

Technische Universität München

Lehrstuhl für Mikrobiologie

Charakterisierung der Enzymausstattung von *Clostridium stercorarium* für den vollständigen Abbau von Hemicellulosen

Jannis Keven Bröker

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Erwin Grill

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Wolfgang Liebl
2. Prof. Dr. Rudi F. Vogel

Die Dissertation wurde am 01.07.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 16.09.2019 angenommen.

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	III
II	Abbildungsverzeichnis	VIII
III	Tabellenverzeichnis	XII
IV	Abkürzungsverzeichnis	XV
V	Zusammenfassung	XVIII
VI	Abstract	XIX
VII	Publikationen	XX
1	Einleitung	1
1.1	Lignocellulose Biomasse: ein nachwachsender Rohstoff	1
1.1.1	Struktureller Aufbau lignocellulose Biomasse	2
1.1.2	Industrielle Nutzung lignocellulose Biomasse	6
1.2	Struktur, Hydrolyse und Isolierung hemicellulose Polysaccharide.....	8
1.2.1	Xylane	9
1.2.2	β -Glucane	11
1.2.3	Mannane	11
1.2.4	Xyloglucane	12
1.2.5	Hemicellulose-assoziierte Polysaccharide.....	13
1.2.6	Isolierung hemicellulose Polysaccharide	15
1.3	Mikrobielle Hydrolyse lignocellulose Biomasse	15
1.3.1	Enzymsysteme saccharolytischer Bakterien	16
1.3.2	Kohlenhydrataktive Enzyme (CAZymes)	17
1.3.3	Synergistische Hydrolyse von Polysacchariden.....	19
1.4	<i>Clostridium stercorarium</i>	19
1.5	Zielsetzung der Dissertation	21
2	Material und Methoden	23

2.1	Materialien, Nährmedien, Bakterienstämme und Substrate	23
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	23
2.1.2	Geräte und Software	24
2.1.3	Nährmedien und Medienzusätze	25
2.1.4	Bakterienstämme und Plasmide.....	28
2.1.5	Enzymsubstrate	28
2.2	Bioinformatische Methoden	31
2.2.1	<i>In silico</i> Klonierung.....	31
2.2.2	Berechnung von Signalpeptiden und Protein Parametern.....	31
2.2.3	Identifizierung von Protein-Modulen	31
2.3	Mikrobiologische Methoden	31
2.3.1	Kultivierung von <i>Clostridium stercorarium</i>	31
2.3.2	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	31
2.3.3	Bestimmung der optischen Dichte (OD ₆₀₀).....	32
2.3.4	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	32
2.3.5	Glycerin-Stocks von <i>E. coli</i> Stämmen.....	32
2.4	Gentechnische Methoden	32
2.4.1	Primer	32
2.4.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
2.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA	37
2.4.4	Spaltung von DNA (Restriktionsverdau).....	38
2.4.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	38
2.4.6	Aufreinigung von DNA	38
2.4.7	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	39
2.4.8	Klonierung mittels Gibson Assembly (Gibson, 2009)	39
2.4.9	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	39
2.4.10	DNA-Sequenzierung	40
2.5	Proteinbiochemische Methoden.....	40

2.5.1	Präparation sekretierter <i>C. stercorearium</i> Proteine	40
2.5.2	Proteinproduktion in <i>E. coli</i>	41
2.5.3	Native His ₆ -Affinitätsreinigung.....	41
2.5.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	43
2.5.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
2.5.6	Enzymatische Hydrolyse von Polysacchariden.....	46
2.5.7	Bestimmung der Enzymaktivität mit DNSA (Wood und Bhat, 1988)	47
2.5.8	Bestimmung der Enzymaktivität mit Xylose- und Arabinose-Assay.....	49
2.5.9	Bestimmung der pH- und Temperaturabhängigkeit von Enzymen.....	49
2.5.10	Thermische Inaktivierung von Enzymen	50
2.5.11	Bestimmung der Enzymaktivität mit <i>para</i> -Nitrophenyl-Glycosiden	50
2.5.12	Bestimmung der Produktspezifität	52
2.5.13	Bestimmung der Produktinhibition.....	52
2.5.14	Bestimmung der Enzymaktivität von Esterasen.....	53
2.6	Analytische Methoden	53
2.6.1	Dünnschichtchromatographie (DC).....	53
2.6.2	HPLC	55
2.6.3	HPAEC-PAD (Mechelke <i>et al.</i> , 2017a).....	56
2.6.4	Kohlenhydrat-Analyse von Polysacchariden	57
2.7	Präparation und Hydrolyse von Hemicellulose.....	58
2.7.1	Präparation von Hemicellulose aus Weizenstroh	58
2.7.2	Prototyp Hydrolyse von Hemicellulosepräparationen.....	60
3	Ergebnisse	62
3.1	Hemicellulolytische Aktivität sekretierter <i>C. stercorearium</i> Enzyme.....	62
3.2	Heterologe Produktion hemicellulolytischer <i>C. stercorearium</i> Enzyme	63
3.2.1	Auswahl hemicellulolytischer Glycosidhydrolasen und Kohlenhydratesterasen	63
3.2.2	Produktion der rekombinanten Enzyme in <i>E. coli</i>	64
3.3	Charakterisierung der <i>C. stercorearium</i> Glycosidhydrolasen	68

3.3.1	Hemicellulolytische Aktivität auf <i>p</i> NP-Glycosiden und Polysacchariden	68
3.3.2	Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von pH-Wert und Temperatur	76
3.3.3	Produktspezifität Xylan-hydrolysierender Glycosidhydrolasen	78
3.3.4	Thermische Inaktivierung Xylan-hydrolysierender Glycosidhydrolasen	80
3.3.5	Produktinhibition Xylan-hydrolysierender Glycosidhydrolasen.....	81
3.4	Charakterisierung der <i>C. stercorarium</i> Kohlenhydratesterasen.....	83
3.5	Hydrolyse von ausgewählten Polysacchariden mit Enzymkombinationen.....	85
3.5.1	Hydrolyse von Arabinan	86
3.5.2	Hydrolyse von 4- <i>O</i> -Methyl-Glucuronoxylan und Xylan aus Birken	87
3.5.3	Hydrolyse von Arabinoxylan aus Weizen	89
3.6	Hydrolyse von Hemicellulosepräparationen	95
3.6.1	Präparation von Hemicellulose aus Weizenstroh	96
3.6.2	Prototyp Hydrolyse der isolierten Hemicellulosepräparation.....	98
4	Diskussion.....	103
4.1	Hemicellulolytisches Potential von <i>C. stercorarium</i>	103
4.2	Hydrolyse von Arylglycosiden.....	106
4.3	Hydrolyse von verschiedenen Polysacchariden	107
4.3.1	Partielle und vollständige Hydrolyse von Xylanen	108
4.3.2	Hydrolyse von β -Glucanen	118
4.3.3	Hydrolyse von Mannan, Glucomannan und Galactomannan	119
4.3.4	Freisetzung von D-Galactose aus Xyloglucan.....	119
4.3.5	Hydrolyse von pektischem Arabinan und Galactan	120
4.4	Hydrolyse von Carbonsäureestern	121
4.5	Hydrolyse von deesterifizierter Hemicellulose aus Weizenstroh.....	123
4.6	Ausblick.....	126
5	Literaturverzeichnis.....	128
6	Anhang	139

6.1	Klonierung, Produktion und Reinigung rekombinanter <i>C. stercorarium</i> Enzyme	139
6.2	Referenzgeraden	143
6.3	Charakterisierung rekombinanter <i>C. stercorarium</i> Enzyme.....	146
6.4	Hydrolyse von ausgewählten Polysacchariden mit Enzymkombinationen.....	148
6.5	Präparation und Hydrolyse von Hemicellulosepräparationen.....	151
VIII	Eidesstattliche Erklärung.....	153
IX	Danksagung.....	154
X	Lebenslauf.....	155

