um das aktive Zentrum der Xylanase I und Xylanase II auszuschalten wurde die Methode der zielgerichteten Mutagenese (4.5.6) angewendet. Dabei wurden jeweils zwei Einzelmutanten und eine Doppelmutante mit der FastCloning Methode (4.5.5) erstellt. Als Template für die zielgerichtete Mutagenese wurde für die Xylanase I das Konstrukt Xyl_I-SP und für die Xylanase II das Konstrukt Xyl II-SP (2.5.5) verwendet. Bei der Xylanase I wurden die Kodons für die Glutaminsäuren an Position 97 und Position 188 GAA gegen Kodons für Methionin (ATG) ausgetauscht, bei der Xylanase II wurden die Kodons für die Glutaminsäuren an Position 155 und 241 (GAA) gegen das Kodon für Methionin (ATG) jeweils einzeln oder beide zusammen ausgetauscht. Für die Einzelmutanten E97M der Xylanase I wurden die Primer X1_E97M [F] und X1_E97M [R] (4.1.4), für die Einzelmutante E188M der Xylanase I wurden die Primer X1_E188M [F] und X1_E188M [R] (4.1.4) verwendet. Um beide Kodons der Glutaminsäuren in der Xylanase I zur Generierung der Mutante E97M / E188M auszutauschen, wurde die Mutante E97M als Template verwendet und das Kodon für die Glutaminsäure 188 mutiert. Für die Einzelmutante E155M der Xylanase II wurden die Primer X2_E155M [F] und X2_E155M [R] (4.1.4), für die Einzelmutante E241M wurden die Primer X2_E241M [F] und X2_E241M [R] (4.1.4) verwendet. Die Doppelmutante der Xylanase II, E155M / E241M wurde synthetisch hergestellt (4.1.5).

Die Konstrukte der Xylanase I, E97M, E188M, E97M / E188M, und die Konstrukte der Xylanase II, E155M, E241M sowie das synthetisch hergestellt Konstrukt E155M / E241M wurden in $10-\beta$ -Competent E. coli Zellen (4.4.2) transformiert (4.5.7) und ausplattiert. Die auf dem Selektionsmedium (4.3.3) gewachsenen Kolonien wurden vermehrt (4.5.7) und die Plasmide isoliert (4.5.4). Zur Überprüfung, ob die Nukleotide an den richtigen Positionen im Gen ausgetauscht wurden, wurden alle Konstrukte mit den Primern pET28b [F] und pET28b [R] (4.1.4) sequenziert (4.1.8) und *in silico* mit dem Programm Geneious (4.7.5) auf ihre Sequenz kontrolliert. Alle sechs Konstrukte besaßen an den richtigen Stellen den Austausch von drei Nukleotiden auf, was bei der Expression zu dem Einbau von der Aminosäure Methionin anstatt von Glutaminsäure führt.

Die Konstrukte wurden in BL21 (DE3) *E. coli* Zellen (4.3.3) transformiert (4.5.7) und wie bei den Wildtyp-Konstrukten Xyl_I-SP und Xyl_II-SP (2.5.5) exprimiert (4.6.6). Die

Reinigung der exprimierten Enzyme E97M, E188M, E97M / E188M, E155M, E241M und E155M / E241M erfolgte in Triplikaten und mit einem 50 mL Ansatz. Um zu testen, ob das aktive Zentrum durch den Austausch der Aminosäuren inaktiviert wurde, wurde die Aktivität aller reinen Enzyme mit der DNS Methode (4.4.8) bestimmt (Abbildung 19).

Die Aktivität der nicht mutierten Xylanase I und der Xylanase II wurde = 100% gesetzt. Die Mutante E97M hat 4% Aktivität, die Mutante E188M 13% Aktivität und die Doppelmutante E97M / E188M hat 4% Aktivität (Abbildung 19 A). Die Mutante E155M hat 9% Aktivität, die Mutante E241M hat 7% Aktivität und die Doppelmutante E155M / E241M hat 10% Aktivität (Abbildung 19 B).



Abbildung 19: Spezifische Aktivität (%) der Einzel- und Doppelmutanten der Xylanase I (A) und der Xylanase II (B), gemessen mit der DNS Methode und bezogen auf die Aktivität der nicht mutierten Enzyme.

2.5.9.1 3D-Struktur der Xylanase I und der Xylanase II basierend auf Homologiemodellen Die beiden Xylanasen wurden in ihrer berechneten 3D-Struktur dargestellt. Mit dem Programm YASARA (4.7.4) wurde anhand der Aminosäuresequenz und der Datenbank von PDB (4.7.4) ein Homologiemodell errechnet. Die Darstellung in 3D erfolgte mit dem Programm PyMol (4.7.4). In Abbildung 20 sind die Xylanase I und die Xylanase II in blau dargestellt. Beide Proteine binden das Substrat Xylan, welches in grün-rot dargestellt ist. Die Aminosäure Glutaminsäure ist in grau, die mutierte Aminosäure Methionin ist in pink dargestellt.

Die Xylanase I bildet in ihrer 3D-Struktur eine *jelly roll fold* (Abbildung 20 A). Vergrößert man den Ausschnitt des aktiven Zentrums, so sieht man die beiden Aminosäuren

Glutaminsäure sowie die beiden Aminosäuren Methionin, an denen das Substrat mittels klassischem Koshland-Haltemechanismus gebunden sind. Die Distanz der beiden Aminosäuren zum Substrat Xylan liegt bei 3,7 und 4,7 Ångström. Xylanase II bildet in ihrer 3D-Struktur eine *TIM barrel fold* (Abbildung 20 B). Das Substrat Xylan wird ebenso von den beiden Aminosäuren mittels Koshland-Haltemechanismus gebunden. Die Distanz zwischen beiden Substraten liegt bei 3,0 und 5,4 Ångström.



Abbildung 20: Homologiemodelle der Xylanase I (A) und der Xylanase II (B) mit Vergrößerung des aktiven Zentrums. Die Modelle wurden mit dem Programm YASARA und der Proteindatenbank PDB berechnet. Die Darstellung erfolgte mit Hilfe des Programms PyMol. Enzym=blau, Xylan=grün und rot, Glutaminsäure=grau, Methionin=pink

2.6 Identifizierung und Charakterisierung der Pilzisolate FW16.1 und FW57

Die Pilzisolate FW16.1 und FW57 wiesen eine hohe Cellulase- bzw. Chitinaseaktivität auf (2.2.2). Eine taxonomische Einordung wurde mit Hilfe der ITS- und LSU-Sequenzierung durch die DSMZ Braunschweig ermittelt (4.2.1). Zum Zeitpunkt der Identifizierung der Pilzisolate waren beide Genome noch nicht sequenziert. Von beiden Pilzisolaten wurde das Genom *de novo* sequenziert (4.2.3), die spezifische Aktivität bestimmt (4.4.8) und eine CAZyme Analyse (4.2.5) durchgeführt.

2.6.1 *De novo* Sequenzierung von FW16.1 und FW57

Eine taxonomische Einordung der Pilzisolate FW16.1 und FW57 konnte mit Hilfe der ITS-Sequenzierung (4.7.1) nicht ermittelt werden. Die Identifizierung beider Pilzisolate erfolgte bei der Einlagerung bei der DSMZ Braunschweig mittels der Sequenzierung von der ITS und partiellen LSU Region (*large subunit*) der ribosomalen DNA (4.2.1). Das Pilzisolat FW16.1 wurde als *Fusarium solani* identifiziert, das Pilzisolat FW57 wurde als *Humicola fuscoatra* identifiziert. Zum Zeitpunkt der Identifizierung der Pilzisolate waren beide Genome noch nicht vollständig sequenziert worden. Um eine CAZyme Analyse durchzuführen wurde das gesamte Genom benötigt.

Die gDNA der Pilzisolate FW16.1 und FW57 wurde mit der CTAB Methode (4.5.1) isoliert und mittels Gelelektrophorese (4.6.1) und photometrischer Quantifizierung (4.6.2) auf ihre Reinheit und Qualität überprüft. Es wurde je Pilzisolat ca. 11 µg reine und hoch molekulare gDNA mittels 270 bp short HiSeq und PACBIO 20K library de novo sequenziert (4.2.3). Das Pilzisolat FW16.1 hat eine Genomgröße von 47,43 mbp und setzt sich zusammen aus 9 Scaffolds. Das Pilzisolat FW57 hat eine Genomgröße von 35,599 mbp und besitzt 6 Scaffolds. Als Scaffold bezeichnet man einen großen zusammenhängenden Genomabschnitt. Beide Genome stehen als Biosamples bei NCBI in dem Bioproject PRJN413482 zur Verfügung (2.4).

2.6.2 Aktivitätstest von FW16.1 und FW57 mit verschiedenen Substraten

Die Pilzisolate FW16.1 und FW57 wurden in Minimalmedium supplementiert mit verschiedenen Substraten angezogen, um die unterschiedliche Aktivität der Enzyme je Substrat mittels DNS Methode (4.4.8) zu messen. Bei dem Pilzisolat FW16.1 wurde die Cellulaseaktivität unter Verwendung der Substrate Avicel[®] PH-101, α -Cellulose, Hydroxyethylcellulose und Carboxymethylcellulose (hohe, mittlere und geringe Viskosität, 4.4.8) gemessen. Bei dem Pilzisolat FW57 wurde die Chitinaseaktivität unter Verwendung der Substrate von Chitin und Chitosan (hohes, mittleres und geringes Molekulargewicht, 4.4.8) gemessen.



Abbildung 21: Spezifische Aktivität von (A) FW16.1 und (B) FW57 induziert mit unterschiedlichen Substraten. (A) Spezifische Aktivität (U/mg) von FW16.1 gemessen mit der DNS Methode, induziert mit Avicel[®] PH-101, α -Cellulose, Hydroxyethylcellulose und CMC (hoher, mittlerer und niedriger Viskosität). (B) Spezifische Aktivität (U/mg) von FW57 gemessen mit der DNS Methode, induziert mit Chitin und Chitosan (hohem, mittlerem und niedrigem Molekulargewicht). Die Messungen wurden in vier Replikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der vier Messungen.

Das Pilzisolat FW16.1 hat eine spezifische Cellulaseaktivität von 0,04 U/mg bei der kristallinen Cellulose Avicel[®] PH-101 (Abbildung 21 A). Die spezifische Aktivität steigt fast um das Doppelte bei dem Substrat α -Cellulose auf 0,075 U/g. Die höchste Cellulaseaktivität wurde gemessen bei dem Substrat Hydroxyethylcellulose mit 0,18 U/mg. Die spezifische Cellulaseaktivität bei Carboxymethylcellulose (CMC) bei hoher, mittlerer und niedriger Viskosität wurde bei ca. 0,07 bis 0,1 U/mg gemessen. Das Pilzisolat FW57 weist eine geringe Chitinaseaktivität von 0,009 U/mg bei dem Substrat Chitin auf (Abbildung 21 B). Die spezifische Aktivität steigt auf 0,029 U/mg bei Chitosan mit hohem Molekulargewicht und erreicht ihren Höchstwert von 0,037 U/mg bei Chitosan mit niedrigem Molekulargewicht liegt bei 0,014 U/mg.

2.6.3 CAZyme Analyse der Pilzisolate FW16.1 und FW57

Die Pilzisolate FW16.1 und FW57 wurden nach der Genomsequenzierung mit der CAZyme Datenbank (4.2.5) analysiert. Bei dem Pilzisolate FW16.1 wurden insgesamt 694 verschiedene Enzyme gefunden, die in die CAZyme Gruppen Glykosidhydrolasen (GH), Glykosidhydrolasen + *Carbohydrate-Binding-Module* (GH+CBM), Kohlenhydrat Esterasen (CE), Kohlenhydrat Esterasen + *Carbohydrate-Binding-Module* (CE+CBM), Polysaccharid Lyasen (PL), Polysaccharid Lyasen + *Carbohydrate-Binding-Module* (PL+CBM), Oxidoreduktasen (AA), Oxidoreduktasen Enzyme (AA) + *Carbohydrate-Binding-Module* (AA+CBM) und Glykosyltransferasen (GT) eingeordnet sind. FW16.1 produziert CAZyme in 58 verschiedenen GH Familien, in 20 GH+CBM Familien, in 11 CE Familien, in nur einer CE+CBM Familie, in 7 PL Familien, 2 PL+CBM Familien, 12 AA Familien, 4 AA+CBM Familien und 30 GT Familien (Tabelle 7).

Bei dem Pilzisolat FW57 wurden 635 verschiedene Enzyme gefunden, die in die oben erwähnten CAZyme Gruppen eingeordnet werden konnten. FW57 produziert CAZyme in 59 verschiedenen GH Familien, in 26 GH+CBM Familien, in 11 CE Familien, in neun CE+CBM Familie, in 6 PL Familien, 12 AA Familien, 3 AA+CBM Familien und in 31 GT Familien (Tabelle 7). Die genaue Anzahl der Enzyme verteilt auf die CAZyme Gruppen bzw. Familie ist in Anhang X aufgelistet.

Tabelle 8: CAZyme Analyse der Genome der Pilzisolate FW16.1 und FW57. Anzahl der beim
Abgleichen der de novo sequenzierten Genome mit der CAZyme Datenbank (4.2.5) gefundene Familien
von GH (Glykosidhydrolase), GH+CBM (Glykosidhydrolase + Carbohydrate-Binding-Module), CE
(Kohlenhydrat Esterase), CE+CBM (Kohlenhydrat Esterase + Carbohydrate-Binding-Module), PL
(Polysaccharid Lyase), PL+CBM (Polysaccharid Lyase + Carbohydrate-Binding-Module), AA
(Oxidoreduktasen), AA+CBM (Oxidoreduktasen + Carbohydrate-Binding-Module und GT
(Glykosyltransferasen).

	GH	GH+CBM	CE	CE+CBM	PL	PL+CBM	AA	AA+CBM	GT
FW16.1	58	20	11	1	7	2	12	4	30
FW57	59	26	11	9	6	0	12	3	31

Für eine spezifischere Analyse von Kohlenhydrat aktiven Enzymen (CAZyme) wurden die Pilzisolate FW16.1 und FW57 entsprechend ihrer Enzymaktivitäten in verschiedenen Substraten angezogen und für drei Tage inkubiert (4.4.8). Der Überstand wurde konzentriert (4.6.3) und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (4.6.3). Die vom Pilz in Anwesenheit des jeweiligen Substrates sekretierten Enzyme wurden mittels LC/MS-MS Analyse (4.2.2) identifiziert. Die Ergebnisse der LC/MS-MS Analyse wurden verwendet, um die CAZyme zu analysieren (4.2.5) und mit dem Programm BRIG (4.7.3) auf die Genome des jeweiligen Pilzisolates (2.6.1) abzubilden. Die Liste der CAZyme und die zugehörigen Enzyme sind in Anhang X aufgelistet.

2.6.3.1 CAZyme Analyse des Isolats FW16.1

In Abbildung 22 ist die CAZyme Analyse von FW16.1 unter Verwendung der jeweiligen Substrate dargestellt. Die Substrate Avicel[®] PH-101, α-Cellulose, Hydroxyethylcellulose und Carboxymethylcellulose (hohe, mittlere und geringe Viskosität) und die sekretierten

CAZyme wurden auf die *Scaffolds* aufgeteilt und abgebildet vom inneren zum äußeren Kreis. Die Unterteilung der CAZyme Analyse auf die verschiedenen *Scaffolds* der Pilzisolate erfolgte aufgrund der besseren Untersuchung auf eventuelle Gen *Cluster* der CAZyme. Die unterschiedlichen Substrate wurden so um das jeweilige *Scaffold* angeordnet, dass die kristalline Eigenschaft der Substrate vom inneren Ring (Avicel[®] PH-101) bis zum äußeren Ring (CMC geringe Viskosität) abnimmt. Die in blauer Farbe markierten CAZyme wurden mindestens in zwei Triplikaten detektiert. Die grau hinterlegten CAZymes wurden in lediglich einem Triplikat gemessen. Die Pfeile zeigen die Start-Stop Richtung der Gene auf den *Scaffolds* an. Die meisten sekretierten CAZyme werden auf *Scaffold* 1, *Scaffold* 4 und *Scaffold* 5 kodiert (Abbildung 22 A, D und F). Die Glykosidhydrolasen sind fast auf jedem *Scaffold* 5, *Scaffold* 6 und *Scaffold* 7 kodiert sind (Abbildung 22 A, E, F und G). Auf *Scaffold* 1 werden außerdem *Carbohydrate-Binding-Modules* und Kohlenhydrat Esterasen kodiert. Die GH Gruppe, kombiniert mit dem CBMs, wird auf fast allen *Scaffolds* kodiert. Die *Scaffolds* 6, 8 und 9 kodieren die wenigsten CAZyme (Abbildung 22 F, H und I).

Einige CAZyme werden bei allen getesteten Substraten produziert, einige werden nur bei bestimmten Substraten gebildet. Die Glykosidhydrolasen Gruppen GH72, GH16, GH75, GH55, GH10 und GH74 sowie die Carbohydrate-Binding-Module CBM73 werden bei allen sechs getesteten Substraten produziert. Die Kohlenhydrat Esterasen Gruppen CE4, CE6, CE16 und CE12, die AA Gruppe AA9 sowie die Polysaccharid Lyasen Familie PL20 kommen fast bei allen Substraten vor. Ebenso die GH Gruppen in Kombination mit dem CBMs GH72+CBM43, GH5+CBM1, GH7+CBM1, GH3+CBM1, GH71+CBM24+CBM24 werden bei allen Substraten produziert. Um die kristallinen Substrate wie Avicel[®] PH-101, α -Cellulose und Hydroxyethylcellulose abzubauen, werden zusätzlich zu den bereits erwähnten CAZymen noch andere Enzyme der Glykosidhydrolasen, GH17 und GH12, gebildet (Abbildung 22 B und G). Außerdem werden GH3+CBM1 und GH3 verstärkt gebildet (Abbildung 22 E). PL3 wird bei dem Substrat bei Avicel[®] PH-101 und α-Cellulose gebildet (Abbildung 22 I). Auffällig ist, dass bei dem Substrat α-Cellulose Enzyme von CAZyme Gruppen gebildet werden, die bei kristallineren Substraten wie Avicel[®] PH-101 oder weniger kristallinen Substraten wie CMC und Hydroxyethylcellulose nicht gebildet werden. Generell gilt, dass bei höher kristallinem Substrat weniger Enzyme gebildet werden als bei weniger kristallinem Substrat. Dazu zählen CBM73, CE4, GH72, GH12 und GH3 (Abbildung 22 B, C und E). Einige CAZyme werden vermehrt bei nicht kristallinen Substraten gemessen wie Carboxymethylcellulosen (hohe, mittlere und geringe Viskosität).

Die GH Gruppen GH5, GH81, GH134, GH132, GH7, GH24, GH43 und GH6+CBM1 werden bei allen Formen von CMC produziert. Die AA Gruppe AA7 sowie die Kombination mit dem CBMs, AA9+CBM1 und AA13+CBM20, werden auch vorwiegend bei CMC produziert (Abbildung 22 A und F).



Abbildung 22: CAZyme Analyse des Pilzisolates FW16.1 abgebildet auf die neun *Scaffolds* des Genoms von FW16.1. Das Pilzisolat wurde in den Substraten Avicel[®] PH-101, α -Cellulose, Hydroxyethylcellulose, CMC mit hoher, mittlerer und niedriger Viskosität angezogen, die sekretierten Enzyme mittels LC/MS-MS Analyse identifiziert und die CAZyme mittels CAZyme Analyse untersucht. Die verschiedenen Substrate sind als Ringe dargestellt. Von Innen nach Außen: Avicel[®] PH-101, α -Cellulose, Hydroxyethylcellulose, CMC mit hoher, mittlerer und niedriger Viskosität. Die PH-101, α -Cellulose, Hydroxyethylcellulose, CMC mit hoher, mittlerer und niedriger Viskosität. Die Pfeile zeigen die Start-Stop Richtung der Gene auf den *Scaffolds* an.

(A) Scaffold 1 mit einer Größe von 10325791 bp, (B) Scaffold 2 mit einer Größe von 9323355 bp,

(C) Scaffold 3 mit einer Größe von 6657356 bp. (D) Scaffold 4 mit einer Größe von 6447761 bp,

(E) Scaffold 5 mit einer Größe von 5100582 bp, (F) Scaffold 6 mit einer Größe von 3581636 bp,

(G) Scaffold 7 mit einer Größe von 2872130 bp, (H) Scaffold 8 mit einer Größe von 2483838 bp,

(I) *Scaffold* 9 mit einer Größe von 644109 bp, Die Messung erfolgte in Triplikaten. CAZyme, die bei mindestens zwei Triplikaten gemessen wurden sind in Dunkelblau dargestellt. Die CAZyme die nur in einem Triplikat gemessen wurden sind in Grau dargestellt.

2.6.3.2 CAZyme Analyse des Isolats FW57

In Abbildung 23 ist die CAZyme Analyse von FW57 unter Verwendung der Substrate Chitin und Chitosan (hohes, mittleres und geringes Molekulargewicht, 4.4.8) dargestellt. Die Substrate und die entsprechenden sekretierten CAZyme wurden auf die Scaffolds aufgeteilt und vom inneren (Chitin) zum äußeren Kreis (Chitosan mit geringem Molekulargewicht) abgebildet. Die unterschiedlichen Substrate wurden so um das jeweilige Scaffold angeordnet, dass die kristalline Eigenschaft der Substrate vom inneren Ring (Chitin) zum äußeren Ring (Chitosan geringes Molekulargewicht) abnimmt. Die in blauer Farbe markierten CAZyme wurden mindestens in zwei der vier Replikate detektiert. Die grau hinterlegten CAZyme sind nur in einem der vier Replikate gemessen worden. Die Pfeile zeigen die Start-Stop Richtung der Gene auf den Scaffolds an. Die meisten CAZyme werden auf Scaffold 1 kodiert (Abbildung 23 A). Danach folgen die die Scaffold 3, Scaffold 4 und Scaffold 6 (Abbildung 23 C, D und F). Auf Scaffold 5 und Scaffold 2 werden die wenigstens CAZyme kodiert (Abbildung 23 B und E). Im Gegensatz zur CAZyme Analyse von FW16.1 werden die weitaus meisten CAZymes bei FW57 nicht substratspezifisch gebildet. Nahezu alle gebildeten CAZyme sind bei allen Substraten vertreten. Ausnahmen bilden Enzyme der GH3, GH20 und GH37 auf Scaffold 1, Die GH71 und CE15 auf Scaffold 2, die CE5 auf Scaffold 3, die GH7 und GH47 auf Scaffold 4, die AA3 auf Scaffold 5 und die AA3 auf Scaffold 6. FW57 produziert viele Enzyme der Familien der Oxidoreduktasen und viele Mitglieder der GH18 und GH16 in den unterschiedlichen Scaffolds. FW75 bildet fast auf allen Scaffolds Fusionsproteine mit CBMs. Auf Scaffold 1 liegen die CE+CBM1, die AA7, die GH18+CBM18, die GH16+CBM18 und die GH17 sehr nah beieinander und in derselben Start-Stop Richtung.



Abbildung 23: CAZyme Analyse des Pilzisolates FW57 abgebildet auf die sechs *Scaffolds* des Genoms von FW57. Das Pilzisolate FW57 wurde in den Substraten Chitin, Chitosan (hohem, mittlerem und niedrigem Molekulargewicht) angezogen und die sekretierten Enzyme mittels LC/MS-MS Analyse identifiziert und die CAZyme mittels CAZyme Analyse untersucht. Die verschiedenen Substrate sind als Ringe dargestellt. Von Innen nach Außen: Chitin und Chitin mit hohem, mittlerem und geringem Molekulargewicht. Die Pfeile zeigen die Start-Stop Richtung der Gene auf den *Scaffolds* an. Chitin (A) *Scaffold* 1 mit einer Größe von 15373855 bp, (B) *Scaffold* 2 mit einer Größe von 5310578 bp, (C) *Scaffold* 3 mit einer Größe von 4885104 bp, (D) *Scaffold* 4 mit einer Größe von 4093307 bp, (E) *Scaffold* 5 mit einer Größe von 3647397 bp, (F) *Scaffold* 6 mit einer Größe von 2288905 bp. Die Messung erfolgte in Quarduplikaten. CAZyme, die bei mindestens zwei von vier Replikaten gemessen wurden sind in Dunkelblau dargestellt. Die CAZyme die nur in einem von vier Replikaten gemessen wurden sind in Grau dargestellt.

3 Diskussion

3.1 Die Pilzsammlung aus Vietnam und deren antifungales Potential

Es konnte eine Pilzsammlung von 211 Pilzisolaten der Ascomycota aus neun unterschiedlichen Habitaten in Vietnam generiert werden, wobei einige Isolate eine antifungale Wirkung gegen phytopathogene Pilze zeigten. Die Suche nach neuen Fungiziden und neuen Wirkstoffen gegen humanpathogene Pilze wie C. albicans ist für die Agrarwirtschaft sowie die Humanmedizin von großem Interesse. Fungizide, deren Wirkstoffe aus Pilzen gewonnen wurden sind bereits seit längerem bekannt [Grove et al. 1952; Schwartz et al. 1989; Anke et al. 1977]. Daher wurde die Pilzsammlung sechs phytopathogene Pilze, F. graminearum, F. oxysporum, gegen F. oxysporum f. sp. cubense, M. oryzae, B. sorokiniana, S. nodorum und gegen den humanpathogenen Pilz C. albicans getestet. 15 Pilzisolate der Sammlung zeigten eine antifungale Wirkung gegenüber bis zu vier phytopathogenen Pilzen. Das Pilzisolat SF32.1, phylogenetisch identifiziert als Acrophialophora levis, zeigte eine antifungale Wirkung gegen M. oryzae, S. nodorum, F. oxysporum und B. sorokiniana sowie gegen C. albicans. A. levis wurde bereits für seine antifungale und antibakterielle Wirkung beschrieben [Turhan und Grossmann 1989]. Er wirkt inhibitorisch gegenüber 16 phytopathogenen Pilzen aus der Gruppe der Mastigomycotina, Ascomycotina, *Basidiomycotina* und Deuteromycotina, sowie gegenüber sechs Bakterienarten. Vor allem gegenüber Botrytis cinerea, Erreger der Grauschimmelfäule [Williamson et al. 2007], und Sclerotinia sclerotiorum, dem Verursacher der Weißstängligkeit [Purdy 1979], zeigte er die stärkste Inhibition.

Das bisher meist genutzte Fungizid Strobilurin wurde aus einem Basidiomyceten der Gattung *Strobilurus* isoliert [Anke et al. 1977]. Mittlerweile wurden unterschiedliche Stoffklassen aus der Gruppe der Strobilurine synthetisiert und als kommerzielle Fungizide weitläufig eingesetzt [Generaldirektion Gesundheit und Lebensmittelsicherheit der Europäischen Kommission 2016]. Eine Alternative zum Strobilurin ist die Verwendung von Azolen, die die Permeabilität und die Beweglichkeit der Pilzmembran zerstören [Joseph-Horne und Hollomon 2006; Yoshida 1988].

Die größte Herausforderung bei der Verwendung dieser Fungizide stellt die Ausbildung von natürlichen Resistenzen durch Mutationen dar [Cools und Fraaije 2013; Kim et al. 2003;
Lesemann et al. 2006; Schepers 1985]. Um diese zu umgehen, ist die Suche nach neuen Metaboliten mit antifungaler Wirkung zielführend. Es konnte gezeigt werden, dass die in Vietnam gesammelte Sammlung an *Ascomycota* einige Pilzisolate enthält, die eine antifungale Wirkung gegen phyto- und humanpathogene Pilze aufweist. Das Screening auf die inhibitorische Wirkung gegen Phyto- und Humanpathogene liefert vielversprechende vorläufige Daten und stellt die Grundlage für weitere Untersuchungen dar. In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Identifizierung der Enzyme und deren Aktivität gesetzt.

3.2 Die Pilzsammlung aus Vietnam und deren enzymatisches Potential

Neben der Nutzbarkeit für mögliche antifungale Wirkstoffe werden Pilze auch aufgrund ihrer sekretierten Biomasse abbauenden Enzyme, wie Cellulasen, Xylanasen, Chitinasen und Lipasen, in der Biotechnologie eingesetzt. Für eine optimierte Anwendung in der Biotechnologie sind effiziente Enzyme, mit einer höheren Umsetzungsrate, einer höheren Stabilität oder auch Enzyme, die unter unterschiedlichen Bedingungen aktiv sind, interessant.

Um die wichtigsten Zersetzer von Cellulose, Xylan, Chitin und Lipide zu identifizieren, wurden neun Habitate ausgewählt, in denen man Pilzisolate mit dieser enzymatischen Aktivität aufgrund des gegebenen Substrates vermutete. Die Anzahl der gesammelten Isolate variiert pro Habitat. Die unterschiedliche Anzahl an gesammelten Pilzisolaten pro Habitat lässt keine Korrelation zwischen den gefundenen Arten und deren Habitat zu. Die gesammelten Pilzisolate geben einen Überblick über das Gattungsspektrum im jeweiligen Habitat. Von 295 gesammelten Pilzisolaten zeigten dabei 211 einen phänotypischen Unterschied. Um eine erste Vorauswahl von enzymatisch aktiven Pilzen aus den 211 Pilzisolaten zu treffen, wurde die Disc Diffusion Methode [Bauer et al. 1966] angewendet. Diese Methode ist ursprünglich für die antimikrobielle Untersuchung von Bakterien entwickelt worden. In dieser Arbeit wurde eine modifizierte Methode als enzymatischer Plattentest etabliert. Während bei der ursprünglichen Anwendung dieses Tests Bakterien auf Antibiotika getestet wurden, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass vom Pilz sekretierte Enzyme das im Agar enthaltene Substrat abbauen. Durch eine Färbung der langkettigen Zucker konnte die Abbaurate des Substrates bestimmt werden. Diese einfach anzuwendende Methode gab einen ersten Überblick über die enzymatische Aktivität der Pilzisolate.

Nach dem qualitativen enzymatischen Aktivitätstest nach der Disc Diffusion Methode, konnten 168 Pilzisolate mit mindestens einer enzymatischen Aktivität der getesteten Enzyme identifiziert werden. Diese 168 Isolate wurden auf der Basis von ITS-Sequenzen taxonomisch eingeordnet. Dafür wurde ein phylogenetischer Baum nach den Kriterien des Maximum Liklihood (ML) und des Maximum Parsimony (MP) [Goker et al. 2011] berechnet. Mit über 150 Referenzsequenzen aus den Datenbanken Mycobank [Robert et al. 2013] und TrichOKEY 2 [Druzhinina et al. 2005] war es möglich, die Sammlung der 168 phänotypisch unterschiedlichen Pilzisolate phylogenetisch in das Reich der Pilze und in die Untergattung der Ascomycota in Gattungen und Sektionen einzuordnen. Für die erste Einordnung in das Reich der Pilze was es nicht notwendig, die Pilzisolate auf Artniveau zu bestimmen. Um die Art jedes Pilzisolates zu ermitteln, ist es empfehlenswert, eine *multi-gene* Phylogenie durchführen [Rintoul et al. 2012]. Dabei werden die Sequenzen der kleinen ribosomale RNA Untereinheit (nrSU) und der großen ribosomale RNA Untereinheit (nrLSU) sowie die ITS Sequenz (ITS1, 5,8S Gen, ITS2) zur Einordnung einbezogen. Außerdem werden die Sequenzen des β-Tubulin Gens, der Elongations Faktor 1α (EF-1α), die Untereinheiten der RNA Polymerase II (RPB1 und RPB2) und die Untereinheit 6 der mitochondrialen ATP Synthase (mtATP6) ausgewertet [Sung et al. 2007; Spatafora et al. 2006]. Alle Markersequenzen werden analysiert und die Art bestimmt. Die ITS Sequenz allein ist für eine genaue Artbestimmung dagegen nicht ausreichend. Ausgewählte Pilze mit herausragenden enzymatischen Aktivitäten wurden im Laufe dieser Arbeit de novo sequenziert und phylogenetisch genauestens bestimmt.

Die meisten Pilzisolate konnten den Gattungen Aspergillus, Penicillium, Trichoderma und Fusarium der Ascomycota zuordnet werden. Vertreter dieser Gattungen kommen in den meisten Habitaten weltweit vor [Jaklitsch und Voglmayr 2015; Samson et al. 2014; Visagie et al. 2014; Lombard et al. 2015]. Die dominante Verbreitung dieser vier Gattungen wurde schon in anderen Pilzsammlungen beobachtet [Ja'afaru 2013]. Die gesammelten Gattungen mit wenigen Pilzisolaten (<20%) waren Mucor, Rhizopus, Cunninghamella und Gongronella aus der Untergattung der Mucoromycota, und Humicola, Taifanglania, Diaporthe, Lasiodiplodia, Curvularia, Talaromyces, aus der Untergattung Ascomycota. Die Pilzisolate der Gattungen Taifanglania, Lasiodiplodia, Cunninghamella und Gongronella und Gongronella faiten enzymatische Aktivität bei den in dieser Arbeit getesteten Enzymen auf. Einige Mitglieder dieser Gattungen zeigten jedoch in anderen Arbeiten eine leichte Aktivität als Zersetzer von Cellulose, Xylan und Fettsäuren [Latha 2013; Gopinath et al. 2002].

Generell sind Vertreter der Gattung *Trichoderma* hauptsächlich auf Pflanzenmaterial, im Boden und auf abgestorbenem Holz zu finden [Kredics et al. 2014]. *Trichoderma ressei* ist der bekannteste und am meisten erforschte *Ascomycota* der letzten Jahre und wird aufgrund seiner Cellulasen und Xylanasen industriell eingesetzt [Nevalainen et al. 1994]. Das lässt die Tatsache erklären, dass kein Pilzisolat der Gattung *Trichoderma* in den marinen Habitaten (Garnelenschalen / Krabbenschalen) gefunden wurde. Die für ihr Wachstum notwendigen kohlenstoffhaltigen Substrate sind in marinen Habitaten nicht zu finden. Man kann spekulieren, dass die Gattung *Trichoderma* ein spezifischeres Substratspektrum aufweist als die Gattung *Aspergillus*, welche in allen neun Habitaten gefunden wurde. Die Gattung *Aspergillus* mit ihren 22 Sektionen und mehr als 250 Arten ist ubiquitär auf der ganzen Welt vertreten [Geiser et al. 2008]. Die gesammelten Gattungen *Penicillium* und *Fusarium* stammen von den Habitaten Mangrovenwald, Bodenoberfläche, dem Ölhaltigen Habitat und den Marinen Habitaten (Garnelenschalen und Krabbenschalen) sowie von Insektenkörpern. Beide Gattungen gelten ebenfalls zu den weit verbreitetsten Pilzen weltweit.

Es konnte gezeigt werden, dass ein breites Spektrum an unterschiedlichen Gattungen in der gesammelten Pilzsammlung aus neun Habitaten in Vietnam gesammelt werden konnte. Dies bestätigt die beschriebene Biodiversität in Vietnam. Außerdem wurde gezeigt, dass die unterschiedlichen Pilzisolate je nach Gattung in ihrem beschriebenen Verbreitungsgebiet vorkommen. Allerdings lässt die unterschiedliche Anzahl an gesammelten Pilzisolaten pro Habitat keine Korrelation zwischen den gefundenen Arten und deren Habitat zu. Sie gibt einen Einblick in die pilzliche Diversität in Vietnam und deren Habitate. Alle Pilzisolate der Sammlung wurden auf ihre Enzymaktivität hin untersucht und entsprechend der untersuchten Enzyme Chitinase, Cellulase, Xylanase und Lipase analysiert.

3.2.1 Chitinasen in der Pilzsammlung

Chitinasen hydrolysieren das Biopolymer Chitin und werden für viele biotechnologische Prozesse eingesetzt (siehe Einleitung 1.4.3). Durch ihre Fähigkeit, pilzliche Zellwände sowie das Exoskelett von Insekten zu zersetzen, werden sie zur Bekämpfung von mikrobiellen Pflanzenpathogen oder als Insektizid eingesetzt [Roberts und Selitrennikoff 1988; Kramer und Muthukrishnan 1997]. Sie zersetzen zudem Chitin zu pharmazeutisch aktiven Produkten wie *N*-Acetyl-D-Glucosamin und Chito-Oligosacchariden, die eine Tumor inhibitorische Wirkung besitzen [Aam et al. 2010; Shen et al. 2009].

Aus dem Habitat Garnelenschalen wurden zwei Arten mit hoher Chitinaseaktivität, Fsh101 (*Aspergillus* Sektion *Nidulans*) und Fsh6 (*Fusarium*) isoliert. Das Isolat Fsh101 weist eine

Chitinaseaktivität von 0,13 U/mg auf. Diese Aktivität ist in etwa vergleichbar mit der Chitinaseaktivität von 0,24 U/mg von Aspergillus nidulans [Reyes et al. 1989] bei einem verwendete Kulturüberstand von 1000 mL, im Gegensatz zu den in dieser Arbeit verwendeten Kulturüberstand von 10 mL. Es war nicht zu erwarten, dass weitere vier FW35. SF7 FF1. Pilzisolate, FW57, und der Gattungen Humicola. Aspergillus Sektion Fumigati und Aspergillus Sektion Flavi, mit einer ähnlich hohen Chitinaseaktivität aus den Habitaten Bodenoberfläche, Mangrovenwald und Früchte isoliert wurde.

Isolierte und charakterisierte Chitinasen der Gattungen Aspergillus, Penicillium und Fusarium wurden bereits beschrieben [Duo-Chuan 2006; Karthik et al. 2014; Silva et al. 2011]. Aufgrund der ubiquitären Verbreitung dieser Gattungen haben sie ein breites enzymatisches Spektrum. Obwohl bei Arten aus der Gattung *Trichoderma* Chitinasen mit hoher enzymatischer Aktivität beschrieben wurden [Duo-Chuan 2006; Karthik et al. 2014], konnte in der Pilzsammlung aus Vietnam kein Isolat der Gattung *Trichoderma* mit Chitinaseaktivität charakterisiert werden. Die Gattung *Trichoderma* ist in den chitinhaltigen Habitaten Krabbenschalen und Garnelenschalen mit nur 6,7% unterrepräsentiert. In den Habitaten Mangrovenwald und Bodenoberfläche ist *Trichoderma* mit 27% bzw. 27,3% häufiger vertreten. Eine solche Häufigkeit wurde auch in anderen Studien dokumentiert [Druzhinina et al. 2012].

3.2.2 Cellulasen in der Pilzsammlung

Cellulasen werden hauptsächlich in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie, in der Textilindustrie sowie bei der Vorbehandlung bei der *Second Generation* Bioethanol Produktion eingesetzt [Arja 2007; Gamage et al. 2010; Kuhad et al. 2011; Mai et al. 2004]. Durch die Verwendung von lignocellulytischer Biomasse beim *Second Generation Bioethanol* besteht das Problem, dass die verwertbaren Zucker in der Biomasse eingeschlossen sind und durch eine Vorbehandlung gelöst werden müssen. Obwohl die Vorbehandlung von Biomasse auch durch chemische sowie physikalische Verfahren erfolgen kann, wie beispielsweise die Säure-Vorbehandlung mit verdünnter Schwefelsäure oder Phosphorsäure [Israilides et al. 1978; Nguyen et al. 2000], ist die biologische Vorbehandlung durch Enzyme kostengünstiger, schneller und umweltfreundlicher [Kumar und Wyman 2009; Kumar und Sharma 2017; Sánchez 2009]. Um die chemischen und physikalischen Vorbehandlungen zu umgehen, ist die Suche nach leistungsstarken Cellulasen von besonderem Interesse [Srivastava et al. 2018]. Die Pilzisolate Fsh13 (Fusarium sp.), FW16.1 (Fusarium sp.) und SF31 (Aspergillus Sektion Terrei sp.) zeigten die höchste Cellulaseaktivität der Pilzsammlung mit 0,05 bis 0,09 U/mg. Viele Arten der Gattungen Fusarium und Aspergillus sind Pflanzenpathogene und gelten als Produzenten von aktiven sekretierten Cellulasen [Kwon et al. 2007]. Cellulasen sind, wie andere Zellwand abbauenden Enzyme, Xylanasen und Endo-Polygalacturonase, beschrieben als mögliche Virulenzfaktoren bei der Infektion von pflanzenpathogenen Pilzen [Cooper et al. 1988; Paccanaro et al. 2017]. Betrachtet man die Habitate, in denen Pilzisolate mit einer Cellulaseaktivität gefunden wurden, so fällt auf, dass eine große Anzahl an Pilzen mit dieser Aktivität in den Habitaten Mangrovenwald und Bodenoberfläche gefunden wurde. Diese Verteilung war aufgrund der Zellwand abbauenden Aktivität zu erwarten. Es scheint zunächst unverständlich, dass auch Pilzisolate mit Cellulaseaktivität in den Habitaten Garnelenschalen und Insektenkörper gefunden wurden, wenngleich mit geringer Anzahl. Dieses Vorkommen weist auf eine promiskuitive β-Glucuronidaseaktivität hin, welche Cellulose abbauen kann [O'Brien und Herschlag 1999; Khersonsky und Tawfik 2010]. Extrazelluläre Cellulasen von Fusarium oxysporum und Aspergillus terreus wurden mit einer Aktivität von etwa 0,5 bis Höhe 0.9 U/mg beschrieben. Die der Aktivität ist von der verwendeten Substratkonzentration abhängig [Abdel-Fatah et al. 2012; Mirzaakhmedov et al. 2007; Dar et al. 2013]. Im Gegensatz zu den beschriebenen aktiven Cellulasen der Gattung Trichoderma [Bischof et al. 2016; Schuster und Schmoll 2010] konnte jedoch innerhalb dieser Studie keine hohe Cellulaseaktivität der Gattung Trichoderma detektiert werden.

3.2.3 Xylanasen in der Pilzsammlung

Neben der Produktion von Biokraftstoffen werden Xylanasen bei biotechnologische Prozesse wie der Nahrung- und Futterindustrie sowie der Bioethanolproduktion verwendet [Beg et al. 2001; Nagar et al. 2012; Sultan et al. 2008]. Die Pilzisolate mit einer nachweislichen Xylanaseaktivität sind ähnlich verbreitet wie die Pilzisolate mit einer Cellulaseaktivität. Dies war zu erwarten, da Cellulasen sowie Xylanasen synergistisch die Pflanzenzellwand von organischem Material abbauen [Murashima et al. 2003; Pérez et al. 2002].

Die Pilzisolate Fsh17, FR1 (0,74 U/mg und 0,97 U/mg, *Aspergillus* Sektion *Flavi*) und FL100 (1 U/mg, *Penicillium* Sektion *Citrina*) weisen eine hohe Xylanaseaktivität auf. Eine spezifische Aktivität von Xylanasen, isoliert aus *Aspergillus flavus*, wurde mit 0,11 bis 20,40 U/mg beschrieben [De Alencar Guimaraes et al. 2013]. Für die Aktivität der Xylanase

spielt das verwendete Substrat eine erhebliche Rolle. Durch ein anderes Substratspektrum ist es möglich, die Aktivität der Enzyme zu optimieren. Während in dieser Arbeit das Xylan von Buchenholz als Substrat verwendet wurde, wurde in anderen Studien gezeigt, dass die **Xylanaseaktivität** bei variierendem Substrat erhöht werden kann [De Alencar Guimaraes et al. 2013]. Wie bei der Cellulaseaktivität der Sammlung bereits an früherer Stelle beschrieben, konnte auch keine Xylanaseaktivität von Pilzisolaten der Gattung Trichoderma festgestellt werden. Dies begründet sich mit hoher Wahrscheinlichkeit dadurch, dass die Xylanasen von Trichoderma ihre höchste Aktivität nur durch eine Substratinduktion erreichen [Juhász et al. 2005; Kubicek und Penttilä 1998]. Xylanasen spielen eine große Rolle bei der Infektion von Pflanzen durch pflanzenpathogene Pilze. Diese wirken oft zusammen mit anderen Zellwand abbauenden Enzymen, um die Pflanzenzellwand der Wirtspflanze abzubauen. Paccanaro et al. [2017] beschrieb, dass die Xylanase (Xyr1) und die Endo-Polygalacturonase (PG1) des phytopathogenen Pilz F. graminearum synergistisch an dem Abbau der Zellwand beteiligt sind und somit ein möglicher Virulenzfaktor ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Pilzsammlung einige Pilzisolate mit einer hohen Xylanaseaktivität aufweist.

3.2.4 Lipasen in der Pilzsammlung

Die höchste Lipaseaktivität wurden bei den Pilzisolaten *Fusarium* sp. Fsh13 (0,14 U/mg) und *Aspergillus* Sektion *Nidulans* sp. Fsh102 (0,27 U/mg) gemessen. Diese Werte sind mit der Lipaseaktivität von *Fusarium* sp. YM-30 von 0,15 U/mg [Mase et al. 1995] und einer Lipase von *Aspergillus nidulans* mit 0,3 U/mg [Mayordomo et al. 1999] zu vergleichen. Beide Pilzisolate der Sammlung wurden im Habitat Garnelenschalen isoliert, welches eine erhebliche Menge an hoch molekularen Kohlenwasserstoffen als Substrat für die enzymatische Funktion der Lipase bietet. Die in dieser Arbeit untersuchte Pilzsammlung aus Vietnam beinhaltet einige Ascomycota mit einer hoher Lipaseaktivität. Diese Pilzisolate sind potentielle Kandidaten für verschiedene industrielle Anwendungsgebiete bei denen aktive Lipasen benötigt werden (siehe Einleitung 1.4.4).

Durch den enzymatischen Aktivitätstest der gesamten Pilzsammlung konnte gezeigt werden, dass viele Pilzisolate aus den neun unterschiedlichen Habitaten eine Enzymaktivität der Chitinase, Lipase, Cellulase und Xylanase aufweisen. Allgemein ist festzuhalten, dass die detektierte enzymatische Aktivität der Pilzisolate mit ihren Habitaten übereinstimmt. So findet man in Habitaten mit viel organischer Biomasse Pilzisolate mit Cellulase- und Xylanaseaktivität sowie in marinen Habitaten Pilzisolate mit Chitinaseaktivität. Die Pilzisolate der Gattung *Trichoderma* konnten nicht mit einer hohen Cellulase- und Xylanaseaktivität detektiert werden.

3.3 Die unterschiedlichen Habitate und *high performance degrader*

Sehr divers in ihrer enzymatischen Aktivität sind die Pilzisolate vom Habitat Ölhaltiges Habitat FL6 (Aspergillus Sektion Terrei), FL10 und FL100 (Penicillium Sektion Citrina), vom Habitat Garnelenschalen, Fsh101, Fsh102, Fsh200 (Aspergillus Sektion Nidulans) und Fsh201 (Penicillium Sektion Citrina) sowie des Habitates Früchte, FF1 (Aspergillus Sektion Flavi), des Habitates Mangrovenwald FW36 (Aspergillus Sektion Fumigati) und des Habitates Bodenoberfläche SF19.1 (Aspergillus Sektion Flavi). Alle diese Pilzisolate zeigen Aktivität in mindestens drei der vier untersuchten Enzyme. Die Pilzisolate FL6 und Fsh102 weisen eine Aktivität in allen vier untersuchten Enzymen auf. Beide Habitate haben eine heterogene Zusammensetzung. Das Habitat Garnelenschalen besteht hauptsächlich aus Chitin sowie aus Proteinen und Lipiden, das Habitat ölhaltiges Habitat ist aus Lipiden und Proteinen zusammengesetzt. Es ist anzunehmen, dass die Heterogenität der unterschiedlichen Energiequellen im Habitat dazu führt, dass die dortigen Pilzisolate ein breit gefächertes enzymatisches Potential haben, welches zur effizienten Degradierung der in diesem Habitat zu findenden Substraten benötigt wird. Im Habitat Bodenoberfläche findet man viele Pilzisolate mit einer niedrigen bis mittlere Aktivität der untersuchten Enzyme. Diese Ansiedlung von Pilzisolaten mit unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten ist auf das heterogene Habitat und die damit einhergehenden Substrate für diverse Enzyme zurück zu führen. An der Bodenoberfläche sind neben lebendem und totem Pflanzenmaterial auch Insekten, Lipide und Proteine zu finden. Es ist anzunehmen, dass die zwei Habitate Ölhaltiges Habitat und Garnelenschalen im Gegensatz zu den anderen untersuchten Habitaten, ein weiteres Spektrum an enzymatischen Aktivitäten aufweisen.

Eine wichtige Charakteristik von so genannten *high performance degraders* (Hochleistungs Zersetzern) ist die geringe Substrat- und Produktinhibition. Es wurde gezeigt, dass das Endprodukt der Enzyme die enzymatische Aktivität hemmt [Andrić et al. 2010]. So wurde beschrieben, dass Glukose eine inhibitorische Wirkung auf die β -Glucosidase von *Aspergillus niger* hat [Xiao et al. 2004]. Durch eine geringe Produktinhibition der Enzyme kann mehr Substrat eingesetzt und somit eine höhere Produktmenge erreicht werden, wie es bei einigen pilzlichen Cellulasen und Xylanasen gezeigt wurde [Ribeiro et al. 2014]. Die in dieser Arbeit präsentierten Enzyme können möglicherweise verwendet werden, um diese

Limitationen zu überwinden. Um ein höheres Potential der enzymatischen Aktivität zu erreichen, wäre es möglich, die Anzuchtbedingungen der Pilzisolate zu verändern. De Alencar Guimaraes et al. [2013] zeigten, dass die Enzymaktivität von Aspergillus flavus und Aspergillus niger bei der Verwendung von 0,5% Maiskolben und 0,5% Zuckerrohr Bagasse im Gegensatz zu 1% Glukose um ein 200-faches gesteigert werden kann [De Alencar Guimaraes et al. 2013]. Urbina-Salazar et al. [2018] beschreibt die erhöhte Chitinase Produktion durch Trichoderma harzianum bei Anzucht des Pilzes in einem Medium, welches Nebenprodukte des chitinhaltigen Pilzes Agaricus bisporus enthält [Urbina-Salazar et al. 2018]. Es wurde bereits beschrieben, dass eine Substratinduktion zur erhöhten enzymatischen Aktivität führt [Juhász et al. 2005; Kubicek und Penttilä 1998; Mandels und Reese 1960]. Die Induktion kann dabei auch durch ein anderes Substrat als das herkömmliche erfolgen. Schuerg et al. [2017] zeigte, dass Xylose die Cellulase Produktion von Thermoascus aurantaicus induziert. Nicht nur ein optimiertes Medium bei der Anzucht des Pilzes führt zur Erhöhung der Enzymproduktion. Bei der Feststoff-Fermentation durch Penicillium citrium konnte die Xylanaseaktivität um das 150-fache erhöht werden [Ghoshal et al. 2012; Ghoshal et al. 2014]. Für die industrielle Anwendung von Enzymen ist es notwendig, dass zwei Schritte berücksichtigt werden: die verwendeten Enzyme müssen heterolog exprimiert und gereinigt sein, um die beste Kapazität auszuschöpfen. Ein zweiter wichtiger Schritt ist, dass das Enzym soweit mutiert und verbessert wurde, um die katalytische Eigenschaft des Enzyms zu optimieren. Eine verbesserte Kapazität der reinen Proteine wurde für verschiedene Enzyme bereits gezeigt. So zeigt die Cellulase von einem Fusarium oxysporum Stamm eine 30-fach erhöhte spezifische Aktivität nach der Aufreinigung [Dar et al. 2013], die Chitinase von Aspergillus fumigatus S-26 eine 61-fache höhere spezifische Aktivität [Jung et al. 2006], für Xylanasen von Penicillium citrium Isolat die spezifische Aktivität um 23-fach [Bagewadi et al. 2016] und die spezifische Aktivität von den Lipasen von Fusarium sp. YM-30 und Aspergillus nidulans [Mase et al. 1995; Mayordomo et al. 1999] konnte um das mehrere 100-fache erhöht werden.

Um eine aufwendige Reinigung der Enzyme zu umgehen, wird in der Industrie oft die Festphasen-Fermentation (SSF) und die Submersfermentation (SmF) angewendet, um die benötigten Enzyme zu produzieren [Couto und Sanromán 2005; Hölker et al. 2004; Subramaniyam und Vimala 2012]. Bei der SSF werden die Pilze in einem festen aber feuchten Substrat angezogen. Bei der SmF werden die Pilze in Flüssigmedium angezogen wobei dieser die Enzyme in das flüssige Medium sekretiert. Ebenso wird die *fed-batch*

Fermentation (FBF) zur Kultivierung von Pilzen angewendet, wie bei der Kultivierung von *Rhodosporidium toruloides* Y4 [Li et al. 2007].

Die in dieser Arbeit verwendeten Wachstumsbedingungen wurden für alle 211 Stämme gleichbleibend angewendet, um diese in ihrem Wachstum und ihrer enzymatischen Aktivität vergleichen zu können. Es ist anzunehmen, dass bei der Anpassung der Wachstumsbedingungen, Temperatur, Medium und Licht, für jedes einzelne Pilzisolat die verschiedenen Enzymaktivitäten drastisch erhöht werden können. Ebenso können unterschiedliche Substrate für den jeweiligen Enzymtest zur Optimierung der Enzymaktivität führen, wie zum Beispiel unterschiedlich lange Kettenlängen bei Fettsäuren für die Lipaseaktivität oder verschiedene kristalline (Avicel® PH-101) und nicht kristalline Cellulosen (Carboxymethylcellulose) für die Cellulaseaktivität.

Es konnte gezeigt werden, dass die Pilzsammlung aus Vietnam einige high producer der getesteten Enzyme Cellulase, Xylanase, Chitinase und Lipase aufweist. Heterogene Habitate besitzen oft Pilzisolate mit einem großen Spektrum an Enzymaktivitäten. Durch unterschiedliche Methoden, wie die Reinigung der Enzyme, die Modifikation der Wachstumskonditionen und durch Substratinduktion kann die Aktivität der beschriebenen Enzyme erhöht werden. Neben den vier getesteten Enzymen ist es ebenfalls möglich, die Pilzsammlung auf weitere für die Biotechnologie interessante Enzyme testen. Für die Industrie sind zum Beispiel Polyethylenterephthalat (PET) abbauende Enzyme interessant zur Reduktion des Plastikmülls [Danso et al. 2018]. Weitere Tests im Hinblick auf Amin-transferierende Enzyme für die Herstellung von Feinchemikalien [Bommarius und Riebel 2004] und für die Produktion von aktiven pharmazeutischen Inhaltsstoffen wie ω-Transaminasen [Aleku et al. 2017; Kelly et al. 2018] könnten mit dieser Pilzsammlung durchgeführt werden. Des Weiteren kann die Aktivität von Laccasen für die Entwicklung von implantierbaren Biosensoren und Biobrennstoffzellen [Rodríguez-Delgado et al. 2015] untersucht werden. Somit hat die in dieser Arbeit charakterisierte Sammlung an 211 Pilzisolaten ein hohes Potential für die Biotechnologie.

3.4 Das Pilzisolat Fsh102 als *high producer* von Xylanasen und Cellulasen

Die Gattung *Aspergillus* gilt weltweit als *high producer* von Cellulasen und Xylanasen mit einem hohen enzymatischen Potential, pflanzliche Biomasse abzubauen [Sajith et al. 2016; Beg et al. 2001]. Speziell die Cellulasen von *Aspergillus niger* und *Aspergillus fumigatus* finden diesbezüglich in der Biotechnologie Anwendung [Ang et al. 2013; Kang et al. 2004]. Das hier identifizierte Pilzisolat Fsh102 ist phylogenetisch in die Gattung *Aspergillus* Sektion *Nidulans* eingeordnet und wurde als *Aspergillus sydowii* identifiziert. In den Enzymtests zeigte sich eine Aktivität bei allen vier getesteten Enzymen, Xylanase, Cellulase, Chitinase und Lipase.

A. sydowii, als weit verbreiteter Saprophyt, wurde bereits als Produzent von Cellulasen und Xylanasen beschrieben [Ghosh et al. 1993; Matkar et al. 2013]. In einem *A. sydowii* Stamm aus Indien konnte Aktivität von Endocellulase, Exocellulase und β-Glucosidase aus dem Gesamtextrakt bei einer Submersfermentation nachgewiesen werden. *A. sydowii* ist bekannt für die Kontamination von Nahrung [Biango-Daniels und Hodge 2018; Piotrowska 2013] sowie als Humanpathogen bei immungeschwächten Menschen und Verursacher von Aspergillosis [Rinaldi 1983]. Das natürliche Verbreitungsgebiet von *A. sydowii* ist hauptsächlich trockenes Material wie Baumwolle und Stroh, Boden und Lebensmittel. Aufgrund seines natürlichen Verbreitungsgebietes war es daher nicht zu erwarten, das Pilzisolat Fsh102 mit einer Cellulaseaktivität von 0,03 U/mg und einer Xylanaseaktivität von 0,61 U/mg im Habitat Garnelenschalen zu finden. Beruhend auf den hohen enzymatischen Aktivitäten und der geringen Anzahl durchgeführter Studien auf dem Gebiet der Enzymaktivität wurde das Pilzisolate Fsh102 für die enzymatische Charakterisierung ausgewählt.

3.4.1 Identifikation zweier Xylanasen aus dem Pilzisolat Fsh102

Xylanasen (EC 3.2.1.8) zählen zu den Hemicellulasen und sind wichtige Enzyme im Abbau den der Pflanzenzellwand. Sie werden in unterschiedlichsten Sparten der Nahrungsmittelindustrie eingesetzt, zum Beispiel zur Aufhellung von Fruchtsäften [Nagar et al. 2012] (siehe Einleitung 1.4.2). Aufgrund der hohen Xylanaseaktivität des Pilzisolates Fsh102 in den Enzymtests wurden die im induzierten Medium aktiven Xylanasen mittels LC/MS-MS Analyse identifiziert. Es wurden zwei Endo-1,4-β-Xylanasen und eine Exo-1,4-β-Xylanase identifiziert. Es war zu erwarten, dass mehrere Endoxylanasen sowie Exoxylanasen durch das induzierte Medium mit Xylan produziert werden um das Substrat Xylan abzubauen. Die Endoxylanasen spalten die β -1,4-Glykosid Bindung in der langen Xylanpolysaccharidkette und es entstehen verzweigte und nicht verzweigte Xylo-Oligosaccharide [Saha und Bothast 1999]. Die Exo-1,4-β-Xylanase spalten die β-1,4-Glykosid-Bindung in Xylo-Oligosaccharide am reduzierten Ende und produzieren kurzkettige Xylo-Oligosaccharide und Xylose. Es ist bekannt, dass Ascomycota mehrere Enzyme mit gleichen oder ähnlichen Eigenschaften je nach Substrat produzieren.

Liao et al. [2015] identifizierte sechs verschiedene Xylanasen von *Penicillium oxalicum* GZ-2-Stamm, die jeweils unterschiedliche Substratspezifizitäten aufweisen. Es ist zu vermuten, dass sich die beiden von Fsh102 produzierten Endoxylanasen unterscheiden, jedoch synergistisch zu einem effektiven Abbau des Substrats führen. Die Unterschiede beider Xylanasen werden in der folgenden Arbeit weiter thematisiert.

Die identifizierten Endo-1,4- β -Xylanasen wurden ohne Signalpeptid im prokaryotischen Expressionsorganismus *E. coli* mit N-terminalem His-Fusionsprotein exprimiert und nativ über eine Ni-NTA-Säule gereinigt. Die Klonierung ohne Signalpeptid führte zur erfolgreichen Expression in der löslichen Fraktion. Das Signalpeptid ist eine Abfolge von Aminosäuren, die oft am N-terminalen Ende eines Proteins fusioniert ist und für den Transport des Proteins innerhalb der Zelle verantwortlich ist. Sie wird nach dem erfolgreichen Transport abgespalten. Signalpeptide haben einen hydrophoben Kern, was die Löslichkeit des Proteins beeinflusst. Singh et al. [2013] zeigte, dass die Klonierung ohne Signalpeptid die Löslichkeit des Proteins positiv beeinflusst. Dies wurde in dieser Arbeit bestätigt.

Xylanasen werden generell posttranslational glykosyliert [Funaguma et al. 1991; Kulkarni et al. 1999]. Die posttranslationale Glykosylierung in Eukaryoten trägt dabei zur erhöhten Löslichkeit der Proteine bei [Solá und Griebenow 2009]. Kloniert man das Gen und exprimiert es in einem prokaryotischen Expressionssystem wie zum Beispiel *E. coli*, entfällt diese posttransionalen Glykosylierung [Marston 1986]. Obwohl zur Expression der Xylanasen ein prokaryotisches Expressionssystem, *E. coli*, verwendet wurde und demnach keine posttranslationale Glykosylierung stattfand, konnten beide Xylanasen in der löslichen Fraktion exprimiert werden.

Die Glykosylierung hat auch Einfluss auf die Aktivität von exprimierten Enzymen. Dotsenko et al. [2016] beschrieb die Abnahme der Enzymaktivität bei mangelnder Glykosylierung der Endocellulase IIa (Cel5A) von *Penicillium verrucosum*. Einen Einfluss der Aktivität auf die exprimierten Xylanasen kann hier nicht ausgeschlossen werden. Die Veränderung der Glykosylierungsstellen kann zur Erhöhung der Enzymaktivität genutzt werden [Adney et al. 2009]. Xylanase I und Xylanase II weisen eine hohe Aktivität auf, aber könnten durch die fehlende Glykosylierung geringere Aktivitäten als homolog exprimierte Xylanasen haben. Um das Risiko einer Aktivitätseinbuße zu umgehen, ist es möglich, die Enzyme in *S. cerevisiae* oder *P. pastoris* zu exprimieren [Beggs 1978; Cregg et al. 2000; Finkelstein et al. 1989]. Die Xylanase I besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 25,5 kDa, welches vergleichbar ist mit dem Molekulargewicht der Xylanase 1 von Aspergillus caespitosus mit 26.3 kDa [Sandrim et al. 2005]. Die Xylanase II dagegen besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 37,1 kDa, welches sich mit dem Molekulargewicht von der Xylanase von Aspergillus ficuum AF-98 mit 35 kDa vergleichen lässt [Lu et al. 2008]. Zwei Xylanasen von A. sydowii SBS 45 mit einem Molekulargewicht von 20,1 kDa und 43 kDa wurden identifiziert [Nair et al. 2008]. Aufgrund des Molekulargewichts kann davon ausgegangen werden, dass es sich um unterschiedliche Xylanasen handelt. Die Xylanase von Nair et al. [2008] wurden aus dem Gesamtextrakt gereinigt und anhand von Fraktionierung durch Ionenaustauschromatographie mittels Aktivitättests identifiziert. Sie wurden nicht wie in dieser Arbeit heterolog exprimiert, die Proteinsequenz identifiziert und ihre Nukleotidsequenz sequenziert, was einen Vergleich mit den hier identifizierten Xylanasen erschwert. Eine Xylobiohydrolase aus A. sydowii mit einem Molekulargewicht von 30 wurde von Ghosh und Nanda [1994] identifiziert. Bei der Reinigung von Xylanase I über die Affinotätschromatographie ist der Verlust an Enzym gering, was man an den Aktivitätsbestimmungen der einzelnen Reinigungsschritte ablesen kann. Die Ausbeute der Elution 1 beträgt 55%, was vergleichbar ist mit anderen Studien [Li et al. 2018]. Bei der Xylanase II geht durch die Reinigungsschritte viel Protein verloren (Ausbeute von 27%). Obwohl der Proteingehalt und auch die Aktivität im Gesamtextrakt von Xylanase II mit 35,74 mg und 57,09 U/mg fast doppelt so hoch ist wie bei Xylanase I mit 17,49 mg und 33,7 U/mg. Bei der Reinigung von Proteinen geht auch das aufzureinigende Enzym durch die verschiedenen Schritte verloren [Bagewadi et al. 2016]. Der Reinigungsquotient von 5,41 bei Xylanase I und 1,96 bei Xylanase II ist indirekt vergleichbar mit dem Reinigungsquotienten von 5,3 bzw. 1,9 bei zwei Xylanasen von Trichoderma inhamatum [Silva et al. 2015]. Bei der erfolgreichen Reinigung von Proteinen sind Anzahl und Position der Histidine im Protein entscheidend. Um die Proteinausbeute beim Reinigungsprozess zu erhöhen, ist es möglich, einen verlängerten His6-Tag zu nutzen, eine um sechs Histidinmoleküle verlängerte Sequenz. Dieses führte bei dem Neurotensin-Membranrezeptor zu einer besseren Bindung an die Säule und damit zu einer besseren Reinigungsperformance des Proteins [Grisshammer und Tucker 1997].

Das Genom von A. sydowii CBS 593.65 besitzt zwei Enzyme der GH10 Familie und drei Enzyme der GH11 Familie. Die Anzahl der Enzyme in den einzelnen GH Familien variiert je nach Art. So hat die verwandte Art Aspergillus oryzae RIB40 vier Enzyme der GH10 Familie und vier Enzyme der GH11 Familie, Aspergillus niger CBS 513.88 hingegen nur

ein Enzym der GH10 Familie, aber vier Enzyme der GH11 Familie [Cantarel et al. 2009; Lombard et al. 2014]. Beim Abbau der Pflanzenzellwand arbeiten vielen xylolytische Enzyme synergistisch zusammen. Gonçalves et al. [2015] zeigte, dass die synergistische Wirkung von fünf Xylanasen aus unterschiedlichen thermophilen Mikroorganismen, *Thermobifida fusca* und *Clostridium thermocellum*, die Produktion von reduzierten Zuckern erhöht.

3.4.2 Die Charakterisierung der Xylanasen aus *A. sydowii* auf ihre biotechnologische Anwendbarkeit

Die Verwendung von Xylanasen ist aus der Biotechnologie seit Jahren nicht mehr wegzudenken. Allerdings werden in industriellen Prozessen verschiedene Lösungsmittel, Salze, ein extremer pH-Wert oder erhöhte Temperaturen verwendet. Um Enzyme in diese Prozesse zu integrieren, ist es erforderlich, dass diese eine gewisse Toleranz gegenüber oben genannten Bedingungen haben müssen. Das Substratspektrum und die Analyse der enzymatischen Hydrolyse ist in der Biotechnologie dabei zuträglich, die geeigneten Enzyme Vor Hydrolyseprofil auszuwählen. allem das ist ein wichtiger Teil der Proteincharakterisierung und ist für die Auswahl des Substrates und für die Ausgangsprodukte ein zentraler Aspekt im Hinblick auf deren Einsatz in der Biotechnologie. Mittels Dünnschichtchromatographie wurden die Reaktionsprodukte der enzymatischen Hydrolyse detektiert. Die langkettigen Xylo-Oligosaccharide werden durch beide Xylanasen zuerst abgebaut, nach 17 h sind kurzkettige Xylosen nachweisbar. Obwohl beide Xylanasen aufgrund ihrer Eigenschaft erst die längerkettigen Xylo-Oligosaccharide schneiden und demnach zur Klassifizierung der Endoxylanasen gehören, ist die Produktion der Reaktionsprodukte ab einem Zeitpunkt von 15 Minuten unterschiedlich. Bei der Xylanase I ist sind erst nach 17 h eine geringe Menge an Xylose auf der Dünnschichtchromatographie sichtbar, während das Reaktionsprodukt Xylose bei Xylanase II schon nach einer Stunde nachweisbar ist. Somit kann man davon ausgehen, dass Xylanase II auch kurzkettigere Oligosaccharidketten angreift. Bei der Xylanase II ist schon nach einer Stunde Xylotriose nachweisbar, welche nach 17 h komplett zu Xylose abgebaut ist. Xylotetraose ist bei beiden Xylanasen nicht nachweisbar, was darauf schließen lässt, dass das Genom von Fsh102 noch eine weitere Xylanase für den Abbau von Xylotetraose benötigt. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch bei der Xylanase XynVII von Aspergillus niger herausgefunden werden [Takahashi et al. 2013]. Es wurden zuerst die Xylo-Oligosaccharidketten mit einem höheren Molekulargewicht abgebaut und dann die Substrate mit geringerem Molekulargewicht. Zwei Xylanasen von *Trichoderma inhamatum* wurden ebenso aufgrund ihrer hydrolytischen Katalyse von Xylo-Oligosacchariden als Endoxylanasen ermittelt [Silva et al. 2015].

Das Substratspektrum eines Proteins gibt Aufschluss darüber, welches Substrat bevorzugt eingesetzt wird, um eine erhöhte Abbaurate zu erlangen. Xylanase I und Xylanase II wurden auf verschiedene Substrate getestet und haben eine vergleichbare Substratspezifizität. Xylan aus Buchenholz ist das bevorzugte Substrat gegenüber anderen getesteten Oligosacchariden wie Stärke, Arabinoxylan vom Weizen oder CMC. Ab einer Kettenlänge von fünf Zuckern bauen beide Xylanasen das Substrat ab. Obwohl die Xylanase II eine Endoxylanase ist, weist sie eine leichte Aktivität von 10% bei Xylotriose als Substrat auf. Xylanase II ist demnach in der Lage, kurzkettige Zucker ab einer Kettenlänge von drei Xylosen abzubauen. Dieses Ergebnis wurde auch mit der Dünnschichtchromatographie belegt. In dieser Studie wurde neben der Xylanase I, die ausschließlich längerkettige Xylo-Oligosaccharide schneidet, eine Exo-1,4-β-Xylanase identifiziert, die wahrscheinlich Xylobiose in Xylose spaltet. Für genauere Aussagen müsste dieses Enzym charakterisiert werden. Man kann spekulieren, dass die Xylanase II gebraucht wird, um die Xylo-Oligosaccharide ab einer Kettenlänge von drei Xylosen zu spalten. Dies erklärt die Produktion von zwei Endoxylanasen mit einer unterschiedlichen Substratspezifizität. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass eine erhöhte Substratkonzentration die Aktivität des Enzyms steigert. Es konnte gezeigt werden, dass die höhere Xylankonzentration zu einer höheren Aktivität führt. Allerdings ist die Löslichkeit des Xylans in Flüssigkeit mit steigender Xylankonzentration erschwert. Dies führte zu einer hohen Standardabweichung bei den Messungen.

Dass beide in dieser Arbeit untersuchten Xylanasen unterschiedlichen sind, ist auch aus ihrer spezifischen Aktivität bei unterschiedlichen Temperaturen ersichtlich. Eine hohe Temperaturtoleranz der Xylanasen ist in der Industrie erstrebenswert, um unter anderem eine Kontamination durch andere Mikroben zu verhindern [Yeoman et al. 2010]. Die Xylanase II hat eine fast doppelt so hohe Aktivität bei 50°C wie Xylanase I, die ihr Optimum bei 30°C hat. Diese Aktivität kann sie über 2 h Stunden lang beibehalten. Bei 70°C ist die Xylanase II noch bis zu einer halben Stunde mit 70% aktiv. Diese Toleranz gegenüber hohen Temperaturen ist höher als die Toleranz der Xylanase Bacillus amyloliquefaciens XR44A, die nur fünf Minuten bei einer Temperatur von 70°C stabil bleibt [Amore et al. 2015]. Xylanase II behält außerdem seine Aktivität bis zu 24 h bei einem sauren pH-Wert von 4,8 und bis zu 24 h bei einem basischen pH-Wert von 9. Die Xylanase von *Penicillium* sp. CGMC 1669 weist ebenso Temperaturoptimum und ein eine

Temperaturstabilität von 40°C und eine pH-Stabilität zwischen einem pH-Wert von 4,5 - 9 auf [Liu et al. 2010]. Diese Werte sind vergleichbar mit der Xylanase von *Aspergillus lentulus*, die ein pH-Optimum von 5,3 und ein Temperatur-Optimum von 50°C aufweist [Kaushik et al. 2014].

Die Xylanase XynVII von *Aspergillus niger* hat vergleichbare Temperatur- und pH-Stabilität. Sie ist aktiv bei einem pH-Wert bis zu 10 und einer Temperatur bis etwa 60°C über 24 h [Takahashi et al. 2013]. In industriellen Prozessen, wie das *biobleaching* von Zellstoff und Papier, bei dem Xylanasen bevorzugt zum Einsatz kommen, bieten beide Charakteristiken einen Vorteil [Sridevi et al. 2017]. Die Xylanasen von *Aspergillus sydowii* identifiziert von Nair et al. [2008] zeigten ihr Temperaturoptimum bei 50°C jedoch bei einer Inkubationszeit von 4 h. Xylanase I erreicht ihre höchste Aktivität bei 30°C, bleibt aber bis zu 192 h stabil. Ebenso bleibt sie bei einem basischem sowie saurem pH-Wert für ca. 7 Tage stabil. Demnach ist die Xylanase I für Verfahren, bei denen das Enzym für längere Zeit in nicht neutralem pH-Wert das gewünschte Substrat umsetzen soll, geeignet. Diese hohe Aktivität in einem breiten pH-Spektrum ist für die biotechnologische Nutzung von Vorteil verglichen mit einer Xylanase von *Aspergillus niger*, die ihren optimalen pH-Wert bei 8 aufweist [Taneja et al. 2002].

Ein weiterer Aspekt, um die biotechnologische Nutzbarkeit der Enzyme zu untersuchen, ist ihre Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln, Salzen und nichtionischen Tensiden, die häufig in industriellen Reinigungsmitteln angewendet werden. Xylanase I und Xylanase II weisen eine unterschiedliche Aktivität in Gegenwart verschiedener Chemikalien auf. Während Xylanase I eine höhere Toleranzgrenze bei organischen Lösungsmitteln und Alkoholen hat, weist Xylanase II auch bei niedrigen Konzentrationen dieser Chemikalien nur eine geringe Aktivität auf. Bei dem Lösungsmittel DMSO allerdings, welches in biotechnologischen Prozesse aufgrund seiner lösenden Eigenschaft von organischen Materialien und anorganisch Salze eingesetzt wird [Gaylord Chemical Company 2014], hat die Xylanase II keinerlei Einbußen bei der Aktivität bei 5% sowie 30% im Gegensatz zur Xylanase von *Aspergillus niger* C3486, welche schon bei geringen Konzentration von 2% DMSO inhibiert wird [Yang et al. 2010]. Xylanase I weist bei einer DMSO-Konzentration von 30% nur noch 30% Aktivität auf.

Bei der Untersuchung der Toleranz gegenüber anorganischen Salzen, zeigten sich unterschiedliche Inhibitionen von Xylanase I und Xylanase II gegenüber den Salzen MgCl₂ und MnCl₂. Die Xylanase I wird erst bei einer Konzentration von 100 mM MgCl₂ zu 50%

inhibiert, die Xylanase II hat schon bei einer Konzentration von 5 mM MgCl₂ nur noch 50% Aktivität. Die Glykosidhydrolasen sind aufgrund ihres katalytischen Mechanismus nicht Co-Faktor abhängig. Um die Inhibierung durch die Salze erklären zu können, sind weitere Untersuchungen notwendig. Im Gegensatz zu nicht Co-Faktor abhängigen Enzymen sind die Glykosyltransferasen *fold*-A Co-Faktor abhängig [Lairson et al. 2008]. Das nichtionische Tensid DDT, welches Disulfidbrücken aufbricht und somit die Faltung des Enzymes beeinflusst, hat in beiden getesteten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Aktivität beider Xylanasen. Xylanase I besitzt nur ein Cystein und kann keine Disulfidbrücken bilden, Xylanase II besitzt in seiner AA Sequenz drei Cysteine, jedoch in einem Abstand von > 5 Ångstrom. Daher sind die in dieser Arbeit identifizierten Xylanasen wahrscheinlich nicht in der Lage intramolekulare Disulfidbrücken auszubilden und werden aufgrund dessen nicht von DDT inhibiert.

Die Anwesenheit des Komplexbildners EDTA mit einer Konzentration von 2 mM bewirkt bei der Xylanase I eine spezifische Aktivität von 110%, was höher ist als die Aktivität von einer β -Xylosidase von *Dictyoglomus thermophilum* mit 94% relativer Aktivität bei einer EDTA Konzentration von 1 mM [Li et al. 2018]. EDTA in einer Konzentration von 50 mM wirkt dagegen hemmend auf beide Xylanasen. EDTA kann durch Komplexbildung bivalente Ionen entziehen und somit die Aktivität von Proteinen hemmen, die zweiwertige Ionen als Co-Faktoren benötigen. Wie bereits diskutiert, sind die Glykosidhydrolasen nicht Co-Faktor abhängig, wobei es dennoch möglich ist, dass die Proteinfaltung leicht gestört wird.

Gegenüber den Tensiden Tween 20 und Triton X 100 hat die Xylanase I eine höhere Toleranz als Xylanase II. Xylanase I besitzt bei Zusatz von 5% Triton X 100 noch eine spezifische Aktivität von etwa 100%. Im Gegensatz dazu hat die Xylanase von *Dictyoglomus termophilum* nur eine spezifische Aktivität von 32% bei 0,5% Triton X 100 [Zhang et al. 2010]. SDS hat eine derart inhibitorische Wirkung, dass beide in dieser Arbeit untersuchten Xylanasen keine Aktivität mehr aufweisen. Dies war zu erwarten, da SDS die nichtkovalenten Bindungen der Proteine aufbricht und somit deren Quartär- und Tertiärstruktur zerstört, was zu einer Fehlfaltung bzw. Auffaltung der Enzyme führt. Es gibt nur wenige Enzyme, die nicht durch SDS gehemmt werden [Vincenzini et al. 1985]. Die Proteasen von *Bacillus clausi* I-52 [Joo et al. 2003] und *Bacillus* sp. RGR-14 [Oberoi et al. 2001] gehören beispielsweise dazu. Die Gründe dafür sind die Ausbildung von mehr nichtkovalenten Bindungen bei Proteasen. Neben der Charakterisierung der Xylanasen, also der Bestimmung ihres optimalen pH-Wertes und Temperaturstabilität sowie deren Inhibition durch organische Lösungsmittel, Salze und nichtionische Tenside, ist die Analyse des aktiven Zentrums ein wichtiger Aspekt biotechnologische Anwendung. Die 3D-Struktur für die der Xylanasen der Glykosidhydrolasen Familien GH10 und GH11 ist bekannt [Henrissat et al. 1995; Wakarchuk et al. 1994]. Aufgrund von Sequenzhomologien von den beiden in dieser Arbeit analysierten Xylanasen und von Aminosäuresequenzen von Xylanasen aus der Datenbank PDB war es möglich, die 3D-Struktur der Xylanase I und Xylanase II zu modulieren. Xylanase I bildet in der Tertiärstruktur eine *jelly roll fold*, was für die Glykosidhydrolasen Gruppe GH11 zutrifft [Wakarchuk et al. 1994]. Weitere Xylanasen der Familie GH11 bilden ebenso eine jelly roll fold, wie die Xylanase 1 von Aspergillus niger [Krengel und Dijkstra 1996] und eine Xylanase von Trichoderma longibrachiatum [Moukhametzianov et al. 2008]. Xylanase II hingegen bildet in ihrer 3D-Struktur eine $(\alpha/\beta)_8$ TIM barrel fold, was für die Glykosidhydrolasen Familie GH10 zutrifft [Henrissat et al. 1995]. Die GH10 Xylanasen von Thermoascus aurantiacus und Fusarium oxysporum bilden ebenso eine TIM barrel fold [Dimarogona et al. 2012; Vardakou et al. 2005]. Die Art der Faltung der Proteine ist nicht verknüpft mit einer funktionellen Klassifizierung der Enzyme. Das aktive Zentrum der Familien GH10 und GH11 wurde schon beschrieben [MacLeod et al. 1994; Miao et al. 1994; Tull et al. 1991] und konnte somit mittels zielgerichteter Mutagenese ausgeschaltet werden. Hierfür wurden jeweils zwei Glutaminsäuren (Xylanase I an Position 97 und 155, Xylanasen II an Position 155 und 241), die für die Bindung des Substrates im aktiven Zentrum wahrscheinlich verantwortlich sind, durch zwei Methionine ausgetauscht. Der Austausch des Kodons für Glutaminsäure zu Methionin ist eine gängige Methode bei der Ausschaltung des aktiven Zentrums von Enzymen, da beide in etwa den gleichen sterischen Raumanspruch haben. Die Distanz zwischen den substratbindenden Aminosäuren und dem Substrat selber liegt bei der Xylanase I bei 3,7 und 4,7 Å und bei Xylanase II bei 3,0 Å und 5,4 Å. Der Abstand zwischen dem Enzym und dem bindenden Substrat sollte keinen größeren Abstand als 5 Å haben, da sonst keine Enzym-Substrat-Bindung zustande kommt. Bei der Distanzmessung ist zu berücksichtigen, dass es sich bei den Homologie-Modellen um starre Strukturen handelt, quasi eine Momentaufnahme. Proteine, in Lösung, sind jedoch in Bewegung und dadurch werden zeitweise größere und kleinere Distanzen möglich. Es wurden für beide Xylanasen jeweils zwei Einzelmutanten durch Austausch von Glutaminsäure in Position 97 und 188 bei Xylanase I und bei Xylanasen II an Position 155 und 241 bzw. eine jeweilige Doppelmutante für jede Xylanase generiert. Vergleicht man die

katalytische Aktivität der Mutanten mit den nicht mutierten Xylanasen, so beobachtet man eine Aktivitätseinbuße von mehr als 90% bei allen Einzelmutanten (E97M, E188M, E155M und E241M) sowie bei den Doppelmutanten (E97M / E188M und E155M / E241M). Durch den Koshland-Haltemechanismus, die Bindung und Umsetzung des Substrates durch zwei Aminosäuren (siehe Einleitung 1.5), war zu erwarten, dass die Einzelmutanten E97M der Xylanase I und E155M der Xylanase II noch Substrat in kleinen Mengen umsetzen. Bei den Einzelmutanten wird das Substrat noch am aktiven Zentrum gebunden, wodurch eine andere Aminosäure als Nukleophil agieren kann. Bei der Doppelmutante hingehen sollte die Enzym-Substrat-Bindung nicht zustanden kommen. Da bei den Doppelmutanten von Xylanase I (E97M / E188M) und von Xylanase II (E155M / E241M) jeweils bis zu 10% Aktivität nachgewiesen wurde, kann man spekulieren, dass andere Aminosäuren im unmittelbaren Umfeld des aktiven Zentrums die Katalyse zum Teil übernehmen.

Die in dieser Arbeit identifizierten und charakterisierten Xylanasen können wegen ihrer Eigenschaften in der Biotechnologie für die verschiedensten Anwendungsgebiete (siehe Einleitung 1.4.2) angewendet werden. Xylanase I ist bei 30°C für bis zu sieben Tage stabil und hat eine hohe Toleranz gegenüber Lösungsmitteln, Salzen und Detergenzien. Xylanase II ist für eine Stunde bei 70°C aktiv und für mindestens zwei Stunden bei 50°C. Xylanase II ist bei 2 mM EDTA noch zu 100% aktiv und ist vermutlich in der Lage, Xyloseketten mit weniger als fünf Xylose-Einheiten zu spalten. Die untersuchten Xylanasen könnte man auch für die Anwendung zur Erstellung eines Xylanosomes verwenden. Xylanosome sind Protein-Komplexe, die aus Xylanasen und anderen Hemicellulasen bestehen [McClendon et al. 2012]. Diese Xylanasome weisen eine erhöhte Produktivität auf und können synergistisch mit Cellulasen die Pflanzenzellwand effizient abbauen. Die Existenz von Protein-Komplexen wurde bereits durch das Cellulosome des Mikroorganismus Clostridium thermocellum beschrieben [Lamed und Bayer 1988]. Sie sind zusammengesetzt aus Zellwand abbauenden Enzymen. Wie auch die Cellulosome können die Xylanasome künstlich hergestellt und für die Biotechnologie angewendet werden [Nordon et al. 2009; McClendon et al. 2012].

3.4.3 Identifizierung der vier Cellulasen aus dem Pilzisolat Fsh102

Das Pilzisolat Fsh102 zeigte im Plattentest eine erhöhte Cellulaseaktivität. Daher wurde die Cellulaseaktivität quantitativ im Flüssigkeitstest untersucht. Identifiziert wurden neun extrazelluläre Cellulasen im induzierenden Medium mit CMC. Die Endo- und Exocellulasen sind hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität besonders interessant für den Abbau von kristalliner Cellulose. Aufgrund dessen beschränkte sich die Identifikation, Klonierung und Expression auf zwei Endo-(1,4)- β -D-Glucanasen (EC 3.2.1.4) und zwei Exo-(1,4)- β -D-Glucanasen (EC 3.2.1.91). Die kristalline Cellulose ist eine stark verzweigte und geordnete Struktur der Cellulose. Aufgrund der Schwierigkeit des Abbaus der kristallinen Cellulose ist die Identifikation von neuen Endocellulasen aus Pilzen von besonderem Interesse für die Biotechnologie. Endo1 gehört zur Glykosidhydrolasen Familie GH5, welche β-Glucosidasen und β-Galactosidasen beinhalten. Endo2, Exo1 und Exo2 sind Mitglieder der GH7. Der Reaktionsmechanismus der Enzyme beider Familien unterliegen, ebenso wie bei den Xylanasen der GH Familien GH10 und GH11, dem Koshland-Haltemechanismus [Gebler et al. 1992; Koshland 1953; Withers et al. 1986]. Durch die Produktion von neun verschiedenen Cellulasen, die in unterschiedlichen Bereichen der Cellulose-Polysaccharidkette wirken, kann man annehmen, dass alle sekretierte Cellulasen synergistisch das Substrat CMC abbauen. Ascomycota, sowie auch Bakterien, produzieren meistens mehrere Cellulasen mit gleicher oder ähnlicher katalytischer Aktivität, um die Effizienz des Substratabbaus zu erhöhen [Reese 1956; Woodward 1991]. Die Fähigkeit der Enzyme, zusammen schneller Substrate abzubauen, ist für die Industrie von großer Bedeutung. Cellulosomen, natürlich produziert oder in genetisch manipulierter Weise, werden in der Industrie eingesetzt [Gunnoo et al. 2016; Lamed und Bayer 1988]. Die industriellen Cellulasen, die kommerziell genutzt werden, stammen unten anderem von dem Ascomycota Aspergillus niger [Singh et al. 2016]. Die hier identifizierten Cellulasen weisen aufgrund ihrer Einordnung in die GH Familien und ihrer Sequenzhomologie darauf hin, dass sie zu den Endocellulasen gehören.

Die Expression der vier Cellulasen erfolgte wie bei den Xylanasen im Expressionsorganismus *E. coli* ohne Signalpeptid, aber mit N-terminalem His₆-Tag. Alle Cellulasen konnten im Gesamtextrakt nachgewiesen werden und das erwartete Molekulargewicht mittels Western-Blot und mit einem His₆-Tag spezifischen Antiserum bestätigt werden. Die Reinigung und Charakterisierung dieser Cellulasen kann ebenso wie bei den Xylanasen erfolgen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass vier Endocellulasen aus einem Pilz erfolgreich in ein prokaryotisches Expressionssystem kloniert werden konnten und die Expression im Gesamtextrakt nachgewiesen werden konnte.

76

3.5 Enzymatische Aktivität des Pilzisolate FW16.1 und FW57 und deren CAZyme Analyse bei Verwendung verschiedener Substrate

Pilze produzieren abhängig vom Substrat viele verschiedene Enzyme, um möglichst effizient Substrat abzubauen [Gupta et al. 2016]. Um die genaue Zusammensetzung der sekretierten Kohlenhydrat aktiven Enzyme (CAZyme) zu untersuchen, die der Pilz beim Abbau von Substrat produziert, dient die CAZyme Analyse. Eine Möglichkeit dabei, ist die sekretierten Enzyme mittels LC/MS-MS zu identifiziert und mit der CAZyme Datenbank abzugleichen. Alle Kohlenhydrat aktiven Enzyme, wie Cellulasen, Chitinasen und Xylanasen, aber auch Esterasen und Transferasen, werden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit in Gruppen und Familien unterteilt, um diese bioinformatisch zu klassifizieren. Die hier untersuchte Pilzkollektion aus Vietnam bietet eine Sammlung von 69 Pilzisolaten mit lignocellulytischer Aktivität, sowie Pilzisolate mit der Fähigkeit Chitin abzubauen. Davon wurde ein Pilzisolat mit einer Cellulaseaktivität (FW16.1) und ein Pilzisolat mit einer Chitinaseaktivität (FW57) untersucht. FW16.1 zeigte in der Pilzsammlung eine hohe Cellulaseaktivität (0,05 U/mg). Kommerziell erhältliche Cellulasen von Aspergillus niger können eine Cellulaseaktivität von 0,3 U/mg und 0,8 U/mg aufweisen (Sigma Aldrich, Deutschland, Bestellnummer: C1184 und 22178). Das Pilzisolat FW16.1 wurde durch die phylogenetische Einordnung, mittels ITS-Sequenzierung, als Spezies zugehörig zum Fusarium solani Spezies Komplex (FSSC) eingeordnet [Nalim et al. 2011; O'Donnell 2000; O'Donnell et al. 2008; Short et al. 2013]. F. solani wurde bereits für seine Cellulaseaktivität beschrieben [Dutta et al. 2018; Wood und McCrae 1977]. Das Pilzisolat FW57 wies beim quantitativen Enzymtest eine Chitinaseaktivität von 0,11 U/mg auf. Die Chitinaseaktivität von FW57 ist nicht zu vergleichen mit kommerziell erhältlichen Chitinasen wie zum Beispiel von Trichoderma viride mit einer spezifischen Aktivität von 600 U/mg (Sigma Aldrich, Deutschland, Bestellnummer C8241). Mit der Sequenzierung der ITS-Region (internal transcribed spacer) und der großen ribosomalen RNA Untereinheit (nrLSU), wurde das Pilzisolat FW57 phylogenetisch als Humicola fuscoatra identifiziert. Bisher gibt es wenig Berichte über das Vorkommen, die Verbreitung und das enzymatische Potential von H. fuscoatra und es wird in dieser Arbeit zum ersten Mal als Chitinase aktiver Pilz beschrieben. Um eine CAZyme Analyse durchzuführen, wurden beide Pilze de novo sequenziert. Das Genom von H. fuscoatra ist in dieser Arbeit zum ersten Mal sequenziert worden, das Genom von F. solani MPI-SDFR-AT-0091 v1.0 wurde im Rahmen des 1000 Fungal Genomes Project 2018 publiziert [1000 Fungal Genomes Project - JGI 2018;

Nordberg et al. 2014]. Zur Grundlage der CAZyme Analyse beider Pilzisolate wurden die in dieser Arbeit sequenzierten Genome verwendet.