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Struktur lignocellulosischer Biomasse.	4
Abbildung 1.2	Schematische Struktur von Glucuronoarabinoxylan mit Enzymaktivitäten für die Hydrolyse.....	9
Abbildung 1.3	Schematische Struktur von β -Glucan mit gemischten Bindungen mit Enzymaktivitäten für die Hydrolyse.....	11
Abbildung 1.4	Schematische Struktur von Galactoglucomannan mit Enzymaktivitäten für die Hydrolyse.....	11
Abbildung 1.5	Schematische Struktur von Xyloglucan (Typ XXXG) mit Enzymaktivitäten für die Hydrolyse.....	12
Abbildung 1.6	Schematische Struktur von (A) Arabinan und (B) Arabinogalactan mit Enzymaktivitäten für die Hydrolyse.....	14
Abbildung 2.1	Gleichläufiger Doppelschneckenextruder des Wolfson Centre for Materials Processing bei der Extrusion von Weizenstroh mit 6 % (w/v) NaOH zur Isolierung von Hemicellulose.	60
Abbildung 3.1	Relative Aktivität der sekretierten Enzyme von <i>C. stercorarium</i> kultiviert auf Haferspelzen Xylan (hellgrau) oder Cellulose (dunkelgrau).....	62
Abbildung 3.2	Schematische Struktur der <i>C. stercorarium</i> Glycosidhydrolasen (GH) und Kohlenhydratesterasen (CE) mit nachgewiesener Aktivität.....	67
Abbildung 3.3	Dünnschichtchromatographien (DC) hydrolytischer Produkte verschiedener Polysaccharide.	72
Abbildung 3.4	Relative Aktivität der charakterisierten Glycosidhydrolasen bei verschiedenen pH. pH-Aktivitätsprofile der (A) Xylanasen Xyn11A, Xyn10B, Xyn10C und Xyn10D, (B) Arabinose freisetzenden Enzyme.....	77
Abbildung 3.5	Relative Aktivität der charakterisierten Glycosidhydrolasen bei verschiedenen Temperaturen.	78
Abbildung 3.6	Hydrolyse von Arabinoxylan mit Xyn10B und Xyn11A analysiert mit HPAEC-PAD... ..	79
Abbildung 3.7	Hydrolyse von Arabinoxylan mit Arf51B und Axf43A analysiert mit (A) HPAEC-PAD und (B) Quantifizierung der freigesetzten Arabinose mit dem Arabinose Assay Kit (Megazyme).	80

Abbildung 3.8	Thermische Inaktivierung der Glycosidhydrolasen (A) Xyn10B, Xyn11A, Axx43A und (B) Bxl3B für 48 h bei 60 °C.	81
Abbildung 3.9	Produktinhibition der Glycosidhydrolasen Arf51B, Axx43A und Bxl3B durch (A) Arabinose und (B) Xylose.	82
Abbildung 3.10	Produktinhibition der Xylanasen Xyn10B und Xyn11A durch 50 g/l Xylose.	83
Abbildung 3.11	Enzymaktivität der Kohlenhydratesterasen Axe4A und Axe7B auf 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-D-xylopyranose (XTA) und β -D-Glucose-pentaacetat (GPA).	84
Abbildung 3.12	Hydrolyse von feruloylierten pNP- α -L-Arabinofuranosiden mit Axe7B und Arf51B.	85
Abbildung 3.13	Hydrolyse von Arabinan mit Abn43A, Arf51B, Axx43A, Arf43C und Kombinationen aus der Arabinanase Abn43A mit Arf51B, Axx43A oder Arf43C.	86
Abbildung 3.14	Synergistischer Effekt bei der Hydrolyse von Arabinan mit Abn43A und Arf51B.	87
Abbildung 3.15	Synergistischer Effekt bei der Hydrolyse von 4-O-Methyl-Glucuronoxylan und Xylan aus Birken mit Xyn11A und Bxl3B.	88
Abbildung 3.16	Hydrolyse von Arabinoxylan und ausgefälltem, unlöslichem Xylan.	90
Abbildung 3.17	Synergistischer Effekt bei der Hydrolyse von Arabinoxylan mit Kombinationen aus zwei der Enzyme Xyn10B, Xyn11A, Axx43A und Bxl3B.	91
Abbildung 3.18	Synergistischer Effekt bei der Hydrolyse von Arabinoxylan mit Xylanase, β -Xylosidase und Arabinoxylan-Arabinofuranohydrolase.	92
Abbildung 3.19	Hydrolytische Produkte der Hydrolyse von löslichem und unlöslichem Arabinoxylan analysiert mit HPAEC-PAD.	93
Abbildung 3.20	pH-vs-Temperatur-Aktivitätsprofil der Enzymkombination mit Xyn10B, Axx43A und Bxl3B bei der Hydrolyse von Arabinoxylan.	95
Abbildung 3.21	Hydrolytische Produkte der Hydrolyse der Hemicellulosepräparation HP4 im 40 ml Maßstab mit Enzymkombinationen aus Xyn10B, Xyn11A, Axx43A, Arf51B und Bxl3B.	100
Abbildung 3.22	Kinetik der Prototyp Hydrolyse der Hemicellulosepräparation HP4 im 5 l Maßstab mit der Enzymkombination aus Xyn10B, Xyn11A, Axx43A, Arf51B und Bxl3B. .	101
Abbildung 3.23	Xylose- und Arabinosekonzentrationen die bei der Prototyp Hydrolyse von HP4 im 5 l Maßstab mit der Enzymkombination aus Xyn10B, Xyn11A, Axx43A, Arf51B und Bxl3B freigesetzt wurden.	102
Abbildung 4.1	Allgemeine schematische Struktur hemicellulosischer Heteropolysaccharide mit Enzymaktivitäten für die Hydrolyse.	104

Abbildung 6.1	Vektorkarte des pET-24c(+) Leervektors mit den Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme.....	139
Abbildung 6.2	Beispiele für ein Chromatogramm und eine SDS-PAGE Analyse aus der Proteinreinigung.....	139
Abbildung 6.3	Restriktionsverdau der 58 pET-24c(+) Expressionsvektoren mit den <i>C. stercorarium</i> Genen für die ausgewählten Glycosidhydrolasen (1–50) und Kohlenhydratesterasen (51–58).....	140
Abbildung 6.4	SDS-PAGE Analyse der heterolog produzierten Glycosidhydrolasen (1–50) und Kohlenhydratesterasen (51–58).....	140
Abbildung 6.5	Schematische Struktur der <i>C. stercorarium</i> Glycosidhydrolasen (GH) und Kohlenhydratesterasen (CE) für die keine Aktivität nachgewiesen werden konnte.....	142
Abbildung 6.6	Bradford-Referenzgerade zur photometrischen Quantifizierung der Gesamtproteinkonzentration bei einer Wellenlänge von 595 nm.....	143
Abbildung 6.7	Lineare DNSA-Referenzgerade zur photometrischen Quantifizierung der Xyloseäquivalente bei einer Wellenlänge von 540 nm.	143
Abbildung 6.8	Sigmoidale DNSA-Referenzgerade zur photometrischen Quantifizierung der Xyloseäquivalente bei einer Wellenlänge von 540 nm.....	143
Abbildung 6.9	Referenzgerade zur photometrischen Quantifizierung der Xylose- und Arabinosekonzentration mit dem Xylose/Arabinose Assay Kit (Megazyme) bei einer Wellenlänge von 340 nm.	144
Abbildung 6.10	Lineare pNP-Referenzgerade zur photometrischen Quantifizierung der freigesetzten pNP-Konzentration bei einer Wellenlänge von 405 nm.	144
Abbildung 6.11	Referenzgerade zur photometrischen Quantifizierung der Acetatkonzentration mit dem Acetic Acid Assay Kit (Megazyme) bei einer Wellenlänge von 340 nm.....	144
Abbildung 6.12	Referenzgerade zur Quantifizierung der Xylose- und Arabinosemenge mit HPLC... ..	145
Abbildung 6.13	Referenzgerade zur Quantifizierung der Arabinosekonzentration mit HPAEC-PAD.	145
Abbildung 6.14	Hydrolyse von Arabinoxylan mit verschiedenen Konzentrationen von Axl43A analysiert mit HPAEC-PAD.....	146
Abbildung 6.15	Enzymaktivität der Kohlenhydratesterasen Axe4A und Axe7B auf 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-D-xylopyranose (XTA) und β -D-Glucose-pentaacetat (GPA).....	146
Abbildung 6.16	Acetatkonzentration die bei der Hydrolyse von unlöslichem Arabinoxylan (AX(u)) mit den Kohlenhydratesterasen freigesetzt wurde.	147