3.5.1 Enzymaktivität der Pilzisolate FW16.1 und FW57 bei unterschiedlichen Substraten Die enzymatische Aktivität von FW57 und FW16.1 wurde, basierend auf den Tests des quantitativen Enzymtests, in Anwesenheit unterschiedlicher Substrate gemessen. FW16.1 zeigte die höchste Cellulaseaktivität bei dem Substrat Hydroxyethylcellulose. Hydroxyethylcellulose ist ein Polymer, welches in der Arzneimittelindustrie und für die Herstellung für Kosmetika eingesetzt wird [Holtzapple 2003]. Child et al. [1973] beschrieb die Hydroxyethylcellulose als gutes Substrat für die Ermittlung von Cellulaseaktivität. Die geringste Cellulaseaktivität (0,18 U/mg) weist FW16.1 bei dem kristallinen Substrat Avicel auf. Vergleicht man die Cellulaseaktivität von FW16.1 der unterschiedlichen Substrate sieht man, dass kristalline sowie nicht kristalline Cellulose vom Pilz abgebaut werden, er jedoch aktiver bei nicht kristalliner Cellulose wie der Carboxymethylcellulose und der Hydroxyethylcellulose ist. Der Abbau von kristalliner Cellulose ist durch die verknüpfte Struktur erschwert. Cellulose besteht aus einer eng verzweigten Struktur von hunderten bis tausenden 1,4-β-Glucose Molekülen mit kristallinen und amorphen Bereichen. Aufgrund der komplexen Struktur und dem damit einhergehenden schwierigen Abbau, ist die Suche nach Enzymen mit einer hohen Cellulaseaktivität von besonderem Interesse.

Die Chitinaseaktivität von FW57 wurde bei den Substrat Chitin und Chitosan (verwendet wurde Chitosan bei unterschiedlichen Molekulargewichten) getestet. FW57 zeigt die höchste Chitinaseaktivität (0,037 U/mg) bei dem Substrat Chitosan mit einem mittleren Molekulargewicht. Chitosan ist ein Biopolymer und wird durch die Deacetylierung von Chitin gewonnen [Shahidi und Synowiecki 1991]. Man kann spekulieren, dass das Pilzisolat FW57 aktive Chitosanasen (EC 3.2.1.132) sekretiert, die bevorzugt Chitosan mit mittlerem Molekulargewicht abbauen. Chitosanasen spalten die 1,4-β-Verbindungen zwischen D-Glucosaminen des deacetylierten Chitins. Die niedrigste Chitinaseaktivität wurde bei dem Substrat Chitin detektiert. Chitin, als stark acetylierte N-Acetyl-D-Glucosamine-Kette kann schwieriger hydrolytisch abzubauen werden, als das deacetylierte Chitosan. Man kann spekulieren, dass das Pilzisolat FW57 eine hohe Chitosanaseaktivität und eine geringe aufweist. Die Chitinaseaktivität des Pilzisolates FW57 Chitinaseaktivität ist substratspezifisch. Die Enzymaktivität kann durch optimierte Expressionskonditionen und die Reinigung der aktiven Enzyme erhöht werden. Dies zeigte Thakker et al. [2016], die die Chitinaseaktivität einer Chitinase von *Baccillus* sp. durch die Enzymaufreinigung um das 1,5-fache erhöhten. Eine andere Möglichkeit, die Aktivität der Chitinasen des Pilzisolates FW57 weiter substratspezifisch zu untersuchen, ist die Verwendung von α -Chitin und β -Chitin unterschiedlichen Ursprungs. Hajji et al. [2014] beschrieb, dass die Struktur von Chitin und Chitosan je nach Ursprungsorganismus unterschiedlich ist.

Es konnte anhand von enzymatischen Aktivitätstests, bei verschiedenen Substraten gezeigt werden, dass FW16.1 und FW57 je nach Substrat eine unterschiedlich hohe Aktivität besitzen. FW16.1 baut bevorzugt nicht kristalline Cellulose ab, FW57 produziert neben Chitinasen auch Chitosanasen, die eine hohe Aktivität bei Chitosan mit mittlerem Molekulargewicht aufweisen. Beide Pilzisolate können durch Optimierung des Substrates ihre enzymatische Aktivität verstärken und somit potentiell in biotechnologischen Verfahren verwendet werden.

3.5.2 CAZyme Analyse der Pilzisolate FW16.1 und FW57

Um einen allgemeinen Überblick der CAZyme bekommen, die potentiell von den Pilzisolaten FW57 und FW16.1 im Genom kodiert sind, wurden die Pilzisolate FW57 und FW16.1 de novo sequenziert und mit der CAZyme Datenbank abgeglichen. Dies zeigte, dass die Verteilung und die Anzahl der CAZyme Familien zwischen FW16.1 und FW57 variieren. Zhao et al. [2013] verglich 103 pilzliche Proteome von unterschiedlichen Spezies und stellte fest, dass die Pilzspezies eine starke Diversität in der Anzahl und der Familien besitzen. Generell wurden bei dem Pilzisolat FW16.1 mehr CAZyme gefunden (694) als bei dem Pilzisolat FW57 (635). Die Diversität der Anzahl und der Familien der CAZyme, je nach Spezies, zeigte auch die Untersuchung der Glykosidhydrolasen (GH) von Aspergillus nidulans [Martinez et al. 2008]. Während in der vorliegenden Arbeit bei dem Pilzisolat FW16.1 321 und bei dem Pilzisolat FW57 257 Gene der Glykosidhydrolasen identifiziert wurden, weist A. nidulans nur 247 verschiedene Gene der GHs auf. Trichoderma reesei, obwohl oft als Zellwand abbauender Pilz und industriell genutzt beschrieben, besitzt nur 200 mögliche Enzyme der GH Familie [Martinez et al. 2008]. Generell kann man sagen, dass bei Zellwand abbauenden Pilzen wie Trichoderma reesei oder Aspergillus nidulans mehr Gene der Familie der Glykosidhydrolasen zu finden sind, als bei nicht Zellwand abbauenden Pilzen wie Candida albicans oder Candida glabrata [Zhao et al. 2013]. Dennoch ist allein die Anzahl der Enzyme der GH Familie nicht mit deren enzymatischer Effektivität korrelierbar. Das Bakterium Clostridium termitidis kann nur 199 Glykosidhydrolasen produzieren, obwohl es für seine cellulytische Aktivität bekannt ist [Munir et al. 2014]. C. thermocellum, ebenso beschrieben als effizienter consolidated bioprocessing (CBP)

Kandidat [Lynd et al. 2005], bildet von den 133 Glykosidhydrolasen Familien nur 27 im Gegensatz zu FW16.1 mit 58 GH Familien [Munir et al. 2014]. Caldicellulosiruptor bescii besitzt nur 88 CAZyme, welche aber multi-modular und auch multi-funktional sind [Dam et al. 2011]. Das Gen-Cluster von C. bescii kodiert mehrere Gene der *Carbohydrat-Binding-Modules* CBM3 und unterschiedliche Familien der Glykosidhydrolasen. Man kann spekulieren, dass C. bescii aufgrund der multi-funktionalen Eigenschaft der Gen-Cluster mit weniger CAZyme Genen auskommt. Der Mechanismus der Gen-Cluster von C. bescii im Vergleich zu dem Cellulase System Cel7A von T. reesei ist unterschiedlich [Yarbrough et al. 2017]. Durch die CAZyme Analyse konnte gezeigt werden, dass die Pilzisolate FW16.1 und FW57 unterschiedlich viele Gene für CAZyme kodieren, dies aber vermutlich nicht in Relation mit der Biomasse abbauenden Funktion gesetzt werden kann. Um potentielle multi-funktionelle CAZyme der Pilzisolate FW16.1 und FW57 zu identifizieren, sind weitere Analysen notwendig.

3.5.2.1 Die substratspezifische CAZyme Analyse des Pilzisolates FW16.1 und deren biotechnologische Anwendung

Das Sekretieren der Enzyme bei unterschiedlichen Substraten kann für industrielle Prozesse, in denen Enzymgemische zum effektiven Abbau von Biomasse eingesetzt werden, von Interesse sein. Um die Zusammensetzung der sekretierten Enzyme zu analysieren, wurden diese vom Pilzisolat FW16.1 in unterschiedlichen Substraten mittels LC/MS-MS identifiziert und mit der CAZyme Datenbank verglichen. Durch die *de novo* Sequenzierung konnten die Gene der sekretierten CAZyme im Genom lokalisiert und auf die assemblierten *Scaffolds* angeordnet werden.

Um einen Unterschied der sekretierten CAZyme zu detektieren, wurde das Pilzisolat FW16.1 aufgrund seiner Cellulaseaktivität mit den Substraten Avicel. Hydroxyethylcellulose, α-Cellulose und CMC (geringe bis hohe Viskosität) angezogen und die sekretierten CAZyme identifiziert. Dabei wurde eine große Diversität der sekretierten CAZyme Familien festgestellt. Die sekretieren Enzyme unterscheiden sich je nach Substrat. Cellulose wird hauptsächlich durch die Endo-(1,4)-β-D-Glucanasen (EC 3.2.1.4), die Exo-(1,4)- β -D-Glucanasen (EC 3.2.1.91) und die die β -Glucosidase (EC 3.2.1.21) abgebaut. Zusätzlich sekretiert der Pilz Enzyme der Oxidoreduktasen (AA) Familien und Carbohydrate-Binding-Modules (CBM). Die Enzyme der AAs und die CBMs unterstützen die Glykosidhydrolasen (GH), zu der alle drei genannten Cellulasen zählen, bei dem Abbau der Cellulose [Beeson et al. 2015; Forsberg et al. 2011; Levy und Shoseyov 2002; Morgenstern et al. 2014]. Der komplizierte Abbau von Cellulose erklärt die hohe Diversität an sekretierten CAZymen, die in der CAZyme Analyse von FW16.1 gefunden wurden. Die sekretierten Enzyme, die bei allen getesteten Substraten vorkommen, sind vermutlich Cellulose spezifische Enzyme, wie die GH16 und die GH55, welche beide Endo-1,3-β-Glucanasen beinhalten. Die Glykosidhydrolasen Familie GH74 beinhaltet Enzyme mit einer Endoglucanaseaktivität. Die Glykosidhydrolasen der Familie GH72 beinhaltet Enzyme der β-1,3-Glucanosyltransglycosylasen. Die Glykosidhydrolasen sind in der Lage sich mit verschiedenen *Carbohydrate-Binding-Modules* (CBMs) zusammenzufügen, um Cellulose effizienter abzubauen. Die CBMs binden an das Polysaccharid, bringen das Enzym nah an das Substrat, womit die Enzymkonzentration an der Oberfläche des Substrates erhöhen wird [Bolam et al. 1998; Teeri et al. 1998; Tomme et al. 1995a; Tomme et al. 1995b; Tomme et al. 1998; Srisodsuk et al. 1997]. Die dadurch verursachte geringe Distanz des Substrates zum Enzym führt zur schnelleren Umsetzung des Substrats. Bei FW16.1 ist zu beobachten, dass in allen Substraten die Glykosidhydrolasen Familien GH3, GH5 und GH7 in Kombination dem Modul CBM1 sekretiert werden. Die GH Familien GH3, GH5 und GH7 beinhalten Enzyme mit Cellulaseaktivität und das Carbohydrate-Binding-Module CBM1 zählt zu den Cellulose spezifischen Modulen und bindet an Cellulose Polysaccharidketten [Henrissat 1991; Henrissat und Bairoch 1996; Lehtio et al. 2003]. Die Enzyme der Glykosidhydrolasen können sich ebenso mit mehreren Mitgliedern der Carbyhydrate-Binding-Modul verbinden wie der Enzymkomplex GH71+CBM24+CBM24 zeigt. Es wurden bisher noch nicht viele Mitglieder der Glykosidhydrolasen Familie GH71 detektiert. Die beschrieben Enzyme der GH71 besitzen eine α-1,3-Glucanasenaktivität (EC 3.2.1.59) [Wei et al. 2001]. Mitglieder des Moduls CBM24 wurden bereits für ihre Funktion, an die α -1,3-Glucanasen zu binden, beschrieben [Fuglsang et al. 2000]. Man kann spekulieren, dass durch die Verbindung von zwei CBMs mit einem Mitglied der Glykosidhydrolasen die hydrolytische Aktivität verstärkt wird. Diese Kombination von mehreren Carbohydrate-Binding-Modules mit Glykosidhydrolasen wurde bereits bei Bakterien beschrieben [Dam et al. 2011]. Die Glykosidhydrolase Familie GH5, ebenso bei allen Substraten detektiert, enthält Enzyme wie Cellulasen, Xylanasen, Mannasen, Xyloglucanasen und Galactanasen, die funktionell für den Abbau von Biomasse interessant sind [Aspeborg et al. 2012]. Enzyme der Familie GH5 sind die meist verbreiteten Glykosidhydrolasen in Pilzen und kommen nur in Eukaryoten vor [Li und Walton 2017]. Das Fehlen der Glykosidhydrolasen der GH5 Familie bei Prokaryoten lässt auf eine paraloge Entwicklung im Laufe der Evolution schließen. Die Verdopplung der Gene und die dadurch evolutionär bedingte Sequenzänderung, kann durch einen horizontalen Gentransfer entstanden sein [Doolittle 1999]. Der Horizontaler Gentransfer von einem Gen oder sogar von Gen-Clustern zwischen Eukaryoten und Prokaryoten und deren evolutionäre Bedeutung wurde bereits mehrfach beschrieben [Marcet-Houben und Gabaldón 2010; Slot und Rokas 2011; Fitzpatrick 2012]. Garcia-Vallvé et al [2000] beschrieben den horizontalen Gentransfer einer Endoglucanase vom Bakterium *Fibrobacter succinogenes* zum Pilz *Orpinomyces joyonii*.

Vergleicht man die Anzahl der sekretierten CAZyme zwischen den Substraten, so fällt auf, dass bei der Umsetzung von kristallinen Substraten weniger Enzyme gebildet werden. Dies scheint zunächst unverständlich, jedoch kann man spekulieren, dass die wenigen sekretierten Enzyme eine höhere Effizienz bei der Umsetzung von kristallinem Substrat und eine entsprechende Spezialisierung aufweisen. Dies weist darauf hin, dass die Kombination der sekretierten CAZyme eine wichtige Rolle für den Abbau von kristalliner Cellulose spielt.

Enzyme die spezifisch bei kristallinem Substrat sekretiert wurden, sind Glykosidhydrolasen der Familie GH17, die Glucan-Endo-1,3- β -Glucosidasen enthalten, und Enzyme der Glykosidhydrolasen Familie GH12, die Endoglucanase enthalten. Endocellulasen wurden bereits als Enzyme, die kristalline Cellulose abbauen können, beschrieben [Cohen et al. 2005; Gal et al. 1997]. Mitglieder der Familie GH3 und GH3+CBM1 wurden ebenso verstärkt bei kristallinen Substraten gebildet. Zu den GH3 gehören die β -Glucosidasen, welche nicht-reduzierte terminale β -Glucoreste der Oligosaccharidketten hydrolysieren. Die Bildung von Enzymen der Familie GH3 bestätigt, dass das Pilzisolat FW16.1 kristalline Cellulose in Glucosemonomere spalten kann. Die hier präsentierten Daten zeigen, dass bei kristallinen Substraten mehr β -Glucosidasen gebildet werden und bei nicht kristallinen Substraten mehr Endocellulasen.

Auch die Verbindung der GH7 Familie mit dem *Carboyhdrate-Binding-Modul* CBM1 wurde bei allen Substraten detektiert. Bei dem Pilz *Trichoderma reesei* konnte gezeigt werden, dass die Verbindung der GH7 mit dem CMB1 zu einem effizienten Abbau von kristalliner Cellulose führt [Igarashi et al. 2009; Sipos et al. 2010]. Dies lässt darauf schließen, dass die hier sekretierte Kombination von GH7 + CMB1 ebenso zum effizienten Abbau von Cellulose führt. Das Fehlen von GH Familien, die spezifisch das kristalline Substrat abbauen, kann man mit der geringen Cellulaseaktivität des Pilzisolates FW16.1 bei kristalliner Cellulose wie Avicel in Verbindung bringen.

Es konnte gezeigt werden, dass das Pilzisolat FW16.1 neben Glykosidhydrolasen und die Kombination mit *Carbohydrate-Binding-Modules* andere CAZyme Gruppen sekretiert, wie die Polysaccharid Lyasen. Diese spalten Polysaccharidketten wie das Gluykosaminogluykan und das Pektin, die Uronsäure enthalten [Cantarel et al. 2009]. Ein Enzym der Polysaccharid Lyasen Familie PL20 ist die Endo- β -1,4-Glucuronan Lyase [Konno et al. 2009]. Mitglieder der PL20 sind bei fast allen getesteten Substraten vertreten.

Es war nicht zu erwarten, dass das Pilzisolat FW16.1 nur wenige Enzyme der Oxidoreduktasen (AA) sekretiert, da diese für ihre leitende Funktion bei der Umsetzung von cellulytischem Substrat beschrieben wurden [Agger et al. 2014; Harris et al. 2010; Quinlan et al. 2011]. Die Gruppe der AA werden zur oxidativen Depolymerisierung der Cellulose benötigt [Beeson et al. 2015], wirken synergistisch mit Cellulasen und beschleunigen so den Abbau von Cellulose [Harris et al. 2010; Hu et al. 2014; Langston et al. 2011]. Einige Enzyme der Familien AA9 und AA13 sind bei den nicht kristallinen Substraten vertreten. Die Oxidoreduktasen Familien können sich an die Carbohydrate-Binding-Module anlagern, wie die AA9+CBM1 und die AA13+CBM20 zeigen. Harris et al. [2010] beschrieb, dass 20% aller pilzlichen AA9 eine C-terminale Cellulose Bindestelle für das Carbohydrate-Binding-Modul CBM1 aufweisen. Man kann spekulieren, dass die bei FW16.1 sekretierten Enzyme diese Bindestelle aufweisen. Das Zusammenlagern von Glykosidhydrolasen und Carbohydrate-Binding-Module wurden bei dem Pilzisolat FW16.1 nur bei den nicht kristallinen Substraten sekretiert. Die Analyse der sekretierten CAZyme bei unterschiedlicher kristalliner Cellulose und somit unterschiedlicher Wasserlöslichkeit gibt Aufschluss über ein Muster an CAZyme Familien, die bei den verschiedenen Substraten gebildet werden. Dies kann bei der Herstellung von synthetischen Kohlenhydraten zur vereinfachten in der Glykobiologie, Pharmazie und Humanmedizin angewendet werden. Einige Oligosaccharide werden zum Beispiel an der Oberfläche von tumoralen Zellen vermehrt produziert und können als Kohlenhydratmarker als Basis für eine Kohlenhydrat basiertes Detektionssystem fungieren [Hakomori 2001; Seeberger und Werz 2007]. Dieses Detektionssystem stellt somit die Basis für die Entwicklung neuer Impfungen dar [Ada und Isaacs 2003; Goldblatt 1998]. Diese Kohlenhydrat Antigene werden vermehrt synthetisch hergestellt anstatt isoliert [Seeberger und Werz 2007]. Die CAZyme Analyse bietet die Möglichkeit der Untersuchung durch welche Enzyme spezifische Kohlenhydrate synthetisiert werden können.

meisten Pilze sekretieren Enzyme, die synergistisch Biomasse Die abbauen [Payne et al. 2015]. Diese werden zur Optimierung von industriellen Prozessen zu Enzymgemischen kombiniert. Die lignocellulytische Biomasse besitzt, je nach verwendetem Pflanzenmaterial, eine andere Zusammensetzung an verwertbarer Cellulose und Hemicellulose. Weizenstroh und Reisstroh, oftmals verwendet zur Second Generation Bioethanolproduktion, haben einen ähnlichen Cellulosegehalt (ca. 38%) aber einen unterschiedlichen Hemicelluloseanteil (Weizenstroh 26,5% und Reisstroh 18,7%) [Bakker et al. 2013; Zhu et al. 2006]. Dies führt dazu, dass genau untersucht werden muss, welche Kombination an Enzymen das verwendete Substrat abbauen kann. Die Analyse der sekretierten CAZyme, die bei der Substratumsetzung produziert werden, kann dahingehend Aufschluss geben und zur Identifikation eines effizienteren Enzymgemischs [Takano und Hoshino 2018] betragen. Takano und Hoshino [2018] zeigten, dass durch ein optimales Enzymgemisch die Bioethanolproduktion, mit der gleichzeitigen Verzuckerung und Fermentation, erhöht werden kann. Die höchste Bioethanolproduktion (30,6 g/L in 36 h) wurde durch Zugabe eines Enzymgemischs erreicht, im Gegensatz zur Verwendung von einer einzelnen Cellulase bei der etwa 28 g/L Ethanol in 36 h produziert wurde.

Ein weiteres Anwendungsgebiet der CAZyme Analyse ist die Identifizierung von Enzymen, die die lignocellulytische Biomasse ohne die kostenintensive Vorbehandlung abbauen. Die Verwendung von Weizenstroh um Cellulose-Ethanol zu produzieren, ist seit einigen Jahren im Fokus. Dabei muss die Biomasse mittels Thermodruckanalyse oder chemischer Behandlung aufgeschlossen werden, um die verwertbaren Zucker vom Lignin zu lösen [Alvira et al. 2010; Hendriks und Zeeman 2009; Kumar und Sharma 2017].

Die Produktion von nachhaltigen Rohstoffen und die vollständige Verwertung des Abfallmaterials (*zero waste*) ist in der nachhaltigen Bioökonomie ein wichtiger Bestandteil [Bioökonomie in Deutschland - BMBF 2015; Horizont 2020 im Blick - BMBF 2014; Nationale Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030 - BMBF 2010]. Bei der Papier- und Zellstoffindustrie entsteht durch die Reinigung der Cellulose mittels Sulfatverfahren eine schwarze Flüssigkeit aus Lignin, auch *black liquor* genannt [Demirbaş 2002]. Diese Aufreinigungsflüssigkeit kann bisher energetisch kaum genutzt werden. Eine Analyse der sekretierten CAZyme bei cellulytischem, sowie lignocellulytischem Material kann Aufschluss über enzymatischen Abbau von Lignin geben bzw. die Enzyme identifizieren, die die Hemicellulose abbauen, ohne diese vorher vom Lignin zu trennen.

Die CAZyme Analyse des Pilzisolates FW16.1 bei unterschiedlichen Substraten hat gezeigt, dass FW16.1 eine unterschiedliche Anzahl und Diversität an CAZymen produziert. Die Zusammensetzung der CAZyme bei kristallinem Substrat unterscheidet sich zu nicht kristallinem Substrat. Generell wurden weniger CAZyme bei kristallinem Substrat gebildet, was auf eine spezifische synergistische Wirkung der sekretierten CAZyme schließen lässt. Diese Erkenntnis kann für die Vorbehandlung bei der Bioethanolproduktion, bei der Verwertung von organischen Abfallprodukten, sowie in der synthetischen Glykobiologie angewendet werden.

3.5.2.2 Die substratspezifische CAZyme Analyse des Pilzisolates FW57 und deren biotechnologische Anwendung

Die sekretierten CAZyme des Pilzisolates FW57 wurde, wie bei dem Pilzisolat FW16.1 beschrieben, analysiert. Je nach verwendetem Substrat, Chitin und Chitosan (mit geringem bis hohem Molekulargewicht) wurden die sekretierten Enzyme mit der CAZyme Datenbank abgeglichen und durch die *de novo* Sequenzierung im Genom lokalisiert und auf den *Scaffolds* angeordnet. Bei der CAZyme Analyse fällt die geringe Diversität der CAZyme bei den Substraten Chitin und Chitosan auf. Dies steht im Gegensatz zu der CAZyme Analyse des Pilzisolates FW16.1, bei dem eine hohe Diversität an unterschiedlichen CAZymen sekretiert wurden. Die bei FW57 sekretierten CAZyme bei dem Substrat Chitin sind bis auf einige wenige Enzyme identisch zu den Chitosan Substraten. Chitin ist ein hochgradig spezialisiertes Polymer und zeigt im Gegensatz zu Cellulose wenig Variabilität in seiner Struktur [Carlstrom 1957]. Man kann spekulieren, dass *H. fuscoatra* ein Set an Chitin abbauenden Enzymen produziert, welche bei Anwesenheit von Chitin und Chitosan gleichermaßen sekretiert werden.

Generell findet man Chitin und Chitosan spezifische CAZyme wie die Glykosidhydrolasen GH18. Familien GH123, **GH20** Die Familie GH123 und enthält β-*N*-Acetylglucosaminidasen und die Familie der GH20 enthält neben anderen Enzymen die β-1,6-N-Acetylglucosaminidasen (EC3.2.1-). Die Familie GH18 beinhaltet Chitinasen und ist vor allem in Kombination mit dem Carbohydrate-Binding-Module CBM18 auf Scaffold 1 und Scaffold 3 des Pilzisolates FW57 zu finden. Das CBM18 fügt sich zusammen mit der Glykosidhydrolasen Familie GH16, welche die Chitin-β-1,6-Glucoansyltransferase (EC 2.4.1-) beinhaltet. Das Carbohydrate-Binding-Module CBM18 ist chitinspezifisch und Modul mit Chitin-Binde-Funktion wurde schon als einer beschrieben [Aranda-Martinez et al. 2016]. Das Carbohydrate-Binding-Modul CBM1 bindet neben Cellulose auch spezifisch an Chitin und wurde gleichermaßen bei Chitin und Chitosan gebildet [Yoshida et al. 2005]. Es war nicht zu die erwarten. dass Carbohydrate-Bindung-Module Familie CBM12, welche bekannt für die Bindung an Chitin Polymeren ist, nicht sekretiert wurde. Man kann spekulieren, dass bei dem Pilzisolat FW57 das Modul CBM12 für den Abbau von Chitin nicht notwendig ist. Das sekretierte Fusionsprotein GH18+CBM18+CBM50 beinhaltet Chitin spezifischen Enzyme. CBM50 ist bekannt für seine Bindung zu Glykosidhydrolasen Familie GH18 und wurde als Bindemodul zu Chitin beschrieben [Aranda-Martinez et al. 2016].

Die Anzahl der sekretierten Oxidoreduktasen (AA) ist im Vergleich zum Pilzisolat FW16.1 höher. Es wurden 19 verschiedene Enzyme der AA gefunden, die hauptsächlich zu den Familien AA3, AA5, AA7 und AA9 zählen. Die Gruppe der Oxidoreduktasen ist eine neue Gruppe innerhalb der Klassifizierung der CAZyme [Levasseur et al. 2013]. Sie sind Redox Enzyme, die in Verbindung mit anderen Mitgliedern der CAZyme fungieren können [Vaaje-Kolstad et al. 2010]. Die Familie AA3 beinhalten Cellobiose Dehydrogenasen (EC 1.1.99.18) und die Familie der AA5 beinhalten vor allem Oxidasen (EC 1.1.3.-). Die Familie AA7 beinhaltet die Chitooligosaccharid Oxidase (EC1.1.3.-). Vergleicht man die Anzahl der im Genom vorhandenen Gene für Enzyme der Oxidoreduktasen (AA) Familie von FW57 (30) mit der Anzahl von FW16.1 (10), so fällt auf, dass FW57 dreimal so viele Gene besitzt. Dieses Ergebnis korreliert mit der erhöhten Anzahl an sekretierten AA bei allen getesteten Substraten. Man kann spekulieren, dass bei dem Abbau von Chitin und Chitosan mehr Oxidoreduktasen benötigt werden als bei dem Substrat Cellulose. Die lytischen Polysaccharid Monooxygenasen (LPMOs) der Familie der AA9 wurden bereits als weit verbreitet in Ascomyceten beschrieben [Harris et al. 2010]. Die Familie AA9 ist ebenso wie die Glykosidhydrolasenfamilie GH5 nur bei Eukaryoten vertreten. Ebenso kann auf eine paraloge evolutionäre Entwicklung der Enzyme durch einen horizontalen Gentransfer spekuliert werden.

Bei dem Pilzisolat FW57 fügt sich ein Mitglied der Oxidoreduktasen Familie AA9 mit dem *Carbohydrate-Binding-Module* CMB1 zusammen. Diese Kombination wurden schon bei der CAZyme Analyse von *Pochonia chlamydosporia* beschrieben, wo sie vermutlich die Deacetylierung von Chitin der Nematoden Eierschalen beschleunigen [Aranda-Martinez et al. 2016]. Man kann spekulieren, dass die Kombination auch bei dem Pilzisolat FW57 zu einer effektiven Umsetzung des Substrates führt. Die Oxidoreduktasen Familie AA10 (ehemals CBM33) wurde für ihre fördernde Funktion bei dem Abbau von

Diskussion

Chito-Oligosacchariden beschrieben. Diese konnte in dieser Arbeit nicht detektiert werden. Man kann dennoch spekulieren, dass anderer Enzyme der Oxidoreduktasen eine ebenso fördernde Wirkung bei dem Abbau von Chitin und Chitosan haben.

Die Kohlenhydrat Esterasen (CE), verantwortlich für die Deacetylierung von Sacchariden, sind ebenso vertreten bei der CAZyme Analyse von FW57. Das Genom des Pilzisolates FW57 enthält 39 Gene, die für Kohlenhydrat Esterasen kodieren. Vergleicht man die Anzahl der Gene der CE Familien mit denen in Bakterien, so fällt auf, dass Bakterien weniger CE Gene besitzen. Das Genom von *C. termitidis* besitzt nur 15 CE aus fünf verschiedenen CE Familie [Munir et al. 2014]. Die Kohlenhydrat Esterasen Familie CE4, welche Chitin Deacetylasen enthält, wurde nur bei dem Substrat Chitin translatiert. Chitin Deacetylasen katalysieren die Reaktion von Chitin und H₂O zu Chitosan und Acetat.

Die meisten CAZyme werden auf dem Scaffold 1 kodiert. Dort findet man auch ein Muster an Chitin spezifischen CAZymen, die alle in die gleiche Richtung kodieren. Zu dem Muster gehören die Familien der CE1+CBM1, AA7, GH18+CBM18, GH16+CBM18 und GH17. Diese Kombination war zu erwarten, da alle diese CAZyme Familien Enzyme enthalten, die am Abbau von Chitin beteiligt sind. Durch die nahe Lokalisation und die Kodierung in eine Richtung im Genom, kann man spekulieren, dass dieses Muster ein Gen-Cluster darstellt. Martinez et al. [2008] fand in T. reesei 25 mögliche CAZyme Gen-Cluster, die jeweils 2 bis 10 verschiedene CAZyme Gene enthielten. Durch die Spezialisierung der Enzyme in Bezug auf das Substrat und die geringe Variabilität des Substrates Chitin kann sich so ein Gen-Cluster evolutionär gebildet haben. Für eine weitere Analyse des möglichen Genclusters müsste dieser Bereich des Genoms genauer bioinformatisch untersucht werden. Spezialisierte Gen-Cluster, die Polysaccharide-Utilization-Loci (PULs), sind in dem Phylum der Bacteriodetes bekannt [Terrapon et al. 2018]. Diese Gen-Cluster sind streng als Cluster definiert, die in Anwesenheit von co-regulierten homologen B-Transportergenen, welche für die Bindung und den Transport von Stärke-Oligosacchariden verantwortlich sind, agieren [Shipman et al. 2000; Martens et al. 2009]. Im Reich der Pilze sind solche PULs bisher nicht beschrieben.

Durch die CAZyme Analyse von FW57 bei verschiedenen Substraten von Chitin konnte gezeigt werden, dass bei dem Abbau von Chitin und Chitosan die gleichen CAZyme Familien sekretiert werden und keine Diversität zwischen den Substraten besteht. Es wurden mehr Enzyme der AA sekretiert, was die fundamentale Bedeutung dieser CAZyme Gruppe

87

beim Abbau von Chitin unterstreicht. Es konnte ein mögliches CAZyme Gen-Cluster bei dem Pilzisolat FW57 identifiziert werden.

Brunecky et al. [2018] konnten zeigen, dass eine CAZyme Kassette, konstruiert aus wenigen CAZyme Genen des thermophilen C. bescii, eine höhere Aktivität aufweisen, als das gesamte Exoproteom dieses Bakteriums. Diese CAZyme Kassetten aus Genen, die für effiziente Biomasse abbauenden Enzyme kodieren, können in der Zukunft helfen, die enzymatische Zusammensetzung bei biotechnologischen Prozessen zu beschleunigen. Gerade für den Gebrauch beim consolidated bioprocessing (CBP) sind diese von Nutzen. Das Verfahren der CBP beinhaltet die Produktion von Cellulasen, die enzymatische Hydrolyse und die Fermentation in einem Schritt [Lynd et al. 2005; van Zyl et al. 2007]. Durch die Fähigkeit, effektive und hoch aktive CAZyme Kassetten zu generieren, könnte man das consolidated bioprocessing weiter aufwerten. Die Identifizierung von aktiven CAZymen, die synergistisch Biomasse abbauen, bietet eine gute Alternative zu den Cellulosomen. Die Cellulosome, natürlich von einigen anaeroben Bakterien wie C. thermoscellum und Pilzen gebildet, sind Komplexe an Biomasse abbauenden Enzymen, die durch eine nichtkatalytische Untereinheit, das Scaffoldin, gebunden sind [Bayer et al. 1998, Bayer at al. 2004]. Aufgrund der Schwierigkeit, Cellulosome in Mengen zu produzieren, ist die Anwendung von CAZyme Kassetten eine Alternative. Die neue Erkenntnis über Gen-Cluster von CAZymen kann dazu beitragen nur effektive Enzyme mit guter katalytischer Aktivität zusammen zu stellen.

In weitaus mehr industriellen Prozessen, als diejenigen, die bereits genannt wurden, sind biomasseabbauende Mikroorganismen und deren Enzyme gefragt. In Biogasanlagen, ein wichtiger Energiegewinnungsprozess der heutigen Zeit, werden unter thermischen und anaeroben Bedingungen Mikroorganismen eingesetzt. Um die Energiegewinnung zu optimieren, ist es notwendig, weitere Mikroorganismen mit höherer katalytischer Aktivität zu finden. Neben den diskutieren Biomasse abbauenden Enzymen sind unter anderem Pectinasen und Agarasen in biotechnologischen Prozessen von Interesse. Pectinasen werden vor allem für die Saft-Industrie benötigt, um komplexe Polysaccharide in kleinere Moleküle wie Galacturonsäure zu spalten [Tapre und Jain 2014]. Agarasen, welche die Hydrolyse von finden hauptsächlich Anwendung in der Nahrungs-Agar katalysieren. und Kosmetikindustrie [Fu und Kim 2010]. Deren Produkte, die Neoagarose-Oligosaccharide, haben eine antioxidante Wirkung und gelten als potentielle Krebsheilmittel [Enoki et al. 2012; Kang et al. 2014].

4 Material und Methoden

4.1 Material und Hersteller

4.1.1 Allgemeine Chemikalien

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden, falls nicht gesondert benannt, von folgenden Herstellern verwendet: Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sarstedt AG & Co (Nürnbrecht, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Megazyme (Bray, Irland), Promega (Mannheim, Deutschland). Alle Substrate für die Enzymtests wurden, wenn nicht gesondert gekennzeichnet, von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) verwendet.

Alle Medien und Puffer wurden mit vollentsalztem Wasser (VE Wasser) angesetzt. Für die Verdünnung von Oligonukleotiden, die Ergänzung in einer PCR und die Erstellung von Konidien wurde Reinstwasser (PureLab[®]flex, ELGA LabWater, Großbritannien) verwendet.

4.1.2 Enzyme

Alle Restriktionsendonukleasen und deren Puffer wurden, wenn nicht anders benannt, bei New England BioLabs GmbH (Frankfurt, Deutschland) erworben. Folgende DNA Polymerasen wurden benutzt: *OneTaq*® 2X Mastermix (New England BioLabs GmbH, Frankfurt, Deutschland), *Q5* (New England BioLabs GmbH, Frankfurt, Deutschland), *pfu* (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland). Die Degradierung der RNA wurde durch die RNase A (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

4.1.3 Medien und Puffer

Im Folgenden werden die häufig verwendeten Medien aufgelistet. Alle weiteren spezifischen Medien und Puffer werden bei der jeweiligen Methode beschrieben.

Kartoffelextrakt-Dextrose-Agar (PDA)	0,4%	(w/v)	Kartoffel-Infus
(engl. <u>P</u> otato Extract <u>D</u> extrose <u>A</u> gar)	2%	(w/v)	Glukose
	1,5%	(w/v)	Agar
Hefeextrakt-Pepton-Dextrose (YPD)	1%	(w/v)	Hefeextrakt
(engl. <u>Y</u> east <u>P</u> eptone <u>D</u> extrose)	2%	(w/v)	Pepton
	2%	(w/v)	Glukose

LB - Medium (Luria-Miller) (<i>engl. Lysogeny Broth</i>)	1% 0,5% 1%	(w/v) (w/v)	Trypton Hefeextrakt NaCl ₂
SOC Medium (engl. <u>Super Optimal Broth with</u> <u>Catabolic Repression</u>)	2,5 10 10 20	mM mM mM	KCl MgCl ₂ MgSO ₄ Glukose in LB Medium lösen
DNS Lösung	260,6 177,2 11 5,3 0,9	mM mM mM mM	NaOH C4H4KNaO6 3,5-Dinitrosalicylsäure Phenol Na ₂ SO4
Mineralsalz Flüssigmedium pH 6,5	34,6 8,6 2 6,7 0,04 1%	mM mM mM mM (w/v)	KNO_3 K_2HPO_4 $MgSO_4 \ge 7 H_2O$ KCl $FeSO_4 \ge 7 H_2O$ Substrat (4.4.8)
Natriumphosphatpuffer pH 6 - 8			Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O In unterschiedlichen Mengen je pH-Wert zusammen 100 mM
Citratpuffer pH 3 - 6			C ₆ H ₆ O ₇ C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ x 2 H ₂ O In unterschiedlichen Mengen je pH-Wert zusammen 100 mM
Glycin-HCl-Puffer pH 2,5 - 3	100	mM	Glycin
Glycin-NaOH-Puffer pH 8 - 10	100	mM	Glycin

Für Agar Platten des jeweiligen Mediums wurde 1% (w/v) Agar vor dem Autoklavieren hinzugefügt.

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Medien und Puffer 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Hitzeempfindliche Zusätze wurden durch einen 0,45 µm Filter (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) steril filtriert.

4.1.4 Synthetische Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Primer bezeichnet) wurden von Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland, synthetisiert. Zur Erstellung der Oligonukleotide wurde die Software Geneious 11.0 (Biomatters ApS, Silkeborg, Dänemark) verwendet. In den folgenden Tabellen sind die Oligonukleotide entsprechend ihrer Anwendungsbereiche aufgelistet. [F] weist auf den Primer für den kodogenen Strang hin, [R] markiert die Primer für den nicht kodogenen Strang.