Abbildung 6.17	DC der Hydrolyse von (A) <i>p</i> NP-2- <i>O</i> - <i>trans</i> -feruloyl- α -L-Arabinofuranosid und (B) <i>p</i> NP-5- <i>O</i> - <i>trans</i> -feruloyl- α -L-Arabinofuranosid mit den Kohlenhydratesterasen.	147
Abbildung 6.18	Hydrolytische Produkte der Hydrolyse von Arabinan mit ABn43A und Arf51B analysiert mit HPAEC-PAD.	148
Abbildung 6.19	Ausgefälltes unlösliches Xylan nach der Hydrolyse von Arabinoxylan mit Arf51B und Axh43A.....	148
Abbildung 6.20	Hydrolytische Produkte der Hydrolyse von Arabinoxylan mit Xyn11A, Bxl3B und Axh43A analysiert mit HPAEC-PAD.....	150
Abbildung 6.21	Quantifizierung der freigesetzten (A) Xylose und (B) Arabinose nach Hydrolyse von Arabinoxylan mit Xyn11A, Bxl3B und Axh43A.	150
Abbildung 6.22	Hydrolytische Produkte der Hydrolyse von löslichem Arabinoxylan (AX(I)) und der Hemicellulosepräparationen HP1, HP2 und HP4 analysiert mit HPAEC-PAD.	151
Abbildung 6.23	Hydrolytische Produkte der Hydrolyse der Hemicellulosepräparation HP4 mit der Enzymkombination aus Xyn10B, Xyn11A, Axh43A, Arf51B und Bxl3B im (A) 40 ml oder (B) 5 l Maßstab analysiert mit HPLC.	151

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Ungefähre Zusammensetzung verbreiteter lignocellulosischer Biomassen.	3
Tabelle 1.2	Zusammensetzung des Hemicelluloseanteils in lignocellulosischen Biomassen.	5
Tabelle 1.3	In der Literatur beschriebene kohlenhydrataktive Enzyme von <i>C. stercorarium</i>	20
Tabelle 2.1	Verwendete Chemikalien	23
Tabelle 2.2	Verwendete Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 2.3	Verwendete Enzyme, Kits und Längenstandards.....	23
Tabelle 2.4	Verwendete Geräte.....	24
Tabelle 2.5	Verwendete Software	25
Tabelle 2.6	LB-Medium.....	26
Tabelle 2.7	SOC-Medium	26
Tabelle 2.8	ZYP-5052-Medium.....	26
Tabelle 2.9	Einzelkomponenten des ZYP-5052-Medium	26
Tabelle 2.10	GS2-Medium.....	27
Tabelle 2.11	Kohlenstoffquellen für GS2-Medium	27
Tabelle 2.12	Glucose-Stammlösung für SOC-Medium.....	27
Tabelle 2.13	Kanamycin-Stammlösung.....	28
Tabelle 2.14	Verwendete Bakterienstämme	28
Tabelle 2.15	Verwendete <i>para</i> -Nitrophenol Glycoside	28
Tabelle 2.16	Verwendete Oligosaccharide	29
Tabelle 2.17	Verwendete Polysaccharide	29
Tabelle 2.18	Verwendete Esterase Substrate.....	30
Tabelle 2.19	Klonierungsprimer für Gibson-Assembly	33
Tabelle 2.20	Sequenzierungsprimer	35
Tabelle 2.21	Ansätze für die PCR	37
Tabelle 2.22	PCR Programm Phusion DNA Polymerase.....	37
Tabelle 2.23	PCR Programm DreamTaq DNA Polymerase.....	37
Tabelle 2.24	Ansatz für den Restriktionsverdau	38
Tabelle 2.25	TAE-Puffer und DNA-Auftragspuffer	38
Tabelle 2.26	Ansatz für Gibson Assembly.....	39
Tabelle 2.27	Ansatz für den DNA-Primer-Mix.....	40
Tabelle 2.28	Lysozym-Stammlösung.....	41

Tabelle 2.29	Protokoll für die nativen His ₆ -Affinitätsreinigung	42
Tabelle 2.30	Lysepuffer und Elutionspuffer	42
Tabelle 2.31	Stripping Puffer und Regenerationslösung	43
Tabelle 2.32	Ansatz für ein SDS-Gel.....	45
Tabelle 2.33	Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE	45
Tabelle 2.34	Ansatz für die Hydrolyse von Polysacchariden	46
Tabelle 2.35	MOPS-Reaktionspuffer	47
Tabelle 2.36	DNSA-Lösung.....	48
Tabelle 2.37	Konzentrationen der Xylose-Referenzgerade	48
Tabelle 2.38	Ansatz für die Bestimmung von pH- und Temperaturoptimum	49
Tabelle 2.39	Reaktionspuffer für die pH- und Temperaturkurven	49
Tabelle 2.40	Pipettierschema für Citrat-Phosphat-Puffer (3x) mit verschiedenen pH	50
Tabelle 2.41	Stammlösungen für den Citrat-Phosphat-Puffer (3x)	50
Tabelle 2.42	Ansatz für den pNP-Assay	51
Tabelle 2.43	Eingesetzte Konzentrationen für die Produktinhibition	52
Tabelle 2.44	DC-Färbelösung.....	54
Tabelle 2.45	Mono- und Oligosaccharid-Standards für die Zuckeranalytik	54
Tabelle 2.46	Interner Standard (ISTD) für die HPAEC-PAD.....	56
Tabelle 2.47	Laufmittel für die HPAEC-PAD.....	57
Tabelle 2.48	Gradient für die HPAEC-PAD	57
Tabelle 2.49	Zusammensetzung des AXOS-Standards für die HPAEC-PAD	57
Tabelle 2.50	Reaktionspuffer für die Hydrolyse im 40 ml und 5 l Maßstab	61
Tabelle 3.1	Glycosidhydrolase (GH) und Kohlenhydratesterase (CE) Familien im <i>C. stercorarium</i> Genom.....	64
Tabelle 3.2	Produzierte Glycosidhydrolasen und Kohlenhydratesterasen von <i>C. stercorarium</i> ..	66
Tabelle 3.3	Enzymaktivität der Glycosidhydrolasen auf pNP-Glycosiden	69
Tabelle 3.4	Enzymaktivität von 17 Glycosidhydrolasen auf Polysacchariden. (Teil 1)	74
Tabelle 3.5	Fortsetzung: Enzymaktivität von 17 Glycosidhydrolasen auf Polysacchariden. (Teil 2)	75
Tabelle 3.6	Optimale Reaktionsbedingungen von dreizehn ausgewählten hemicellulolytischen Glycosidhydrolasen	76
Tabelle 3.7	Hemicelluloseausbeute bei der Präparation von Hemicellulose aus Weizenstroh... 96	
Tabelle 3.8	Kohlenhydrat-Fingerabdruck von Arabinoxylan, Hemicellulosepräparationen und Weizenstroh.....	98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.9	Aktivität der Enzyme die in dieser Arbeit und von der Firma ASA Spezialenzyme produziert wurden.	99
Tabelle 3.10	Enzymkombinationen für die Hydrolyse der Hemicellulosepräparation HP4 im 40 ml Maßstab.	100
Tabelle 4.1	Enzymaktivitäten für die Hydrolyse hemicellulosischer und Hemicellulose-assoziiierter Polysaccharide	104
Tabelle 6.1	Nummerierung der <i>C. stercorarium</i> Proteine für den Restriktionsverdau der pET-24c(+) Expressionsvektoren und die SDS-Page der rekombinanten Proteine.	141
Tabelle 6.2	Proteinkonzentrationen der rekombinanten <i>C. stercorarium</i> Proteine.	141
Tabelle 6.3	Quantifizierung der Xylose und Arabinose Freisetzung bei der Hydrolyse von HP4 im 40 ml und 5 l Maßstab.....	152