Tabelle 9: Bestimmung	g der ITS	Sequenz der	gesamten]	Pilzsammlung
-----------------------	-----------	-------------	------------	--------------

Oligonukleotidbezeichnung	Sequenz $(5^{\circ} - 3^{\circ})$	Anwendungsbereich	Referenz
ITS1 [F]	TCCGTAGGTGAACCTGC GG	PCR Primer zur Amplifizierung der ITS Region	White <i>et al.</i> , 1990
ITS4 [R]	TCCTCCGCTTATTGATAT GC	PCR Primer zur Amplifizierung der ITS Region	White <i>et al.</i> , 1990

Tabelle 10: Überprüfung des Einbaus von Fragmenten in den Vektor pET28b

Oligonukleotidbezeichnung	Sequenz $(5^{\circ} - 3^{\circ})$	Anwendungsbereich	Referenz
pET28b [F]	CCCGCGAAATTAATACG	PCR Primer zur Überprüfung	diese
	ACTCAC	der Klonierung in pET28b	Arbeit
pET28b [R]	CTAGTTATTGCTCAGCG	PCR Primer zur Überprüfung	diese
	GT	der Klonierung in pET28b	Arbeit

Tabelle 11: Oligonukleotide zur Klonierung von Xylanasen aus dem Pilzisolat Fsh102

Oligonukleotidbezeichnung	Sequenz $(5^{\circ} - 3^{\circ})$	Anwendungsbereich	Referenz
X102_1_G [F]	GGTCGGGATCCGAATTC CATGGTTTCGCTCTCTG CCC	PCR Primer des Genes XylI	diese Arbeit
X102_1_G [R]	AGTGCGGCCGCAAGCTT CTAGTAAACAGTAATCG AAGCCG	PCR Primer des Genes XylI	diese Arbeit
X102_1_V [F]	CGGCTTCGATTACTGTT TACTAGAAGCTTGCGGC CGCACT	PCR Primer des Vektors XylI	diese Arbeit

X102_1_V [R]	GGGCAGAGAGCGAAAC CATGGAATTCGGATCCC GACC	PCR Primer des Vektors XylI	diese Arbeit
X102_2_G [F]	GGTCGGGATCCGAATTC CATGGTCTACCTCAAAT CCCTC	PCR Primer des Genes XylII	diese Arbeit
X102_2_G [R]	AGTGCGGCCGCAAGCTT CTACGCCAGTGCATCGA TAA	PCR Primer des Genes XylII	diese Arbeit
X102_2_V [F]	TTATCGATGCACTGGCG TAGAAGCTTGCGGCCGC ACT	PCR Primer des Vektors XylII	diese Arbeit
X102_2_V [R]	GAGGGATTTGAGGTAG ACCATGGAATTCGGATC CCGACC	PCR Primer des Vektors XylII	diese Arbeit
Xyl1_w/o_SP [F]	AAATGGGTCGGGATCC GAATTCCGCCCCTAAAC CATCTGAAGAGTC	PCR Primer zur Entfernung der Signalpeptide von Xyll	diese Arbeit
Xyl1_w/o_SP [R]	TCAGATGGTTTAGGGGC GGAATTCGGATCCCGAC CCATTT	PCR Primer zur Entfernung der Signalpeptide von Xyll	diese Arbeit
Xyl2_w/o_SP [F]	AAATGGGTCGGGATCC GAATTCCCTCCCTCGCC AGTCGACAAG	PCR Primer zur Entfernung der Signalpeptide von XylII	diese Arbeit
Xyl2_w/o_SP [R]	CTTGTCGACTGGCGAGG GAGGGAATTCGGATCC CGACCCATTT	PCR Primer zur Entfernung der Signalpeptide von XylII	diese Arbeit
X1_E97M [F]	CAGAACCCTCTAATCAT GTACTACATTGTTGAAT C	PCR Primer zur Erstellung der Einfachmutante von XylI	diese Arbeit
X1_E97M [R]	GATTCAACAATGTAGTA CATGATTAGAGGGTTCT G	PCR Primer zur Erstellung der Einfachmutante von XylI	diese Arbeit
X1_E188M [F]	GTGGCCACCATGGGGT ATCAG	PCR Primer zur Erstellung der Einfachmutante von Xyl1	diese Arbeit
X1_E188M [R]	CTGATACCCCATCGTGG CCAC	PCR Primer zur Erstellung der Einfachmutante von XylI	diese Arbeit
X2_E241M [F]	GTCGCCATCACCATGCT CGACATCGCG	PCR Primer zur Erstellung der Einfachmutante von XylII	diese Arbeit
X2_E241M [R]	CGCGATGTCGAGCATG GTGATGGCGAC	PCR Primer zur Erstellung der Einfachmutante von XylII	diese Arbeit
X2_E155M [F]	GGGACGTCGTCAACAT GATCTTCGAGGAAG	PCR Primer zur Erstellung der Einfachmutante von XylII	diese Arbeit
X2_E155M [R]	CTTCCTCGAAGATCATG TTGACGACGTCCC	PCR Primer zur Erstellung der Einfachmutante von XylII	diese Arbeit

Oligonukleotidbezeichnung	Sequenz $(5^{\circ} - 3^{\circ})$	Anwendungsbereich	Referenz
Exo1_G [F]	GGGTCGGGATCCGAATT CCATGTATCAGCGCGCT CTTCTCTTC	PCR Primer des Genes Exo1	diese Arbeit
Exol_G [R]	GCTCGAGTGCGGCCGC AAGCTTTTAGAAGCGGC GAGTAGTAGAGTTG	PCR Primer des Genes Exo1	diese Arbeit
Exo1_V [F]	CAACTCTACTACTCGCC GCTTCTAAAAGCTTGCG GCCGCACTCGAGC	PCR Primer des Genes Exo1	diese Arbeit
Exol_V [R]	GAAGAGAAGAGCGCGC TGATACATGGAATTCGG ATCCCGACCC	PCR Primer des Genes Exo1	diese Arbeit
Exo2_G [F]	GGGTCGGGATCCGAATT CCATGTACAAGGCTCTT CTCTTCTCCTC	PCR Primer des Genes Exo2	diese Arbeit
Exo2_G [R]	GCTCGAGTGCGGCCGC AAGCTTTTAAAATGTCG ACCCAATCGGCCCAA	PCR Primer des Genes Exo2	diese Arbeit
Exo2_V [F]	TTGGGCCGATTGGGTCG ACATTTTAAAAGCTTGC GGCCGCACTCGAGC	PCR Primer des Genes Exo2	diese Arbeit
Exo2_V [R]	GAGGAGAAGAGAGAAGAG CCTTGTACATGGAATTC GGATCCCGACCC	PCR Primer des Genes Exo2	diese Arbeit
Endo1_G [F]	GGGTCGGGATCCGAATT CCATGAAGCTCAACCCT CTTTTCGTTG	PCR Primer des Genes Endo1	diese Arbeit
Endo1_G [R]	TCGAGTGCGGCCGCAA GCTTCTAACCAAGATAA GGCTTCAACGTATC	PCR Primer des Genes Endo1	diese Arbeit
Endo1_V [F]	GATACGTTGAAGCCTTA TCTTGGTTAGAAGCTTG CGGCCGCACTCGA	PCR Primer des Genes Endo1	diese Arbeit
Endo1_V [R]	CAACGAAAAGAGGGTT GAGCTTCATGGAATTCG GATCCCGACCC	PCR Primer des Genes Endo1 in	diese Arbeit
Endo2_G [F]	GGGTCGGGATCCGAATT CCATGGCTCCTATACTC AGCACCC	PCR Primer des Genes Endo2 in	diese Arbeit
Endo2_G [R]	TCGAGTGCGGCCGCAA GCTTTTACTCAGTTCCC CGAAAAGTCGAC	PCR Primer des Genes Endo2 in	diese Arbeit
Endo2_V [F]	GTCGACTTTTCGGGGAA CTGAGTAAAAGCTTGCG GCCGCACTCGA	PCR Primer des Genes Endo2 in	diese Arbeit
Endo2_V [R]	GGGTGCTGAGTATAGG AGCCATGGAATTCGGAT CCCGACCC	PCR Primer des Genes Endo2 in	diese Arbeit
Exo1_w/o_SP [F]	GATCCGAATTCCCAGCA	PCR Primer zur Entfernung der	diese
------------------	--	---	-----------------
	GGCAGGCACCCTGCAG	Signalpeptide von Exol	Arbeit
Exo1_w/o_SP [R]	TGCCTGCTGGGAATTCG GATCCCGACCCATTTGC TG	PCR Primer zur Entfernung der Signalpeptide von Exol	diese Arbeit
Exo2_w/o_SP [F]	GAATTCCCAAAAGGTC	PCR Primer zur Entfernung der	diese
	GGCACCCA	Signalpeptide von Exo2	Arbeit
Exo2_w/o_SP [R]	GGAATTCGGATCCCGAC	PCR Primer zur Entfernung der	diese
	CCATTTG	Signalpeptide von Exo2	Arbeit
Endo2_w/o_SP [F]	AATTCCCAACAAATCGG	PCR Primer zur Entfernung der	diese
	CACCCCG	Signalpeptide von Endo2	Arbeit
Endo2_w/o_SP [R]	TTGTTGGGAATTCGGAT	PCR Primer zur Entfernung der	diese
	CCCGACC	Signalpeptide von Endo2	Arbeit

4.1.5 Synthetische Gene

Die verwendeten synthetischen Gene Cellulase Endo1 und Xylanase II Doppelmutante (DM) wurden von der Firma Biocat GmbH (Heidelberg, Deutschland) hergestellt. Dabei wurden die Sequenzen der Gene sowie die Vektorsequenz synthetisiert.

4.1.6 Kommerzielle Kits

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Kits eingesetzt, die in der folgenden Tabelle aufgelistet sind.

Anwendungsbereich	Bezeichnung	Hersteller	
Isolation von Plasmid - DNA	Presto [™] Mini Plasmid Kit	Geneaid Biotech Ltd., New Taipei City, Taiwan	
DNA Aufreinigung aus einem Agarosegel	NucleoSpin [®] Gel und PCR Clean- up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland	
RNA - Isolation	peqGOLD TriFast [™]	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland	
cDNA Synthese	RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland	
Bestimmung der Proteinkonzentrationen	Protein Detektions Kit BCA protein detection kit	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland	
Bestimmung der Proteinkonzentrationen	Roti [®] -Nanoquant	Karl Roth, Karlsruhe, Deutschland	

Tabelle 13: Kommerzielle Kits

4.1.7 Vektoren

Für die Klonierung mit der *FastCloning* Methode nach Li [Li et al. 2011] und die heterologe Expression der untersuchten Gene wurden folgende Plasmide verwendet.

Plasmid	Verwendung	Hersteller
pET28b	Klonierung in 10-β-competent <i>E. coli</i> , Heterologe Expression in <i>E. coli</i> BL21 (4.3.3)	GenScript Biotech Corporation, Piscataway, New Jersey, USA

Tabelle 14: Verwendete Plasmide zur Klonierung und Expression in Escherichia coli

Der Vektor pET28b besitzt eine Kanamycin Resistenz Kassette und Sequenzen zur Translation von einem N - terminalen sowie einem C - terminalen His₆-Tag.

4.1.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA Fragmenten zur Überprüfung des Einbaus von DNA Fragmente in Vektoren (4.1.4, 4.1.7) wurde von der Firma Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland, durchgeführt.

Die Sequenzierung der ITS (*internal transcribed spacer*) Sequenzen (4.1.4) wurde von der Firma StarSEQ GmbH, Mainz, Deutschland, durchgeführt.

4.2 Auftragsarbeiten

4.2.1 Einlagerung der Pilzsammlung bei der DSMZ Braunschweig

Die gesamte Pilzsammlung wurde bei dem Leibniz – Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) in Braunschweig, Deutschland, hinterlegt. Die Pilzisolate wurden in der Abteilung Molekulare Phytopathologie, Universität Hamburg, Hamburg, Deutschland, auf PDA Platten (4.1.3) angezogen und für 5 Tage inkubiert und als Myzelplatte zum DSMZ nach Braunschweig geschickt. Dort wurden die Pilzisolate mittels ITS Sequenzierung und partieller LSU Sequenzierung (*large subunit* der ribosomalen RNA) [Gardes und Bruns 1993; Vilgalys und Hester 1990] phylogenetisch identifiziert.

4.2.2 Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie - Kopplung

Proteine wurden mit der Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie – Kopplung (LC-MS/MS) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hartmut Schlüter (AG *Mass Spectrometric Proteomics*, Institut für Klinische, Chemische und Laboratoriumsmedizin, Zentrum für Diagnostik, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg, Deutschland) identifiziert. Der Verdau der Proben erfolgte durch einen Trypsinverdau. Anschließend wurden die Proben über eine Acclaim PepMap RSLC C18 Säule (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) mit einer RSLC Dionex 3000 (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) analysiert.

4.2.3 Genomsequenzierung

Die *de novo* Sequenzierung der Genome der Pilzstämme FW16.1 und FW57 erfolgte durch die Firma BGI (Hongkong, China). Dazu wurde die genomische DNA (gDNA, 4.5.1) isoliert. Es wurden die Sequenzierungsmethode *HiSeq* und *PacBio* [Schadt et al. 2010; Illumina, Inc. 2010] angewendet und eine Annotation durchgeführt.

4.2.4 Erstellung eines phylogenetischen Baumes

Die Berechnung des phylogenetischen Baumes erfolgte in Kooperation mit dem Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) mit Dr. Richard L. Hahnke.

Der phylogenetische Baum leitet sich von den Sequenzen der ITS1 Region, des 5,8 S rRNA Gens und der ITS2 Region ab (Abbildung 24). Das Alignment erfolgte mit poa [Lee et al. 2002] und gblocks [Castresana 2000]. Der Baum wurde mit den Kriterien des Maximum Likelihood (ML) und des Maximum Parsimony (MP), [Goker et al. 2011] berechnet. Die ITS Referenzsequenzen stammen von der Datenbank Mycobank [Robert et al. 2013], die Nomenklatur der *Trichoderma* spp. Isolate wurde mit der Datenbank TrichOKEY 2 [Druzhinina et al. 2005] verifiziert.

4.2.5 CAZyme Analyse

Die CAZyme Analyse, für die in dieser Arbeit sequenzierten Genome (4.2.3), wurde von Dr. Richard L. Hahnke (Institut für Mikroorganismen, Leibniz Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) durchgeführt. Die durch die *de novo* Sequenzierung entstandenen kodierten Regionen (CDS) wurden verglichen mit der CAZyme Datenbank [Cantarel et al. 2009; Lombard et al. 2014]. Die Annotation der CAZyme ergab sich aus einer Kombination aus der RAPSearch2 Suche [Ye et al. 2011; Zhao et al. 2012] und HMMER Scanning [Finn et al. 2014] beschrieben in Hahnke et al. [2015].

4.3 Verwendete Organismen

4.3.1 Pilzisolate der Sammlung aus Vietnam

Die in dieser Arbeit verwendeten Pilzstämme wurden in neun unterschiedlichen Habitaten in Vietnam von Dr. Thuat van Nguyen und Mitarbeitern gesammelt. Die Charakterisierung und Aufbereitung der einzelnen Stämme erfolgte an der Universität Hamburg. In folgender Tabelle ist die Anzahl der Stämme, die geographischen Daten der Habitate und das Datum der Bestandsaufnahme aufgelistet. Die Bezeichnung der Stämme sowie deren Einlagerungsnummer (Leibniz - Institut DSMZ - Deutsche Sammlung Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) ist im Anhang dieser Arbeit aufgelistet (Anhang I).

Habitat	Anzahl an Pilzisolate	Geographische Koordinaten	Datum der Bestandsaufnahme
Mangrovenbäumen	70	10° 36' 015 N, 106° 56' 045 E	14.08.2014
Reisstroh	44	18° 57' 038 N, 105° 04' 022 E	21.08.2014
Bodenoberfläche	55	21° 0′ 017 N, 105° 55′ 058 E	27.08.2014
Insektenkörper	47	10° 13' 047 N, 106° 22' 033 E	16.08.2014
Garnelenschalen	27	16° 33' 059 N, 107° 34' 031 E	19.08.2014
Krebsschalen	13	16° 33' 059 N, 107° 34' 031 E	19.08.2014
Ölhaltige Habitate	24	21° 00' 042 N, 105° 51' 057 E	26.08.2014
Heiße Quellen	12	20° 42' 001 N, 105° 30' 034 E	25.08.2014
Früchte	2	19° 48' 000 N, 105° 46' 000 E	01.09.2014

Tabelle 15: Geographische Koordinaten und die Daten der Sammlung der Pilzkollektion.

4.3.2 Phyto- und humanpathogene Pilze

Für die Inhibitionstests der Pilzsammlung wurden unterschiedliche pflanzenpathogene Pilze und ein humanpathogener Pilz verwendet. Alle verwendeten Pilze wurden von der Arbeitsgruppe AG Schäfer, Molekulare Pflanzenpathologie, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 16: Die verwendeten phyto- und humanpathogenen Pilze für die Inhibitionstests und ihre Wirtspflanzen.

Phytopathogene Pilze	Wirtsorganismus
Fusarium graminearum	Weizen, Roggen, Mais
Fusarium oxysporum	Getreide
Fusarium oxysporum f. sp. cubense	Banane
Stagonospora nodorum	Weizen
Bipolaris sorokiniana	Weizen, Gerste
Cochliobolus heterostrophus	Mais
Magnaporthe oryzae	Reis, Weizen, Roggen, Gerste, Perlhirse
Humanpathogene Pilze	Wirtsorganismus
Candida albicans	Mensch

4.3.3 Bakterienstämme

Name	Genotyp	Hersteller
10-β-competent <i>E. coli</i>	$ \begin{bmatrix} \Delta(ara-leu) & 7697 & araD139 & fhuA \\ \Delta lacX74 & galK16 & galE15 & e14- \\ \phi 80dlacZ\Delta M15 & recA1 & relA1 \\ endA1 & nupG & rpsL & (StrR) & rph \\ spoT1 & \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)] $	New England BioLabs (NEB [®] , Frankfurt/Main, Deutschland)
BL21 (DE3)	[fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hsdS λ DE3 = λ sBamHIo Δ EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δ nin5]	New England BioLabs (NEB [®] , Frankfurt/Main, Deutschland)
Rosetta-gami [™] 2 (DE3) pLysS Competent Cells	[Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac+ lacIq pro] gor522::Tn10 trxB pLysSRARE2 (CamR, StrR, TetR)]	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
OverExpress [™] C41 (DE3)	[F – ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)]	Lucigen Corporation, St. Middleton, USA

Tabelle 17: Verwendete Escherichia coli Stämme, ihre Genotypen und deren Bezugsquelle.

Kulturen von *E. coli* wurden bei 37°C und 145 rpm in LB Flüssigmedium (4.1.3) angezogen. Entsprechend den verwendeten Resistenzen, wurden die folgenden Antibiotika für eine Selektion ins Medium gegeben: Kanamycin (50 µg/mL), Ampicillin (30 µg/mL), Chloramphenicol (20 µg/mL), Tetracyclin (20 µg/mL), Streptomycin (2 mg/mL). Für die dauerhafte Lagerung der verschiedenen *E. coli* Stämme wurde 60 % (v/v) Glycerol zur Kultur gegeben und diese bei -70°C gelagert.

4.4 Methoden der Mikrobiologie

4.4.1 Isolation der Pilzisolate aus ihren Ursprungshabitaten

Zur Herstellung von Reinkulturen der Pilzisolate (4.3.1) wurde 10 g Material der jeweiligen Habitate in 100 mL H₂O gelöst. Aus diesem Gemisch wurden serielle Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000) in H₂O hergestellt und von je 100 µL auf PDA-Agar (4.1.3) plattiert. Nach einer Inkubation bei 28°C von 3 bis 5 Tagen in Dunkelheit wurden sichtbare reine Kulturen ausgewählt und für den Transport nach Deutschland präpariert. Dazu wurden mit Myzel bewachsene Agarstücke ausgeschnitten und in Reaktionsgefäßen gelagert.

4.4.2 Anzucht der Pilzisolate

Alle in Vietnam gesammelten Pilzisolate (4.3.1) wurden auf PDA Agar (4.1.3) ausplattiert. Die Platten wurden bei 28°C und Dunkelheit für drei Tage inkubiert. Bei Kontaminationen der Pilzisolate wurden diese erneut ausplattiert. Die Flüssigkultivierung der Pilze erfolgte durch die Inokulation von 20 µL Konidiensuspension in YPD Medium (4.1.3). Das inokulierte Medium wurde für 3 Tage bei 28°C und ständigem Schütteln inkubiert.

Mandels Medium Agar (MM)	0,14%		(NH ₄) ₂ SO ₄
[Mandels und Weber 1969] (modifiziert)	0,2%		KH_2PO_4
	0,03%		CaCl ₂
	0,02%		MgSO ₄ x 7 H ₂ 0
	0,5%	(w/v)	Pepton
	0,2%	(w/v)	Hefeextrakt
	0,03%	(w/v)	Harnstoff
	0,2%	(w/v)	Glukose
	1%	(v/v)	Salz Lösung
	2%	(w/v)	Agar
Salz Lösung	0.025	σ	FeSO4 x 7 H2O
	0,07	e g	$ZnSO_4 \times 7 H_2O$
	0,08	g	MnSO ₄ x 7 H ₂ O
	0,01	g	CaCl ₂ x 6 H ₂ O
Medium zur Flüssigkultivierung	2 106	(\mathbf{w}/\mathbf{v})	PDA(413)
wiedrum Zur Prussigkundvierung	0,7%	(w/v) (w/v)	Hefeextrakt

4.4.3 Anzucht des Pilzisolates FW57

Zur Anzucht des Pilzisolates FW57 wurde 20 μ L Konidiensuspension (4.4.4) auf Mandels Medium Agar inokuliert und für 7 bis 10 Tage bei 37°C inkubiert. Um das Pilzisolat in Flüssigmedium anzuziehen, wurde das Medium zur Flüssigkultivierung mit Agarstücken (Ø 5 mm) inokuliert und 7 bis 10 Tage bei 37°C ohne schütteln inkubiert.

4.4.4 Herstellung von Konidien

Um die Pilzsammlung nachhaltig zu lagern, wurden von jedem Pilz (4.3.1) Konidien produziert. Ein kleiner 5 mm großer Myzelblock der Pilze (4.3.1) wurde auf PDA-Agar (4.1.3) platziert und für 3 bis 7 Tage bei 28°C und Dunkelheit inkubiert. Die Anzahl der Tage war dabei abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit des jeweiligen Pilzisolates. Nach Auftreten von Konidien wurden diese mit H₂O und einen Drigalskispatel von der Platte abgewaschen und die Suspension durch einen 40 µm Sieb gefiltert. Die Konidien im Filtrat wurden bei 4°C und 2693 g sedimentiert und in sterilem Wasser resuspendiert. Für die langfristige Lagerung wurde die Suspension aliquotiert und bei -70°C gelagert.

4.4.5 *Dual Culture* Methode zum Test auf antifungale Wirkung von Pilzen gegen pflanzenpathogene Pilze

Um die antifungale Wirkung der Pilzisolate zu testen wurde die *Dual Culture* Methode [Dhanasekaran et al. 2012] angewendet. Die Pilze wurden auf PDA Agarplatten (4.1.3) anzogen (4.4.2) Jeweils ein Agarstücke mit Myzel (ø 5mm) eines potentiell fungiziden Pilzes wurde im Abstand von 2-3 cm zu einem Agarstücke mit Myzel (ø 5mm) eines phytopathogenen Pilzes (4.3.2) auf eine Mineralsalz Agarplatte (4.1.3) gesetzt. Die Agarplatte wurde bei 28°C für 4 bis 7 Tage und Dunkelheit inkubiert. Bei einer Inhibierung war das Wachstum der pflanzenpathogenen Pilze eingeschränkt.

4.4.6 *Overlay* Methode zum Test auf antifungale Wirkung von Pilzen gegen humanpathogene Pilze

Hefeextrakt-Pepton-Dextrose (YPD)	1%	(w/v)	Hefeextrakt
Softagar	2%	(w/v)	Pepton
	2%	(w/v)	Glukose
	0,5%	(w/v)	Agar

Um die antifungale Wirkung der Pilzisolate gegen den humanpathogenen Pilz *Candida albicans* (4.3.2) zu testen wurde die *Overlay* Methode [Gratia 1936] angewendet. Die Pilze wurden auf PDA Agarplatten (4.1.3) anzogen (4.4.2). Eine Übernachtkultur von 50 mL YPD Medium (4.1.3) wurde mit *C. albicans* (4.3.2) angezogen. Jeweils ein Agarstücke mit Myzel (ø 5mm) eines potentiell fungiziden Pilzes wurde in die Mitte einer PDA Agarplatte (4.1.3) platziert. In 10 mL YPD Softagar wurden mit der Übernachtkultur angeimpft bis eine OD600 von 1 erreicht wurde. Auf die Agarplatte mit dem Agarstück Myzel wurden 10 mL des 45°C warmen YPD Softagars gegossen. Nach einer kurzen Ruhezeit von 20 Minuten wurde die Agarplatte bei 37°C für 48 h und Dunkelheit inkubiert. Bei einer Inhibierung war das Wachstum von *C. albicans* um das Pilzmyzel eingeschränkt.

4.4.7 Plattenbasierter qualitativer Enzymaktivitätstest - Disc Diffusion Methode

Die Pilzisolate (4.3.1) wurden auf Enzymaktivität von Xylanasen, Cellulasen, Chitinasen und Lipasen mit einer modifizierten *Disc Diffusion* Methode Bauer [Bauer et al. 1966] qualitativ evaluiert. Für die Lipaseaktivität wurde eine modifizierte Methode von Von Tigerstrom und Stelmaschuk [Von Tigerstrom und Stelmaschuk 1989] verwendet.

Name	Zusammensetzung
Chitinase-Medium	Mineral Salz Medium + 1% (w/v) Chitin (Sigma Aldrich)
Lipase-Medium	1% Bacto TM Peptone + 0,01% (w/v) CaCl ₂ und 1 % (v/v) Tween 20
Xylanase-Medium	Mineral Salz Medium + 1% (w/v) Xylan von Buchenholz (Sigma Aldrich)
Cellulase-Medium	Mineral Salz Medium + 1% (w/v) Carboxymethylcellulose (Sigma Aldrich)

Tabelle 18: Medien zur Testung von Enzymaktivitäten

Als Vorkultur wurden 50 mL YPD Medium (4.1.3) mit 20 µL Konidiensuspension des Pilzisolates (4.3.1) inokuliert und drei Tage bei 28°C und 150 rpm inkubiert. Das mit H₂O gewaschene Myzel (1 g) wurde im Mineral Salz Medium mit 1% induzierendem Substrat (Tabelle 18) für weitere 3 Tage inkubiert. Die Kultur wurde 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert (2693 g), der Überstand abgenommen und für den folgenden Plattentest verwendet.

Mit einem Korkbohrer (Ø 5mm) wurde ein Loch in die Agarplatten mit induzierendem

Medium (Tabelle 18) gestanzt und 20 µL vom Kulturüberstand der Vorkultur inokuliert. Nach Inkubation von 24 Stunden bei 28°C und Dunkelheit wurden gebildeten Polysaccharide auf den Platten mit Lugol`scher Lösung (6% (w/v) Kaliumiodid, 4% (w/v) Iod) nach Steinecke und Auge [Steinecke und Auge 1963] gefärbt. Bei dem Lipaseassay bilden sich an den abgespaltenen Fettsäure mit der Anwesenheit von CaCl₂ feine Kristalle. Die Breite des entstandenen Ringes der reduzierten Zucker bzw. der Kristalle beim Lipaseassay um die Pilzkolonie wurde gemessen und eine hohe Aktivität mit einer

oberen Grenze von 1 cm definiert. Niedrige Aktivität wurde definiert zwischen einer sichtbaren Zone (ca. 2 mm) bis zu 1 cm Durchmesser.

4.4.8 Quantitativer Enzymtest im Flüssigmedium

Die quantitative Enzymaktivität der Pilzisolate wurde für die Cellulase- und Chitinaseaktivität mit der Schales Methode nach Ferrari [Ferrari et al. 2014], die Xylanaseaktivität mit der DNS Methode nach Breuil und Saddler [Breuil und Saddler 1985] und die Lipaseaktivität nach Winkler und Stuckmann [Winkler und Stuckmann 1979] evaluiert. Die Messungen erfolgten in Kooperation mit Dr. Bernhard Ellinger (Fraunhofer Institut, Hamburg, Deutschland).

Die Pilzisolate wurden in YPD Medium (4.1.3) für 3 Tage kultiviert (4.4.2), das Myzel mit H₂O gewaschen und mit Filterpaper getrocknet. Das getrocknete Myzel (0,1 g) wurde in 10 mL induzierendem Medium (4.4.7) für 3 Tage und 145 rpm bei 28° C inkubiert. Der

Ansatz wird im Folgenden als Kulturüberstand bezeichnet. Bei den Pilzen FW57 und FW16.1 wurde zusätzliche eine Kultivierung in verschiedenen Substraten vorgenommen.

Substrate für Chitinaseaktivität

Substrate für Cellulaseaktivität

Chitin	Avicel	
Chitosan geringes MW	Hydroxyethylcellulose	
Chitosan medium MW	α-Cellulose	
Chitosan hoch MW	CMC gering Viskosität	
	CMC medium Viskosität	
	CMC hoch Viskosität	

Cellulase- und Chitinaseaktivität:

Im folgenden Abschnitt wird die Messung der qualitativen Enzymaktivität [Ferrari et al. 2014] beschrieben.

Schales Reagenz	0.5	Μ	NaCO ₃
	1.5	mМ	K ₃ [Fe(CN) ₆]

Für die Messung wurde 1,5 mL Kulturüberstand mit 1,5 mL 2% Substrat (Cellulose, Mikrocrystalline Sigma Aldrich; Chitin von Garnelenschalen, Sigma Aldrich) in 50 mM Natriumacetat (pH 6,5) bei 37°C für zwei Stunden und bei 300 rpm inkubiert. Die Enzymaktivität wurde durch die Menge der vom jeweiligen Enzym umgesetzten Monosaccharide, β -D-Glucose als Produkt der Cellulase und N-Acetyl- β -D-Glucosamin als Produkt der Chitinase, gemessen. Dafür wurden 400 µL des Kulturüberstandes mit 400 µL Schales Reagenz gemischt und für 15 Minuten im Wasserbad gekocht. Die Reaktion wurde durch das Abkühlen auf 4°C gestoppt und die Absorption bei 410 nm photometrisch bestimmt (EnSpire 2300, PerkinElmer Inc.).

Xylanaseaktivität:

Das Produkt der Xylanaseaktivität, das Monosaccharid β -D-Xylose, wurde mit der DNS Methode gemessen [Breuil und Saddler 1985].

Ein Teil des Kulturüberstandes (100 μ L) wurden mit 400 μ L H₂O und 1.5 mL DNS Lösung (4.1.3) gemischt. Das Gemisch wurde für 10 Minuten gekocht. Die Reaktion wurde durch Abkühlen auf 4°C gestoppt und die Absorption bei 575 nm gemessen (EnSpire 2300, PerkinElmer Inc.).

Lipaseaktivität:

Die Umsetzung des para-Nitrophenolpalmitats (p-NPP) in para-Nitrophenol (410nm) und Palmitat durch Lipaseaktivität wurde wie folgt gemessen:

Lipase Reaktionspuffer	500	μМ	p-NPP
рН 7,5	50	mМ	TRIS-HCl

Dabei wurden 100 µL Kulturüberstand mit 100 µL Lipase-Reaktionspuffer für zwei Stunden bei 37°C und stetigem Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Aufgrund des Extinktionsmaximums von para-Nitrophenolpalmitat konnte die veränderte Absorption bei 410 nm gemessen werden (EnSpire 2300, PerkinElmer Inc.).

4.4.9 Charakterisierung der Xylanasen

Die Charakterisierung der reinen Xylanasen (4.6.7) erfolgte mit der DNS Methode [Breuil und Saddler 1985]. Um eine allgemeine Charakterisierung der Enzyme zu erhalten, wurden die Substrate mit verschiedenen pH-Werten und Temperaturen getestet. Außerdem wurde die absolute Enzymaktivität in Anwesenheit von verschiedenen Lösungsmitteln und Salzen gemessen. Dazu wurden 10 μ L der konzentrierten Proteinsuspension (4.6.7) mit 50 μ L Substrat und 40 μ L des jeweiligen Puffers 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde 100 μ L DNS Lösung (4.4.8) auf das Protein-Substrat-Gemisch gegeben und die Reaktion durch 10 Minuten kochen gestoppt. Die Konzentration der entstandenen Zucker wurde bei 510 nm photometrisch quantifiziert (4.6.2).

4.4.10 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen des qualitativen Enzymtests im Flüssigmedium (4.4.8) wurde nach Angaben des Herstellers mit dem *BCA protein detection kit* (4.1.6) bestimmt.

Proteinkonzentrationen der gereinigten Proteine (4.6.7) und deren Charakterisierung (4.4.9) wurden mit dem Kit Roti[®]-Nanoquant (4.1.6) nach Anleitung des Herstellers gemessen.

4.5 Methoden der Molekularbiologie

4.5.1 Isolation genomischer DNA

Genomische DNA wurde nach Murray und Thompson [Murray und Thompson 1980] mit Modifikationen isoliert.

CTAB- Lysepuffer	2%	(w/v)	CTAB
(pH 8.0)	100	mМ	TRIS-HC
	1,4	М	NaCl
	20	mМ	EDTA

Für die Isolierung wurde das im Flüssigkeitsmedium YPD (4.1.3) angezogene Myzel eines Pilzstammes (4.3.1) über Nacht lyophilisiert. Das Myzel wurde mit Flüssigstickstoff im Mörser zu einem feinen Pulver gemörsert und 100 mg davon in 900 μ L CTAB-Lysepuffer aufgenommen. Das Gemisch wurde kräftig durchmischt und für 60 Minuten bei 65°C inkubiert. Ungelöste Bestandteile wurden sedimentiert (18.500 g, 15 Minuten, 4°C). Der Überstand mit der DNA wurde mit 900 μ L Chloroform 30 Mal invertiert. Nach dem Zentrifugieren von 10 Minuten bei 18.500 g und 4°C wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde wiederholt. Die DNA wurde mit 750 μ L Isopropanol ausgefällt. Nach 20 Minuten Inkubation bei -20°C wurde die ausgefällte DNA 15 Minuten bei 4 °C und 18.500 g sedimentiert. Das DNA Pellet wurde mit 1 mL 70% Ethanol geschüttelt, 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Pellet wurde unter dem Abzug angetrocknet und in 100 μ L H₂O gelöst. Zur Qualitätsbestimmung wurde die DNA mittels Gelelektrophorese (4.6.1) überprüft und photometrisch quantifiziert (4.6.2). Für die dauerhafte Aufbewahrung wurde die DNA bei -70°C gelagert.

4.5.2 Isolation der RNA

Zur Vorbereitung der RNA Isolation aus Pilzmyzel wurde darauf geachtet, dass alle verwendeten Reagenzien, Reaktionsgefäße und Mörser RNase frei waren. Es wurde stets unter dem vorher gründlich gereinigten Abzug gearbeitet.

Das im induzierten Flüssigmedium angezogene Pilzmyzel (4.4.7) wurde zweimal mit H₂O gewaschen und lyophilisiert.

Das trockene Myzel wurde im Mörser mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Von dem Puder wurden 50-100 mg mit 1 mL peqGOLD TriFast[™] (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) vermischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor mit 0,2 mL Chloroform 30 Sekunden kräftig geschüttelt wurde. Nach

erneuter zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe 5 Minuten bei 18500 g bis zur Phasenauftrennung zentrifugiert. Die RNA aus der wässrigen Phase wurde mit 500 μ L Isopropanol für 15 Minuten auf Eis ausgefällt. Anschließend wurde die RNA für 10 Minuten bei 18.500 g sedimentiert. Das sich gebildete Pellet wurde zur Reinigung von Salzen zweimal mit 75% (v/v) Ethanol geschüttelt und anschließend erneut bei 18.500 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach einer kurzen Trocknungsphase des Pellets unter dem Abzug wurde das Pellet in 400 μ L RNase freiem Wasser gelöst und für die dauerhafte Lagerung bei -70°C aufbewahrt. Zur Qualitätsbestimmung wurde die RNA mittels Gelelektrophorese (4.6.1) überprüft und photometrisch quantifiziert (4.6.2).

4.5.3 cDNA - Synthese

Um eine eventuelle Kontamination der isolierten RNA mit DNA auszuschließen, wurde folgender Reaktionsansatz bei 37°C für 30 Minuten inkubiert:

RNA (4.5.2)	1 µg
DNase I	1 U
10 x Reaktionspuffer mit MgCl ₂ (Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt, Deutschland)	1 µL
H ₂ O	bis 10 µL

Die Reaktion wurde mit 1 µL 50 mM EDTA (pH 8,0) und 10 Minuten bei 65°C gestoppt.

Die cDNA wurde mit dem *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis* Kit (4.1.6) synthetisiert. Dafür wurde folgender Reaktionsansatz zuerst 5 Minuten bei 25°C und dann 60 Minuten bei 42°C inkubiert.

RNA nach Behandlung mit DNase I (4.5.3)		
random hexamer Oligonukleotide (100 µM)		
5x Reaktionspuffer	4 µL	
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)	1 µL	
10 mM dNTP Mix	$2\mu L$	
RevertAid H Minus M-MulV Reverse Transkriptase (200 U/µL)	1 µL	

Um die Aktivität der Reversen Transkriptase zu beenden, wurde der Ansatz 10 Minuten bei 70°C erhitzt. Die synthetisierte cDNA wurde bei -70°C gelagert oder für die Amplifikation von Genen (4.5.5) verwendet.

4.5.4 Isolation der Plasmid DNA aus E. coli

Unter Selektionsdruck gewachsene *E. coli* Kolonien (4.5.7) wurden über Nacht in einem 15 mL Kulturröhrchen mit LB Medium (4.1.3) und entsprechenden Antibiotika (4.3.3) bei 37°C und 145 rpm inkubiert, um am folgenden Tag die Plasmide mit dem *Presto*TM *Mini Plasmid Kit* (4.1.6) nach Angaben des Herstellers zu isolieren. Durch spezifische Primer (4.1.4) und DNA Sequenzierung (4.1.8) konnte die Sequenzabfolge und die erfolgreiche Transformation überprüft werden.

4.5.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Überprüfung des Einbaus von Genfragmenten in einen Vektor pET28b (4.1.7) wurde der *OneTaq 2 x Mastermix* (4.1.2) mit den entsprechenden Primern (4.1.4) verwendet.

Template (4.5.4)	250	ng	94°C	30 Sekunden
OneTaq 2 x Mastermix	12,5	μL	94°C	30 Sekunden
pET28b [F] (10 µM)	0,5	μL	45-65°C	30 Sekunden
pET28b [R] (10 µM)	0,5	μL	68°C	1 Minute/ Kb
H ₂ O	ad 25	μL	68°C	5 Minuten

Die ITS (*internal transcribed spacer*) der Pilzisolate (4.4.1) wurden mit der *Q5 DNA Polymerase* (4.1.2) mit den Primern ITS1 und ITS4 (4.1.4) amplifiziert.

DNA (4.5.1)	250	ng	98°C	30 Sekunden
dNTPs (10 mM)	0,5	μL	98°C	10 Sekunden
ITS1 [F] (10 μM)	1,25	μL	58°C	30 Sekunden
ITS4 [R] (10 µM)	1,25	μL	72°C	30 Sekunden/Kb
5 x Q5 Reaktionspuffer	5	μL	72°C	2 Minuten
DMSO	1	μL		
Q5 DNA Polymerase	0,02	U/µL		
H ₂ O	ad 25	μL		

Die Amplifikation der Plasmid- und Genfragmente für die Klonierungen der Xylanasen erfolgte nach der *FastCloning* Methode [Li et al. 2011]. Dazu wurden die Fragmente mit Hilfe der *pfu DNA Polymerase* (4.1.2) amplifiziert.

DNA (Plasmid / genomische DNA)	1 / 250	ng	95°C	2 Minuten
dNTPs (10mM)	0,5	μL	95°C	30 Sekunden
Primer [F] (10 µM)	1	μL	50-70°C	30 Sekunden
Primer [R] (10 µM)	1	μL	72°C	2 Minuten/Kb
10 x <i>Pfu</i> Puffer mit MgSO4	2,5	μL	72°C	5 Minuten
DMSO	1	μL		
Pfu DNA Polymerase	1,25	U		
H ₂ O	ad 25	μL		

Nach der Amplifikation der Plasmid – und Genfragment wurde ein Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym DpnI (New England BioLabs GmbH, Frankfurt, Deutschland) nach Angaben der *FastCloning* Methode [Li et al. 2011] durchgeführt.

Alle PCR Reaktionen wurden im TProfessional Standard Gradient Thermocycler (Biometra, Göttingen) mit 30 Zyklen durchgeführt. Die Annealing - Temperatur der Primer (4.1.4) wurde *in silico* mit der Software Geneious 11.0 (Biomatters ApS, Silkeborg, Dänemark) berechnet.

4.5.6 Zielgerichtete Mutagenese

Die Primersequenzen wurden mit einer QuikChange[®] Methode nach Nobili et al. [2013] erstellt (4.1.4). Es wurden für den zielgerichteten Austausch von Nukleotiden im Gen die *FastCloning* Methode [Li et al. 2011] verwendet. Die Methode ist in dem Kapitel Polymerase Kettenreaktion (4.5.5) beschrieben.

4.5.7 Transformation von Plasmiden in E. coli

Plasmide (4.1.7) wurden in chemisch kompetente Zellen nach der TfB Methode [Hanahan 1983] transformiert.

TfB Puffer A	30	mM	KCH ₃ COO
	100	mM	KCL
	10	mM	CaCl ₂
	13%	(v/v)	Glycerol

TfB Puffer B	10	mM	KCL
	100	mM	CaCl ₂
	1	mM	MOPS
	13%	(v/v)	Glycerol
MgCl ₂ Lösung	0,5	mМ	MgCl ₂ x 4 H ₂ O

Es wurden 1 mL einer Übernachkultur von *E. coli* (4.3.3) in 100 mL LB Medium (4.1.3) angeimpft und zu einer OD_{600nm} von 0.4 - 0.6 bei 37°C und 145 rpm angezogen. Die Zellen wurden 10 Minuten bei 2693 g sedimentiert und anschließend in 30 mL TfB Puffer A und 3,5 mL MgCl₂ Lösung resuspendiert. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut sedimentiert (10 Minuten, 2693 g), in 4 mL TfB Puffer B resuspendiert und auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden zu je 50 µL aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und danach bei -80°C gelagert.

Ein Aliquot kompetenter Zellen wurde zur Transformation auf Eis angetaut. Es wurde Plasmid DNA (4.5.4) und amplifiziertes Gen (4.5.5) vom *FastCloning* Ansatz (4.5.5), 2 μ L bis 5 μ L, mit den Zellen gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 30 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und danach für 2 Minuten auf Eis gelagert. Die Zellen wurden mit 250 μ L SOC Medium (4.1.3) für eine Stunde bei 37°C und 145 rpm regeneriert.

Die transformierten *E. coli* Zellen wurden auf LB Agar mit den jeweiligen Antibiotika (4.3.3) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.6 Biochemische Methoden

4.6.1 Gelelektrophorese

10 x TBE Puffer	108	g	TRIS
	55	g	Borsäure
	40	mL	EDTA 0,5 M (pH 9)
6 x Ladepuffer	250	mg	Xylencyanol
	250	mg	Bromphenolblau
	30	mL	Glycerol
	70	mL	TBE (1 x)

Die Überprüfung der amplifizierten PCR Produkte (4.5.5) erfolgte über ein 0,8% (w/v) Agarose Gel in 1 x TBE Puffer. Es wurden 3 - 6 μ L DNA Produkt mit dem 6 x Ladepuffer (Verhältnis 1:6) gemischt, in die Geltaschen geladen und bei 80 – 120 Volt 30 bis 50 Minuten aufgetrennt. Als Marker wurde der *GeneRuler*TM *1 kb Plus DNA Ladder* (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland) benutzt. Die Färbung der DNA bzw. RNA erfolgte in einem Ethidiumbromidbad (300 µL einer 1% Lösung auf 500 mL) für 15 Minuten. Die Dokumentation des Gels erfolgte in einem UV-Transilluminator (SynGene Genius, Bio Imaging System).

4.6.2 Photometrische Quantifizierung von DNA / RNA

Die Photometrische Quantifizierung der DNA und RNA erfolgt mit dem Photometer NanoVue Plus[™] (Biochrom, Holliston, USA). Die DNA und die RNA Konzentrationen wurden bei einer Absorption von 260 nm und 280 nm gemessen, wobei die Wellenlänge 260 nm die maximale Absorption und die Wellenlänge 280 nm die maximale Absorption von Proteinen misst. Liegt der Wert des Quotienten A₂₆₀/A₂₈₀ bei ~1,8 kann man von einer reinen Nukleinsäure ausgehen. Liegt der Wert des Quotienten A₂₆₀/A₂₈₀ bei ~2 kann man von einer reinen RNA ausgehen.

4.6.3 Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelekrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [1970].

SDS-Laufpuffer	50	mМ	TRIS-HCl
pH 8,4	384	mM	Glycin
	0,1%	(w/v)	SDS
APS (10%)	10%	(w/v)	Ammoniumpersulfat
SDS-PAGE Probenpuffer	20	mМ	TRIS-HCl
(pH 8.0)	20%	(v/v)	Glycerol
(I -) -)	4%	(w/v)	SDS
	0,01%	(w/v)	Bromphenolblau
	10%	(v/v)	β -Mercaptoethanol
Sammelgelpuffer	1,5	Μ	TRIS-HCl
рН 6,8	0,4%	(w/v)	SDS
Tranngalpuffar	0.5	М	TDIS HCI
	0,5	1 VI	
рн ө,ө	0,4%	(W/V)	202

Die Lösungen für das Trenngel (Tabelle 19) wurden angesetzt und in eine Gelkammer (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) geladen. Eine dünne Schicht Isopropanol wurde während der Polymerisation auf das Gel gegeben, um eine gerade Oberfläche zum Sammelgel zu erhalten. Diese Schicht wurde nach Aushärtung des Gels entfernt und die Lösung des Sammelgels auf das Trenngel pipettiert. Ein Kamm zur Taschenbildung wurde in das Sammelgel gesteckt.

Lösung	Trenngel 12,5%	Sammelgel 4%
Trenngelpuffer (pH 8,8)	2 mL	-
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	-	1 mL
Acrylamid / Bis-Lösung (40%)	2,5 mL	40 µL
(Carl Roth, Karlsruhe)		
APS (10%)	40 µL	40 µL
TEMED	4 μL	4 µL
H ₂ O	3,5 mL	2,6 mL

Tabelle 19: Lösungen von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE

Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in die Laufkammer gespannt und der Kamm nach Zugabe des SDS-Laufpuffers entfernt.

Die Proteinproben (4.6.6, 4.6.7) wurden zu gleichen Teilen mit dem SDS-PAGE Probenpuffer vermischt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Nach kurzem sedimentieren der Proben bei 2693 g für 30 Sekunden wurden 5 – 10 μ L des Überstandes in die Gelkammern pipettiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei 25 mA je Gel für 1,5 Stunden.

4.6.4 Proteinfärbung im SDS-PAGE Gel mit Coomassie Brilliant Blue

Coomassie - Färbelösung	0,2%	(w/v)	Coomassie Brilliant Blue G-250
	10%	(v/v)	Essigsäure
	40%	(v/v)	Ethanol
Entfärbelösung	25%	(v/v)	Ethanol
	7,5%	(v/v)	Essigsäure

Das Anfärben der Proteine erfolgte mit *Coomassie Brilliant Blue* G-250 [Weber und Osborn 1969]. Das Trenngel wurde für mindestens 4 Stunden in der *Coomassie* - Färbelösung unter stetigem leichtem Schütteln inkubiert. Durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung wurde der nicht an Proteine gebundene Farbstoff aus dem Gel herausgewaschen.

4.6.5 Zymogramm

Zur Identifizierung der aktiven sekretierten Enzyme wurde ein Zymogramm erstellt [Vandooren et al. 2013].