IV Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AA	Hilfsaktivitäten (<i>Auxiliary Activities</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
b/bp	Basen/Basenpaare
bar	Druck (10^5 Pascal)
CAZymes	kohlenhydrataktive Enzyme (<i>Carbohydrate-Active enZymes</i>)
CE	Kohlenhydratesterase (<i>carbohydrate esterase</i>)
CBM	Kohlenhydrat-Bindungsmodul (<i>carbohydrate binding module</i>)
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNSA	3,5-Dinitrosalicylsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ϵ	Extinktionskoeffizient
EC-Nummer	Klassifikationssystem für Enzyme (<i>Enzyme Commission number</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und weitere
FPLC	Schnelle Protein-Flüssigkeitschromatographie (<i>fast protein liquid chromatography</i>)
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GH	Glycosidhydrolase (<i>glycoside hydrolase</i>)
GT	Glycosyltransferase
h	Stunde (<i>hour</i>)
HMF	Hydroxymethylfurfural
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HPAEC-PAD	Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (<i>high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection</i>)
ISTD	Interner Standard (<i>Internal standard</i>)
l	Liter
LPMO	lytische Polysaccharid-Monooxygenasen
m	Meter
M	mol/l (Molar)
min	Minute
Mio.	Millionen
mol	Mol ($6,022 \times 10^{23}$ Teilchen)
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-Propansulfonsäure

Abkürzungsverzeichnis

MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PL	Polysaccharidlyase
pNP	<i>para</i> -Nitrophenol
R _f -Wert	Retentionsfaktor
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SLH	S-Layer Homologie (<i>S-layer homology</i>)
SV	Säulenvolumen
T	Temperatur
t	Tonnen
t	Zeit (<i>time</i>)
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (1 µmol Substratumsatz pro Minute)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIS	sichtbares Licht
vs.	gegen (<i>versus</i>)
v/v	Volumenprozent (Volumen pro Volumen)
w/v	Massenprozent (Gewicht pro Volumen)

Mono-, Oligo- und Polysaccharide

AG I	Arabinogalactane Typ I
Ara	L-Arabinose
AX	Arabinoxylan
AXOS	Arabinoxyloligosaccharide
Gal	D-Galactose
GalA	D-Galacturonsäure
GlcA	D-Glucuronsäure
Glu	D-Glucose
GPA	β-D-Glucose-pentaacetat
Man	D-Mannose
MeGlcA	4-O-Methyl-D-Glucuronsäure
Rha	L-Rhamnose
XOS	Xyloligosaccharide
XTA	1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-D-xylopyranose
Xyl	L-Xylose

Größeneinheiten

M	Mega (10^6)
k	Kilo (10^3)
c	Zenti (10^{-2})
m	Milli (10^{-3})
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
p	Piko (10^{-12})

V Zusammenfassung

Hemicellulosen sind ein Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwand und bilden zusammen mit Cellulose und Lignin die wichtigste Quelle nachwachsender Rohstoffe auf der Welt: Lignocellulose. Die effiziente Verwertung von Lignocellulose erfordert eine möglichst vollständige Hydrolyse der Cellulose- und Hemicellulosebestandteile. *Clostridium stercorarium* ist ein thermophiles, saccharolytisches Bakterium, das hervorragend an den Abbau von Hemicellulose angepasst ist. Sein Genom umfasst 58 Gene, die hemicellulolytische Glycosidhydrolasen und Esterasen kodieren. Diese thermostabilen Enzyme sind vielversprechende Kandidaten für industrielle Anwendungen.

Um das hemicellulolytische Potential von *C. stercorarium* und seiner Enzyme zu ermitteln, wurden 50 Glycosidhydrolasen und 8 Kohlenhydratesterasen heterolog in *Escherichia coli* produziert und charakterisiert. Das aus Kulturüberstand präparierte Sekretom von *C. stercorarium* zeigte hydrolytische Aktivität für Xylan, β -Glucan, Xyloglucan, Glucomannan und Galactan. Darüber hinaus hydrolysierten die rekombinanten Glycosidhydrolasen Mannan, Galactomannan und Arabinan. 20 *C. stercorarium* Glycosidhydrolasen, einschließlich einem Enzym mit einem nicht klassifizierten Glycosidhydrolase (GH) Modul, werden in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben. Die Xylanase Xyn105F und die β -D-Xylosidase Bxl31D zeigten für ihre GH-Familie bisher nicht beschriebene Aktivitäten. Zwei Kohlenhydratesterasen, Axe4A und Axe7B, zeigten Acetylerase-Aktivität; Axe7B hydrolysierte zusätzlich Feruloyl-ester. 11 von 13 Polysaccharid-hydrolysierenden Glycosidhydrolasen waren am aktivsten bei pH 5,0 bis pH 6,5 und Temperaturen von 57 °C bis 76 °C. Bei der Hydrolyse von löslichem Arabinoxylan mit einer synergistischen Kombination der Xylanasen Xyn10B und Xyn11A, der Arabinose-freisetzenden Enzyme Axh43A und Arf51B und der β -Xylosidase Bxl3B konnten 75 % des Polysaccharids zu Xylose und Arabinose hydrolysiert werden. Arf51B und Axh43A spalteten L-Arabinose sowohl von mono- als auch von diarabinosylierten Xyloseeinheiten ab, wobei Axh43A 94 % der gebundenen L-Arabinose freisetzte. Während die Xylanasen und Axh43A nach 48 h bei 60 °C noch über 50 % Restaktivität besaßen, wurde Bxl3B bei 60 °C innerhalb von 24 h thermisch inaktiviert. Arf51B, Axh43A und Bxl3B wurden durch ihre Reaktionsprodukte inhibiert, mit Restaktivitäten von 65 %, 1 % bzw. 7 % bei 50 g/l Xylose bzw. Arabinose. Die Aktivität von Xyn10B und Xyn11A wurde durch 50 g/l Xylose nicht inhibiert. Die synergistische Kombination der Arabinanase Abn43A und Arf51B hydrolysierte Arabinan, mit einer Ausbeute von 77 %, zu L-Arabinose. Um die industrielle Anwendbarkeit der Enzyme zu zeigen, wurde Hemicellulose in einem Extruderprozess aus Weizenstroh isoliert und mit der Enzymkombination für die Hydrolyse von Arabinoxylan hydrolysiert. Im 40 ml und 5 l Maßstab konnten bis zu 71 % der enthaltenen Xylose und 56 % der enthaltenen Arabinose freigesetzt werden.

VI Abstract

Hemicellulosic polysaccharides are major components of the plant cell wall and form together with cellulose and lignin the most abundant renewable resource in the world: lignocellulose. The efficient utilization of lignocellulose ideally requires complete degradation of its cellulose as well as its hemicellulose components. *Clostridium stercorarium* is a thermophilic, saccharolytic bacterium which is well adapted to the degradation of hemicellulose. Its genome includes 58 genes coding for hemicellulolytic glycoside hydrolases and carbohydrate esterases. These thermostable enzymes are promising candidates for industrial applications.