Rückfaltungspuffer	50	mM	TRIS-HCl
рН 6,8	2%	(v/v)	Triton X-100
Waschpuffer			Na ₂ HPO ₄
рН 6,8			NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
			In unterschiedlichen Mengen je pH-Wert zusammen 100 mM
Kongorot	0,1%	(w/v)	Kongorot
Entfärbelösung	1	М	NaCl
Substrate	0,5%	(w/v)	CMC
	0,5%	(w/v)	Xylan

Für das Zymogramm wurden das Pilzisolat Fsh102 (4.4.1) in YPD Medium (4.1.3) vorkultiviert und in 50 mL induzierenden Medium (4.4.7) bei 28°C für 3 Tage unter Schütteln inkubiert. Die Zellen aus der Kultur wurden bei 18500 g sedimentiert und der Überstand in einem Centricon (Vivaspin[®] 20, Sartorius AG, Göttingen) bis auf 500 μ L konzentriert. Die Gele für das Zymogramm wurden wie ein SDS-PAGE Gel gegossen (4.6.3) und mit 0,5% des jeweiligen Substrats (CMC oder Xylan) versetzt.

Die Überstände wurden zu gleichen Teilen mit SDS-PAGE Probenpuffer (4.6.3) gemischt und im SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine im Gel wurden anschließend im Rückfaltungspuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur renaturiert. Das Gel wurde für weitere 30 Minuten in 50 mM TRIS-HCl (pH 6,8) gewaschen und für eine Stunde in Waschpuffer Puffer bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde nicht umgesetztes Substrat mit Kongorot angefärbt und überschüssiger Farbstoff mit 1 M NaCl Lösung mit mehrmaligem Wechseln der Lösung entfernt. Um eine eindeutige Entfärbung zu erhalten, wurde das Gel für einige Minuten in 70% (v/v) Ethanol inkubiert.

Auf dem Gel entstandene entfärbte Banden wurden ausgeschnitten und mittels LC/MS-MS analysiert (4.2.2).

4.6.6 Expression der Proteine

In dieser Arbeit wurden Proteine in E. coli (4.3.3) heterolog exprimiert.

Proteinexpression in E. coli

Stamm – IPTG	1	М	IPTG
Extraktionspuffer pH 7,5			Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O In unterschiedlichen Mengen je pH-Wert zusammen 100 mM

Die Proteinexpression im prokaryotischen System *E. coli* BL21 (4.3.3) wurde durch die Zugabe von IPTG induziert. Aus einer Übernachtkultur (4.3.3) wurden 1 mL in 50 mL LB Medium (4.1.3) mit entsprechendem Antibiotika (4.3.3) angeimpft und bei 37°C und 145 rpm inkubiert, bis eine OD_{600nm} von 0,4 – 0,6 erreicht wurde. Um die Expression der Cellulasen und Xylanasen zu induzieren, wurde 10 μ L vom Stamm IPTG hinzugefügt und bei jeweils drei verschiedenen Temperaturen (22°C, 28°C und 37°C) über Nacht unter Schütteln inkubiert. Nach einer Stunde, vier Stunden und über Nacht wurde die OD_{600nm} gemessen, durch den Wert 3 dividiert und die entsprechende Menge an Volumen abgenommen um. Der Wert 3 dient als Normierung der Zellen.

Die geernteten Zellen wurden 5 Minuten bei 4°C sedimentiert (18500 g) und in 200 µL Extraktionspuffer aufgenommen. Die Zellen aus der Suspension wurden aufgebrochen (Ultraschallprozessor, Stärke 60, Intervall 0,5 Hielscher Ultrasonic GmbH, Teltow) und die lösliche Fraktion (Überstand) von der unlöslichen Fraktion (Pellet) durch Zentrifugation (4°C, 2 Minuten, 185000 g) getrennt. Beide Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (4.6.3) aufgetrennt.

Für die Aufreinigung über Affinitätschromatographie wurden von der Vorkultur 5 mL in 500 mL LB Medium angeimpft und bei 22°C über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei 18500 g und 4°C sedimentiert und in 10 mL Protein-Probenpuffer (4.6.7) aufgenommen. Anschließend folgte eine Sonifizierung von 2 x 2 Minuten auf Eis und Sedimentierung bei 18500 g und 4°C. Der Überstand wurde über einen Sterilfilter (0,45 μ m) von groben Bestandteilen befreit. Aus dem Überstand wurden die Proteine mittels Affinitätschromatographie (4.6.7) angereichert.

Bindepuffer pH 8,0	50 0,5	mM M	Natriumphosphatpuffer (4.1.3) NaCl
Elutionspuffer pH 8,0	50 0,5 500	mM M mM	Natriumphosphatpuffer (4.1.3) NaCl Imidazol
Protein-Probenpuffer	95% 5%		Bindepuffer Elutionspuffer

4.6.7 Aufreinigung von Proteinen über Affinitätschromatographie

Proteine mit His₆-Tags wurden über eine Affinitätschromatographie über Ni-NTA Agarose (PureCube Ni – NTA Agarose, Biozym, Hamburg, Deutschland) aufgetrennt. Die Ni-NTA Agarose wurde in 5 mL Säulen (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers vorbereitet und mit 7,5 mL Protein-Probenpuffer äquilibriert.

Der filtrierte Überstand (4.4.7) wurde über die Säule gegeben. Die an der Ni-Agarose gebundenen Proteine wurden zunächst mit 3,5 mL Elutionspuffer (Elution 1) und in einem zweiten Schritt mit 7,5 mL Elutionspuffer (Elution 2) von der Säule gelöst. Die Elution 1 wurde im Centricon (Vivaspin® 20, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) konzentriert und mit Bindepuffer zweimal gewaschen, um das restliche Imidazol auszuwaschen. Die Säule wurde mit 10 mL Protein-Probenpuffer regeneriert und für weitere Aufreinigungen bei 4°C gelagert.

Blot-Puffer pH 8,3	25 192 20%	mM mM (v/v)	TRIS Glycin Methanol
РВS pH 7,5	137 1,5 8,1 2,7	mM mM mM mM	NaCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ KCl
PBS-T pH 7,4 Alkalische Phosphatase Puffer pH 9,5	0,05% 100 100 5	(v/v) mM mM mM	Tween-20 in PBS (1x) TRIS-HCl NaCl MgCl ₂
Nitrobluetetrazolium (NBT)	0,05	g	in 1 mL 70% Dimethylformamid (DMF)

4.6.8 Immunologischer Nachweis von Proteinen im Western-Blot

Bromochloroindolyl-dinatrium 0,05 g Salz (BCIP) in 1 mL 100% Dimethylformamid (DMF)

Um die über die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (4.6.3) nachzuweisen wurden diese zunächst elektrophoretisch auf eine Membran aus Nitrocellulose (Protran 83 Nitrocellulose, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) übertragen. Dazu wurde das SDS-PAGE Gel auf einer Membran platziert und mit Blotpuffer umgeben. Die Membran wurde zwischen zwei Filterpapiere (Satorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen), zwei Schwammtücher und zwei Kunststoffgitter geklemmt und fixiert. Diese Konstruktion wurde senkrecht in eine Blotkammer (Transphor Electrophoresis Unit, Hoefer Scientific Instruments, USA) geschoben und diese mit Blotpuffer gefüllt. Es wurde bei 40 mA und 4°C über Nacht geblottet. Nach dem Blotten wurde die Membran in Milchpulversuspension aus 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS-T unter stetigem Schütteln für 30 Minuten blockiert. Danach wurde die Membran mit dem Antigen-spezifischen Antikörper (RGS-His Antibody 34610 Hilden. Deutschland) 2.5% Qiagen, in (w/v)PBT-T Milchpulversuspension für zwei Stunden unter Schütteln und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran drei Mal für 10 Minuten mit PBS-T gewaschen um den überschüssigen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (Rabbit Anti-Maus Alkalische Phosphatase-Konjugat (A3562), Sigma Aldrich, München, Deutschland) in 2,5% (w/v)PBS-T Milchpulversuspension für zwei Stunden unter Schütteln und bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschgang und Äquilibrierung der Membran mit alkalischem Phosphatase Puffer. Durch die Zugabe des Substrates (66 µL NBT + 33 µL BCIP in 10 mL alkalische Phosphatase Puffer) wurde die Bindung des Konjugats detektiert.

4.6.9 Dünnschichtchromatographie

Die Produkte der enzymatischen Hydrolyse von Xylan, durch Xylanasen, wurden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) untersucht.

Organisches Laufmittel	fmittel 9 Teile		Essigsäureethylester	
	3 Teile		Essigsäure	
	1 Teil		Methansäure	
	3 Teile		H_2O	
Färbelösung	0,2%	(w/v)	Oricin	
	1 Teil		Schwefelsäure	

0.05		
0,00	М	Natriumacetat
0,1% 0,1% 0,1% 0,1% 0,1%	(w/v) (w/v) (w/v) (w/v) (w/v) (w/v)	Xylose Xylobiose Xylotriose Xylotetraose Xylopentose Xylohexose
	0,05 0,1% 0,1% 0,1% 0,1% 0,1%	0,05 M 0,1% (w/v) 0,1% (w/v) 0,1% (w/v) 0,1% (w/v) 0,1% (w/v) 0,1% (w/v)

Um die Hydrolyse des Xylans zu ermitteln, wurde

Aufgereinigtes Protein (4.6.7)	10%
Xylan (0,1%)	50%
Hydrolysepuffer	40%

in einem 100 µL Ansatz bei 30°C für 15 Minuten, 1 Stunde und 17 Stunden inkubiert.

Nach jedem Zeitpunkt wurde 1 μ L abgenommen und auf eine Silicagel G-60 Platte F254 (20 x 20 cm, Merck, Darmstadt, Deutschland) pipettiert. Als Standard wurde je 1 μ L der unterschiedlichen Oligomere in einem Abstand von 1,5 cm auf die Platte gegeben. Die Platte wurde aufrecht in 100 mL Organischem Laufmittel in eine Dünnschichtkammer (Desaga-GmbH, Sarstedt, Wiesloch, Deutschland) gestellt und für 40 Minuten laufen gelassen. Anschließend wurden die Platten bei 80°C für 10 Minuten getrocknet, mit der Färbelösung besprüht und weitere 2 Stunden bei 80°C inkubiert. Das Restriktionsmuster der Enzyme konnte durch den Vergleich zu den Standards abgelesen werden.

4.7 Bioinformatische Methoden

4.7.1 ITS Sequenzierung der Pilzsammlung

Die ITS (*Internal transcribed spacer*) Sequenz ist eine Marker Sequenz, die in jedem Genom von Mikroorganismen und Pflanzen. Bei Pilzen dient sie als bevorzugte Sequenz der ribosomalen DNA um Pilzisolate innerhalb einer Art und zwischen Arten phylogenetisch zu identifizieren [Schoch et al. 2012]. Sie umfasst die Sequenz des ITS1, das 5,8 S rRNA Gen und die Region ITS2 und wird von der 18S Region und 28S Region flankiert (Abbildung 24) Die gesamte ITS Region wurde mit spezifischen Oligonukleotiden (4.1.4) mittels PCR (4.5.5) amplifiziert und zur Überprüfung von beiden Seiten sequenziert (4.1.8), um anschließend mit SeqMan (5. Edition 2006, Lasergene, DNASTAR) assembliert zu werden.

	ITS 1 Region		ITS 2 Region	
18 S rRNA Gen		5.8 rRNA Gen		28 S rRNA Gen

Abbildung 24: Genregion ITS 1 und Genregion ITS 2

4.7.2 Datenbanken

Zur Analyse von *Aspergillus sydowii* wurde die Datenbank von JGI (*Joint Genome Institut*, https://jgi.doe.gov/) verwendet. Das Genom des Stammes *Aspergillus sydowii* CBS 593.65 v1.0 wurden am 13.12.2011 unter der JGI Projekt ID 403567 auf der Internetseite URL: https://genome.jgi.doe.gov/portal/ veröffentlich.

4.7.3 BLAST Ring Image Generator (BRIG)

Zur Darstellung der CAZyme Analyse (4.2.5) auf die spezifischen Chromosomen der Pilzisolate FW57 und FW16.1 wurde das Programm BRIG (*BLAST Ring Image Generator*) Version 0.95 benutzt.

4.7.4 Homologiemodelle

Um die Proteine visuell darzustellen wurde mit der Protein Data Base (PDB, https://www.wwpdb.org/) und dem Programm YASARA (*Yet Another Scientific Artificial Reality Application*, Version 13.9.8) ein Homologiemodell der jeweiligen Enzyme erstellt. Mit dem Programm PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.4.2, Schrödinger, LLC) wurde das 3D-Modell modelliert.

4.7.5 Bioinformatische Programme

Um das Signalpeptid in den Genen zu verifizieren wurde das Programm SignalP 4.1 Server benutzt [Petersen et al. 2011]. Die Annotierung des codogen und nicht codogen sequenzierten ITS Strangs wurde mit der Software SeqMan 7.1.0 (Lasergene, DNASTAR) gemacht. Die Annotation der identifizierten Peptide aus der LC/MS-MS (4.2.2) wurde mit dem *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) von *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) durchgeführt. Zur Bestimmung der Ähnlichkeit zu Aminosäuren der in der LC/MS-MS Analyse (4.2.2) identifizierten Peptide wurde der *pBLAST* von NCBI durchgeführt, der auf der Aminosäuresequenz der Proteine beruht.

Zur Kontrolle der Glykosylierung der untersuchten Enzyme wurden folgende Programm verwendet. Für die O-Glykosylierung wurde das Internet Tool NetOGlyc 4.0 Server [Steentoft et al. 2013] verwendet, für die N-Glykosylierung der Proteine wurde das Internet Tool NetNGlyc 1.0 Server [Gupta et al. 2004] verwendet.

Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

Ascomycota produzieren neben antifungalen Metaboliten auch Biomasse abbauende Enzyme, die in diversen biotechnologischen Prozessen zum Einsatz kommen. Vietnam als tropisches Land bietet durch seinen Artenreichtum die beste Voraussetzung, Pilzisolate mit unterschiedlichen Enzymaktivitäten zu finden. Daher wurde eine Pilzsammlung von 295 Ascomyceten in neun unterschiedlichen Habitaten in Vietnam erstellt, von denen 164 Isolate auf Gattungsebene phylogenetisch eingeordnet wurden.

Alle 295 Ascomyceten wurden gegen sechs wirtschaftlich relevante phytopathogene Pilze und gegen einen humanpathogenen Pilz auf inhibitorische Wirkung getestet. Bei 15 Isolaten konnte eine allgemeine inhibitorische Wirkung gezeigt werden.

Darüber hinaus wurden die Isolate der Pilzsammlung qualitativ und quantitativ auf die Aktivität von Cellulasen, Xylanasen, Chitinasen und Lipasen überprüft. Es wiesen 69 Pilzisolate eine hohe Enzymaktivität bei einem oder mehreren der Enzyme auf, wobei einige Isolate als Hochleistungszersetzer identifiziert wurden. So wurde das Pilzisolat Fsh102, *Aspergillus sydowii*, als sehr guter Produzent für Xylanasen und Cellulasen identifiziert. Zwei Xylanasen zeigten bei *A. sydowii* in einer heterologen Expression Aktivität. Eine dieser Xylanasen war über mehrere Tage stabil und zeigte eine hohe Toleranz gegenüber verschiedenen Salzen und Detergenzien, während die andere Xylanase tolerant gegenüber extremen Temperaturen und verschiedenen Lösungsmitteln war. Beide Xylanasen zeigen ein unterschiedliches Substratspektrum und sind damit beide für eine biotechnologische Nutzung interessant.

Das Pilzisolat FW57, *Humicola fuscoatra*, wurde aufgrund seiner hohen Chitinaseaktivität und das Pilzisolat FW16.1, *Fusarium solani*, wegen seiner hohen Cellulaseaktivität für eine CAZyme Analyse bei verschiedenen Substraten ausgewählt und *de novo* sequenziert. Sekretierte CAZyme sind für biotechnologische Prozesse von großer Bedeutung. Die sekretierten CAZyme unterscheiden sich bei FW16.1 abhängig vom Substrat, wobei FW57 bei beiden getesteten Substraten, Chitin und Chitosan, die gleichen Enzyme sekretiert. Einige Gene der sekretierten CAZyme konnten mit einer *de novo* Sequenzierung als mögliches Gen-Cluster identifiziert werden. Die Identifizierung von solchen Gen-Clustern ist ein wichtiger Schritt für das Verständnis des Zusammenwirkens unterschiedlicher Enzyme zum synergistischen Substratabbau.

Abstract

6 Abstract

Ascomycota are able to produce antifungal metabolites and biomass degrading enzymes which are useful in various biotechnological processes. Vietnam as a tropical country provides ideal conditions to find fungal isolates with different enzyme activities. Therefore, a fungal collection of 295 ascomycetes from nine different habitats in Vietnam was collected, of which 164 isolates were phylogenetically classified at the genome-level.

All 295 ascomycetes were tested against six economically relevant phytopathogenic fungi and against a human pathogenic fungus for inhibitory effect. In 15 isolates a general inhibitory effect could be shown.

The isolates of the fungal collection were checked qualitatively and quantitatively for the activity of cellulases, xylanases, chitinases and lipases. There were 69 fungal isolates with a high enzyme activity in one or more of the enzymes, with some isolates identified as high-performance decomposers. The fungal isolate Fsh102, *Aspergillus sydowii*, was identified as a very good producer of xylanases and cellulases. Two xylanases of *A. sydowii* were expressed in a heterologous way, retaining their enzymatic activities. One of the xylanases was stable for several days and showed a high tolerance to various salts and detergents. The other xylanase was stable at extreme temperatures and showed high tolerance to solvents. Both xylanases show a different substrate spectrum and are of interest for biotechnological applications.

In general, secreted CAZymes are of great importance for biotechnological processes. Therefore, two fungal strains were *de novo* sequenced and used for a CAZyme analysis on various substrates. The fungus isolate FW57, *Humicola fuscoatra*, was selected due to its high chitinase activity and the fungus isolate FW16.1, *Fusarium solani*, due to its high cellulase activity. The secreted CAZymes differ in FW16.1 depending on the substrate. FW57 secretes the same enzymes on both tested substrates, chitin and chitosan. Some genes coding for the secreted CAZymes could be identified by *de novo* sequencing as part of a possible gene cluster. The identification of such gene clusters is an important step in understanding the interaction of different enzymes for synergistic substrate degradation.

7 Literaturverzeichnis

- Aam BB, Heggset EB, Norberg AL, Sørlie M, Vårum KM, Eijsink VGH (2010) Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. *Marine Drugs* 8: 1482–1517.
- Aaslyng D, Gormsen E, Malmos H (2007) Mechanistic Studies of Proteases and Lipases for the Detergent Industry. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 50: 21–30.
- Abdel-Fatah OM, Hassan MM, Elshafei AM, Haroun BM, Atta HM, Othman AM (2012) Physiological Studies on Carboxymethyl Cellulase Formation by Aspergillus terreus DSM 826. Brazilian Journal of Microbiology 43: 01-11.
- Achkar JM, Fries BC (2010) Candida Infections of the Genitourinary Tract. Clinical Microbiology Reviews 23: 253–73.
- Acuña-Argüelles ME, Gutiérrez-Rojas M, Viniegra-González G, Favela-Torres. E (1995) Production and Properties of Three Pectinolytic Activities Produced By Aspergillus niger in Submerged and Solid-State Fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology 43: 808–14.
- Ada G, Isaacs D (2003) Carbohydrate-Protein Conjugate Vaccines. Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 9: 79–85.
- Adams DJ (2004) Fungal Cell Wall Chitinases and Glucanases. Microbiology 150: 2029-35.
- Adney WS, Jeoh T, Beckham GT, Chou YC, Baker JO, Michener W, Brunecky R, Himmel ME (2009) Probing the Role of N-Linked Glycans in the Stability and Activity of Fungal Cellobiohydrolases by Mutational Analysis. *Cellulose* 16: 699–709.
- Agger JW, Isaksen T, Várnai A, Vidal-Melgosa S, Willats WGT, Ludwig R, Horn SJ, Eijsink VGH, Westereng B (2014) Discovery of LPMO Activity on Hemicelluloses Shows the Importance of Oxidative Processes in Plant Cell Wall Degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 6287-6292.
- Agulló E, Rodríguez MS, Ramos V, Albertengo L (2003) Present and Future Role of Chitin and Chitosan in Food. *Macromolecular Bioscience* 3: 521–30.
- Aider M (2010) Chitosan Application for Active Bio-Based Films Production and Potential in the Food Industry: Review. *LWT Food Science and Technology* 43: 837–42.
- Aleku GA, France SP, Man H, Mangas-Sanchez J, Montgomery SL, Sharma M, Leipold F, Hussain S, Grogan G, Turner NJ (2017) A Reductive Aminase from Aspergillus oryzae. Nature Chemistry 9: 961–69.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M (1996) Introductory Mycology. Wiley. 868 Seiten
- Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ (2010) Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process Based on Enzymatic Hydrolysis: A Review. *Bioresource Technology* 101: 4851–4861.
- Amore A, Parameswaran B, Kumar R, Birolo L, Vinciguerra R, Marcolongo L, Ionata E, La Cara L, Pandey A, Faraco V (2015) Application of a New Xylanase Activity from

Bacillus amyloliquefaciens XR44A in Brewer's Spent Grain Saccharification. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 90: 573–81.

- Andrić P, Meyer AS, Jensen PA, Dam-Johansen K (2010) Effect and Modeling of Glucose Inhibition and *In Situ* Glucose Removal During Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Wheat Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160: 280–97.
- Ang SK, Shaza EM, Adibah Y, Suraini AA, Madihah MS (2013) Production of Cellulases and Xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 Using Untreated Oil Palm Trunk through Solid State Fermentation. *Process Biochemistry* 48: 1293–1302.
- Anke T, Oberwinkler F, Steglich W, Schramm G (1977) The Strobilurins-New Antifungal Antibiotics from the Basidiomycete *Strobilurus tenacellus*. *The Journal of Antibiotics* 30: 806–10.
- Aranda-Martinez A, Lenfant N, Escudero N, Zavala-Gonzalez EA, Henrissat B, Lopez-Llorca LV (2016) CAZyme Content of *Pochonia chlamydosporia* Reflects That Chitin and Chitosan Modification Are Involved in Nematode Parasitism. *Environmental Microbiology* 18: 4200–4215.
- Armenta S, Moreno-Mendieta S, Sánchez-Cuapio Z, Sánchez S, Rodríguez-Sanoja R (2017) Advances in Molecular Engineering of Carbohydrate-Binding Modules. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 85: 1602–17.
- Aspeborg H, Coutinho PM, Wang Y, Brumer H, Henrissat B (2012) Evolution, Substrate Specificity and Subfamily Classification of Glycoside Hydrolase Family 5 (GH5). *BMC Evolutionary Biology* 12: 186.
- Bagewadi ZK, Mulla SI, Ninnekar HZ (2016) Purification, Characterization, Gene Cloning and Expression of GH-10 Xylanase (*Penicillium citrinum* Isolate HZN13). 3 Biotech 6: 169.
- Bakker R, Elbersen HW, Poppens RP, Lesschen JP (2013) Rice Straw and Wheat Straw -Potential Feedstock for Biobased Economy. In *Netherlands Enterprice Agency*.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic Susceptibility Testing by a Standard Single Disk Method. *American Journal Of Clinical Pathology* 45: 493-496.
- Bauer H, Claeys M, Vermeylen R, Schueller E, Weinke G, Berger A, Puxbaum H (2008) Arabitol and Mannitol as Tracers for the Quantification of Airborne Fungal Spores. *Atmospheric Environment* 42: 588–93.
- Bayer EA, Shimon LJW, Shoham Y, Lamed R (1998) Cellulosomes-Structure and Ultrastructure. *Journal of Structural Biology* 124: 221–34.
- Bayer EA, Belaich JP, Shoham Y, Lamed R (2004) The Cellulosomes: Multienzyme Machines for Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Annual Review of Microbiology* 58: 521–54.
- Becker WF, Von Jagow G, Anke T, Steglich W (1981) Oudemansin, Strobilurin A, Strobilurin B and Myxothiazol: New Inhibitors of the Bc1 Segment of the Respiratory Chain with an E-β-Methoxyacrylate System as Common Structural Element *FEBS Letters* 132: 329–33.

- Beeson WT, Phillips CM, Cate JHD, Marletta MA (2012) Oxidative Cleavage of Cellulose by Fungal Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenases. *Journal of the American Chemical Society* 134: 890–92.
- Beeson WT, Vu VV, Span EA, Phillips CM, Marletta MA (2015) Cellulose Degradation by Polysaccharide Monooxygenases. *Annual Review of Biochemistry* 84: 923–46.
- Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS (2001) Microbial Xylanases and Their Industrial Applications: A Review. Applied Microbiology and Biotechnology 56: 326-38.
- Beggs JD (1978) Transformation of Yeast by a Replicating Hybrid Plasmid. *Nature* 275: 5676.
- Béguin P, Aubert JP (1994) The Biological Degradation of Cellulose. *FEMS Microbiology Reviews* 13: 25–58.
- Belghith H, Ellouz-Chaabouni S, Gargouri A (2001) Biostoning of Denims by *Penicillium occitanis* (Pol6) Cellulases. *Journal of Biotechnology* 89: 257–62.
- Bhat MK (2000) Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology. *Biotechnology* Advances 18: 355–83.
- Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta RK (2007) Bacterial Chitinases: Properties and Potential. *Critical Reviews in Biotechnology* 27: 21–28.
- Biango-Daniels MN, Hodge KT (2018) Sea Salts as a Potential Source of Food Spoilage Fungi. *Food Microbiology* 69: 89–95.
- Biely P (2012) Microbial Carbohydrate Esterases Deacetylating Plant Polysaccharides. *Biotechnology Advances* 30: 1575–88.
- Bioökonomie in Deutschland BMBF (2015) Bioökonomie in Deutschland Chancen für eine biobasierte und nachhaltige Zukunft. www.biooekonomie.de, zugegriffen am 03.09.2018.
- Bischof RH, Ramoni J, Seiboth. B (2016) Cellulases and beyond: The First 70 Years of the Enzyme Producer *Trichoderma reesei*. *Microbial Cell Factories* 15: 106.
- Blackburn TM, Gaston KJ (1996) A Sideways Look at Patterns in Species Richness, or Why There Are So Few Species Outside the Tropics. *Biodiversity Letters* 3: 44.
- Blackwell M (2011) The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species?. *American Journal of Botany* 98: 426–38.
- Bolam DN, Ciruela A, McQueen-Mason S, Simpson P, Williamson MP, Rixon JE, Boraston A, Hazlewood GP, Gilbert HJ (1998) Pseudomonas Cellulose-Binding Domains Mediate Their Effects by Increasing Enzyme Substrate Proximity. *The Biochemical Journal* 331: 775–81.
- Bommarius AS, Riebel BR (2004) Application of Enzymes as Catalysts: Basic Chemicals, Fine Chemicals, Food, Crop Protection, Bulk Pharmaceuticals. *Biocatalysis*, 159–208.
- Bommarius AS, Sohn M, Kang Y, Lee JH, Realff MJ (2014) Protein Engineering of Cellulases. *Current Opinion in Biotechnology* 29: 139–45.

- Boraston AB, McLean BW, Kormos J, Alam M, Gilkes NR, Haynes CA, Tomme P, Kilburn DG, Warren RAJ (1999) Carbohydrate-Binding Modules: Diversity of Structure and Function. In *H. J. G.* The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Boraston A, Bray M, Burn E, Creagh AL, Gilkes N, Guarna M, Jervis E, et al. (1998) The Structure and Function of Cellulose Binding Domains. In Cleayssen M, Nerinkx W, Piens K (Ed.) Carbohydrate from *Trichoderma reesei* and Other Organisms. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Boraston AB, McLean BW, Guarna MM, Amandaron-Akow E, Kilburn DG (2001) A Family 2a Carbohydrate-Binding Module Suitable as an Affinity Tag for Proteins Produced in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 21: 417–23.
- Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ (2004) Carbohydrate-Binding Modules: Fine-Tuning Polysaccharide Recognition. *Biochemical Journal* 382: 769–81.
- Breuil C, Saddler JN (1985) Comparison of the 3,5-Dinitrosalicylic Acid and Nelson-Somogyi Methods of Assaying for Reducing Sugars and Determining Cellulase Activity. *Enzyme and Microbial Technology* 7: 327–32.
- Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC (2012) Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Medical Mycology* 4:165–78.
- Brunecky R, Chung D, Sarai NS, Hengge N, Russell JF, Young J, Mittal A, Pason P, Wall TV, Michener W, Shollenberger T, Westpheling J, Himmel ME, Bomble YJ (2018) High Activity CAZyme Cassette for Improving Biomass Degradation in Thermophiles. *Biotechnology for Biofuels* 11: 22.
- Buckeridge MS (2010) Seed Cell Wall Storage Polysaccharides: Models to Understand Cell Wall Biosynthesis and Degradation. *Plant Physiology* 154: 1017–23.
- Buckeridge MS, de Souza AP (2014) Breaking the 'Glycomic Code' of Cell Wall Polysaccharides May Improve Second-Generation Bioenergy Production from Biomass. *BioEnergy Research* 7: 1065–73.
- Butt MS, Tahir-Nadeem M, Ahmad Z, Sultan MT (2008) Xylanases and Their Applications in Baking Industry. *Food Technology and Biotechnology* 46: 22-31
- Campana-Filho SP, de Britto D, Curti E, Abreu FR, Cardoso MB, Battisti MV, Sim PC, Goy RC, Signini R, Lavall RL (2007) Extraction, Structures and Properties of α- and β-Chitin. *Química Nova* 30: 644–50.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes Database (CAZy): An Expert Resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research* 37: 233–38.
- Carlstrom D (1957) The Crystal Structure of Alpha-Chitin (Poly-N-Acetyl-D-Glucosamine). *The Journal of Cell Biology* 3: 669–83.
- Castresana J (2000) Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17: 540–52.
- Chakraborty S, Gupta R, Jain KK, Hemansi, Gautam S, Kuhad RC (2016) Cellulases: Application in Wine and Brewery Industry. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Cellulases System Properties*

and Application, 193–200.

- Chambergo FS, Valencia EY (2016) Fungal Biodiversity to Biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100: 2567–77.
- Chandra RP, Bura R, Mabee WE, Berlin A, Pan X, Saddler JN (2007) Substrate Pretreatment: The Key to Effective Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosics? In *Biofuels*, 67–93. Springer Berlin, Heidelberg.
- Chérif M (1990) Cytochemical Aspects of Chitin Breakdown During the Parasitic Action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* 80: 1406.
- Cherif S, Mnif S, Hadrich F, Abdelkafi S, Sayadi S (2011) A Newly High Alkaline Lipase: An Ideal Choice for Application in Detergent Formulations. *Lipids in Health and Disease* 10: 221.
- Child JJ, Eveleigh DE, Sieben AS (1973) Determination of Cellulase Activity Using Hydroxyethylellulose as Substrate. *Canadian Journal of Biochemistry* 51: 39–43.
- Cihangir N, Sarikaya E (2004) Investigation of Lipase Production by a New Isolate of *Aspergillus* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20:193–97.
- Çinar I (2005) Effects of Cellulase and Pectinase Concentrations on the Colour Yield of Enzyme Extracted Plant Carotenoids. *Process Biochemistry* 40: 945–49.
- Claassen PAM, van Lier JB, Lopez Contreras AM, van Niel EWJ, Sijtsma L, Stams AJM, de Vries SS, Weusthuis RA (1999) Utilisation of Biomass for the Supply of Energy Carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52:741–55.
- Cohen R, Suzuki MR, Hammel KE (2005) Processive Endoglucanase Active in Crystalline Cellulose Hydrolysis by the Brown Rot Basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 2412–17.
- Collen B, Whitton F, Dyer EE, Baillie JEM, Cumberlidge N, Darwall WRT, Pollock C, Richman NI, Soulsby AM, Böhm M (2014) Global Patterns of Freshwater Species Diversity, Threat and Endemism. *Global Ecology and Biogeography* 23: 40–51.
- Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K (1993) Plant Chitinases. *The Plant Journal* 3: 31–40.
- Conrath U, Domard A, Kauss H (1989) Chitosan-Elicited Synthesis of Callose and of Coumarin Derivatives in Parsley Cell Suspension Cultures. *Plant Cell Reports* 8: 152-55.
- Cools HJ, Fraaije BA (2013) Update on Mechanisms of Azole Resistance in *Mycosphaerella* graminicola and Implications for Future Control. *Pest Management Science* 69: 150-55.
- Cooper RM, Longman D, Campbell A, Henry M, Lees PE (1988) Enzymic Adaptation of Cereal Pathogens to the Monocotyledonous Primary Wall. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32: 33–47.
- Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR (2000) Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris. Molecular Biotechnology* 16: 23–52.

- Crestini C, Kovac B, Giovannozzi-Sermanni G (1996) Production and Isolation of Chitosan by Submerged and Solid-State Fermentation From *Lentinus edodes*. *Biotechnology and Bioengineering* 50: 207–10.
- Cruz J, Hildalgo-Gallego A, Lora JM, Benitez T, Pintor-Toro JA, Llobell A (1992) Isolation and Characterization of Three Chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Biochemistry* 206: 859–67.
- Dam P, Kataeva I, Yang SJ, Zhou F, Yin Y, Chou W, Poole FL, Westpheling J, et al. (2011) Insights into Plant Biomass Conversion from the Genome of the Anaerobic Thermophilic Bacterium *Caldicellulosiruptor bescii* DSM 6725. *Nucleic Acids Research* 39 (8): 3240–54.
- Danso D, Schmeisser C, Chow J, Zimmermann, Wei WR, Leggewie C, Li X, Hazen T, Streit WR (2018) New Insights into the Function and Global Distribution of Polyethylene Terephthalate (PET)-Degrading Bacteria and Enzymes in Marine and Terrestrial Metagenomes. *Applied and Environmental Microbiology* 84: 02773-17.
- Dar RA, Saba I, Shahnawaz M, Sangale MK, Ade AB, Rather AH, Qazi PH (2013) Isolation, Purification and Characterization of Carboxymethyl Cellulase (CMCase) from Endophytic *Fusarium oxysporum* Producing Podophyllotoxin. *Advances in Enzyme Research* 01: 91–96.
- De Alencar Guimaraes NC, Sorgatto M, Peixoto-Nogueira SDC, Almeida Betini JH, Fonseca Zanoelo F, Marques MR, Moraes Polizeli MLT, Giannesi GC (2013) Bioprocess and Biotecnology: Effect of Xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on Pulp Biobleaching and Enzyme Production Using Agroindustrial Residues as Substract. *SpringerPlus* 2: 380.
- De Carvalho LMJ, de Castro IM, Bento da Silva CA (2008) A Study of Retention of Sugars in the Process of Clarification of Pineapple Juice (*Ananas comosus*, L. Merril) by Micro- and Ultra-Filtration. *Journal of Food Engineering* 87: 447–54.
- Demirbaş A (2002) Pyrolysis and Steam Gasification Processes of Black Liquor. *Energy Conversion and Management* 43: 877–84.
- Dhanasekaran D, Thajuddin N, Panneerselvam A (2012) Applications of Actinobacterial Fungicides in Agriculture and Medicine. In *Fungicides for Plant and Animal Diseases*. InTech. Kapitel 2
- Dhiman TR, Zaman MS, Gimenez RR, Walters JL, Treacher R (2002) Performance of Dairy Cows Fed Forage Treated with Fibrolytic Enzymes Prior to Feeding. *Animal Feed Science and Technology* 101: 115–25.
- Dimarogona M, Topakas E, Christakopoulos P, Chrysina ED (2012) The Structure of a GH10 Xylanase from *Fusarium oxysporum* Reveals the Presence of an Extended Loop on Top of the Catalytic Cleft. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 68: 735–42.
- Doolittle WF (1999) Lateral Genomics. Trends in Cell Biology 9: 5-8.
- Dotsenko AS, Gusakov AV, Rozhkova AM, Sinitsyna OA, Nemashkalov VA, Sinitsyn AP (2016) Effect of N-Linked Glycosylation on the Activity and Other Properties of

Recombinant Endoglucanase IIa (Cel5A) from *Penicillium verruculosum*. *Protein Engineering Design and Selection* 29: 495–502.

- Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Komon M, Bissett J, Szakacs G, Kubicek CP (2005) An Oligonucleotide Barcode for Species Identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology* 42: 813–28.
- Druzhinina IS, Shelest E, Kubicek CP (2012) Novel Traits of *Trichoderma* Predicted through the Analysis of Its Secretome. *FEMS Microbiology Letters* 337: 1–9.
- Duo-Chuan L (2006) Review of Fungal Chitinases. Mycopathologia 161: 345-60.
- Dutta SD, Tarafder M, Islam R, Datta B (2018) Characterization of Cellulolytic Enzymes of Fusarium Soil Isolates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 14: 279–85.
- Ebringerová A, Heinze T (2000) Xylan and Xylan Derivatives Biopolymers with Valuable Properties, 1. Naturally Occurring Xylans Structures, Isolation Procedures and Properties. *Macromolecular Rapid Communications* 21:542–56.
- Elbert W, Taylor PE, Andreae MO, Pöschl U (2007) Contribution of Fungi to Primary Biogenic Aerosols in the Atmosphere: Wet and Dry Discharged Spores, Carbohydrates, and Inorganic Ions. *Atmospheric Chemistry and Physics* 7: 4569–88.
- Enoki T, Tominaga T, Takashima F, Ohnogi H, Sagawa H, Kato I (2012) Anti-Tumor-Promoting Activities of Agaro-Oligosaccharides on Two-Stage Mouse Skin Carcinogenesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 35: 1145–49.
- Ferguson BA, Dreisbach TA, Parks CG, Filip GM, Schmitt CL (2003) Coarse-Scale Population Structure of Pathogenic Armillaria Species in a Mixed-Conifer Forest in the Blue Mountains of Northeast Oregon. *Canadian Journal of Forest Research* 33: 612-623
- Ferrari AR, Gaber Y, Fraaije MW (2014) A Fast, Sensitive and Easy Colorimetric Assay for Chitinase and Cellulase Activity Detection. *Biotechnology for Biofuels* 7: 37.
- Finkelstein DB, Rambosek J, Crawford MS, Soliday CL, McAda PC, Leach J (1989) Protein Secretion in A. niger. In Hershberger CL, Queener SW, Hegeman G (Ed.), Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 295–300.
- Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer ELL, Tate J, Punta M (2014) Pfam: The Protein Families Database. *Nucleic Acids Research* 42: D222–30.
- Fitzpatrick DA (2012) Horizontal Gene Transfer in Fungi. *FEMS Microbiology Letters* 329: 1–8.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2007) GIEWS-Global Information and Early Warning System.
- Forsberg Z, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Bunaes AC, Stenstrøm Y, MacKenzie A, Sørlie M, Horn SJ, Eijsink VGH (2011) Cleavage of Cellulose by a CBM33 Protein. *Protein Science* 20: 1479–83.
- Fröhlich-Nowoisky J, Pickersgill DA, Després VR, Pöschl U (2009) High Diversity of Fungi in Air Particulate Matter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America 106: 12814–19.

- Fu XT, Kim SM (2010) Agarase: Review of Major Sources, Categories, Purification Method, Enzyme Characteristics and Applications. *Marine Drugs* 8: 200–218.
- Fuglsang CC, Berka RM, Wahleithner JA, Kauppinen S, Shuster JR, Rasmussen G, Halkier T, Dalboge H, Henrissat B (2000) Biochemical Analysis of Recombinant Fungal Mutanases. A New Family of Alpha-1,3-Glucanases with Novel Carbohydrate-Binding Domains. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 2009–18.
- Funaguma T, Naito S, Morita M, Okumura M, Sugiura M, Hara A (1991) Purification and Some Properties of Xylanase from *Penicillium herquei* Banier and Sartory. *Agricultural and Biological Chemistry* 55: 1163–65.
- Gal L, Gaudin C, Belaich A, Pages S, Tardif C, Belaich JP (1997) CelG from *Clostridium cellulolyticum*: A Multidomain Endoglucanase Acting Efficiently on Crystalline Cellulose. *Journal of Bacteriology* 179: 6595–6601.
- Gamage J, Lam H, Zhang Z (2010) Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass, A Review. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 4: 3–11.
- Garcia-Vallvé S, Romeu A, Palau J (2000) Horizontal Gene Transfer of Glycosyl Hydrolases of the Rumen Fungi. *Molecular Biology and Evolution* 17: 352–61.
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS Primers with Enhanced Specificity for Basidiomycetes-Application to the Identification of Mycorrhizae and Rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-18.
- Garron ML, Cygler M (2010) Structural and Mechanistic Classification of Uronic Acid-Containing Polysaccharide Lyases. *Glycobiology* 20: 1547–73.
- Gaston KJ (2000) Global Patterns in Biodiversity. Nature 405: 220-27.
- Gaylord Chemical Company (2014) Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Solubility Data. *Gaylord Chemical Company*, L.L.C., Bulletin 102. www.gaylordchemical.com, zugegriffen am 06.07.2018.
- Gebler J, Gilkes NR, Claeyssens M, Wilson DB, Béguin P, Wakarchuk WW, Kilburn DG, Miller RC, Warren RA, Withers SG (1992) Stereoselective Hydrolysis Catalyzed by Related Beta-1,4-Glucanases and Beta-1,4-Xylanases. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 12559–61.
- Geiser DM, Samson RA, Varga J, Rokas A, Witiak SM (2008) *Aspergillus* in the Genomic Era. In Varga J und Samson RA (Ed.) Wageningen Academic Publishers. The Netherlands, 334 Seiten.
- Generaldirektion Gesundheit und Lebensmittelsicherheit der Europäischen Kommission (2016) EU Pesticides Database European Commission. Stand. 2016. Zugegriffen am 06.07.2018.
- Georgelis N, Tabuchi A, Nikolaidis N, Cosgrove DJ (2011) Structure-Function Analysis of the Bacterial Expansin EXLX1. *The Journal of Biological Chemistry* 286: 16814–23.
- Ghosh M, Das A, Mishra AK, Nanda G (1993) *Aspergillus sydowii* MG 49 Is a Strong Producer of Thermostable Xylanolytic Enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* 15: 703-9.

- Ghosh M, Nanda G (1994) Purification and Some Properties of a Xylanase from *Aspergillus* sydowii MG49. Applied and Environmental Microbiology 60: 4620–23.
- Ghoshal G, Banerjee UC, Chisti Y, Shivhare US (2012) Optimization of Xylanase Production from *Penicillium citrinum* in Solid-State Fermentation. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 26: 61-69.
- Ghoshal G, Banerjee UC, Shilvhare US (2014) Xylanase Production by *Penicillium citrinum* in Laboratory-Scale Stirred Tank Reactor. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly Journal* 28: 399-408.
- Gilbert HJ, Knox JP, Boraston AB (2013) Advances in Understanding the Molecular Basis of Plant Cell Wall Polysaccharide Recognition by Carbohydrate-Binding Modules. *Current Opinion in Structural Biology* 23: 669-77.
- Gírio FM, Fonseca C, Carvalheiro F, Duarte LC, Marques S, Bogel-Łukasik R (2010) Hemicelluloses for Fuel Ethanol: A Review. *Bioresource Technology* 101: 4775–4800.
- Goh TK, Hyde KD (1996) Biodiversity of Freshwater Fungi. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 17: 328–45.
- Goker M, Cleland D, Saunders E, Lapidus A, Nolan M, Lucas S, Hammon N, Deshpande S, et al. (2011) Complete Genome Sequence of *Isosphaera pallida* Type Strain (IS1B(T)). *Standards in Genomic Sciences* 4: 63–71.
- Goldblatt D (1998) Recent Developments in Bacterial Conjugate Vaccines. *Journal of Medical Microbiology* 47: 563–67.
- Gomez-Polo P, Ballinger MJ, Lalzar M, Malik A, Ben-Dov Y, Mozes-Daube N, Perlman SJ, Iasur-Kruh L, Chiel E (2017) An Exceptional Family: *Ophiocordyceps* - Allied Fungus Dominates the Microbiome of Soft Scale Insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccidae). *Molecular Ecology* 26: 5855–68.
- Gonçalves GAL, Takasugi Y, Jia L, Mori Y, Noda S, Tanaka T, Ichinose H, Kamiya N (2015) Synergistic Effect and Application of Xylanases as Accessory Enzymes to Enhance the Hydrolysis of Pretreated Bagasse. *Enzyme and Microbial Technology* 72: 16–24.
- Gopinath SCB, Hilda A, Lakshmi priya T, Annadurai G (2002) Purification of Lipase from *Cunninghamella verticillata* and Optimization of Enzyme Activity Using Response Surface Methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 449–58.
- Goswami RS, Kistler HC (2004) Heading for Disaster: *Fusarium graminearum* on Cereal Crops. *Molecular Plant Pathology* 5: 515–25.
- Gratia A (1936) The Numerical Relation between Lysogenic Bacteria and the Phage Particles Which They Carry. *Annales de l'Insitut Pasteur* 57: 652–76.
- Grisshammer R, Tucker J (1997) Quantitative Evaluation of Neurotensin Receptor Purification by Immobilized Metal Affinity Chromatography. *Protein Expression and Purification* 11: 53–60.
- Gröndahl M, Teleman A, Gatenholm P (2003) Effect of Acetylation on the Material Properties of Glucuronoxylan from Aspen Wood. *Carbohydrate Polymers* 52: 359–66.