To reveal the hemicellulolytic potential of *C. stercorarium* and its enzymes, 50 glycoside hydrolases and 8 carbohydrate esterases were heterologously produced in *Escherichia coli* and characterised. The secretome isolated from the supernatant of *C. stercorarium* was active on xylan, β -glucan, xyloglucan, glucomannan and galactan. In addition, the recombinant enzymes hydrolysed mannan, galactomannan and arabinan. 20 glycoside hydrolases from *C. stercorarium*, including one enzyme with a non-classified glycoside hydrolase module, are newly described in this work. The xylanase Xyn105F and the β -D-xylosidase Bxl31D showed activities not described so far for their GH families. Two carbohydrate esterases, Axe4A and Axe7B, showed acetyl esterase activity; Axe7B additionally hydrolysed feruloyl esters. 11 out of 13 polysaccharide-degrading glycoside hydrolases were most active at pH 5.0 to pH 6.5 and at temperatures of 57 °C to 76 °C. In the hydrolysis of soluble arabinoxylan with a synergistic combination of the xylanases Xyn10B and Xyn11A, the arabinose releasing enzymes Axh43A and Arf51B and the β -xylosidase Bxl3B, 75 % of the polysaccharide could be hydrolysed to xylose and arabinose. Arf51B and Axh43A debranched mono- as well as diarabinoxylated xylose units, with Axh43A releasing 94 % of the bound L-arabinose. While the xylanases and Axh43A still had more than 50 % (Xyn11A & Axh43A) and 90 % (Xyn10B) residual activity after 48 h at 60 °C, Bxl3B was thermally inactivated within 24 h at 60 °C. Arf51B, Axh43A and Bxl3B were inhibited by their reaction products with residual activities of 65 % (Arf51B), 1 % (Axh43A) and 7 % (Bxl3B) at 50 g/l xylose and arabinose, respectively. The activity of Xyn10B and Xyn11A was not inhibited by 50 g/l xylose. The synergistic combination of the arabinanase Abn43A and Arf51B hydrolysed arabinan to L-arabinose with a yield of 77 %. To demonstrate the industrial applicability of *C. stercorarium* enzymes, hemicellulose was isolated from wheat straw in an extruder process and hydrolysed with the enzyme combination for the hydrolysis of arabinoxylan. In 40 ml and 5 l scale, up to 71 % of the contained xylose and 56 % of the contained arabinose could be released.

VII Publikationen

Broeker, J., Mechelke, M., Baudrexl, M., Mennerich, D., Hornburg, D., Mann, M., Schwarz, W. H., Liebl, W., Zverlov, V. V. (2018). The hemicellulose-degrading enzyme system of the thermophilic bacterium *Clostridium stercorarium*: comparative characterisation and addition of new hemicellulolytic glycoside hydrolases. *Biotechnology for Biofuels*, 11, 229.

Schwarz, W. H., Brunecky, R., **Broeker, J.**, Liebl, W., Zverlov, V. V. (2018). Handling gene and protein names in the age of bioinformatics: the special challenge of secreted multimodular bacterial enzymes such as the cbhA/cbh9A gene of *Clostridium thermocellum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 34(3), 42.

Mechelke, M., Koeck, D. E., **Broeker, J.**, Roessler, B., Krabichler, F., Schwarz, W. H., Zverlov, V. V., Liebl, W. (2017). Characterization of the arabinoxylan-degrading machinery of the thermophilic bacterium *Herbinix hemicellulosilytica*-Six new xylanases, three arabinofuranosidases and one xylosidase. *Journal of Biotechnology*, 257, 122-130.

Patentschriften

Graubner, S., Schwarz, W. H., Zverlov, V. V., Hauf, W., Andreeßen, B., **Bröker, J.**, Verheyen, C., Jekle, M., Becker, T., Schulte, L. P., Liebl, W. (Priority 2017). Method for the preparation of food products comprising rye.

Graubner, S., Schwarz, W. H., Zverlov, V. V., Hauf, W., Andreeßen, B., Schulte, L. P., **Bröker, J.**, Liebl, W. (Priority 2017). New xylanase with improved thermostability and increased enzyme activity on arabinoxylan.

1 Einleitung

1.1 Lignocellulosische Biomasse: ein nachwachsender Rohstoff

Ungeachtet der Bemühungen, die Emission von Treibhausgasen zu reduzieren, hat sich der Anteil fossiler Brennstoffe an der Energieerzeugung in den letzten 30 Jahren kaum verändert. Rund 80 % des globalen Energiebedarfs werden durch die Verbrennung fossiler Energieträger gedeckt und infolge steigender Bevölkerungszahlen und einer zunehmenden Industrialisierung von Schwellenländern wie China und Indien wird der globale Energiebedarf bis zum Jahr 2040 voraussichtlich um 32–45 % steigen (IEA, 2015). Die Reserven an fossilen Energieträgern sind jedoch limitiert und bei steigendem Bedarf und steigenden Preisen wird deren Verbrennung zunehmend unattraktiv (Alonso *et al.*, 2010). Um die Emission von Treibhausgasen nachhaltig zu reduzieren und auch in Zukunft den globalen Energiebedarf decken zu können, werden große Mengen von alternativen und erneuerbaren Energieträgern benötigt. Die Biomasseproduktion von Landpflanzen beträgt schätzungsweise 170–200 Billionen t pro Jahr (Pauly und Keegstra, 2008). Aufgrund dieser Verfügbarkeit besitzt die Produktion von Biokraftstoffen aus pflanzlicher Biomasse, in Kombination mit weiteren erneuerbaren Energiequellen wie Sonnenenergie, Wind- und Wasserkraft, sowohl das Potential die Emission von Treibhausgasen nennenswert zu reduzieren als auch die Energiesicherheit zu gewährleisten (Kazamia und Smith, 2014; Sarkar *et al.*, 2012). Außer für Biokraftstoffe kann pflanzliche Biomasse auch als Rohstoff für die nachhaltige Herstellung weiterer Bulk- und Spezialchemikalien mittels fermentativer und/oder chemischer Verfahren dienen (Tuck *et al.*, 2012).

Lignocellulose ist, mit einem Anteil von bis zu 50 %, der Hauptbestandteil pflanzlicher Biomasse und die am häufigsten vorkommende, nachwachsende Ressource auf der Welt (Claassen *et al.*, 1999; Perez *et al.*, 2002). In Form von landwirtschaftlichen Reststoffen wie Stroh, Spelzen und Gräsern oder forstwirtschaftlichen Reststoffen wie Holzpellets und Sägemehl ist Lignocellulose ein preiswerter Rohstoff und in großen Mengen regional verfügbar (Sarkar *et al.*, 2012). Jedoch werden derzeit nur etwa 2 % der lignocellulosischen Biomasse vom Menschen genutzt (Pauly und Keegstra, 2008). Lignocellulose besitzt eine heterogene und sehr komplexe Struktur mit einer natürlichen Resistenz gegen mikrobiellen und enzymatischen Abbau. Diese Widerstandskraft erschwert die Verwertung zu Biokraftstoffen durch biologische Fermentationsprozesse erheblich und macht daher eine Vorbehandlung der Lignocellulose erforderlich; hohe Produktionskosten sind die Folge. Um eine effiziente und nachhaltige Energieerzeugung aus lignocellulosischer

Biomasse zu erreichen, müssen die chemischen und strukturellen Eigenschaften der Lignocellulose überwunden und kostengünstige Technologien zur Vorbehandlung, Hydrolyse und Fermentation von Lignocellulose entwickelt werden (Himmel *et al.*, 2007).

Weizen ist das am häufigsten angebaute Getreide in Europa und, nach Mais und Reis, das dritthäufigst angebaute Getreide weltweit. Im Jahr 2013 wurden weltweit 713 Mio. t Weizen produziert (FAO, 2015). Nur etwa 45 % der geernteten Weizenpflanze sind Korn, während weitere 35 % Weizenstroh sind (Claassen *et al.*, 1999). Allein in Europa werden so jährlich 132,6 Mio. t Weizenstroh produziert (Sarkar *et al.*, 2012). Insgesamt werden in der EU 315,9 Mio. t landwirtschaftliche und 67,6 Mio. t forstwirtschaftliche Reststoffe pro Jahr produziert. Nur geringe Mengen dieser lignocellulosischen Reststoffe werden für die Produktion von Wärme, Strom und Biogas (22,1 Mio. t/Jahr) oder die Zucht von Tieren, Pflanzen und Pilzen (26,4 Mio. t/Jahr) verwendet. Nach Abzug der Biomasse, die zur Erhaltung der Bodenqualität auf den Feldern und im Wald verbleiben sollte, stehen jährlich 84,6 Mio. t landwirtschaftliche und 9,2 Mio. t forstwirtschaftliche Reststoffe für eine nachhaltige Produktion von Biokraftstoffen zur Verfügung (Searle und Malins, 2016).