- Grove JF, MacMillan J, Mulholland TPC, Rogers MAT (1952) Griseofulvin. Part I. Journal of the Chemical Society 1952: 3949-3958
- Gunnoo M, Cazade PA, Galera-Prat A, Nash MA, Czjzek M, Cieplak M, Alvarez B, Aguilar M, Karpol A, Gaub H, Carrión-Vázques, M, Bayer EA, Thompson D (2016) Nanoscale Engineering of Designer Cellulosomes. *Advanced Materials* 28: 5619–47.
- Gupta R, Jung E, Brunak S (2004) Prediction of N-Glycosylation Sites in Human Proteins. *In Preparation*. http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/ zugegriffen 13.05.18
- Gupta VK, Kubicek CP, Berrin JG, Wilson DW, Couturier M, Berlin A, Filho EXF, Ezeji T (2016) Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. *Trends in Biochemical Sciences* 41: 633–45.
- Gusakov AV (2011) Alternatives to *Trichoderma reesei* in Biofuel Production. *Trends in Biotechnology* 29: 419–25.
- Hahnke RL, Stackebrandt E, Meier-Kolthoff JP, Tindall BJ, Huang S, Rohde M, Lapidus A, et al. (2015) High Quality Draft Genome Sequence of *Flavobacterium rivuli* Type Strain WB 3.3-2T (DSM 21788T), a Valuable Source of Polysaccharide Decomposing Enzymes. *Standards in Genomic Sciences* 10: 46.
- Hajji S, Younes I, Ghorbel-Bellaaj O, Hajji R, Rinaudo M, Nasri M, Jellouli K (2014) Structural Differences between Chitin and Chitosan Extracted from Three Different Marine Sources. *International Journal of Biological Macromolecules* 65: 298–306.
- Hakomori S (2001) Tumor-Associated Carbohydrate Antigens Defining Tumor Malignancy: Basis for Development of Anti-Cancer Vaccines. Advances in Experimental Medicine and Biology 491: 369–402.
- Hanahan D (1983) Studies on Transformation of Escherichia Coli with Plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166: 557–80.
- Hankin L, Anagnostakis SL (1975) The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. *Mycologia* 67: 597.
- Hanson HC (1963) Diseases and Pests of Economic Plants of Vietnam, Laos and Cambodia. In *Diseases and Pests of Economic Plants of Vietnam, Laos and Cambodia*, no. 29B. American Institute of Crop Ecology, Washington.
- Haran S, Schickler H, Warburg O (1996) Molecular Mechanisms of Lytic Enzymes Involved in the Biocontrol Activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 1135: 562321–31.
- Harley JL, Smith SE (1983) Mycorrhizal Symbiosis. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press Inc.
- Harris PV, Welner D, McFarland KC, Re E, Navarro Poulsen JC, Brown K, Salbo R, Ding H, et al. (2010) Stimulation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis by Proteins of Glycoside Hydrolase Family 61: Structure and Function of a Large, Enigmatic Family. *Biochemistry* 49: 3305–16.
- Harvey PJ, Schoemaker HE, Palmer JM (1987) Lignin Degradation by White Rot Fungi. *Plant, Cell and Environment* 10: 709–14.
- Hasan F, Shah AA, Hameed A (2006) Industrial Applications of Microbial Lipases. *Enzyme* and Microbial Technology 39: 235–51.

- Hawksworth DL (1991) The Fungal Dimension of Biodiversity: Magnitude, Significance, and Conservation. *Mycological Research* 95: 641–55.
- Hemsworth GR, Henrissat B, Davies GJ, Walton PH (2014) Discovery and Characterization of a New Family of Lytic Polysaccharide Monooxygenases. *Nature Chemical Biology* 10: 122–26.
- Hendriks ATWM, Zeeman G (2009) Pretreatments to Enhance the Digestibility of Lignocellulosic Biomass. *Bioresource Technology* 100: 10–18.
- Henrissat B (1991) A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino Acid Sequence Similarities. *The Biochemical Journal* 280: 309–16.
- Henrissat B (1994) Cellulases and Their Interaction with Cellulose. Cellulose 1: 169-96.
- Henrissat B, Callebaut I, Fabrega S, Lehn P, Mornon JP, Davies G (1995) Conserved Catalytic Machinery and the Prediction of a Common Fold for Several Families of Glycosyl Hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 7090–94.
- Henrissat B, Bairoch A (1996) Updating the Sequence-Based Classification of Glycosyl Hydrolases. *The Biochemical Journal* 316: 695–96.
- Heredia A, Jiménez A, Guillén R (1995) Composition of Plant Cell Walls. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und- Forschung 200: 24–31.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, et al. (2007) A Higher-Level Phylogenetic Classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509–47.
- Hilpmann G, Becher N, Pahner FA, Kusema B, Mäki-Arvela P, Lange R, Murzin DY, Salmi T (2016) Acid Hydrolysis of Xylan. *Catalysis Today* 259: 376–80.
- Hölker U, Höfer M, Lenz J (2004) Biotechnological Advantages of Laboratory-Scale Solid-State Fermentation with Fungi. Applied Microbiology and Biotechnology 64: 175–86.
- Holtzapple MT (2003) Cellulose. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, 998–1007.
- Horizont 2020 im Blick BMBF (2014) Horizont 2020 im Blick: Informationen zum neuen EU-Rahmenprogramm für Forschung und Innovation. *Bundesministerium für Forschung und Bildung (BMBF)*.
- Horn S, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Eijsink VGH (2012) Novel Enzymes for the Degradation of Cellulose. *Biotechnology for Biofuels* 5: 45.
- Houde A, Kademi A, Leblanc D (2004) Lipases and their Industrial Applications: An Overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 118: 155–70.
- Hu J, Arantes V, Pribowo A, Gourlay K, Saddler JN (2014) Substrate Factors That Influence the Synergistic Interaction of AA9 and Cellulases during the Enzymatic Hydrolysis of Biomass. *Energy & Environmental Science* 7: 2308–15.
- Hwang HT, Qi F, Yuan C, Zhao X, Ramkrishna D, Liu D, Varma A (2014) Lipase-Catalyzed Process for Biodiesel Production: Protein Engineering and Lipase Production. *Biotechnology and Bioengineering* 111: 639–53.
- Hyde KD, Gareth Jones EB, Leaño E, Pointing SB, Poonyth AD, Vrijmoed LLP (1998) Role of Fungi in Marine Ecosystems. *Biodiversity & Conservation* 7: 1147–61.
- Igarashi K, Koivula A, Wada M, Kimura S, Penttilä M, Samejima M (2009) High Speed Atomic Force Microscopy Visualizes Processive Movement of *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolase I on Crystalline Cellulose. *Journal of Biological Chemistry* 284: 36186–90.
- Illumina, Inc. (2010) Introducing HiSeq[™] 2000. Redefining the trajectory of sequencing. Verfügbar unter: https://www.illumina.com/documents/products/brochures/brochure_hiseq2000.pdf, Zugegriffen am 10.11.2015.
- Ishii H, Fraaije BA, Sugiyama T, Noguchi K, Nishimura K, Takeda T, Amano, Hollomon DW (2001) Occurrence and Molecular Characterization of Strobilurin Resistance in Cucumber Powdery Mildew and Downy Mildew. *Phytopathology* 91: 1166–71.
- Israilides CJ, Grant, GA, Han YW (1978) Sugar Level, Fermentability, and Acceptability of Straw Treated with Different Acids. *Applied and Environmental Microbiology* 36: 43-46.
- Ja'afaru MI (2013) Screening of Fungi Isolated from Environmental Samples for Xylanase and Cellulase Production. *ISRN Microbiology* 2013
- Jaklitsch WM, Voglmayr H (2015) Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in Mycology* 80: 1–87.
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, et al. (2006) Reconstructing the Early Evolution of Fungi Using a Six-Gene Phylogeny. *Nature* 443: 818–22.
- Joo HS, Kumar CG, Park GC, Paik SR, Chang CS (2003) Oxidant and SDS-Stable Alkaline Protease from *Bacillus clausii* I-52: Production and Some Properties. *Journal of Applied Microbiology* 95: 267–72.
- Joseph-Horne T, Hollomon DW (2006) Molecular Mechanisms of Azole Resistance in Fungi. *FEMS Microbiology Letters* 149: 141–49.
- Juhász T, Szengyel Z, Réczey K, Siika-Aho M, Viikari L (2005) Characterization of Cellulases and Hemicellulases Produced by *Trichoderma reesei* on Various Carbon Sources. *Process Biochemistry* 40: 3519–25.
- Jung WJ, Kuk JH, Kim KY, Jung KC, Park RD (2006) Purification and Characterization of Exo-Beta-D-Glucosaminidase from *Aspergillus fumigatus* S-26. *Protein Expression and Purification* 45: 125–31.
- Kang SW, Park YS, Lee JS, Hong SI, Kim SW (2004) Production of Cellulases and Hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from Lignocellulosic Biomass. *Bioresource Technology* 91: 153–56.
- Kang OL, Ghani M, Hassan O, Rahmati S, Ramli N (2014) Novel Agaro-Oligosaccharide Production through Enzymatic Hydrolysis: Physicochemical Properties and Antioxidant Activities. *Food Hydrocolloids* 42: 304–8.
- Karthik N, Akanksha K, Pandey A (2014) Production, Purification and Properties of Fungal Chitinases-a Review. *Indian Journal of Experimental Biology* 52: 1025–35.

- Kaushik P, Mishra A, Malik A (2014) Dual Application of Agricultural Residues for Xylanase Production and Dye Removal through Solid State Fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 96: 1–8.
- Kelly SA, Pohle S, Wharry S, Mix S, Allen CCR, Moody TS, Gilmore BF (2018) Application of ω -Transaminases in the Pharmaceutical Industry. *Chemical Reviews* 118: 349–67.
- Khersonsky O, Roodveldt C, Tawfik DS (2006) Enzyme Promiscuity Evolutionary and Mechanistic Aspects. *Current Opinion in Chemical Biology* 10: 498-508.
- Kim KH, Tucker MP, Nguyen QA (2002) Effects of Pressing Lignocellulosic Biomass on Sugar Yield in Two-Stage Dilute-Acid Hydrolysis Process. *Biotechnology Progress* 18:-489–94.
- Kim YS, Dixon EW, Vincelli P, Farman ML (2003) Field Resistance to Strobilurin (Q0I) Fungicides in *Pyricularia grisea* Caused by Mutations in the Mitochondrial Cytochrome b Gen. *Phytopathology* 93:891–900.
- Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC (2002) Industrial Enzyme Applications. Current Opinion in Biotechnology 13: 345–51.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008) *Dictionary of the Fungi*. CSIRO Publishing, Australia.
- Knežević A, Milovanović I, Stajić M, Lončar N, Brčeski I, Vukojević J, Ćilerdžić J (2013) Lignin Degradation by Selected Fungal Species. *Bioresource Technology* 138: 117–23.
- Köhle H, Jeblick W, Poten F, Blaschek W, Kauss H (1985) Chitosan-Elicited Callose Synthesis in Soybean Cells as a CA²⁺-Dependent Process. *Plant Physiology* 77: 544-51.
- Konno N, Ishida T, Igarashi K, Fushinobu S, Habu N, Samejima M, Isogai A (2009) Crystal Structure of Polysaccharide Lyase Family 20 Endo-β-1,4-Glucuronan Lyase from the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*. *FEBS Letters* 583: 1323–26.
- Kooiman P (1961) The Constitution of Tamarindus-Amyloid. *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas* 80: 849–65.
- Koshland DE (1953) Stereochemistry and the Mechanism of Enzymatic Reactions. *Biological Reviews* 28: 416–36.
- Kramer KJ, Muthukrishnan S (1997) Insect Chitinases: Molecular Biology and Potential Use as Biopesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27: 887–900.
- Kredics L, Hatvani L, Naeimi S, Körmöczi P, Manczinger L, Vágvölgyi C, Druzhinina I (2014) Biodiversity of the Genus *Hypocrea/Trichoderma* in Different Habitats. In *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, Kapitel 1: 3–24. Elsevier.
- Krengel U, Dijkstra BW (1996) Three-Dimensional Structure of Endo-1,4-β-Xylanase I From Aspergillus niger: Molecular Basis for Its Low PH Optimum. Journal of Molecular Biology 263: 70–78.
- Kubicek CP, Penttilä ME (1998) Regulation of Production of Plant Polysaccharide Degrading Enzymes by *Trichoderma*. In Harman GE, Kubicek CP (Ed.) *Trichoderma* and Gliocladium, Enzymes, Biological Control and Commercial Applications, 49–67. Taylor & Francis Ltd., Bristol

- Kubicek CP, Kubicek EM (2016) Enzymatic Deconstruction of Plant Biomass by Fungal Enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology* 35: 51–57.
- Kuhad RC, Gupta R, Singh A (2011) Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research* 2011
- Kuk JH, Jung WJ, Jo GH, Ahn JS, Kim KY, Park RD (2005) Selective Preparation of N-Acetyl-D-Glucosamine and N,N-Diacetylchitobiose from Chitin Using a Crude Enzyme Preparation from *Aeromonas* sp. *Biotechnology Letters* 27: 7–11.
- Kulkarni N, Shendye A, Rao M (1999) Molecular and Biotechnological Aspects of Xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 23: 411–56.
- Kumamoto CA (2011) Inflammation and Gastrointestinal *Candida* Colonization. *Current Opinion in Microbiology* 14: 386–91.
- Kumar R, Wyman CE (2009) Effects of Cellulase and Xylanase Enzymes on the Deconstruction of Solids from Pretreatment of Poplar by Leading Technologies. *Biotechnology Progress* 25: 302–14.
- Kumar AK, Sharma S (2017) Recent Updates on Different Methods of Pretreatment of Lignocellulosic Feedstocks: A Review. *Bioresources and Bioprocessing* 4:7.
- Kumirska J, Czerwicka M, Kaczyński Z, Bychowska A, Brzozowski K, Thöming J, Stepnowski P (2010) Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan. *Marine Drugs* 8: 1567–1636.
- Kwon HW, Yoon JH, Kim SH, Hong SB, Cheon Y, Ko SJ (2007) Detection of Extracellular Enzymes Activities in Various *Fusarium* spp. *Mycobiology* 35: 162–65.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–85.
- Lairson LL, Henrissat B, Davies GJ, Withers SG (2008) Glycosyltransferases: Structure, Functions, and Mechanisms, *Annual Review of Biochmistry* 77: 521-555
- Lamed R, Bayer EA (1988) The Cellulosome of Clostridium Thermocellum. *Advances in Applied Microbiology* 33: 1–46.
- Langston JA, Shaghasi T, Abbate E, Xu F, Vlasenko E, Sweeney MD (2011) Oxidoreductive Cellulose Depolymerization by the Enzymes Cellobiose Dehydrogenase and Glycoside Hydrolase 61. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 7007–15.
- Latha P (2013) Cell Wall Degrading Enzymes of *Lasiodiplodia theobromae* Causing Collar and Root Rot in Physic Nut (*Jatropha curcas* L.). *Advances in Plant Sciences* 26: 377-80.
- Le MT, Arie T, Teraoka T (2010) Population Dynamics and Pathogenic Races of Rice Blast Fungus, Magnaporthe Oryzae in the Mekong Delta in Vietnam. *Journal of General Plant Pathology* 76: 177–82.
- Lee J (1997) Biological Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol. *Journal of Biotechnology* 56: 1–24.
- Lee C, Grasso C, Sharlow MF (2002) Multiple Sequence Alignment Using Partial Order Graphs. *Bioinformatics* 18: 452–64.

- Lehtio J, Sugiyama J, Gustavsson M, Fransson L, Linder M, Teeri TT (2003) The Binding Specificity and Affinity Determinants of Family 1 and Family 3 Cellulose Binding Modules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 484–89.
- Lesemann SS, Schimpke S, Dunemann F, Deising HB (2006) Mitochondrial Heteroplasmy for the Cytochrome b Gene Controls the Level of Strobilurin Resistance in the Apple Powdery Mildew Fungus *Podosphaera leucotricha* (Ell. & Ev.) E.S. Salmon. *Journal* of Plant Diseases and Protection 113: 259–66.
- Levasseur A, Drula E, Lombard V, Coutinho PM, Henrissat B (2013) Expansion of the Enzymatic Repertoire of the CAZy Database to Integrate Auxiliary Redox Enzymes. *Biotechnology for Biofuels* 6: 1.
- Levy I, Shoseyov O (2002) Cellulose-Binding Domains: Biotechnological Applications. *Biotechnology Advances* 20: 191–213.
- Li Y, Zhao Z, Bai F (2007) High-Density Cultivation of Oleaginous Yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 in Fed-Batch Culture. *Enzyme and Microbial Technology* 41: 312–17.
- Li C, Wen A, Shen B, Lu J, Huang Y, Chang Y (2011) FastCloning: A Highly Simplified, Purification-Free, Sequence- and Ligation-Independent PCR Cloning Method. *BMC Biotechnology* 11: 92.
- Li B, Walton JD (2017) Functional Diversity for Biomass Deconstruction in Family 5 Subfamily 5 (GH5_5) of Fungal Endo-β-1,4-Glucanases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101: 4093–4101.
- Li Q, Wu T, Qi Z, Zhao L, Pei J, Tang F (2018) Characterization of a novel thermostable and xylose-tolerant GH 39 β-xylosidase from *Dictyoglomus thermophilum*. *BMC Biotechnology* 18: 29.
- Liao H, Zheng H, Li S, Wei Z, Mei X, Ma H, Shen Q, Xu Y (2015) Functional Diversity and Properties of Multiple Xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. *Scientific Reports* 5:12631.
- Liese A, Seelbach K, Wandrey C (2001) *Industrial Biotransformations Molecules* 6. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Deutschland
- Liu W, Shi P, Chen Q, Yang P, Wang G, Wang Y, Luo H, Yao B (2010) Gene Cloning, Overexpression, and Characterization of a Xylanase from *Penicillium* sp. CGMCC 1669. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162: 1–12.
- Lombard V, Bernard T, Rancurel C, Brumer H, Coutinho PM, Henrissat B (2010) A Hierarchical Classification of Polysaccharide Lyases for Glycogenomics. *Biochemical Journal* 432: 437–44.
- Lombard V, Ramulu HG, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B (2014) The Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research* 42: D490–95.
- Lombard L, van der Merwe NA, Groenewald JZ, Crous PW (2015) Generic Concepts in Nectriaceae. *Studies in Mycology* 80: 189–245.
- Lorito M (1993) Chitinolytic Enzymes Produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal Activity of Purified Endochitinase and Chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302.

- Lu F, Lu M, Lu Z, Bie X, Zhao H, Wang Y (2008) Purification and Characterization of Xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresource Technology* 99:5938–41.
- Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 506–77.
- Lynd LR, van Zyl WH, McBride JE, Laser M (2005) Consolidated Bioprocessing of Cellulosic Biomass: An Update. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 577-83.
- MacLeod AM, Lindhorst T, Withers SG, Warren RA (1994) The Acid/Base Catalyst in the Exoglucanase/Xylanase from *Cellulomonas fimi* Is Glutamic Acid 127: Evidence from Detailed Kinetic Studies of Mutants. *Biochemistry* 33: 6371–76.
- Mai C, Kües U, Militz H (2004) Biotechnology in the Wood Industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 477–94.
- Mandels M, Reese ET (1960) Induction of Cellulase in Fungi by Cellobiose. *Journal of Bacteriology* 79: 816-826.
- Mandels M, Weber J (1969) The Production of Cellulases. Cellulases and their Applications. *Advances in Chemistry* 95: 391–414.
- Manigandan V, Karthik R, Ramachandran S, Rajagopal S (2018) Chitosan Applications in Food Industry. *Biopolymers for Food Design* 469–91.
- Marcet-Houben M, Gabaldón T (2010) Acquisition of Prokaryotic Genes by Fungal Genomes. *Trends in Genetics* 26: 5–8.
- Marston FA (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 240: 1–12.
- Martens EC, Koropatkin NM, Smith TJ, Gordon JI (2009) Complex Glycan Catabolism by the Human Gut Microbiota: The Bacteroidetes Sus-like Paradigm. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 24673-7
- Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, Chapman J, et al. (2008) Genome Sequencing and Analysis of the Biomass-Degrading Fungus *Trichoderma reesei* (Syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology* 26: 553–60.
- Mase T, Matsumiya Y, Akiba T (1995) Purification and Characterization of a New Lipase from *Fusarium* sp. YM-30. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59: 1771-72.
- Matkar K, Chapla D, Divecha J, Nighojkar A, Madamwar D (2013) Production of Cellulase by a Newly Isolated Strain of *Aspergillus sydowii* and Its Optimization under Submerged Fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 78: 24-33.
- Mayer FL, Wilson D, Hube B (2013) *Candida albicans* Pathogenicity Mechanisms. *Virulence* 4: 119–28.
- Mayordomo I, Randez-Gil F, Prieto JA (1999) Isolation, Purification, and Characterization of a Cold-Active Lipase from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 105-9
- McClendon SD, Mao Z, Shin HD, Wagschal K, Chen RR (2012) Designer Xylanosomes: Protein Nanostructures for Enhanced Xylan Hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167: 395–411.

- Mcmullen M, Jones R, Gallenberg D (1997) Scab of Wheat and Barley, A Re-Emerging Disease of Devastating Impact. *Plant Disease* 81: 1340-1348
- Miettinen-Oinonen A (2007) Cellulases in the Textile Industry. In Polaina J, MacCabe AP (Ed.) *Industrial Enzymes*. Springer, Dordrecht, Kapitel 4: 51–63.
- Miao S, Ziser L, Aebersold R, Withers SG (1994) Identification of Glutamic Acid 78 as the Active Site Nucleophile in *Bacillus subtilis* Xylanase using Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Biochemistry* 33: 7027–32
- Ministry of Natural Resources and Environment (2011) Vietnam National Biodiversity Strategy to 2020, Vision to 2030.
- Mirzaakhmedov SY, Ziyavitdinov ZF, Akhmedova ZR, Saliev AB, Ruzmetova DT, Ashurov KB, Fessas D, Iametti S (2007) Isolation, Purification, and Enzymatic Activity of Cellulase Components of the Fungus *Aspergillus terreus*. *Chemistry of Natural Compounds* 43: 594–97.
- Moore D, Robson GD, Trinci APJ (2011) 21th Century Guidebook to Fungi. Cambridge University Press. Cambridge, UK
- Moretti AN (2009) Taxonomy of *Fusarium* Genus, a Continuouse Fight between Lumpers and Splitters. *Proceedings of the National Academy of Science* 117: 7–13.
- Morgenstern I, Powlowski J, Tsang A (2014) Fungal Cellulose Degradation by Oxidative Enzymes: From Dysfunctional GH61 Family to Powerful Lytic Polysaccharide Monooxygenase Family. *Briefings in Functional Genomics* 13: 471–81.
- Mostert D, Molina AB, Daniells J, Fourie G, Hermanto C, Chao CP, Fabregar E, Sinohin VG, Masdek N, Thangavelu R, Li C, Yi G, Mostert L, Viljoen A (2017) The Distribution and Host Range of the Banana Fusarium Wilt Fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, in Asia. *PLoS ONE* 12: e0181630.
- Moukhametzianov R, Burghammer M, Edwards PC, Petitdemange S, Popov D, Fransen M, McMullan G, Schertler GFX, Riekel C (2008) Protein crystallography with a micrometre-sized synchrotron-radiation beam. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography 64: 158–66.
- Mueller GM, Bills GF (2004) Biodiversity of Fungi. In Foster M, Bills G (Ed.) *Biodiversity* of Fungi, Kapitel 1, 1–4. Burlington: Academic Press.
- Munir RI, Schellenberg J, Henrissat B, Verbeke TJ, Sparling R, Levin DB (2014) Comparative Analysis of Carbohydrate Active Enzymes in *Clostridium termitidis* CT1112 Reveals Complex Carbohydrate Degradation Ability. *PLoS ONE* 9: e104260.
- Murashima K, Kosugi A, Doi RH (2003) Synergistic Effects of Cellulosomal Xylanase and Cellulases from *Clostridium cellulovorans* on Plant Cell Wall Degradation. *Journal of Bacteriology* 185: 1518–24.
- Murphy C, Powlowski J, Wu M, Butler G, Tsang A (2011) Curation of Characterized Glycoside Hydrolases of Fungal Origin. *Database* 2011
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid Isolation of High Molecular-Weight Plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321–25.
- Muzzarelli RAA (1977) Chitin. Pergamon Press, Oxford, UK.

- Nagar S, Mittal A, Gupta VK (2012) Enzymatic Clarification of Fruit Juices (Apple, Pineapple, and Tomato) Using Purified *Bacillus pumilus* SV-85S Xylanase. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 17:1165–75.
- Naidu DS, Hlangothi SP, John MJ (2018) Bio-Based Products from Xylan: A Review. *Carbohydrate Polymers* 179: 28–41.
- Nair SG, Sindhu R, Shashidhar S (2008) Purification and biochemical characterization of two xylanases from Aspergillus sydowii SBS 45. Applied Biochemistry and Biotechnology 149: 229–43.
- Nalim FA, Samuels GJ, Wijesundera, RL and Geiser DM (2011) New species from the *Fusarium solani* species complex serived from perithecia and soil in the old world tropics. *Mycologia* 103: 1302–30.
- Nationale Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030 BMBF (2010) Nationale Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030 - Unser Weg zu einer bio-basierten Wirtschaft. *Bundesministerium für Forschung und Bildung (BMBF)*.
- Nevalainen H, Suominen P, Taimisto K (1994) On the safety of *Trichoderma reesei*. Journal of Biotechnology 37: 193-200.
- Nguyen QA, Tucker MP, Keller FA, Eddy FP (2000) Two-stage dilute-acid pretreatment of softwoods. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84–86: 561–76.
- Niño-Medina G, Carvajal-Millán E, Rascon-Chu A, Marquez-Escalante JA, Guerrero V, Salas-Muñoz E (2010) Feruloylated arabinoxylans and arabinoxylan gels: structure, sources and applications. *Phytochemistry Reviews* 9: 111–20.
- Nobili A, Gall MG, Pavlidis IV, Thompson ML, Schmidt M, Bornscheuer UT (2013) Use of 'small but smart' libraries to enhance the enantioselectivity of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* towards tetrahydrofuran-3-Yl acetate. *The FEBS Journal* 280: 3084–93.
- Nordberg H, Cantor M, Dusheyko S, Hua S, Poliakov A, Shabalov I, Smirnova T, Grigoriev IV, Dubchak I (2014) The genome portal of the department of Energy Joint Genome Institute: 2014 Updates. *Nucleic Acids Research* 42: D26–31.
- Nordon RE, Craig SJ, Foong FC (2009) Molecular engineering of the eellulosome eomplex for affinity and bioenergy applications. *Biotechnology Letters* 31: 465–76.
- Nsor-Atindana J, Chen M, Goff HD, Zhong F, Sharif HR, Li Y (2017) Functionality and nutritional aspects of microcrystalline cellulose in food. *Carbohydrate Polymers* 172: 159–74.
- O'Brien PJ, Herschlag D (1999) Catalytic Promiscuity and the Evolution of New Enzymatic Activities. *Chemistry & Biology* 6: R91–105.
- O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME, Zhang N, Geiser DM (2008) Molecular Phylogenetic Diversity, Multilocus Haplotype Nomenclature, and In Vitro Antifungal Resistance within the *Fusarium solani* Species Complex. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 2477–90.
- O'Donnell K (2000) Molecular Phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* Species Complex. *Mycologia* 92: 919.

- Oberoi R, Beg OK, Puri S, Saxena RK, Gupta R (2001) Characterization and Wash Performance Analysis of an SDS-Stable Alkaline Protease from a *Bacillus* sp. *Worls Jurnal of Microbiology and Biotechnology* 17: 493–97.
- Omumasaba CA, Yoshida N, Ogawa K (2001) Purification and Characterization of a Chitinase from *Trichoderma viride*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 47: 53–61.
- Ondruschka J, Trutnau M, Bley T (2008) Gewinnung und Potenziale des Biopolymers Chitosan. *Chemie Ingenieur Technik* 80 811–20.
- Ordentlich A, Elad Y, Chet I (1988) The Role of Chitinase of Serratia marcescens in Biocontrol of Sclerotium rolfsii. Phytopathology 78: 84–88.
- Paccanaro MC, Sella L, Castiglioni C, Giacomello F, Martínez-Rocha AL, D'Ovidio R, Schäfer W, Favaron F (2017) Synergistic Effect of Different Plant Cell Wall-Degrading Enzymes Is Important for Virulence of *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 30: 886–95.
- Pandey A (1992) Recent Process Developments in Solid-State Fermentation. *Process Biochemistry* 27: 109–17.
- Pandey A, Soccol CR, Mitchell D (2000) New Developments in Solid State Fermentation: I-Bioprocesses and Products. *Process Biochemistry* 35: 1153–69.
- Pang KL, Chow RKK, Chan CW, Vrijmoed LLP (2011) Diversity and Physiology of Marine Lignicolous Fungi in Arctic Waters: A Preliminary Account. *Polar Research* 30: 5859.
- Pawar K, Render D, Rangari V, Lee Y, Babu RJ (2018) Evaluation of Non-Crystalline Cellulose as a Novel Excipient in Solid Dose Products. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 44: 1512-1519.
- Payne CM, Knott BC, Mayes HB, Hansson H, Himmel ME, Sandgren M, Ståhlberg J, Beckham GT (2015) Fungal Cellulases. *Chemical Reviews* 115: 1308-1448.
- Percival Zhang YH, Himmel ME, Mielenz JR (2006) Outlook for Cellulase Improvement: Screening and Selection Strategies. *Biotechnology Advances* 24: 452–81.
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, Martínez J (2002) Biodegradation and Biological Treatments of Cellulose, Hemicellulose and Lignin: An Overview. *International Microbiology* 5: 53–63.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: Discriminating Signal Peptides from Transmembrane Regions. *Nature Methods* 8: 785–86.
- Piotrowska M (2013) Contamination of Breakfast Cereal Products by Fungi and Mycotoxins–a Potential Risk for Consumer's Health. *Biotechnology and Food Science* 77: 3–10.
- Purdy LH (1979) *Sclerotinia sclerotiorum*: History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact. *Phytopathology* 69: 875-880.
- Queiroz JS de, Griswold D, Tu ND, Hall P (2013) Vietnam Tropical Forest and Biodiversity Assessment. *Open Development Mekong*, 79 Seiten
- Quinlan RJ, Sweeney MD, Leggio LL, Otten H, Poulsen JCN, Johansen KS, Krogh KBRM, et al. (2011) Insights into the Oxidative Degradation of Cellulose by a Copper

Metalloenzyme That Exploits Biomass Components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 15079–84.

- Ramírez-Coutiño L, Marín-Cervantes MC, Huerta S, Revah S, Shirai K (2006) Enzymatic Hydrolysis of Chitin in the Production of Oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* Chitinases. *Process Biochemistry* 41: 1106–10.
- Ranalli A, Pollastri L, Contento S, Lucera L, Del Re P (2003) Enhancing the Quality of Virgin Olive Oil by Use of a New Vegetable Enzyme Extract during Processing. *European Food Research and Technology* 216: 109–15.
- Ray S (2015) Application of Extracellular Microbial Lipase a Review. *International Journal of Research in Biotechnology and Biochemistry* 5: 6–12.
- Reese ET (1956) A Microbiological Process Report; Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Applied Microbiology* 4: 39–45.
- Reyes F, Calatayud J, Vazquez C, Martinez MJ (1989) β-N-Acetylglucosaminidase from Aspergillus nidulans which Degrades Chitin Oligomers during Autolysis. FEMS Microbiology Letters 65: 83–87.
- Ribeiro LFC, Ribeiro LF, Jorge JA, Polizeli MLTM (2014) Screening of Filamentous Fungi for Xylanases and Cellulases Not Inhibited by Xylose and Glucose. British Biotechnology Journal Original Research Article British Biotechnology Journal 4: 30-39.
- Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP (2000) Nosocomial Infections in Combined Medical-Surgical Intensive Care Units in the United States. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 21: 510–15.
- Rinaldi MG (1983) Invasive Aspergillosis. Revious of Infectious Disease 5: 1061-77.
- Rintoul TL, Eggertson QA, Lévesque CA (2012) Multigene Phylogenetic Analyses to Delimit New Species in Fungal Plant Pathogens. *Methods in Molecular Biology* 549-69.
- Robert V, Vu D, Amor AB, van de Wiele N, Brouwer C, Jabas B, Szoke S, et al. (2013) MycoBank Gearing up for New Horizons. *IMA Fungus* 4: 371–79.
- Roberts WK, Selitrennikoff CP (1988) Plant and Bacterial Chitinases Differ in Antifungal Activity. *Microbiology* 134: 169–76.
- Rodríguez-Delgado MM, Alemán-Nava GS, Rodríguez-Delgado JM, Dieck-Assad G, Martínez-Chapa SO, Barceló D, Parra R (2015) Laccase-Based Biosensors for Detection of Phenolic Compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 74: 21–45.
- Rodriguez B, Kavoosi M, Koska J, Creagh AL, Kilburn DG, Haynes CA (2004) Inexpensive and Generic Affinity Purification of Recombinant Proteins Using a Family 2a CBM Fusion Tag. *Biotechnology Progress* 20: 1479–89.
- Rodríguez Couto S, Sanromán MA (2005) Application of Solid-State Fermentation to Ligninolytic Enzyme Production. *Biochemical Engineering Journal* 22: 211–19.
- Saba H, Vibhash D, Manisha M, Prashant KS, Farhan H, Tausseef A (2012) *Trichoderma*-a Promising Plant Growth Stimulator and Biocontrol Agent. *Mycosphere* 3: 524-531.

- Saha BC, Bothast RJ (1999) Enzymology of Xylan Degradation. In *Biopolymers*, Kapitel 11 167–94. American Chemical Society.
- Saikkonen K, Wäli P, Helander M, Faeth SH (2004) Evolution of Endophyte–Plant Symbioses. *Trends in Plant Science* 9: 275–80.
- Sajith S, Priji P, Sreedevi S, Benjamin S (2016) An Overview on Fungal Cellulases with an Industrial Perspective. *Journal of Nutrition & Food Sciences* 06: 1–13.
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, Perrones G, et al. (2014) Phylogeny, Identification and Nomenclature of the Genus Aspergillus. Studies in Mycology 78: 343–71.
- Sánchez C (2009) Lignocellulosic Residues: Biodegradation and Bioconversion by Fungi. *Biotechnology Advances* 27: 185–94.
- Sandrim VC, Rizzatti ACS, Terenzi HF, Jorge JA, Milagres AMF, Polizeli MLTM (2005) Purification and Biochemical Characterization of Two Xylanases Produced by *Aspergillus caespitosus* and Their Potential for Kraft Pulp Bleaching. *Process Biochemistry* 40: 1823–28.
- Saravanakumar K, Kathiresan K (2014) Bioconversion of Lignocellulosic Waste to Bioethanol by *Trichoderma* and Yeast Fermentation. *3 Biotech* 4: 493–99.
- Sarnklong C, Cone JW, Pellikaan W, Hendriks WH (2010) Utilization of Rice Straw and Different Treatments to Improve Its Feed Value for Ruminants: A Review. *Asian-Australasien Journal of Animal Science* 23 (5): 680–92.
- Schadt EE, Turner S, Kasarskis A (2010) A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics* 19: R227-R240
- Schepers HTAM (1985) Fitness of Isolates of Sphaerotheca fuliginea Resistant or Sensitive to Fungicides Which Inhibit Ergosterol Biosynthesis. Netherlands Journal of Plant Pathology 91: 65–76.
- Schoch CL, Seifert K, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W (2012) Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 6241–46.
- Schuerg T, Prahl JP, Gabriel R, Harth S, Tachea F, Chen CS, Miller M, et al. (2017) Xylose Induces Cellulase Production in *Thermoascus aurantiacus*. *Biotechnology for Biofuels* 10: 271.
- Schuster A, Schmoll M (2010) Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. Applied Microbiology and Biotechnology 87 (3): 787–99.
- Schwartz RE, Giacobbe RA, Bland A, Monaghan RL (1989) L-671,329, a New Antifungal Agent. I. Fermentation and Isolation. *The Journal of Antibiotics* 42: 163–67.
- Schweigkofler W (2006) Ascomycota: Introduction to Biodiversity, Evolutionary Genomics and Systematics. In Sharma AK, Aharma A (Ed.) *Plant Genome: Biodiversity and Evolution*, 189–240. Science Publisher Inc.
- Seeberger PH, Werz DB (2007) Synthesis and Medical Applications of Oligosaccharides. *Nature* 446: 1046–51.

- Seidl V (2008) Chitinases of Filamentous Fungi: A Large Group of Diverse Proteins with Multiple Physiological Functions. *Fungal Biology Reviews* 22: 36–42.
- Shahidi F, Synowiecki J (1991) Isolation and Characterization of Nutrients and Value-Added Products from Snow Crab (*Chionoecetes opilio*) and Shrimp (*Pandalus borealis*) Processing Discards. Journal of Agricultural and Food Chemistry 39: 1527-32.
- Shallom D, Shoham Y (2003) Microbial Hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology* 6: 219–28.
- Shearer CA, Descals E, Kohlmeyer B, Kohlmeyer J, Marvanová L, Padgett D, Porter D, Raja HA, Schmit JP, Thorton HA, Voglymayr H (2007) Fungal Biodiversity in Aquatic Habitats. *Biodiversity and Conservation* 16: 49–67.
- Shen KT, Chen MH, Chan HY, Jeng JH, Wang YJ (2009) Inhibitory Effects of Chitooligosaccharides on Tumor Growth and Metastasis. *Food and Chemical Toxicology* 47: 1864–71.
- Shipman JA, Berleman JE, Salyers AA (2000) Characterization of Four Outer Membrane Proteins Involved in Binding Starch to the Cell Surface of *Bacteroides thetaiotaomicron. Journal of Bacteriology* 182: 5365–72.
- Short DPG, O'Donnell K, Thrane U, Nielsen KF, Zhang N, Juba JH, Geiser DM (2013) Phylogenetic Relationships among Members of the *Fusarium solani* Species Complex in Human Infections and the Descriptions of *F. keratoplasticum* sp. nov. and *F. petroliphilum* stat. nov. *Fungal Genetics and Biology* 53: 59–70.
- Shoseyov O, Shani Z, Levy I (2006) Carbohydrate Binding Modules: Biochemical Properties and Novel Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews MMBR* 70: 283–95.
- Sigoillot JC, Berrin JG, Bey M, Lesage-Meessen L, Levasseur A, Lomascolo A, Record E, Uzan-Boukhris E (2012) Fungal Strategies for Lignin Degradation. Advances in Botanical Research 61: 263–308.
- Silva LRC, de Souza OC, dos Santos Fernandes MJ, Massa Lima DM, Rodrigues Coelho RR, Souza-Motta CM (2011) Culturable Fungal Diversity of Shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone from Breeding Farms in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 49–56.
- Silva LAO, Fanchini Terrasan CR, Cano Carmona E (2015) Purification and Characterization of Xylanases from *Trichoderma inhamatum*. *Electronic Journal of Biotechnology* 18: 307–13.
- Singh P, Sharma L, Kulothungan SR, Adkar BV, Singh Prajapati R, Syed Ali PS, Krishnan B, Varadarajan R (2013) Effect of Signal Peptide on Stability and Folding of *Escherichia coli* Thioredoxin. *PLoS ONE* 8: e63442.
- Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK (2016) Microbial Enzymes: Industrial Progress in 21st Century. *3 Biotech* 6: 174.
- Sipos B, Zsuzsa Benkő, Dienes D, Réczey K, Viikari L, Siika-aho M (2010) Characterisation of Specific Activities and Hydrolytic Properties of Cell-Wall-Degrading Enzymes

Produced by *Trichoderma reesei* Rut C30 on Different Carbon Sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 161: 347–64.

- Slot JC, Rokas A (2011) Horizontal Transfer of a Large and Highly Toxic Secondary Metabolic Gene Cluster between Fungi. *Current Biology* 21: 134–39.
- Solá RJ, Griebenow K (2009) Effects of Glycosylation on the Stability of Protein Pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98: 1223–45.
- Spatafora JW, Sung GH, Johnson D, Hesse C, O'Rourke B, Serdani M, Spotts R, et al. (2006) A Five-Gene Phylogeny of Pezizomycotina. *Mycologia* 98: 1018–28.
- Sridevi A, Ramanjaneyulu G, Suvarnalatha Devi P (2017) Biobleaching of Paper Pulp with Xylanase Produced by *Trichoderma asperellum. 3 Biotech* 7: 266.
- Srisodsuk M, Lehtiö J, Linder M, Margolles-Clark E, Reinikainen T, Teeri TT (1997) *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolase I with an Endoglucanase Cellulose-Binding Domain: Action on Bacterial Microcrystalline Cellulose. *Journal of Biotechnology* 57: 49–57.
- Srivastava N, Srivastava M, Mishra PK, Gupta VK, Molina G, Rodriguez-Couto S, Manikanta A, Ramteke PW (2018) Applications of Fungal Cellulases in Biofuel Production: Advances and Limitations. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 82: 2379–86.
- Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KTBG, Kirstine Lavrsen, et al. (2013) Precision Mapping of the Human O-GalNAc Glycoproteome through SimpleCell Technology. *The EMBO Journal* 32: 1478–88.
- Steinecke F, Auge R (1963) Experimentelle Biologie. Quelle & Meyer. Heidelberg.
- Stoykov YM, Pavlov AI, Krastanov AI (2015) Chitinase Biotechnology: Production, Purification, and Application. *Engineering in Life Sciences* 15: 30–38.
- Su GD, Huang DF, Han SY, Zheng SP, Lin Y (2010) Display of *Candida antarctica* Lipase
 B on *Pichia pastoris* and its Application to Flavor Ester Synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86: 1493–1501.
- Subramaniyam R, Vimala R (2012) Solid State and Submerged Fermentation for the Production of Bioactive Substances: A Comparative Study. *International Journal of Science and Nature* 3:480-486
- Suhas, Gupta VK, Carrott PJM, Singh R, Chaudhary M, Kushwaha S (2016) Cellulose: A Review as Natural, Modified and Activated Carbon Adsorbent. *Bioresource Technology* 216: 1066–76.
- Sung GH, Sung JM, Hywel-Jones NL, Spatafora JW (2007) A Multi-Gene Phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of Localized Incongruence Using a Combinational Bootstrap Approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 1204–23.
- Takahashi Y, Kawabata H, Murakami S (2013) Analysis of Functional Xylanases in Xylan Degradation by *Aspergillus niger* E-1 and Characterization of the GH Family 10 Xylanase XynVII. *SpringerPlus* 2: 447.

- Takano M, Hoshino K (2018) Bioethanol Production from Rice Straw by Simultaneous Saccharification and Fermentation with Statistical Optimized Cellulase Cocktail and Fermenting Fungus. *Bioresources and Bioprocessing* 5:16.
- Taneja K, Gupta S, Kuhad RC (2002) Properties and Application of a Partially Purified Alkaline Xylanase from an Alkalophilic Fungus Aspergillus nidulans KK-99. Bioresource Technology 85: 39–42.
- Tapre AR, and Jain RK (2014) Pectinases: Enzymes for Fruit Processing Industry. *International Food Research Journal* 21: 447–53.
- Tavares EQP, Buckeridge MS (2015) Do Plant Cell Walls Have a Code? *Plant Science* 241: 286–94.
- Teeri TT (1997) Crystalline Cellulose Degradation: New Insight into the Function of Cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology* 15: 160–67.
- Teeri TT, Koivula A, Linder M, Wohlfahrt G, Divne C, Jones TA (1998) *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolases: Why so Efficient on Crystalline Cellulose? *Biochemical Society Transactions* 26: 173–78.
- Terrapon N, Lombard V, Drula É, Lapébie P, Al-Masaudi S, Gilbert HJ, Henrissat B (2018) PULDB: The Expanded Database of Polysaccharide Utilization Loci. *Nucleic Acids Research* 46: D677–83.
- Tigerstrom RG, Stelmaschuk S (1989) The Use of Tween 20 in a Sensitive Turbidimetric Assay of Lipolytic Enzymes. *Canadian Journal of Microbiology* 35: 511–14.
- Timell TE (1965) Wood Hemicelluloses: Part II. Advances in Carbohydrate Chemistry 20: 409–83.
- Tiné MAS, Silva CO, Ubeda de Lima D, Carpita NC, Buckeridge MS (2006) Fine Structure of a Mixed-Oligomer Storage Xyloglucan from Seeds of *Hymenaea courbaril*. *Carbohydrate Polymers* 66: 444–54.
- Tomme P, Warren RAJ, Gilkes NR (1995a) Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi. *Advances in Microbial Physiology* 37: 1–81.
- Tomme P, Driver DP, Amandoron EA, Miller RC, Antony R, Warren J, Kilburn DG (1995b) Comparison of a Fungal (Family I) and Bacterial (Family II) Cellulose-Binding Domain. *Journal of Bacteriology* 177: 4356–63.
- Tomme P, Boraston A, McLean B, Kormos J, Creagh AL, Sturch K, Gilkes NR, Haynes CA, Warren RA, Kilburn DG (1998) Characterization and Affinity Applications of Cellulose-Binding Domains. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 715: 283–96.
- Treichel H, de Oliveira D, Mazutti MA, Di Luccio M, Oliveira JV (2010) A Review on Microbial Lipases Production. *Food and Bioprocess Technology* 3: 182–96.
- Tull D, Withers SG, Gilkes NR, Kilburn DG, Warren RA, Aebersold R (1991) Glutamic Acid 274 Is the Nucleophile in the Active Site of a 'Retaining' Exoglucanase from *Cellulomonas fimi. The Journal of Biological Chemistry* 266: 15621–25.
- Turhan G, Grossmann F (1989) Antifungal and Antibacterial Activity of *Acrophialophora levis* Samson and Tariq Mahmood. *Journal of Phytopathology* 124: 200–206.

- Urbina-Salazar AR, Inca-Torres AR, Falcón-García G, Carbonero-Aguilar P, Rodríguez-Morgado B, del Campo JA, Parrado J, Bautista J (2018) Chitinase Production by *Trichoderma harzianum* Grown on a Chitin-Rich Mushroom Byproduct Formulated Medium. *Waste and Biomass Valorization* 1–9.
- Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ, Liu Z, Zhai H, Sørlie M, Eijsink VGH (2010) An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. *Science* 330: 219–22.
- Vandooren J, Geurts N, Martens E, Van den Steen PE, Opdenakker G (2013) Zymography Methods for Visualizing Hydrolytic Enzymes. *Nature Methods* 10: 211–20.
- Vardakou M, Flint J, Christakopoulos P, Lewis RJ, Gilbert HJ, Murray JW (2005) A Family 10 *Thermoascus aurantiacus* Xylanase Utilizes Arabinose Decorations of Xylan as Significant Substrate Specificity Determinants. *Journal of Molecular Biology* 352: 1060–67.
- Vidyalakshmi R, Paranthaman R, Indhumathi J (2009) Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus* spp. *World Journal of Chemistry* 4: 89–91.
- Vilgalys R, Hester M (1990) Rapid Genetic Identification and Mapping of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from Several Cryptococcus Species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238–46.
- Vincenzini MT, Favilli F, Stio M, Vanni P, Treves C (1985) Detergents as Selective Inhibitors and Inactivators of Enzymes. *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR* 17: 279–95.
- Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong SB, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Varga J, Yaguchi T, Samson RA (2014) Identification and Nomenclature of the Genus *Penicillium. Studies in Mycology* 78: 343–71.
- Vu VV, Beeson WT, Phillips CM, Cate JHD, Marletta MA (2014) Determinants of Regioselective Hydroxylation in the Fungal Polysaccharide Monooxygenases. *Journal* of the American Chemical Society 136:562–65.
- Wakarchuk WW, Campbell RL, Sung WL, Davoodi J, Yaguchi M (1994) Mutational and Crystallographic Analyses of the Active Site Residues of the *Bacillus circulans* Xylanase. *Protein Science* 3: 467–75.
- Walia A, Guleria A, Mehta P, Chauhan A, Parkash J (2017) Microbial Xylanases and Their Industrial Application in Pulp and Paper Biobleaching: A Review. *3 Biotech* 7:11.
- Wang SL, Chang WT (1997) Purification and Characterization of Two Bifunctional Chitinases/Lysozymes Extracellularly Produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a Shrimp and Crab Shell Powder Medium. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 380–86.
- Ward OP, Qin WM, Dhajoon J, Ye J, Singh A (2005) Physiology and Biotechnology of *Aspergillus. Advances in Applied Microbiology* 58: 1–75.
- Webb EC (1992) Enzyme Nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes. San Diego, California: Academic Press.

- Weber K, Osborn M (1969) The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry* 244: 4406–12.
- Wei H, Scherer M, Singh A, Liese R, Fischer R (2001) Aspergillus nidulans α-1,3 Glucanase (Mutanase), MutA, Is Expressed during Sexual Development and Mobilizes Mutan. Fungal Genetics and Biology 34: 217–27.
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, Van Kan JAL (2007) *Botrytis cinerea*: The Cause of Grey Mould Disease. *Molecular Plant Pathology* 8: 561–80.
- Winkler UK, Stuckmann M (1979) Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by Serratia Marcescens. *Journal of Bacteriology* 138: 663–70.
- Withers SG, DombroskiD, Berven LA, Kilburn DG, Miller RC, Warren RA, Gilkes NR (1986) Determination of the Stereochemical Course of Hydrolyses Catalysed by Glucanase Components of the Cellulase Complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 139: 487–94.
- Wong MKM, Goh TK, Hodgkiss IJ, Hyde KD, Ranghoo VM, Tsui CKM, Ho WH, Wong WSW, Yuen TK (1998) Role of Fungi in Freshwater Ecosystems. *Biodiversity & Conservation* 7: 1187–1206.
- Wood TM, McCrae SI (1977) Cellulase from *Fusarium solani*: Purification and Properties of the C1 Component. *Carbohydrate Research* 57: 117–33.
- Woodward J (1991) Synergism in Cellulase Systems. Bioresource Technology 36: 67-75.
- Xiao Z, Zhang X, Gregg DJ, Saddler JN (2004) Effects of Sugar Inhibition on Cellulases and β-Glucosidase During Enzymatic Hydrolysis of Softwood Substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 115: 1115–26.
- Yang Y, Zhang W, Huang J, Lin L, Lian H, Lu Y, Wu J, Wang S (2010) Purification and Characterization of an Extracellular Xylanase from Aspergillus niger C3486. African Journal of Microbiology Research 4: 2249–56.
- Yarbrough JM, Zhang R, Mittal A, Wall TV, Bomble YJ, Decker SR, Himmel ME, Ciesielski PN (2017) Multifunctional Cellulolytic Enzymes Outperform Processive Fungal Cellulases for Coproduction of Nanocellulose and Biofuels. ACS Nano 11: 3101–9.
- Ye Y, Choi JH ,Tang H (2011) RAPSearch: A Fast Protein Similarity Search Tool for Short Reads. *BMC Bioinformatics* 12: 159.
- Yeoman CJ, Han Y, Dodd D, Schroeder CM, Mackie RI, Cann IKO (2010) Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry. *Advances in Applied Microbiology* 70:1–55.
- Yoshida M, Igarashi K, Wada M, Kaneko S, Suzuki N, Matsumura H, Nakamura N, Ohno H, Samejima M (2005) Characterization of Carbohydrate-Binding Cytochrome B562 from the White-Rot Fungus Phanerochaete Chrysosporium. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4548–55.

- Yoshida Y (1988) Cytochrome P450 of Fungi: Primary Target for Azole Antifungal Agents. *Current Topics in Medical Mycology* 2: 388–418.
- Zargar V, Asghari M, Dashti A (2015) A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Reviews* 2: 204–26.
- Zhang W, Lou K, Li G. (2010) Expression and Characterization of the Dictyoglomus thermophilum Rt46B.1 Xylanase Gene (XynB) in Bacillus subtilis. Applied Biochemistry and Biotechnology 160: 1484–95.
- Zhang Z, Smith C, Li W (2014) Extraction and Modification Technology of Arabinoxylans from Cereal By-Products: A Critical Review. *Food Research International* 65: 423–36.
- Zhao Y, Tang H, Ye Y (2012) RAPSearch2: A Fast and Memory-Efficient Protein Similarity Search Tool for next-Generation Sequencing Data. *Bioinformatics* 28: 125–26.
- Zhao Z, Liu H, Wang C, Xu JR (2013) Comparative Analysis of Fungal Genomes Reveals Different Plant Cell Wall Degrading Capacity in Fungi. *BMC Genomics* 14: 274.
- Zhu S, Wu Y, Yu Z, Wang C, Yu F, Jin S, Ding Y, Chi R, Liao J, Zhang Y (2006) Comparison of Three Microwave/Chemical Pretreatment Processes for Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw. *Biosystems Engineering* 93: 279–83.
- Zyl WH van, Lynd LR, den Haan R, McBride JE (2007) Consolidated Bioprocessing for Bioethanol Production Using *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 108:205–35.
- 1000 Fungal Genomes Project JGI (2018) Complete Genom of *F. solani* MPI-SDFR-AT-0091 v1.0. JGI Proposal ID: 1974, Veröffentlicht am 05.06.2018, https://genome.jgi.doe.gov/Fusso1/Fusso1.home.html zugegriffen 01.07.2018

8 Anhang

Anhang I.I: Phylogenetischer Baum der ITS Sequenzen der Pilzsammlung



Abbildung 25: Phylogenetischer Baum der ITS Sequenzen der Pilzsammlung. Die Gattungen *Aspergillus, Penicillium* und *Talaromyces* sind zusammengeklappt und in Anhang I.II dargestellt. Der phylogenetische Baum wurde berechnet mit 398 Referenz Sequenzen der TS Sequenz 1, der 5,8S rRNA und der ITS Sequenz 2. Die Berechnung erfolgte mit dem Maximum Likelihood (ML) und Maximum Parsimony (MP) Kriterien (4.2.4). Die Äste wurden nach der erwarteten Nummer der Substitutionen *per site* skaliert. Die Nummern der Äste geben die Werte an bei 1000 ML *bootstraps* Replikate (links) und bei 1000 MP *bootstraps* Replikaten (rechts) sind, bei Werten höher als 60%. Die Nomenklatur der *Trichoderma* Stämme wurde mit der Datenbank TrichOKEY 2 verifiziert 4.2.4).

Anhang I.II: Phylogenetischer Baum der ITS Sequenzen der Pilzsammlung der Gattungen Aspergillus Penicillium und Talaromyces



Abbildung 26: Phylogenetischer Baum der ITS Sequenzen der Gattungen Aspergillus, Penicillium und Talaromyces. Der phylogenetische Baum wurde mit 398 Referenz Sequenzen der ITS Sequenz 1, der 5,88 rRNA und der ITS Sequenz 2 berechnet. Die Berechnung erfolgte mit dem Maximum Likelihood (ML) und Maximum Parsimony (MP) Kriterien 4.2.4). Die Äste wurden nach der erwarteten Nummer der Substitutionen per site skaliert. Die Nummern der Äste geben die Werte an bei 1000 ML bootstraps Replikate (links) und bei 1000 MP bootstraps Replikaten (rechts) sind, bei Werten höher als 60%. Der Baum wurde gewurzelt mit den Talaromyces Stämmen.

Anhang II: Die gesammelten Pilzisolate und ihre zugehörigen Einlagerungsnummern (DSMZ ID Nummer) vergeben durch das DSMZ in Braunschweig und die GenBank (NCBI) Nummern.

Tabelle 20: Die Pilzisolate mit zugehörigen DSMZ ID Nummern, vergeben durch das DSMZ Braunschweig (4.2.1), und die Genbank Nummern (2.1.2). Die leeren Felder zeigen die noch nicht vollständige Einlagerung der Pilzisolate bei der DSMZ Braunschweig (4.2.1) an.

Pilzisolat	DSMZ ID Nummer	GenBank Nummer
FC1	106217	MG098597
FC12	106227	MG098599
FC2	106218	MG098600
FC3		MG098601
FC4	106219	MG098602
FC5	106220	MG098603
FC6.1	106221	MG098604
FC7	106223	MG098605
FC9	106225	MG098607
FF1	104516	MG098608
FH1	106229	MG098609
FH100	106260	MG098610
FH101	106237	MG098611
FH2.1	106228	MG098612
FH2.2	106230	MG098613
FH3	106231	MG098614
FH4	106232	MG098615
FH5.1	106233	MG098616
FH5.2	106234	Nach Sequenzierung durch DSMZ
Fi1	106442	MG098706
Fi10	106453	MG098708
Fi10.2	106451	MG098707
Fi100	106487	Nach Sequenzierung durch DSMZ
Fi12	106455	MG098709
Fi14	106457	MG098710
Fi19	106461	MG098712
Fi2	106443	Nach Sequenzierung durch DSMZ
Fi20	106462	MG098713
Fi21	106463	MG098714
Fi22	106464	MG098715
Fi23	106465	MG098716
Fi24	106466	MG098717
Fi26	106468	MG098719
Fi29	106471	MG098721
Fi3	106444	MG098722
Fi30	106472	Nach Sequenzierung durch DSMZ
Fi31	106473	Nach Sequenzierung durch DSMZ
Fi32	106477	MG098723

Fi34	106474	MG098725
Fi35	106479	MG098726
Fi36.1	106480	MG098728
Fi38	106475	Nach Sequenzierung durch DSMZ
Fi39	106482	MG098729
Fi4	106445	MG098730
Fi40	106483	Nach Sequenzierung durch DSMZ
Fi41	106484	MG098731
Fi42	106476	Nach Sequenzierung durch DSMZ
Fi43	106485	MG098732
Fi5	106446	MG098734
Fi6.1		MG098735
Fi7	106449	MG098736
Fi9	106451	MG098738
FL1	106238	Nach Sequenzierung durch DSMZ
FL10	106248	MG098617
FL100	106490	MG098618
FL101	106261	MG098619
FL12	106250	MG098620
FL15	106252	MG098621
FL17	106254	MG098622
FL18	106255	MG098623
FL19	106256	MG098624
FL2	106239	Nach Sequenzierung durch DSMZ
FL20	106257	Nach Sequenzierung durch DSMZ
FL3	106240	MG098627
FL5	106242	MG098629
FL6	106243	MG098631
FL6.2	106244	MG098630
FL7	106245	Nach Sequenzierung durch DSMZ
FL8	106246	Nach Sequenzierung durch DSMZ
FL9	106247	MG098632
FR1	106296	MG098633
FR10	106307	MG098634
FR12	106309	MH472613
FR14	106311	Nach Sequenzierung durch DSMZ
FR15	106312	MG098636
FR16	106313	MG098637
FR18	106315	Nach Sequenzierung durch DSMZ
FR19	106319	MG098639
FR2	106297	MG098640
FR21	106317	Nach Sequenzierung durch DSMZ
FR23	106319	MG098641
FR24.1	106320	MG098642
FR25	106322	Nach Sequenzierung durch DSMZ
FR26	106323	MG098643

FR27	106324	MG098644
FR29	106326	MG098645
FR3.2	106299	Nach Sequenzierung durch DSMZ
FR36.1	106333	MG098648
FR39	106337	MG098650
FR5.1	106300	MG098651
FR6	106302	Nach Sequenzierung durch DSMZ
FR9	106306	MG098654
FSh10	106722	MG098655
FSh101	107513	MG098739
FSh102	105790	MG098740
FSh12.2	106715	MG098656
FSh13	107512	MG098657
FSh15		MG098658
FSh16	106756	Nach Sequenzierung durch DSMZ
FSh17	106723	MG098741
FSh18	106729	Nach Sequenzierung durch DSMZ
FSh2	106690	Nach Sequenzierung durch DSMZ
FSh20	106730	MG098742
Fsh200	107515	MG098659
Fsh201	107514	MG098743
FSh21		MG098660
FSh22	106731	MG098661
FSh24	107622	MG098744
FSh3.1		MG098662
FSh3.2		MG098663
FSh4		MG098664
FSh5	106691	MG098665
FSh6	106727	MG098666
FSh7	106721	MH472616
FSh8	107621	MH472617
FSh9	106755	MG098668
FW11	106732	MG098671
FW13	106707	MG098673
FW14	106695	MG098674
FW15	106680	MG098675
FW16	106696	MG098678
FW16.1	105788	MG098676
FW16.2	107620	MG098677
FW17	106708	MG098679
FW18	106697	MG098680
FW2.1	106677	MG098682
FW24	106709	MG098685
FW25	106710	MG098686
FW27	106683	MG098687
FW3	106694	MG098688

FW30	106733	MG098689
FW33	106711	MG098691
FW34	106734	MG098692
FW35	106735	MG098693
FW36	106736	MG098694
FW37	106712	Nach Sequenzierung durch DSMZ
FW38		MG098695
FW4	106705	MG098696
FW42.2	107619	MG098697
FW43		MG098698
FW49	106685	MG098699
FW5		MG098700
FW50.1	106698	Nach Sequenzierung durch DSMZ
FW52	106687	MG098701
FW57	105789	MG098702
FW59	106726	MG098703
FW63	106754	MG098704
FW7.1	106752	Nach Sequenzierung durch DSMZ
FW8	106706	MG098705
FW9.2	106679	Nach Sequenzierung durch DSMZ
GeoThi	106489	MG098746
SF1	106354	MG098747
SF10.1	106364	MG098748
SF10.2	106365	Nach Sequenzierung durch DSMZ
SF10.3	106366	MG098749
SF11.1	106367	Nach Sequenzierung durch DSMZ
SF11.2	106368	Nach Sequenzierung durch DSMZ
SF11.3	106369	MG098750
SF11.4	106370	MH472615
SF12.1	106371	Nach Sequenzierung durch DSMZ
SF12.2	106372	MG098751
SF13	106374	MG098752
SF14	106375	MG098753
SF16	106377	MG098754
SF17	106378	MG098755
SF19.1	106380	MG098756
SF2.2	106356	MH472614
SF22.3	106384	MG098761
SF23	106385	Nach Sequenzierung durch DSMZ
SF25	106387	MG098763
SF26	106388	MG098764
SF27	106389	Nach Sequenzierung durch DSMZ
SF28	106390	MG098765
SF3	106357	MG098766
SF30	106392	MG098767
SF31	106393	MG098768

106394	MG098769
106396	MG098770
106398	MG098771
106399	Nach Sequenzierung durch DSMZ
106402	MG098772
106358	MG098773
106404	Nach Sequenzierung durch DSMZ
106405	MG098774
106359	MG098775
106360	Nach Sequenzierung durch DSMZ
106361	MG098776
106362	Nach Sequenzierung durch DSMZ
	106394 106396 106398 106399 106402 106358 106404 106405 106359 106360 106361 106362

Anhang III: Quantitativer Enzymtest im Flüssigmedium

Tabelle 21: Die getesteten Pilzisolate auf die Enzymaktivitäten der Cellulase, Xylanase, Lipase und
Chitinase mittels des qualitativen Aktivitätstest (4.4.8) im Flüssigmedium (2.2.2). Die Messungen
erfolgten in Triplikaten. Es wurde die Units und die Units/mg des jeweiligen Pilzisolates bestimmt.

	Chitinas	eaktivität	Lipasea	aktivität	Cellulas	eaktivität	Xylanase	eaktivität
	Units	Units/mg	Units	Units/mg	Units	Units/mg	Units	Units/mg
FR27							$0,08698 \pm 0,001213$	$0,30023 \pm 0,004427$
FW63	0,00033 ± 7,11E-06	0,00177 ± 3,82E-05						,
FW					$0{,}00163\pm$	$0{,}02281\pm$		
2.1					2,84E-05	0,000485		
FW5					$0,000597 \pm 0.000155$	$0,006115 \pm 0.00159$		
					$0.00285 \pm$	0.02198 ±		
FW43					5,27E-05	0,000524		
FW33							$0,27904 \pm 0.008312$	$0,58338 \pm 0.016162$
Fsh6	$0{,}01279\pm$	0,096423±	$0{,}03225\pm$	$0{,}14465\pm$.,	.,
	0,000363	0,002843	0,011754	0,052652				
Fsh13					$0,00564 \pm$	$0,05947 \pm 0.000218$		
	0.00326 +	$0.02425 \pm$			1,92E-05	0,000218	0 14875 +	0.45922 +
FW24	1,5E-05	0,000112					0,008668	0,025105
FW					$0,00588 \pm$	$0,05457 \pm$		
16.1					1,34E-05	0,000127		
SF14					$0{,}00726\pm$	$0,\!05773\pm$		
					5,49E-06	7,97E-05		
FW57	$0,01599 \pm$	$0,11114 \pm 0.002609$	$0,01929 \pm$	$0,06016 \pm$				
	0,00038	0,002009	0,00205	0,00002	0.00084 +	0.02253 +		
FW27					1,31E-05	0,000351		
E:12					$0,00194 \pm$	0,01998 ±		
FI12					8,78E-06	9,04E-05		
Fi6					0,001047 8 13E 06	0,01682		
	0.00673 +	0.03105 +			8,15E-00	0,000131		
F134	4,91E-05	0,000227						
Fsh17					$0{,}00938\pm$	0,01931 \pm	$0,\!36607\pm$	$0,73625 \pm$
					6,28E-06	1,78E-05	0,013219	0,026247
Fsh20					$0,00082 \pm$	$0,01527 \pm$	$0,31461 \pm$	$0,55464 \pm$
					5,26E-05	0,001101	0,009023	0,016404
Fsh21					$0,00043 \pm 0.000122$	$0,00332 \pm 0.00137$	$0,32331 \pm 0.007742$	$0,03973 \pm 0.018486$
	$0.01068 \pm$	$0.12858 \pm$			$0.00190 \pm$	$0.01551 \pm$	$0.25169 \pm$	0.45214 ±
FFI	0,004753	0,064565			3,59E-05	0,000287	0,009123	0,016131
SF7	$0{,}01392\pm$	$0{,}08388\pm$			$0{,}00039\pm$	$0{,}00235\pm$		
	0,000529	0,00337			0,000417	0,004454		
SF	$0,00708 \pm$	$0,03437 \pm$			$0,00226 \pm$	$0,02035 \pm$	$0,29686 \pm$	$0,57307 \pm$
19.1	7,35E-05	0,000357			6,23E-06	5,61E-05	0,018152	0,03482
FR1					0,0024 ± 3,71E-05	$0,01326 \pm 0,000249$	$0,55061 \pm 0,017361$	$0,97223 \pm 0,023536$
FL15					$0{,}00086\pm$	0,00467 \pm		
					3,25E-05	0,000186		
FW49					$0,00057 \pm$	$0,00401 \pm$	$0,32018 \pm$	$0,64163 \pm$
					0.00205 +	0,001/23	0,01778	0,036957
Fi7					5,78E-05	0,000292		
Fi10					0,00118 ±	0,00992 ±	0,38091 ±	$0,63220 \pm$
1110					5,45E-05	0,000457	0,011237	0,018417
Fi19					$0,00272 \pm$	$0,00693 \pm$		
					5,79E-05	0,000148		

Fi21	0,00923 ± 0,000132	0,03634 ± 0,000521					0,33474 ± 0,014509	0,58128 ± 0,023074
Fi23					0,00067 ± 8,01E-05	$0,00765 \pm 0,000921$		
Fi39	$0,00718 \pm 0,000133$	$0,04031 \pm 0,000747$			0,00259 ± 2,27E-05	$0,01331 \pm 0,000117$		
FL2	0,00562 ± 8.67E-05	$0,03229 \pm 0.000498$						
SF31	.,	.,			$0,00183 \pm 7.66E-05$	$0,09452 \pm 0.003954$	$0,14610 \pm 0.0099$	$0,23093 \pm 0.015571$
FL6	$0,01424 \pm 0.000148$	$0,06211 \pm 0.000687$	$0,01226 \pm 0.001717$	$0,03668 \pm 0.005129$	$0,00022 \pm 0.000182$	$0,00517 \pm 0.004278$	$0,29928 \pm 0.009555$	$0,52238 \pm 0.018826$
Fsh15	.,	.,	.,	.,	$0,00464 \pm 0.000113$	$0,01959 \pm 0.00032$.,	.,
FW					0,00231 ±	$0,01757 \pm$		
 Fi14					0,00168 ±	0,000305 $0,0613 \pm$		
	0,00529 ±	0,02323 ±			5,8E-05 0,00323 ±	0,002113 $0,0134 \pm$		
1124	7,08E-05	0,000309			1,55E-05	6,45E-05		
Fi43	$0,01535 \pm 0.000831$	$0,03738 \pm 0.001487$			$0,00263 \pm 1.4$ F-05	0,01846 ± 9.83E-05		
	0.00868 +	0.0411 +			1,42 05	9,03E 05		
F122	0,000118	0,000558						
Fsh	0,00894 \pm	$0{,}04756\pm$			0,0025 \pm	0,02002 \pm	$0{,}44746 \pm$	$0{,}63421 \pm$
201	0,000257	0,001472			9,56E-06	7,4E-05	0,017609	0,026128
FL18	$0,00811 \pm 0,000159$	$0,03715 \pm 0,00074$	$0,02109 \pm 0,000855$	$0,10999 \pm 0,003512$				
FL10	$0,00903 \pm 0.000209$	$0,04197 \pm 0.000787$			0,00196 ± 1.25E-05	$0,02318 \pm 0.000431$	$0,3819 \pm 0.009489$	$0,69272 \pm 0.018527$
FL	$0.00767 \pm$	0.03368 ±			$0.00205 \pm$	0.04506 ±	$0.39623 \pm$	$1.02780 \pm$
100	0,000118	0,000395			2,71E-05	0,000365	0,02022	0,050251
FL	$0,00981 \pm$	0,03673 \pm			$0{,}00206\pm$	$0{,}02759 \pm$		
101	0,00014	0,000524			2,24E-05	0,0003		
FW35	$0,02326 \pm$	$0,15480 \pm$			$0,00211 \pm$	$0,01450 \pm$		
	0,001003	0,000550			0.00192 +	0.01136 +	0.26506 +	0.44000 +
FW36	0,000355	0,001469			6,95E-05	0,000411	0,016995	0,030855
Fi1					0,00293 ±	0,01048 ±		
	0.0007	0.0(112)			6,29E-05	0,000225		
FH4	$0,0097 \pm$ 8.08E-05	$0,06112 \pm 0.000507$						
	0,002.00	$0,04235 \pm$						
FH3	0,000214	0,000995						
Fsh	$0{,}01039\pm$	$0{,}13059\pm$	0,01306 \pm	$0{,}08338\pm$	0,00190 \pm	$0{,}02496 \pm$	$0,\!32267\pm$	$0{,}4351 \pm$
101	0,000246	0,003447	0,000954	0,00602	1,84E-05	0,000395	0,008319	0,011452
Fsh 200	$0,00490 \pm$	$0,02928 \pm$			$0,00143 \pm$	$0,00582 \pm$	$0,42275 \pm$	$0,71210 \pm$
 	4,32E-03	0,00027	0.022710+	0.267171 +	0,32E-03	0.02788	0,014465	0.61410
102	5.48E-05	0.000365	0.000772	0.007116	3.83E-05	$\pm 0,000518$	0.005698	$\pm 0,01188$
FH	$0,00622 \pm$	$0,05097 \pm$,	,	0,002554±	0,017184±		
101	6,78E-05	0,000648			0,000136	0,000917		
SF25					$0,000696 \pm$	$0,004219 \pm$	$0,147647 \pm$	$0{,}41032 \pm$
					7,29E-05	0,00041	0,00807	0,023991
FW30							0,33488 ± 0,014303	0,65430 ± 0,027946
Fi4					$0,00212 \pm 2.35E-05$	$0,01529 \pm 0.000169$	$0,24749 \pm 0.013539$	$0,41382 \pm 0.022507$
T. 7					0.00498 +	0.02292 +	0,013337	0,022307
F15					0,000153	0,000706		



Anhang IV: Test auf antifungale Wirkung der Pilzsammlung gegen phytopathogene Pilze

Abbildung 27: Test auf antifungale Wirkung der Pilzsammlung gegen die phytopathogenen Pilze *F. oxysporum* und *F. oxysporum* f. sp. *cubense* mittels *Dual Culture* Methode. A) Inhibitionstest von *F. oxysporum* gegen Fsh8 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *F. oxysporum* nach 3 dpi. B) Inhibitionstest von *F. oxysporum* gegen Fsh15 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *F. oxysporum* nach 5 dpi. C) Inhibitionstest von *F. oxysporum* gegen Fi21 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *F. oxysporum* nach 5 dpi. C) Inhibitionstest von *F. oxysporum* gegen Fi21 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *F. oxysporum* nach 3 dpi. D) Inhibitionstest von *F. oxysporum* cubense gegen SF14 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *F. oxysporum* cubense gegen Fsh8 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *F. oxysporum* cubense gegen Fsh15 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *F. oxysporum* cubense gegen Fsh15 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *F. oxysporum* cubense gegen Fsh15 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *F. oxysporum* cubense gegen Fsh15 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *F. oxysporum* cubense gegen Fi8 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *F. oxysporum* cubense gegen Fi8 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *F. oxysporum* cubense gegen Fi8 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *F. oxysporum* cubense gegen Fi8 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *F. oxysporum* cubense gegen Fi8 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *F. oxysporum* cubense gegen Fi8 (links) und finhibition von *F. oxysporum* cubense gegen Fi8 (links) und finhibition von *F. oxysporum* cubense gegen Fi8 (links) und finhibition von *F. oxysporum* cubense gegen Fi8 (links) und finhibition von *F. oxysporum* cubense gegen Fi8 (links) und finhibition von *F. oxysporum* cubense ge



Abbildung 28: Test auf antifungale Wirkung der Pilzsammlung gegen die phytopathogenen Pilze *M. oryzae* und *B. sorokiniana* mittels *Dual Culture* Methode. A) Inhibitionstest von *M. oryzae* gegen Fsh15 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *M. oryzae* nach 5 dpi. B) Inhibitionstest von *M. oryzae* gegen Fsh16.1 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *M. oryzae* nach 5 dpi. C) Inhibitionstest von *M. oryzae* gegen Fsh24 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *M. oryzae* gegen FL7 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *M. oryzae* gegen FL7 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *M. oryzae* gegen FL7 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *M. oryzae* gegen FL7 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *B. sorokiniana* nach 7 dpi. F) Inhibitionstest von *B. sorokiniana* nach 7 dpi. G) Inhibitionstest von *B. sorokiniana* gegen FL7 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *B. sorokiniana* nach 7 dpi. G) Inhibitionstest von *B. sorokiniana* gegen FL7 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *B. sorokiniana* nach 7 dpi. G) Inhibitionstest von *B. sorokiniana* gegen FL7 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *B. sorokiniana* nach 7 dpi. G) Inhibitionstest von *B. sorokiniana* gegen FL7 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *B. sorokiniana* nach 7 dpi. G) Inhibitionstest von *B. sorokiniana* gegen FL7 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *B. sorokiniana* gegen FW57 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *B. sorokiniana* nach 7 dpi. Das Screening mittels *Dual Culture* Methode erfolgt in n=1.



Abbildung 29: Test auf antifungale Wirkung der Pilzsammlung gegen die phytopathogenen Pilze *S. nodorum* und *C. heterostrophus* mittels *Dual Culture* Methode. A) Inhibitionstest von *S. nodorum* gegen FW16 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *S. nodorum* nach 6 dpi. B) Inhibitionstest von *S. nodorum* gegen FH101 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *S. nodorum* nach 9 dpi. C) Inhibitionstest von *C. heterostrophus* gegen FH4 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *C. heterostrophus* gegen FH4 (links) und das natürliche Wachstum ohne Inhibition von *C. heterostrophus* nach 6 dpi. D) Inhibitionstest von *C. heterostrophus* nach 6 dpi. D) Inhibitionstest von *C. heterostrophus* nach 7 dpi. Das Screening mittels *Dual Culture* Methode erfolgt in n=1.

Anhang V: Enzyme des Pilzisolates Fsh102 induziert mit CMC.

Tabelle 22: Enzyme des Pilzisolates Fsh102 induziert mit CMC. Die Identifikation der Enzyme erfolgtenach dem Zymogramm mit 1% CMC (4.6.5) mittels Flüssigkeitschromatographie mitMassenspektrometrie-Kopplung 4.2.2). Die Annotation, Beschreibung, Deckungsgleichheit(Coverage [%]), Anzahl der Peptide (# Peptide) und das Molekulargewicht in kDa (MW [kDa]) wurdemit dem Genom des Pilzisolates A. sydowii CBS 593.65 (4.7.2) verglichen.

	Annotation	Beschreibung	Coverage	# Peptide	MW
			[%]		[kDa]
1	Putative Glucan endo- 1,3-beta-glucosidase	Aspsy1156803 e_gw1.9.955.1	13,6	5	47.72
2	Putitative gutaminase	Aspsy1147108 e_gw1.3.1326.	7,54	4	91.302
3	Putative Dihydrolipoyl dehydrogenase	Aspsy132999 fgenesh1_pg.8_ #_69	12,24	5	56.501
4	Putative Aminotransferase	Aspsy1142704 e_gw1.1.1152.	21,50	6	41.401
5	Mitochondrial carrier protein	Aspsy157616 fgenesh1_pm.4_ # 719	15,11	4	33.65
6	Aspartyl aminopeptidase	 Aspsy1 87371 gm1.4054_g	8,06	3	53.917
7	Allergenic cerato-platanin	Aspsy158163 fgenesh1_pm.5_ #_458	20,75	2	16.703
8	Polyubiquitin	Aspsy153937 fgenesh1_pm.1_ #_980	32,79	2	34.322
9	Ubiquitin-40S ribosomal protein	Aspsy1 87723 gm1.4406_g	16,23	2	17.622
10	Xylanase or Lipase	Aspsy131023 fgenesh1_pg.4_ #_866	13,96	3	29.495
11	Beta-lactamase	Aspsy155232 fgenesh1_pm.2_ #_554	6,01	2	62.127
12	Glycoside hydrolase, family 13	Aspsy154588 fgenesh1_pm.1_ #_1631	5,91	2	41.962
12	Arabinan endo-1,5-alpha- L-arabinosidase	Aspsy1156274 e_gw1.9.911.1	6,85	2	34.886
13	Putative Adenosylhomocysteinase	Aspsy153104 fgenesh1_pm.1_ #_147	9,80	3	48.686
14	Actin	Aspsy151743 fgenesh1_kg.19 _#_75_#_Locus237v1rpkm81 4.15	9,07	2	41.627
15	Putative Alpha-amylase	Aspsy1 92119 gm1.8802_g	6,39	3	66.865
16	Alpha-mannosidase	Aspsy1769117 CE554079_67 676	3,93	3	123.25 8
17	Enolase (2- phosphoglycerate dehydratase)	Aspsy1 88270 gm1.4953_g	6,85	2	47.479
18	Carbonic anhydrase	Aspsy1141998 e_gw1.1.568.1	12,83	2	25.551
19	Extracellular cell wall glucanase	Aspsy1120588 gw1.1.3837.1	8,75	1	31.977
20	Peptidase	Aspsy126721 fgenesh1_pg.1_ #_1385	13,77	2	25.14
21	Cytochrome c oxidase	Aspsy154236 fgenesh1_pm.1_ #_1279	13,71	2	22.044
22	Putative aminopeptidase	Aspsy1 94487 gm1.11170_g	2,27	2	98.843
23	Conserved hypothetical protein	Aspsy154369 fgenesh1_pm.1_ #_1412	3,25	2	73.954

24	Histone	Aspsy1 145777 e_gw1.2.22.1	20,22	2	10.079
25	Alpha glucuronidase	Aspsy158756 fgenesh1_pm.6_ #_359	3,31	2	70.732
26	Putative Glutamate dehydrogenase	Aspsy1162976 e_gw1.17.262. 1	3,49	1	49.652
27	Putative Aminopeptidase	Aspsy1 86560 gm1.3243_g	2,49	2	98.417
28	Choline dehydrogenase	Aspsy146793 fgenesh1_kg.7_ #_379_#_Locus3116v1rpkm5 4.05	4,04	1	67.139
29	NAD-dependent formate dehydrogenase	Aspsy1164264 e_gw1.19.271. 1	4,08	1	45.474
30	Heat shock protein 90	Aspsy1 61916 fgenesh1 pm.15 # 251	2,00	1	79.522
31	Putative Vacuolar serine protease	Aspsy155062 fgenesh1_pm.2_ # 384	1,72	1	78.695
32	Deuterolysin metalloprotease	Aspsy180480 estExt_fgenesh1 pm.C_90304	3,99	1	36.935
33	1,3-beta- glucanosyltransferase	Aspsy1 90336 gm1.7019_g	2,21	2	48.864
34	Extracellular alkaline serine protease	Aspsy1 88469 gm1.5152_g	6,45	1	42.456
35	Ubiquitin-60S ribosomal	Aspsy1922075 CE707037_13	11,51	1	15.671
36	Putative chitinase	Aspsy1 98891 gw1.15.71.1	4,80	1	44.55
37	Prolyl aminopeptidase	Aspsy1 84523 gm1.1206_g	2,89	1	50.493
38	60S ribosomal protein	Aspsy138143 fgenesh1_kg.1_ #_379_#_Locus214v1rpkm85 9.32	8,39	1	16.967
39	Putative vacuolar aspartyl aminopeptidase	Aspsy1161536 e_gw1.15.178.	1,32	1	108.05 1
40	Putative extracellular serine-rich protein	Aspsy142610 fgenesh1_kg.3_ #_604_#_Locus415v1rpkm46 9.49	1,75	1	85.729
41	Putative Pyridoxine biosynthesis protein	Aspsy1152745 e_gw1.6.114.1	4,53	1	32.655
42	Putative Chitinase	Aspsy143069 fgenesh1_kg.3_ #_1063_#_Locus428v1rpkm4 56.22	5,41	2	48.979
43	Putative endo mannanase	Aspsy1163337 e_gw1.17.259.	2,23	1	65.909
44	Putative 60S ribosomal protein	Aspsy1138768 e_gw1.1.4523.	25,06	1	21.803
45	Cyanate hydratase	Aspsy1 85075 gm1.1758_g	8,13	1	17.836
46	Putative Serine/threonine- protein phosphatase	Aspsy131370 fgenesh1_pg.5_ #_295	4,16	1	61.295
47	Histone	Aspsy139384 fgenesh1_kg.1_ #_1620_#_Locus354v1rpkm5 35.62	9,71	1	11.365
48	Hypothetical protein	Aspsy1 158583 e_gw1.11.750.1	3,75	1	49.598
49	AMP-dependent synthetase	Aspsy1 92998 gm1.9681_g	7,08	1	12.142
50	Laccase	Aspsy1 659517 CE444479_32928	1,30	1	75.967

51	Putative Amine oxidase	Aspsy142178 fgenesh1_kg.3_ #_172_#_Locus4829v1rpkm2 7.14	1,79	1	74.915
52	Superoxide dismutase	Aspsy155065 fgenesh1_pm.2_ #_387	26,62	2	15.895
53	hypothetical protein	Aspsy147806 fgenesh1_kg.9_ #_249_#_Locus6432v1rpkm1 1.88	8,39	1	17.16
54	Putative Alcohol oxidase	Aspsy1 86212 gm1.2895_g	2,25	1	73.867
55	Hypothetical protein	Aspsy11151790 CE936752_1 244	5,29	1	20.462
56	Hypothetical protein	Aspsy150580 fgenesh1_kg.15 _#_160_#_Locus1878v1rpkm 96.58	10,20	1	10.265
57	Sterigmatocystin biosynthesis dehydrogenase	Aspsy1 51901 fgenesh1_kg.20_#_43_ #_Locus6393v1rpkm12.13	4,17	1	43.341
58	Putative Cell wall glucanase	Aspsy1116742 gw1.12.662.1	3,58	1	32.967
59	Putative UDP- galactopyranose mutase	Aspsy1146830 e_gw1.3.1537. 1	1,88	1	59.581
60	Ctr copper transporter family protein	Aspsy157378 fgenesh1_pm.4_ #_481	4,05	1	21.681
61	Hypothetical protein	Aspsy151393 fgenesh1_kg.17 _#_298_#_Locus156v1rpkm1 103.00	3,83	1	29. Apr
62	14-3-3 protein	Aspsy1 88272 gm1.4955_g	3,66	1	30.896
63	Hypothetical protein	Aspsy1120884 gw1.9.977.1	1,76	1	84.009
64	Hypothetical protein	Aspsy155670 fgenesh1_pm.2_ #_992	7,87	1	13.64
65	Histone	Aspsy1118465 gw1.3.1613.1	9,78	1	10.192
66	Hypothetical protein	Aspsy1198063 estExt_Genewi se1Plus.C_3_t20088	1,01	1	87.923
67	Hypothetical protein	Aspsy171830 estExt_fgenesh1 _pg.C_130023	2,60	1	80.85
68	Hypothetical protein	Aspsy1164401 e_gw1.19.364. 1	20,95	4	22.412
69	Putative Dipeptidyl- peptidase 5	Aspsy142088 fgenesh1_kg.3_ #_82_#_Locus877v1rpkm213. 38	7,05	4	79.406
70	Fructosyltransferase	Aspsy1129618 estExt_Genem ark1.C_2_t30091	6,60	3	74.619
71	Cutinase	Aspsy1497571 CE282533_87 10	8,92	2	22.273
72	Putative GPI-anchored cell wall protein	Aspsy136684 fgenesh1_pg.17 _#_115	4,02	1	41.67
73	Putative Beta- hexosaminidase	Aspsy155793 fgenesh1_pm.2_ #_1115	2,14	1	68.235
74	Putative Spermidine synthase	Aspsy128408 fgenesh1_pg.2_ #_1060	4,44	1	33.291
75	Putative 1,3-beta- glucanosyltransferase	Aspsy194587 gm1.11270_g	2,71	1	54.695
76	Extracellular serine carboxypeptidase	Aspsy140061 fgenesh1_kg.1_ #_2297_#_Locus1734v2rpkm 92.23	2,29	1	58.099

77	Urate oxidase	Aspsy1151560 e_gw1.5.1524.	27,78	7	34.605
78	Putative glucoamylase	Aspsy1191239 estExt_Genewi se1Plus.C_1_t20453	6,49	2	52.406
79	Leucine aminopeptidase	Aspsy149800 fgenesh1_kg.13 _#_255_#_Locus2939v3rpkm 11.73	11,13	2	54.302
80	RNase	Aspsy163539 estExt_fgenesh1 _pg.C_1_t10464	9,12	2	31.42
81	Cell wall glucanase	Aspsy162422 fgenesh1_pm.17 _#_210	2,77	1	46.663
82	Catalase	Aspsy151585 fgenesh1_kg.18 _#_162_#_Locus6698v9rpkm 0.00_PRE	2,82	1	54.851
83	Hypothetical protein	Aspsy1212146 estExt_Genewi se1Plus.C_16_t10109	4,71	1	30.803
84	Hypothetical protein	Aspsy11001838 CE786800_1 2787	2,41	1	68.651
85	Putative Kinesin-like protein	Aspsy1146901 e_gw1.3.2209. 1	1,60	1	131.24 2
86	Putative Class V chitinase	Aspsy195784 gm1.12467_g	11,82	1	12.547
87	Putative Class V chitinase	Aspsy1711574 CE496536_24 98	3,03	1	47.562
88	Putative Class V chitinase	Aspsy11171011 MIX17350_8 65_66	3,06	1	47.06
89	1,3-beta- glucanosyltransferase	Aspsy1152690 e_gw1.6.71.1	2,23	1	58.273
90	Putative short-chain dehydrogenase	Aspsy1144413 e_gw1.2.1310.	13,77	1	26.402
89	L-lysine 6- monooxygenase	Aspsy156501 fgenesh1_pm.3_ #_602	3,20	1	66.273
90	Putative Elongation factor 1-alpha	Aspsy146869 fgenesh1_kg.7_ #_455_#_Locus31v1rpkm399 0.29	1,74	1	49.616
91	Phospholipase B-like protein	Aspsy149833 fgenesh1_kg.13 _#_288_#_Locus2134v1rpkm 84.68	1,62	1	66.508
92	RING finger	Aspsy1780439 CE565401_30 465	5,06	1	18.571
93	Putative HEAT repeat protein	Aspsy1 88917 gm1.5600_g	0,54	1	294.32 6
94	Hypothetical protein	Aspsy1 50857 fgenesh1_kg.16_#_73_ #_Locus2354v1rpkm76.39	3,62	1	45.247
95	Endo-beta-1,4- glucanase	Aspsy1 91734 gm1.8417_g	8,84	2	36.097
96	6- phosphogluconolactonase	Aspsy1139272 e_gw1.1.30.1	4,72	1	44.99
97	Extracellular salicylate hydroxylase/monooxygen ase	Aspsy140629 fgenesh1_kg.2_ #_409_#_Locus4508v1rpkm3 0.81	4,03	1	51.459
98	Pectate lyase superfamily protein	Aspsy1 86545 gm1.3228_g	1,86	1	97.136
99	ATP synthase	Aspsy184820 gm1.1503_g	2,12	1	55.384
100	Zn 2cys6 transcription factor	Aspsy161745 fgenesh1_pm.15 _#_80	2,37	1	75.907