1.1.1 Struktureller Aufbau lignocellulosischer Biomasse

Lignocellulosische Biomasse, wie z.B. landwirtschaftliche Reststoffe, besteht hauptsächlich aus pflanzlichen Zellwänden. Den größten Gewichtsanteil bilden die sekundären Zellwände, die den Zellen Stabilität verleihen und gebildet werden, nachdem diese ausgewachsen sind. Sekundäre Zellwände bestehen aus Lignocellulose, einem Komplex aus den strukturellen Polysacchariden Cellulose und Hemicellulose und dem phenolischen Polymer Lignin (Himmel *et al.*, 2010). Die Cellulosemoleküle lagern sich zu parallel angeordneten, kristallinen Cellulosefibrillen zusammen und sind in eine Matrix aus Lignin eingebettet (Claassen *et al.*, 1999). Hemicellulose und Lignin sind entlang der Cellulosefibrillen angeordnet, über kovalente Bindungen miteinander vernetzt und verstärken so die komplexe Struktur (Abbildung 1.1) (Alvarez *et al.*, 2016; Himmel *et al.*, 2010). Lignocellulose besteht zu 40–50 % aus Cellulose, gefolgt von Hemicellulose (20–35 %) und Lignin (15–30 %) (Alonso *et al.*, 2010; Tuomela *et al.*, 2000). Die Anteile dieser drei Polymere variieren und sind abhängig von der Pflanzenart (Tabelle 1.1). Darüber hinaus wird die Zusammensetzung lignocellulosischer Biomasse durch das Alter, das Wachstumsstadium, den Erntezeitpunkt und den Standort beeinflusst (Perez *et al.*, 2002; Van Dyk und Pletschke, 2012).

Tabelle 1.1 Ungefähre Zusammensetzung verbreiteter lignocellulosischer Biomassen (in % Trockenmasse).

Biomasse (Pflanze)	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)	Literatur
Getreide und Gräser:				
Gerstenstroh	42	28	–	b
Maiskolben	35–45	35–42	5–15	d, e
Maisstroh	33–42	14–33	15–20	a, b, c, d, e
Miscanthus	42–43	24–27	13–19	b, c
Reisstroh	32–42	15–32	10–19	c, d, e
Roggenstroh	31	25	–	b
Rutenhirse	31–46	22–32	12–23	a, b, c, d, e
Weizenstroh	33–44	23–31	8–21	a, c, e
Zuckerrohr	48,6	31,1	19,1	c
Bagasse (Zuckerrohr)	33–43	24–30	12–25	d, e
Gräser (Mittelwert)	25–40	25–40	10–30	e
Heu	26,0	26,8	4,7	e
Nadelhölzer:				
Fichte	40–43	21–31	28	a, c
Douglasie	44–50	18–21	28–32	a, e
Kiefer	42–45	21–23	26–28	a, e
Laubhölzer:				
Buche	43,3	31,8	24,4	c
Espe	45,9	17,9	23,0	a
Hybrid-Pappel	40–44	22	24	a, e
Blätter	15–20	80–85	0	e

Die Zusammensetzung lignocellulosischer Biomasse kann sich aufgrund verschiedener Ernten und Erntezeitpunkte unterscheiden. Vorbehandlungen der Biomasse und unterschiedliche Analysemethoden können die Zusammensetzung signifikant beeinflussen (Van Dyk und Pletschke, 2012). –: keine Werte angegeben. Literatur: a: (Alvarez *et al.*, 2016), b: (Otieno und Ahring, 2012), c: (Pauly und Keegstra, 2008), d: (Saha, 2003), e: (Van Dyk und Pletschke, 2012).

Neben Cellulose und Hemicellulosen sind Pektine die dritte Klasse von pflanzlichen Zellwandpolysacchariden. Die primären Pflanzenzellwände enthalten neben Cellulose eine hydratisierte Matrix aus Hemicellulosen und Pektinen. In den sekundären Zellwänden werden Wasser und Pektine durch Lignin ersetzt (Pauly und Keegstra, 2008).

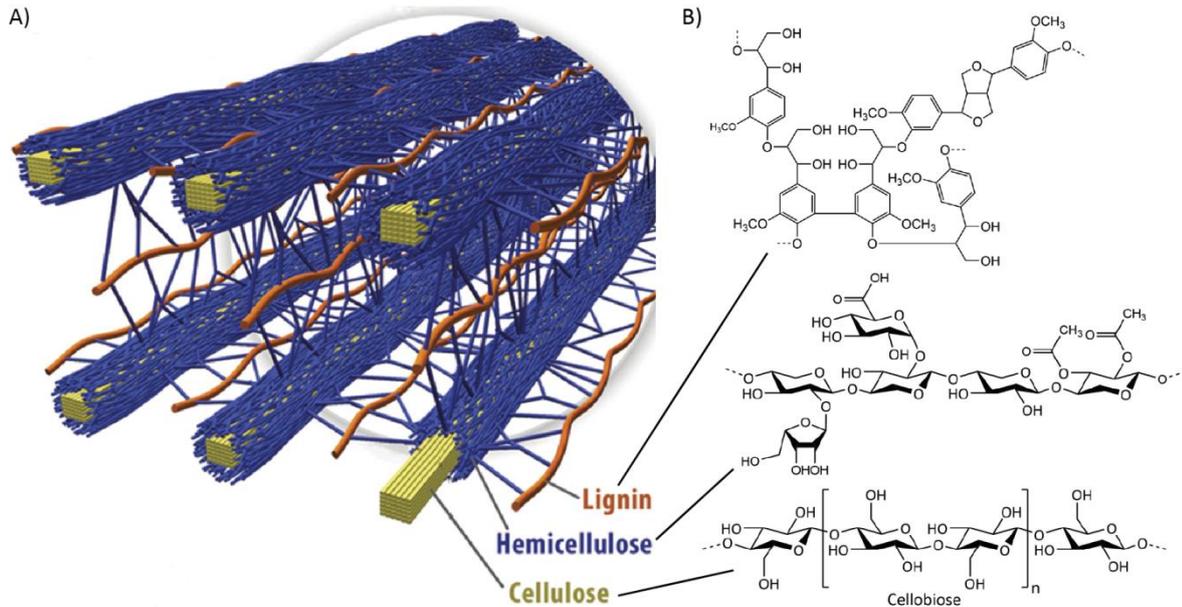


Abbildung 1.1 Struktur lignocelluloseischer Biomasse. A) Räumliche Anordnung von Cellulose, Hemicellulose und Lignin in den Zellwänden lignocelluloseischer Biomasse. Reproduziert mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. (Brandt *et al.*, 2013) (<http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2013/gc/c2gc36364j>). B) Chemische Strukturen von Lignin, Hemicellulose und Cellulose. Strukturinformationen wurden abgeleitet aus: Klemm *et al.* (2005), Perez *et al.* (2002) und Shallom und Shoham (2003)

Cellulose

Cellulose ist die wichtigste Strukturkomponente pflanzlicher Zellwände und die häufigste organische Verbindung in der Biosphäre. Jedes Jahr werden ca. 10^{12} t Cellulose synthetisiert (Berg *et al.*, 2007; Klemm *et al.*, 2005). Das lineare Polysaccharid besteht aus β-D-Glucosemolekülen, die durch glycosidische β-(1,4)-Bindungen miteinander verknüpft sind. Jedes zweite Glucosemolekül ist um 180° gedreht, wodurch Cellobiose die Struktureinheit der Cellulose bildet. (Abbildung 1.1) (Klemm *et al.*, 2005; Schwarz, 2001). Cellulosepolymere bestehen in der primären Zellwand aus etwa 8.000 und in der sekundären Zellwand aus bis zu 15.000 Glucoseeinheiten (Brown, 2004). Die parallel angeordneten Cellulosemoleküle lagern sich durch Wasserstoffbrückenbindungen zu kristallinen Elementarfibrillen zusammen. Elementarfibrillen mit einem Durchmesser von 1,5 bis 3,5 nm lagern sich zu Mikrofibrillen zusammen, die sich wiederum zu Makrofibrillen bündeln. Mikrofibrillen erreichen eine Länge von einigen 100 nm, wobei sich kristalline und amorphe Regionen abwechseln (Chinga-Carrasco, 2011; Klemm *et al.*, 2005).

Hemicellulose

Hemicellulose ist ein Sammelbegriff für eine heterogene Gruppe von linearen und verzweigten Polysacchariden aus Pentosen (Xylose, Arabinose), Hexosen (Glucose, Galactose, Mannose) und Zuckersäuren (Glucuronsäure). Nach der Cellulose sind die Hemicellulosen die zweithäufigsten

Polysaccharide in der Natur und machen 20–35 % der Lignocellulose aus (Saha, 2003; Shallom und Shoham, 2003). Historisch betrachtet, wurde der Begriff Hemicellulose für Polysaccharide verwendet, die im Gegensatz zu Cellulose mit alkalischen Lösungen aus höheren Pflanzen extrahiert werden können. Diese Definition ist jedoch veraltet, da einige der hemicellulosischen Polysaccharide auch ohne alkalische Behandlung leicht extrahierbar sind (Ebringerová *et al.*, 2005; Scheller und Ulvskov, 2010). Basierend auf dem häufigsten Monosaccharid im Rückgrat, werden Hemicellulosen in vier Klassen von strukturell verschiedenen Zellwandpolysacchariden mit einem Rückgrat aus β -glycosidisch verknüpften Zuckereinheiten eingeteilt: Xylane, Mannane, β -Glucane mit gemischten Bindungen und Xyloglucane (Ebringerová *et al.*, 2005; Scheller und Ulvskov, 2010). Hemicellulosen besitzen eine hohe strukturelle und chemische Diversität. Das Rückgrat ist gewöhnlich mit kurzen Oligosacchariden, Monosacchariden und organischen Säuren substituiert (Alvarez *et al.*, 2016; Saha, 2003). Struktur und enzymatische Hydrolyse der hemicellulosischen Polysaccharide werden detailliert in Kapitel 1.2 beschrieben.

Vergleichbar mit der Zusammensetzung von Lignocellulose, ist auch die Zusammensetzung der Hemicellulosen abhängig von Pflanzenart, Kultivierung und Alter der Pflanze (Alvarez *et al.*, 2016; Claassen *et al.*, 1999). In Getreiden und Gräsern ist Arabinoxylan die am häufigsten vorkommende Hemicellulose, während Laubhölzer überwiegend Glucuronoxylan enthalten. In Nadelhölzern sind Galactoglucomannane am häufigsten vertreten (Tabelle 1.2) (Pauly und Keegstra, 2008).

Tabelle 1.2 Zusammensetzung des Hemicelluloseanteils in lignocellulosischen Biomassen (in % Trockenmasse).

Biomasse (Pflanze)	Xylan (%)	Mannan (%)	Arabinan (%)	Galactan (%)	Literatur
Getreide und Gräser:					
Maisstroh	20,3–21,5	0,4–0,6	1,8–2,0	0,7–1,0	a, b
Rutenhirse	19,6–20,4	0,3–0,4	1,5–2,8	0,5–0,9	a, b
Weizenstroh	19,2–21,2	0,3	2,4–2,5	0,7–0,8	a, b
Bagasse (Zuckerrohr)	21,1	0,3	1,9	0,5	b
Nadelhölzer:					
Fichte	5,7	11,5	1,4	2,7	a
Douglasie	2,8	11,0	2,7	4,7	a
Kiefer	5,5–8,8	10,8–11,7	1,6–2,4	2,1–3,9	a, b
Laubhölzer:					
Buche	20,8	0,9	1,5	–	b
Espe	16,7	1,2	0	0	a
Hybrid-Pappel	14,6–17,4	0,5–2,9	0,3–0,6	0,3–0,6	a, b

Die Zusammensetzung des Hemicelluloseanteils ist abhängig von verschiedenen Ernten, Erntezeitpunkt, Vorbehandlung und Analyseverfahren. Die freigesetzte Glucose wird meist der Cellulose zugeordnet, weshalb in den Analysen kein β -Glucan gemessen wird. In dieser Tabelle werden die Polysaccharide Arabinan und Galactan zu den Hemicellulosen gezählt. –: keine Werte angegeben. Literatur: a: (Alvarez *et al.*, 2016), b: (Otieno und Ahring, 2012).

Lignin

Lignin ist ein amorphes und hochverzweigtes, aromatisches Polymer aus Phenylpropaneinheiten und das dritthäufigste Polymer in der Natur. Die drei Phenylpropanmonomere *para*-Coumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol bilden durch Polymerisation ein komplexes, dreidimensionales Netzwerk (Pandey und Kim, 2010; Ratanakhanokchai *et al.*, 2013). Lignin verleiht den Landpflanzen die mechanische Stabilität, eine Resistenz gegen Pathogene und oxidativen Stress und ist entscheidend für den Wassertransport in den Pflanzen. Durch zwei Mechanismen erschwert Lignin die enzymatische Hydrolyse von Lignocellulose: (1) als physikalische Barriere reduziert Lignin die Zugänglichkeit zu den Polysacchariden und (2) inhibiert durch unspezifische Bindungen die hydrolytischen Enzyme (Li *et al.*, 2016).

Pektin

Pektin ist im engeren Sinne ein aus α -(1,4)-verknüpften D-Galacturonsäureeinheiten aufgebautes Polysaccharid (Ridley *et al.*, 2001). Historisch betrachtet, wurden mit diesem Begriff Polysaccharide beschrieben, die im Vergleich zu Cellulose und Hemicellulose mit heißem Wasser, schwachen Säuren oder Chelatbildnern extrahiert werden können (Ebringerová *et al.*, 2005). In diesem Zusammenhang ist es ein Sammelbegriff für eine Gruppe komplexer und heterogener Polysaccharide, die in drei Klassen eingeteilt werden: Homogalacturonan, substituierte Galacturonane und Rhamnogalacturonan I. Während die ersten beiden ein Rückgrat aus α -D-Galacturonsäure besitzen, besteht das Rückgrat von Rhamnogalacturonan I aus einem sich wiederholenden Disaccharid aus α -(1,4)-verknüpfter D-Galacturonsäure und α -(1,2)-verknüpfter L-Rhamnose. Homogalacturonan ist ein lineares Polysaccharid mit Methylierungen und Esterifizierungen. Galacturonane und Rhamnogalacturonan I sind hingegen mit Oligosacchariden substituiert. Rhamnogalacturonan I besitzt lange Seitenketten aus L-Arabinose oder D-Galactose (Ridley *et al.*, 2001). Die Pektine werden anhand dem Grad der Substituierung in „glatte“ (*smooth*) und „haarige“ (*hairy*) Regionen unterteilt (de Vries und Visser, 2001).

1.1.2 Industrielle Nutzung lignocellulosischer Biomasse

Lignocellulosische Biomasse kann auf verschiedene Arten industriell genutzt werden. Häufig wird die Lignocellulose zur Herstellung erneuerbarer Energieträger in fester, gasförmiger oder flüssiger Form verwendet. Holzpellets und Biogas, das durch anaerobe Vergärung organischer Biomasse in Biogasanlagen gewonnen wird, werden primär für die Erzeugung von Strom und Wärme verbrannt. Eine anspruchsvollere Nutzung ist die Hydrolyse der Lignocellulose zu Monosacchariden und die anschließende Fermentation zu flüssigen Kraftstoffen und Lösungsmitteln wie Ethanol und

Butanol (Kazamia und Smith, 2014; Pauly und Keegstra, 2008). Flüssige Biokraftstoffe können direkt als Treibstoffe oder als Zusätze im Transportsektor genutzt werden, ohne die bestehende Infrastruktur zu verändern. Derzeit werden nur Bioethanol und Biodiesel in einem industriellen Maßstab produziert (Antoni *et al.*, 2007).