101	Putative Cytochrome P450	Aspsy1210517 estExt_Genewi se1Plus.C_13_t20262	2,77	1	62.001
102	Putative beta-1,6-glucan boisynthesis protein	Aspsy1 89172 gm1.5855_g	7,89	1	16.253
103	Hypothetical protein	Aspsy145658 fgenesh1_kg.5_ #_942_#_Locus7576v1rpkm5. 96	21,34	2	17.329
104	Putative carboxypeptidase	Aspsy1357228 CE142190_30 159	4,20	2	68.476
105	Putative endopolygalacturonase	Aspsy1177453 estExt_Genewi se1.C_5_t20060	8,16	2	38.775
106	Clathrin heavy chain	Aspsy1163319 e_gw1.17.441. 1	1,97	1	190.45 1
107	CDK-activating kinase	Aspsy1141031 e_gw1.1.4112. 1	5,80	1	39.163
108	Putative Carbamoyl- phosphate synthase	Aspsy1143875 e_gw1.2.1606. 1	0,89	1	247.15 5
109	Hypothetical protein	Aspsy144731 fgenesh1_kg.5_ #_15_#_Locus4551v1rpkm30. 25	2,54	1	51.509
110	Hypothetical protein	Aspsy1140330 e_gw1.1.422.1	1,51	1	99.428
111	Putative Carboxypeptidase	Aspsy1208276 estExt_Genewi se1Plus.C_11_t10241	2,08	1	59.431
112	Hypothetical protein	Aspsy157545 fgenesh1_pm.4_ #_648	3,13	1	36.949
113	Putative E3 ubiquitin- protein ligase	Aspsy162705 fgenesh1_pm.19 _#_83	1,93	1	81.841
114	D-amino-acid oxidase	Aspsy1132292 estExt_Genem ark1.C_5_t10253	3,87	1	38.735
115	Hypothetical protein	Aspsy11048386 CE833348_1 487	2,72	1	61.762
116	Hypothetical protein	Aspsy1 124322 gw1.15.829.1	6,62	1	45.641
117	Putative eukaryotic translation initiation factor	Aspsy147935 fgenesh1_kg.9_ #_378_#_Locus5779v1rpkm1 7.34	6,27	1	45.432
118	C2H2 finger domain protein	Aspsy1 84440 gm1.1123_g	5,62	1	46.475
119	Hypothetical protein	Aspsy1162148 e_gw1.15.675. 1	12,37	3	42.293
120	Putative Alpha-amylase	Aspsy146796 fgenesh1_kg.7_ #_382_#_Locus2623v1rpkm6 7.15	3,45	1	50.35
121	Putative Aspartic proteinase	Aspsy1 56339 fgenesh1_pm.3_#_440	4,06	1	42.584
122	Putative endo beta 1,3 glucanase	Aspsy1 143606 e_gw1.2.1121.1	1,58	1	94.616
123	Beta-lactamase-like protein	Aspsy146545 fgenesh1_kg.7_ #_131_#_Locus1950v2rpkm7 2.32	3,88	1	45.497
124	Pectate lyase	Aspsy1152918 e_gw1.6.1066.	3,13	1	34.209
125	Putative Oxoglutarate dehydrogenase	Aspsy143911 fgenesh1_kg.4_ #_313_#_Locus850v1rpkm21 9.34	1,90	1	$\frac{118.19}{3}$
126	Probable glucan 1,3-beta- glucosidase	Aspsy1131960 estExt_Genem ark1.C_4_t20318	2,90	1	45.259

127	Putative DUF1237 domain protein	Aspsy1373657 CE158619_12 145	13,27	5	59.255
128	Putative Mannan endo- 1,4-beta-mannosidase	Aspsy1 91697 gm1.8380_g	14,80	4	44.374
129	Putative Citrate synthase	Aspsy1157314 e_gw1.10.452. 1	12,83	4	50.746
130	Glycerophosphoryl diester Phosphodiesterase	Aspsy155322 fgenesh1_pm.2_ #_644	10,46	3	45.404
131	Hypothetical protein	Aspsy129969 fgenesh1_pg.3_ #_1131	7,41	2	46.348
132	Hypothetical protein	Aspsy145086 fgenesh1_kg.5_ #_370_#_Locus385v1rpkm50 5.42	14,29	1	17.004
133	Phosphoesterase superfamily protein	Aspsy1153270 e_gw1.6.587.1	5,29	1	50.106
134	Mannosyl- oligosaccharide alpha- 1,2-mannosidase	Aspsy1674804 CE459766_10 412	3,19	1	56.177
135	Putative 1,4-beta-D- glucan cellobiohydrolase	Aspsy159707 fgenesh1_pm.9_ #_81	4,11	1	49.162
136	Probable glucan endo- 1,6-beta-glucosidase	Aspsy1 88712 gm1.5395_g	5,39	1	46.008
137	3-ketoacyl-CoA thiolase	Aspsy144848 fgenesh1_kg.5_ #_132_#_Locus3590v1rpkm4 4.41	2,85	1	44.088
138	Pectin lyase	Aspsy1138350 e_gw1.1.1833.	3,95	1	39.766
139	Pigment biosynthesis protein	Aspsy1152224 e_gw1.5.939.1	2,09	1	64.196
140	Putative myo-inositol- phosphate synthase	Aspsy1 90296 gm1.6979_g	3,56	1	58.165
141	Putative Endo-1,4-beta- mannosidase	Aspsy143475 fgenesh1_kg.3_ #_1469_#_Locus8065v1rpkm 4.47	2,81	1	42.439
142	Tubulin alpha-1 chain	Aspsy153182 fgenesh1_pm.1_ #_225	2,24	1	49.829
143	Putative Gamma- glutamyltranspeptidase	Aspsy130623 fgenesh1_pg.4_ #_466	1,51	1	117.35 8
144	Maltase glucoamylase	Aspsy178132 estExt_fgenesh1 _pm.C_4_t10424	1,47	1	106.63 6
145	1,4-beta-D-glucan- cellobiohydrolyase	Aspsy141148 fgenesh1_kg.2_ #_928_#_Locus359v1rpkm53 1.30	2,21	1	48.633
146	Cell wall mannoprotein	Aspsy1 105623 gw1.11.282.1	8,20	1	12.443
147	Hypothetical protein	Aspsy1144698 e_gw1.2.3108.	3,74	1	34.83
148	Putative AP-3 complex	Aspsy143988 fgenesh1_kg.4_ #_390_#_Locus4446v1rpkm3 1.57	8,15	1	19.789
149	Formamidase	Aspsy11095985 CE880947_1 1946	2,92	1	45.05
150	Catalase-peroxidase	Aspsy185307 gm1.1990_g	3,11	2	82.018
151	Putative Ras guanine- nucleotide exchange protein	Aspsy162284 fgenesh1_pm.17 _#_72	1,02	1	131.43
152	5- methyltetrahydropteroyltr iglutamate-homocysteine methyltransferase	Aspsy1147181 e_gw1.3.1152. 1	2,04	1	44.403
-----	---	--	-------	---	-------------
153	Putative 1,4-beta-D- glucan cellobiohydrolase	Aspsy137937 fgenesh1_kg.1_ #_173_#_Locus6178v1rpkm1 4.05	2,22	1	42.811
154	Histone	Aspsy1143421 e_gw1.2.2731.	5,15	1	15.323
155	GPI anchored dioxygenase	Aspsy135772 fgenesh1_pg.14 _#_231	3,56	1	42.607
156	Peptidase aspartic	Aspsy147980 fgenesh1_kg.9_ #_423_#_Locus14181v1rpkm 0.59	2,20	1	49.016
157	Uracil-DNA glycosylase	Aspsy145748 fgenesh1_kg.6_ #_22_#_Locus2499v1rpkm71. 41	3,18	1	41.332
158	GPI anchored cell wall protein	Aspsy1283126 CE68088_687 3	2,79	1	54.604
159	Putative Carboxypeptidase	Aspsy155870 fgenesh1_pm.2_ #_1192	2,24	1	64.268
160	Mannan endo-1,4-beta- mannosidase	Aspsy158369 fgenesh1_pm.5_ #_664	19,20	5	45.138
161	Probable aspartic-type endopeptidase	Aspsy1188999 estExt_Genewi se1.C_190004	7,23	2	51.588
162	Probable Xaa-Pro aminopeptidase	Aspsy131089 fgenesh1_pg.5_ #_14	4,52	2	51.789
163	Putative Aminopeptidase	Aspsy1917823 CE702785_82 557	9,15	1	54.149
164	Alpha/beta hydrolase family protein	Aspsy1362100 CE147062_10 201	3,70	1	47.553
165	Putative Acid phosphatase	Aspsy1149151 e_gw1.4.919.1	3,47	1	45.028
166	GDSL lipase/acylhydrolase family protein	Aspsy1153371 e_gw1.6.1260. 1	3,97	1	38.984
167	Glycoside hydrolase family 5 protein	Aspsy1153804 e_gw1.7.523.1	2,60	1	49.258
168	Putative FAD binding domain protein	Aspsy1141875 e_gw1.1.1098. 1	2,20	1	53.672
169	Putative oxidoreductase	Aspsy156008 fgenesh1_pm.3_ #_109	1,94	1	78.549
170	Pre-mRNA-splicing factor	Aspsy179166 estExt_fgenesh1 _pm.C_60067	1,62	1	146.65 2
171	PLC-like phosphodiesterase	Aspsy1139158 e_gw1.1.2428. 1	4,35	1	50.025
172	Bestrophin-like	Aspsy154771 fgenesh1_pm.2_ #_93	5,62	1	45.307
173	Hypothetical protein	Aspsy126069 fgenesh1_pg.1_ #_733	3,44	1	58.875
174	Stress protein	Aspsy195199 gm1.11882_g	3,02	1	39.559
175	Short-chain dehydrogenase	Aspsy1155841 e_gw1.8.53.1	4,00	1	27.343
176	Hypothetical protein	Aspsy144491 fgenesh1_kg.4_ #_893_#_Locus11951v1rpkm 1.02	21,74	1	10.396

177	Amine oxidase	Aspsy1157578 e_gw1.10.186. 1	15,21	5	59.945
178	FAD/FMN-containing dehydrogenase	Aspsy191516 gm1.8199_g	5,57	2	61.999
179	Phospholipase	Aspsy1157917 e_gw1.11.540. 1	2,08	1	69.771
180	Putative Endo-beta-1,4- glucanase	Aspsy156848 fgenesh1_pm.3_ #_949	4,44	1	47.337
181	Putative beta- glucuronidase	Aspsy1342693 CE127655_38 199	20,36	10	68.348
182	FAD/FMN-containing isoamyl alcohol oxidase	Aspsy194331 gm1.11014_g	6,61	3	60.589
183	Putative Amidase	Aspsy159884 fgenesh1_pm.9_ #_258	2,69	1	60.336
184	Histidine phosphatase superfamily	Aspsy142929 fgenesh1_kg.3_ #_923_#_Locus6032v1rpkm1 5.23	2,40	1	58.99
185	Putative glucose oxidase	Aspsy1145638 e_gw1.2.3341. 1	2,31	1	65.442
186	Putative hydrolase	Aspsy1 92685 gm1.9368_g	2,08	1	51.498
187	Putative Lysophospholipase	Aspsy1138722 e_gw1.1.273.1	2,22	1	67.722
188	Histone	Aspsy1199586 estExt_Genewi se1Plus.C_3_t50251	5,30	1	13.971
189	Histone	Aspsy11147256 CE932218_3 1879	5,07	1	14.847

Anhang VI: Enzyme des Pilzisolates Fsh102 induziert mit Xylan.

Tabelle 23: Enzyme des Pilzisolates Fsh102 induziert mit Xylan. Die Identifikation der Enzyme erfolgtenach dem Zymogramm mit 1% Xylan (4.6.5) mittels Flüssigkeitschromatographie mitMassenspektrometrie-Kopplung (4.2.2). Die Annotation, Beschreibung, Deckungsgleichheit(Coverage [%]), Anzahl der Peptide (# Peptide) und das Molekulargewicht in kDa (MW [kDa]) wurdemit dem Genom des Pilzisolates A. sydowii CBS 593.65 (4.7.2) verglichen.

	Annotation	Beschreibung	Coverage	# Peptide	MW
		-	[%]	-	[kDa]
1	Actin	Aspsy151743 fgenesh1_kg.19_#_ 75 # Locus237v1rpkm814.15	9,07	2	41.63
2	Heat shock protein 90	Aspsy161916 fgenesh1_pm.15_# 251	2,00	1	79.52
3	Heat shock protein 70	Aspsy133431 fgenesh1_pg.9_#_3 9	2,49	1	69.76
4	Polyubiquitin	Aspsy153937 fgenesh1_pm.1_#_ 980	11,80	1	34.32
5	Putative ubiquitin-40S ribosomal protein	Aspsy1 87723 gm1.4406_g	5,84	1	17.62
6	Histone	Aspsy1118465 gw1.3.1613.1	9,78	1	10.19
7	Hypothetical protein	Aspsy142610 fgenesh1_kg.3_#_6 04_#_Locus415v1rpkm469.49	4,36	3	85.73
8	Putative Exo-1,4-beta- xylosidase	Aspsy1 84747 gm1.1430_g	4,59	2	84.49
9	Hypothetical protein	Aspsy128486 fgenesh1_pg.2_#_1 138	1,98	1	115.18
10	Hypothetical protein	Aspsy1203580 estExt_Genewise1 Plus.C_6_t10196	1,49	1	84.35
11	Hypothetical protein	Aspsy1152814 e_gw1.6.52.1	3,11	1	57.80
12	Actin	Aspsy151743 fgenesh1_kg.19_#_ 75_#_Locus237v1rpkm814.15	11,22	3	41.63
13	Heat shock protein 90	Aspsy161916 fgenesh1_pm.15_# _251	2,00	1	79.52
14	Putative Heat shock protein 70 chaperone	Aspsy139214 fgenesh1_kg.1_#_1 450_#_Locus444v1rpkm444.85	1,78	1	73.81
15	Putative Glucan endo- 1,3-beta-glucosidase	Aspsy1156803 e_gw1.9.955.1	4,38	2	47.72
16	Putative Endo-1,4- beta-xylanase	Aspsy163902 estExt_fgenesh1_pg .C_1_t20379	13,41	3	35.43
17	Putative Glucan endo- 1,3-beta-glucosidase	Aspsy1156803 e_gw1.9.955.1	2,51	1	47.72
18	Hypothetical protein	Aspsy155895 fgenesh1_pm.2_#_ 1217	3,68	1	44.03
19	Putative Endo-1,4- beta-xylanase	Aspsy1168372 estExt_Genewise1 .C_1_t60491	15,00	2	23.52
20	Putative aldehyde dehydrogenase	Aspsy136479 fgenesh1_pg.16_#_ 248	3,98	1	54.46
21	Putative transcription factor	Aspsy131982 fgenesh1_pg.6_#_9 0	1,96	1	105.71
22	Mediator of RNA polymerase II	Aspsy1576851 CE361813_11644	4,95	1	34.85
23	Hypothetical protein	Aspsy1203580 estExt_Genewise1 Plus.C_6_t10196	1,49	1	84.35
24	Hypothetical protein	Aspsy1 55895 fgenesh1_pm.2_#_1217	3,68	1	44.03

Anhang VII: Aminosäuresequenzen der untersuchten Cellulasen (Endo1, Endo2, Exo1,

Exo2) und Xylanasen (Xylanase I und Xylanase II)

Tabelle 24: Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit untersuchten Gene der Cellulasen und Xylanasen. Die Sequenzen, die für die Klonierung und Expression verwendeten Gene Endol, Endo2, Exo1, Exo2, Xylanase I, Xylanase II wurden von dem Pilzisolat *A. sydowii* CBS 593.65 von JGI (4.7.2) verwendet. Die grau hinterlegten Aminosäuren markieren das Signalpeptid (4.7.2). Die rot markierten Aminosäuren zeigen die N-Glykosylierungsstellen. Die grün markierten Aminosäuren zeigen die O-Glykosylierungsstellen 4.7.2).

Enzym	Aminosäuresequenz
Endo1 (jgi Aspsy1 91872 gm 1.8417_g)	MKLNPLFVAFAAGTALAAPRHQKRATFEFFGVNESGAEFGEDNLPG VYGTDYIFPDPDTISTLISDGFNIFRIQFKMERLTPEITGAFDDAYLKN LTSAIKSVTSAGATAILDPHNYGRFNNEIMSTPADFQTWWKNVATEF ADNTNIIFDTNNEYHEMDQELVLNLNQAAIDGIRAAGATSQYIFVEG NSWSGAWTWVDVNDNLKALTDPQDKIVYEMHQYLDSDGSGTSET CVSTTIGSERVADATQWLKDNGKIGIIGEFAGGNNDQCRTAIEGMLD ALKADSDVWLGALWWAAGPWWADYIYSIEPPSGVAYTGMLDTLK PYLG
Endo2 (jgi Aspsy1 56986 fge nesh1_pm.3_#_949)	MAPILSTLSLALTGLPLLSLAQQIGTPENRPLLTTWHCTTRNGCSKQD TSVVLDAATHSIHALDDPSTSCTISSGSLDPTLCPDKETCASNCVIDGI TDYAAHGVETKGGVLKLTQYKNVNGTLNSVSPRVYLLSESNQTSGA NAGAEKYTAPSLLNQEFTFTVDVSALPCGMNGALYLSEMSLTGGRS SELNPAGASYGTGYCDAQCYVTPWINGAANVAENGACCNEMDIWE ANSRATGLTPHPCIYNGGTGSVEEGVYECTNDEECNGPTGENDSVC DKWGCGFNPYALGAKDYYGRGSSGFEVDTTAPFTVVTQFRTDDNT TTGALAEIRRLYIQGGKVIQNAVVTAGNSQADSLTDSLCDVTSSWY AGFGGMERMGEALGRGMVLAMSIWNDAGEYMQWLDGEDSGPCN ATEGAPAFIEAHTPGTSVTFSNLRWGDIGSTFRGTE
Exo1 (jgi Aspsy1 59845 fge nesh1_pm.9_#_81)	MYQRALLFSALLSVSRAQQAGTLQEETHPALTWQRCEASGTCTEVS GSVVLDSNWRWAHSVDDSTNCYTGNEWDATLCPDNEACATNCAV DGADYEGTYGITSTGDALTLKFVTGENVGSRVYLMEDDETYQTFDL LNNEFTFDVDVSNLPCGLNGALYFTSMDPDGGMSKYENNKAGAKY GTGYCDSQCPRDIKFINGLANVEGWEPSDSDANAGVGGMGTCCPE MDIWEANSISSAYTPHPCDDIEQTMCEGDACGGTYSAERYAGTCDP DGCDFNSYRMGNESFYGPGGLVDTSSKMTVVTQFIADGGSLSEIKRF YVQNGNVIANSASNIDGVEGNSITSDFCTAQKTAFGDDDIFAEHGGL SAMGDASSAMVLILSIWDDHYASMMWLDSSYPEDADPSTPGVARG ICENGAGDPSIVETEHADASVTFSNIKFGPIGSTFDSAGIGSGSNSTTR RF
Exo2 (jgi Aspsy1 41148 fge nesh1_kg.2_#_928_#_ Locus359v1rpkm531. 30)	MYKALLFSSILTAVQAQKVGTQQAEDHPSLTWQTCNSGGSCTTVNG EVVIDANWWLHTVDGYTNCY GODWDTSICTSNEVCAEQCALDGA QYSSTYGITTSGSSLRLNFVTQSQQKNIGSRLYLMDDEDTYTMFHLL NREFTFDVDVSELPCGLNGAVYFVSMDADGGVSRYPTNEAGAKYG TGYCDSQCPRDLKFINGQANVEGWEPSATNPNAGVGGHGSCCAEM DIWEANSISTAYTPHPCDTPGQTICSGDSCGGTYSGDRYGGTCDPDG CDFNPYRQGNKTFYGPGMTIDTNIPLTLVTQFITADGTDTGALSEIKR FYVQNGKTIPNSESTWSGNAGNSITTPFCESQKELFGDQDSFSAHGG LAGMGAALEQGMVLVLSLWDDSYANMLWLDSNYPVDADPSQPGI ARGTCPTSSGKPDEVEAOHPNAYVVYSNIKFGPIGSTF

Xylanase I (jgi Aspsy1168372 est Ext_Genewise1.C_1_t 60491)	MVSLSALLFACTTAIGVFAAPKPSEESSLIERSTPSTGWHNGYYYSF WTDGGGDVTYTNGGGGSYSVQWSNVGNFVGGKGWNPGSTRSISYS GTFNPSGNGYLAVYGWTQNPLIEYYIVESYGTYNPGSGGTYRGTVSS DGGTYDIYTAVRYNAPSIEGTATFTQFWSVRQSKRTSGSVNTANHFQ AWARLGMSLGTHNYQIVATEGYQSSGSASITVY
Xylanase II (jgi Aspsy1 63902 est Ext_fgenesh1_pg.C_1 _t20379)	MVYLKSLAGGALFATIASSAAVLPRQSTSLNDAFVAAGKSYFGTCS DQALLQNSENEAVLNAQFGALTPENSMKWDSIEPSQGSFSWSGADF LVDYATENNKLIRGHTLVWHSQLPSWVSSISDKTELQSVMENHISEV MGRYKGKIFHWDVVNEIFEEDGSFRSSVFYNVLGEDFVRIAFEAARA ADPDAKLYINDYNLDSASYAKTQAMVDNVSKWLEAGVPIDGIGSQ GHYSASHWSSSEAPAALAALAGTGVSEVAITELDIAGAASADYLNLL NACLDEEKCVGITVWGVSDKDSWRSELTPLLFNSSYQAKDAYNAII DALA

Anhang VIII: Verifizierung der Enzyme Xylanase I und Xylanase II mittels Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie – Kopplung (LC/MS-MS)

overage ProteinCard													
unbekannt OS=unbe strain GN=yes PE=	2 SV=1												
Annotate PTMs reported in Uniprot	1	21	41	61	81	101	121	141	161	181	201	221	:
Show only PTMs													
Include PSMs that are Filtered Out													
overage: 47.68%													
ound Modifications:	Sequence	Modification List											
			1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	
	111111		1 MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MASMTGGOOM	GRDPNSAPKP	SEESSLIERS	TPSSTGWHNG	YYYSFWIDGG	GDVTYTNGGO	G GSYSVQWSN	U GNEVGGKGWN	
	111111	1	01 PGSTRSISYS	GIFNPSGNGY	LAVYGWIQNP	LIEYYIVESY	GTYNPGSGGT	YRGTVSSDGG	TYDIYTAVRY	NAPSIEGTA	T FTOFWSVROS	S KRTSGSVNTA	
	and the second second		and the second se	Contract Contractory of the									
	111111	2	01 NHFQAWARLG	MSLGTHNYQI	VATEGYQSSG	SASITVY							
verage ProteinCard	111111	2	01 NHFQAWARLG	MSLGTHNYQI	VATEGYQSSG	SASITVY							
verage ProteinCard ibekannt OS=unbe strain GN=yes PE=	-2 SV=1	2	01 NHPQAWARLG	MSLGTHNYQI	VATEGYQSSG	SASITVY							
verage ProteinCand bekannt OS-unbe strain GN-yes PE-] Annotate PTMs reported in Uniprot	-2 SV=1	2	01 NHFQAWARLG	MSLGTHNYQI 101	VATEGYQSSG	SASITVY 151		201		251		301	
verage ProteinCard bekannt OS-unbe strain GN-yes PE- Annotate PTMs reported in Uniprot Show only PTMs	2 SV=1	2	51	MSLGTHNYQI 101	VATEGYQSSG	SASITVY 151		201		251		301	
verage ProteinCard nbekannt OS-unbe strain GN-yes PE- Annotate PTMs reported in Uniprot Show only PTMs Include PSMs that are Fittered Out	-2 SV=1	2	51	MSLGTHNYQI 101	VATEGYQSSG	151		201		251		301	
verage ProteinCard nbekannt OS-unbe strain GN-yes PE- Annotate PTMs reported in Uniprot Show only PTMs Include PSMs that are Fittered Out overage: 48.83%	111111 -2 SV=1	2	51	101	VATEGYQSSG	151		201		251		301	
verage ProteinCard hbekannt OS-unbe strain GN-yes PE- Annotate PTMs reported in Uniprot Show only PTMs Include PSMs that are Filtered Out overage: 48.83% ound Modifications:	2 SV=1	2 Modification List	51	101	VATEGYQSSG	151		201		251		301	:
verage ProteinCard hbekannt OS-unbe strain GN-yes PE- Annotate PTMs reported in Uniprot Show only PTMs Include PSMs that are Filtered Out overage: 48.83% ound Modifications:	111111 2 SV=1 1 Sequence 222222	2 Modification List	51 1 MARCAMARLG	MSLGTHNYQI 101 11 SSGLVPRQSH	21 MASHTGOOGH	151 31 GRUDNSLPRQ	41. STSLNDAFVA	201	61 DQALLQINSEN	251 71 EAVUNOFGA	81 LTPENSAGOID	301 91 SIEPSQOSFS	
Verage ProteinCard nbekannt OS-unbe strain GN-yea PE- 2 Annotate PTMs reported in Uniprot 3 Show only PTMs include PSMs that are Filtered Out ioverage: 48.83% iound Modifications:	2 SV=1	2 Modification List	51	101 101 SSGLVPRGSH ATENNKLIRG	21 MASHTGOODH HTUWHSOLP	151 31 GRDPHSLPRQ SWYSSISOKT	41 STSLEDAFVA ELQSVJENHI	201 51 AGKSYFOTCS SKVAGRYKGK	61 DQALLQNSEN IFHMDVVNEI	251 71 EAVUNAOFGA FREDOSFRES	81 LTPENSIGND VFYNVLGEDF	301 91 SIEPSQOSTS VELAFEAARA	
overage ProteinCard unbekannt OS-unbe strain GN-yes PE- 2 Annotate PTMs reported in Uniprot 3 Show only PTMs 1 Include PSMs that are Filtered Out Coverage: 48.83% Found Modifications:	2 SV=1	2 Modification List	51 1 MGSHRHHHH 1 MGSHRHHHHH 1 MGSHRHHHHH 1 MGSHRHHHHH 1 MGSHRHHHHH 1 MGSHRHHHHH 1 MGSHRHHHH 1 MGSHRHHHH 1 MGSHRHHHH 1 MGSHRHHHH 1 MGSHRHHHH 1 MGSHRHHHH 1 MGSHRHHHH 1 MGSHRHHH 1 MGSHRHH 1 MGSHRHH 1 MGSHRHHH 1 MGSHRHH 1 MGSHRH 1 MGSHR	101 11 SSGLVPRGSH ATEINIKLING	21 MASHTGOOM HTLVMISSUP	151 151 swyssisokt rwissisokt	41 STSLNDAFVA ELQSVARNHI CISQQHYSD	201 51 AGKBYEGTCS SEVARAYKGK SETARSSEAPA	61 DQALQNSEN IFHOVVNEI ALAALAGIOV	251 71 EAVLINGFGA FEEDOSFRSS SEVAITELDI	81 LITPENSMGCHD VFYNVLGEDF AGAASADYIN	301 91 SIEPSGOFFS VZIAFEARA	

Abbildung 30: Verifizierung der A) Xylanase I und der B) Xylanase II mittels Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS-MS). A) Die Übereinstimmung (Coverage %) der Aminosäurensequenz der gereinigten Xylanase I beträgt 47,68%. B) Die Übereinstimmung (Coverage %) der Aminosäuresequenz der Xylanase II beträgt 48,83%. Die grünen Bereiche zeigen die gefunden Aminosäuren an, die gelben Bereiche zeigen die Aminosäuren an, die nicht gefunden wurden. Anhang IX: Proteingehalt, Volumen und Enzymaktivität der Reinigung von Xylanase I und

Xylanase II über Affinitätschromatographie

Tabelle 25: Proteingehalt, Volumen und Enzymaktivität der Reinigung von Xylanase I mittels Affinitätschromatographie. Die Proteinmenge in Relation zum Volumen (mg/ml), Die totale Proteinmenge (mg), die das totale Volumen (mL), die Aktivität (U), die spezifische Aktivität (U/mg), der Reinigungsquotient (*fold*) sowie die Ausbeute (%) sind für jeden Reinigungsschritt aufgeführt. Die Reinigung wurde in Triplikaten durchgeführt.

	Protein (mg/ml)	Protein (mg)	Volumen (ml)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg)	Reinigung (fold)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	2,12 ± 0,23	17,49 ± 1,92	8,25	580,36 ± 35,16	33,70 ± 4,81	1	100
Durchfluss	1,61 ± 0,19	13,32 ± 1,56	8,25	158,79 ± 11,26	12,04 ± 1,28	$0,36\pm0,05$	27,58 ± 3,55
Waschschritt	0,12 ± 0,04	$\begin{array}{c} 0,90 \pm \\ 0,32 \end{array}$	7,5	47,49 ± 2,99	59,15 ± 18,24	1,71 ± 0,33	8,18 ± 0,20
Elution 1	$0,32 \pm 0,03$	$\begin{array}{c} 1,78 \pm \\ 0,18 \end{array}$	5,5	$315,13 \pm 30,73$	181,14 ± 37,76	$5,\!41 \pm 0,\!94$	$54,\!48\pm6,\!07$
Elution 2	0,01 ± 0,01	0,08 ± 0,01	7,5	9,35 ± 0,50	$121,20 \pm 9,93$	$3,65 \pm 0,42$	$1,62 \pm 0,14$
Σ		16,07		530,76 ± 45,47			91,86 ± 8.50

Tabelle 26: Proteingehalt, Volumen und Enzymaktivität der Reinigung von Xylanase II mittels Affinitätschromatographie. Die Proteinmenge in Relation zum Volumen (mg/ml), Die totale Proteinmenge (mg), die das totale Volumen (mL), die Aktivität (U), die spezifische Aktivität (U/mg), der Reinigungsquotient (*fold*) sowie die Ausbeute (%) sind für jeden Reinigungsschritt aufgeführt. Die Reinigung wurde in Triplikaten durchgeführt.

	Protein (mg/ml)	Protein (mg)	Volume (ml)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg)	Reinigung (fold)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	4,33 ± 0,55	35,74 ± 4,56	8,25	2029,12 ± 192,85	57,09 ± 3,27	1	100
Durchfluss	3,05 ± 0,71	25,17 ± 5,84	8,25	843,44 ± 204,96	33,40 ± 0,54	$0,59 \pm 0,04$	40,97 ± 6,91
Waschschritt	$0,61 \pm 0,08$	$\begin{array}{c} 4,56 \pm \\ 0,57 \end{array}$	7,5	366,07 ± 16,88	81,41 ± 9,29	$1,\!42 \pm 0,\!09$	$18,14 \pm 1,17$
Elution 1	$02,07 \pm 0,62$	5,19 ± 1,54	2,5	542,77 ± 146,40	$106,08 \pm 15,94$	$1,96 \pm 0,28$	$27,\!23\pm8,\!51$
Elution 2	$\begin{array}{c} 0,02 \pm \\ 0,00 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0,18 \pm \\ 0,04 \end{array}$	7,5	21,75 ± 3,34	$121,51 \pm 10,89$	$2,\!13\pm0,\!17$	$1,08 \pm 0,16$
Σ		35,09 ± 7,99		1774,03 ± 371,58			87,42 ± 4,53

Anhang X: CAZyme Analyse der Pilzisolate FW16.1 und FW57

Tabelle 27: CAZyme Analyse der Pilzisolate FW16.1 (F. solani) und FW57 (H. fuscoatra). Die CAZyme
Analyse (4.2.5) wurde am DSMZ Braunschweig von Dr. Richard L. Hahnke durchgeführt. Dabe
wurden die durch die de novo Sequenzierung entstandenen kodierten Regionen (CDS) mit der CAZyme
Datenbank [Cantarel et al. 2009; Lombard et al. 2014] verglichen.

CAZyme Familien	FW16.1 (F. solani)	FW57 (H. fuscoatra)
GH1	9	2
GH2	11	8
GH3	36	18
GH4	0	0
GH5	16	11
GH6	0	2
GH7	1	9
GH9	0	0
GH10	2	8
GH11	2	8
GH12	5	3
GH13	8	11
GH15	1	2
GH16	21	14
GH17	6	3
GH18	13	13
GH19	0	0
GH20	2	1
GH23	0	0
GH24	2	2
GH25	0	0
GH26	0	0
GH27	2	2
GH28	10	3
GH29	0	0
GH30	0	3
GH31	9	6
GH32	4	1
GH33	2	0
GH35	7	3
GH36	3	1
GH37	2	2
GH38	1	1
GH39	2	0
GH42	0	0
GH43	41	23
GH45	0	1
GH46	0	0
GH47	11	9
GH49	1	1
GH51	4	2
GH53	1	1
GH54	0	0

GH55	3	1	8
GH62	2		3
GH63	1		1
GH64	2		1
GH65	0		0
GH67	0		1
GH71	4		6
GH72	2		4
GH73	0		0
GH74	1		1
GH75	2		2
GH76	8	1	1
GH78	16		6
GH79	4		6
GH81	1		2
GH84	0		0
GH85	ů 0		0
GH88	5		1
GH89	0		0
GH92	0		3
GH93	4		3
GH94	- 0		1
GH95	3		1 2
GH97	0		∠ ∩
GH105	4		1
GH105	4		1
GH100	1		0
CH114	4		1
GH114 CH115	4		1
CH125	2 2		2 2
CH127	2		5 0
GH12/	3		0
GH128 CH120	4		3 0
GH150	0		0
GH131	1		3
GH132	2		2
GH134	1		1
GH135	2		2
GH0	2		2
GH2;CBM35	0		0
GH5;CBM1	3		4
GH5;CBM2;CBM63	0		0
GH5;CBM63	1		0
GH6;CBM1	1		2
GH7;CBM1	2		3
GH10;CBM1	1		8
GH11;CBM1	1		3
GH12;CBM1	0		0
GH13;GT5	0		0
GH13;CBM20	0		1
GH13;CBM48	1		1

GH15;CBM20	1	2
GH16;CBM1	0	1
GH16;CBM13	0	0
GH16;CBM18	1	1
GH16;CBM18;CBM18	0	0
GH16;CBM6	0	0
GH18;CBM1	0	0
GH18;CBM18	4	3
GH18;CBM18;CBM18	1	3
GH18;CBM18;CBM50	4	4
GH18;CBM19	0	0
GH18;CBM50	0	2
GH20;CBM32;CBM32	0	0
GH25;CBM50	0	0
GH26;CBM35	0	1
GH27;CBM13	0	0
GH27:CBM35	1	0
GH28;CBM1	0	1
GH30:CBM1	0	0
GH31:DAA35002.1	0	0
GH31:GH18	0	0
GH32:CBM38	1	2
GH35:CBM32	0	0
GH43:CBM35	0	0
GH43:CBM1	0	0
GH43:CBM1:CBM6	0	0
GH43:CBM35	3	2
GH43·CBM42	0	- 1
GH43:CBM6	0	1
GH43:CBM66	0	0
GH45:CBM1	1	1
GH46 [·] CBM13	0	0
GH54·CBM13	0	0
GH54:CBM42	1	1
GH55:CBM13	0	0
GH55:CBM50	0	0
GH62:CBM1	0	2
GH62:CBM13	0	0
GH71:CBM24	0	3
GH71:CBM24:CBM24	2	0
GH72:CBM43	1	1
GH73:CBM50	0	1
GH74:CBM1	0	0
GH75:CBM13	1	0
GH07:CPM13	0	0
GH07·CBM51	0	0
GH02-CPM66	0	0
GH02-CPM12-CPM12	0	0
CH121.CPM1	0	0
GE1	0	l
CEI	1	6

CE2	1	0
CE3	7	5
CE4	5	5
CE5	7	6
CE6	18	5
CE8	3	1
CE9	2	1
CE12	2	2
CE15	0	3
CE16	6	1
CE0	2	4
CE1;CBM1	0	6
CE1:CBM2	0	1
CE2:CBM1	0	1
CE3:CBM1	0	1
CE4:CBM18	0	0
CE4:CBM18:CBM18	2	2
CE4:CBM50	0	1
CE5:CBM1	0	2
CE15:CBM1	0	2
CE16;CBM1	0	1
PI 1	12	5
DI 3	12	2
DI A	5	2 1
FL4 DL7	5	4
PL/	1	1
PL0	0	0
PL9	1	1
PLII DL14	1	0
PL14	0	0
PL20	1	1
PLI;CBMI	2	0
PL1;CBM35	0	0
PL3;CBM1	1	0
AAI	15	16
AA2	4	3
AA3	36	27
AA4	6	7
AA5	6	24
AA5	0	0
AA6	1	1
AA7	47	25
AA8	3	7
AA9	10	30
AA9	0	0
AA11	5	5
AA12	1	4
AA13	0	0
AA0	8	2
AA3;CBM1	0	1
AA5;CBM32	1	0

AA3;AA8	0	0
AA5;CBM32	0	0
AA7;CBM18	0	0
AA9;CBM1	2	6
AA9;CBM18	1	0
AA10;CBM2	0	0
AA10;CBM12	0	0
AA13;CBM20	1	1
CBM18	0	0
CBM21	0	0
CBM50	0	0
CBM63	0	0
GT1	18	7
GT2	9	8
GT3	1	1
GT4	7	7
GT8	6	2
GT15	5	4
GT17	1	1
GT18	0	0
GT20	3	3
GT21	1	1
GT22	4	4
GT24	1	1
GT25	0	2
GT31	0	1
GT32	7	5
GT33	1	1
GT34	2	2
GT35	1	1
GT39	3	3
GT41	3	4
GT47	0	0
GT48	2	1
GT50	1	1
GT51	0	0
GT55	0	1
GT57	2	2
GT58	1	1
GT59	1	1
GT62	3	3
GT64	2	0
GT66	1	1
GT69	6	5
GT71	3	5
GT76	1	1
GT90	5	5
GT91	0	0
		-

Danksagung

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Schäfer, für die Möglichkeit meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen, für die wissenschaftliche Betreuung und die fachlichen Diskussionen, sowie für die Forschungsreisen nach Vietnam in Verbindung mit meinem Projekt.

Vielen Dank an Prof. Dr. Streit (Fachbereich Molekularbiologie und Biotechnologie, Universität Hamburg) für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein großer Dank geht an Dr. Thuat von Nguyen, mit dem ich zusammen das NEMBO Projekt startete und das erste Jahr meiner Promotion zusammenarbeiten durfte. Der Beginn dieses Projekts wäre ohne ihn undenkbar gewesen. Leider musste er zu früh gehen und konnte das Ende dieses Projekts nicht mehr miterleben.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Martin Gand (Lebensmittelchemie und Lebensmitteltechnologie, Universität Gießen) für die Übernahme des NEMBO Projekts als PostDoc. Ohne seine unermüdliche Geduld, seine motivierenden Worte, die wissenschaftlichen Diskussionen und die vielen beantworteten Fragen wäre diese Arbeit und das gesamte NEMBO Projekt nicht so erfolgreich beendet worden.

Vielen Dank Dr. Richard L. Hahnke (DSMZ Braunschweig, Hamburg, Deutschland) für die Berechnung des phylogenetischen Baumes, die CAZyme Analyse und für die Bereitschaft mir stetig Neues zu erklären.

Ein großer Dank geht an Dr. Bernhard Ellinger (IME Fraunhofer Institut, Hamburg) für die enzymatische Aktivitätsmessung im Flüssigkeitstest, die Kooperation innerhalb des NEMBO Projekts und die permanente Hilfsbereitschaft.

Vielen Dank an die Kuratoren des DSMZ Dr. Christiane Baschien und Dr. Andrey Yurkov für die Einlagerung der Stammsammlung aus Vietnam und für die tolle Zusammenarbeit.

Vielen Dank an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schlüter (Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) für die LC/MS-MS Messungen. Im Speziellen vielen Dank an Sönke Harder, der die Messungen der LC/MS-MS Analyse tätigte.

Vielen Dank Dr. Nicolas Schauer (Metabolomic Discoveries, Potsdam) für die Kooperation innerhalb des NEMBO Projekt.

Ein großer Dank geht an PD Dr. Cornelia Heinze (Molekulare Phytopathologie, Universität Hamburg) für die fachlichen Ratschläge und die Motivation in der letzten Phase dieser Arbeit.

Ein großer Dank geht an Dr. Marie R. Brandt für die Unterstützung vor allem im letzten Teil dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe der Molekularen Phytopathologie. Für die vielen beantworteten Fragen und die vielen kleinen Freuden während der Arbeit, in den Mittagspausen und nach Feierabend sowie für Pevestorf. Im speziellen möchte ich mich bedanken bei: Dr. Jörg Bormann, Dr. Ana Lilia Martínez-Rocha, Birgit Hadeler, Cathrin Kröger, Brigitte Doormann, Dr. Anika Glasenapp, Dr. Chien Hoàng, Michael Mentges, Dr. Christiane Blum und Tobias Hanak. Vielen Dank an alle Studenten und Ehemaligen.

Gunnar Baermann, vielen Dank für das was war und das was sein wird. Für fast vier Jahre Sport, Lachen und Unterstützung in jeglichen Lebensbereichen. Lewin Günther, Danke für das Joggen und die intensiven Gespräche. Danke Euch für die schöne Zeit.

Ein besonders großer Dank geht an meine Eltern Hjalmar S. und Ute Brandt, die mich immer unterstützt haben, ohne deren Rückhalt und motivierende Liebe ich nicht dort wäre wo ich bin.

Vielen Dank an meine lieben Freunde außerhalb des wissenschaftlichen Lebens – Christina, Paul, Franzi, Mara, Mikhele, Silvia, Sarah, die BioGeos. Vielen Dank Benny.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass die von mir vorliegende Dissertation mit dem Titel "Genomische, enzymatische und biotechnologische Charakterisierung einer Pilzsammlung aus Vietnam" eigenständig und ohne fremde und nicht erwähnte Hilfe geschrieben zu haben. Alle Quellen wurden vollständig angegeben. Ich versichere, dass diese Arbeit noch nicht veröffentlicht wurde und noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegt wurde. Die eingereichte schriftliche Verfassung entspricht dem auf dem elektronischem Speichermedium.

(Ort, Datum)

(Sophie C. Brandt)

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Brandt SC, Ellinger B, Nguyen TV, Thi QD, Nguyen GV, Baschien C, Yurkov A,
Hahnke RL, Schäfer W, Gand M: A unique fungal strain collection from Vietnam characterized for high performance degraders of bioecological important biopolymers and lipids. *PLoS ONE* (akzeptiert August 2018).

Lebenslauf

Sophie Charlotte Brandt

Geboren am 14. Juni 1988 in Lahnstein

<u>Schulbildung</u>	
1998 - 2005	Friedrich von Bodelschwingh Regionalschule Puderbach
	Abschluss: Mittlere Hochschulreife
2005 - 2007	Martin - Butzer - Gymnasium, Dierdorf
	Abschluss: Abitur (Allgemeine Hochschulreife)
<u>Studium</u>	
2007 - 2011	Studium der BioGeo-Analyse (Universität Trier)
	Abschluss: Bachelor of Science (B. Sc.)
	Bachelor of Science (2,6)
	Titel der Arbeit: Molekulare Biogeographie des Gebirgsmohrenfalters <i>Erebia epiphron</i> .
2011 - 2012	Studium der BioGeo-Analyse (Universität Trier)
	Master of Science
2012 - 2013	Studium der Genetik und Evolution (Universität Granada, Spanien)
	Abschluss: Master of Science (M. Sc.)
	Master of Science (1,3)
	Titel der Arbeit: Identification and sequential analysis of expression of the enzymes implied in the cycle of
	europaea L.).
Promotion	
2014 - 2018	Doktorarbeit im Fachbereich der Molekularen
	Phytopathologie (MIN Fakultät, Institut für
	Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie,
	Universität Hamburg)
	Titel der Arbeit: Genomische, enzymatische und biotechnologische Charakterisierung einer Pilzsammlung
	aus Vietnam.