Die Biokraftstoffe der ersten Generation werden aus stärkehaltigen oder ölhaltigen Nahrungspflanzen hergestellt. Bioethanol wird aus Zuckerrohr (Brasilien), Mais (USA) oder Zuckerrüben (EU) produziert, während Biodiesel durch Umesterung aus Rapssamenöl (Deutschland) oder Palm- und Sojaöl produziert wird. Die Produktion von Biokraftstoffen der ersten Generation und die Landnutzung zum Anbau der Pflanzen stehen jedoch in direkter Konkurrenz zu der Produktion von Nahrungsmitteln (Chakravorty *et al.*, 2009; Kazamia und Smith, 2014).

Biokraftstoffe der zweiten Generation werden aus lignocellulosischer Biomasse, z.B. in großen Mengen verfügbaren landwirtschaftlichen Reststoffen, hergestellt. Die Nutzung von Lignocellulose ermöglicht es, Lebensmittel und Kraftstoffe auf dem gleichen Feld zu produzieren (Brandt *et al.*, 2013). Aufgrund der strukturellen Komplexität und niedriger Zugänglichkeit erfordert die Verwendung von Lignocellulose jedoch eine Vorbehandlung. Bei der Produktion von Bioethanol wird die Hemicellulose häufig während der Vorbehandlung entfernt, um die enzymatische Hydrolyse der Cellulose und die Freisetzung der fermentierbaren Kohlenhydrate zu erleichtern. Hemicellulosen werden derzeit in den meisten Pilot- und Demonstrationsanlagen für Lignocellulose-Ethanol nicht genutzt. Verantwortlich dafür sind die komplexe Struktur und die geringe Fermentierbarkeit der Hemicellulosen durch die industriell eingesetzten Mikroorganismen (Girio *et al.*, 2010). Die Verwertung der Hemicellulosen ist jedoch essentiell für eine ökonomische Produktion von Ethanol aus Lignocellulose (Girio *et al.*, 2010; Saha, 2003). Um die Prozesse effizienter und kostengünstiger zu gestalten, werden technologische Fortschritte auf allen Produktionsebenen benötigt. Die Mikrobiologie kann zu dieser Forschung in zwei wichtigen Bereichen beitragen: (1) bei der Bereitstellung von cellulolytischen und hemicellulolytischen Enzymen für die Hydrolyse der Polysaccharide und (2) bei der Fermentation der resultierenden Zucker zu Lösungsmitteln und Kraftstoffen (Zverlov und Schwarz, 2008).

Bei der Fermentation zu Alkoholen geht die strukturelle Komplexität der Kohlenhydrate verloren. Durch eine säurekatalysierte, chemische Totalhydrolyse werden Pentosen und Hexosen zu Furfural und 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) umgesetzt. Beide Verbindungen sind attraktiv für die Synthese einer Reihe von Chemikalien (Tuck *et al.*, 2012). Bei der Vergasung wird Lignocellulose zu CO und H₂ (Synthesegas) konvertiert und kann anschließend über eine katalysierte chemische

Reaktion in Kohlenwasserstoffe umgewandelt werden (Pauly und Keegstra, 2008; Tuck *et al.*, 2012). Eine weitere Möglichkeit ist die partielle Hydrolyse von hemicellulosischen Polysacchariden zu speziellen, unverdaulichen Oligosacchariden, die als Präbiotika für die Lebensmittel- und Pharmaindustrie eingesetzt werden können (Otieno und Ahring, 2012). Nach der Depolymerisation von Cellulose und Hemicellulose bleibt Lignin zurück. Lignin ist der einzige erneuerbare Rohstoff aus Aromaten, jedoch gibt es gegenwärtig keinen effizienten Prozess, um Lignin zu depolymerisieren und die aromatischen Produkte zu gewinnen. Daher wird Lignin wegen seiner hohen Energiedichte primär als Energieträger verbrannt (Tuck *et al.*, 2012).

Die effiziente Hydrolyse von Hemicellulose und die hemicellulolytischen Enzyme sind aufgrund praktischer Anwendungen in verschiedenen industriellen Prozessen, auch unabhängig von der Produktion von Biokraftstoffen und Chemikalien, von großem Interesse. Eine Vorbehandlung mit hemicellulolytischen Enzymen senkt die Energiekosten bei der Papierherstellung und reduziert gleichzeitig beim Papierbleichen die benötigte Menge Chlor, wodurch zusätzlich das Abwasser weniger belastet wird (Perez *et al.*, 2002; Saha, 2003). Die hemicellulolytischen Enzyme können auch zur Klärung von Säften oder zur Verbesserung der Verdaulichkeit von Tierfutter eingesetzt werden (Saha, 2003).

1.2 Struktur, Hydrolyse und Isolierung hemicellulosischer Polysaccharide

Die hemicellulosischen Polysaccharide besitzen ein β -(1,4)-verknüpftes Rückgrat mit äquatorialer Konfiguration. Die einzige Ausnahme sind β -Glucane mit gemischten Bindungen, deren β -(1,4)-verknüpftes Rückgrat durch β -(1,3)-Bindungen unterbrochen wird (Scheller und Ulvskov, 2010). Die Polysaccharide Arabinan und Galactan werden in manchen Publikationen zu den Hemicellulosen gezählt, sind jedoch Seitenketten des Pektins Rhamnogalacturonan I und werden mit den Pektinen synthetisiert. Auch teilen sie nicht die äquatoriale β -(1,4)-verknüpfte Rückgratstruktur der Hemicellulosen (Scheller und Ulvskov, 2010; Van Dyk und Pletschke, 2012).

Aufgrund der Heterogenität der Hemicellulosen, erfordert die Hydrolyse von hemicellulosischen Polysacchariden eine Vielzahl von unterschiedlichen Enzymen, um die verschiedenen chemischen Bindungen zu spalten (Zverlov und Schwarz, 2008). Substituierungen und Acetylierungen der Hemicellulosen sind sterische Hindernisse, die den Umfang der Hydrolyse limitieren, indem sie die Bindung der hydrolytischen Enzyme verhindern (Alvarez *et al.*, 2016).

1.2.1 Xylane

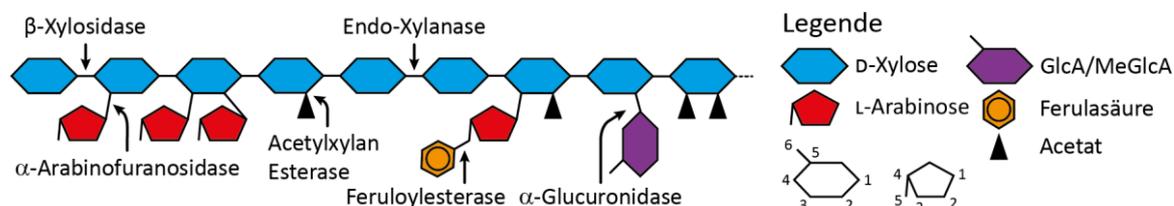


Abbildung 1.2 Schematische Struktur von Glucuronoarabinoxylan mit Enzymaktivitäten für die Hydrolyse. Strukturinformationen und Enzymaktivitäten wurden abgeleitet aus: Mechelke *et al.* (2017b), Biely *et al.* (2016) und Ebringerová *et al.* (2005).

Nach Cellulose sind Xylane die zweithäufigsten pflanzlichen Polysaccharide in der Natur. Xylane sind Heteropolysaccharide mit einem β -(1,4)-D-Xylopyranose-Rückgrat. Die meisten Xylane sind mit kurzen Kohlenhydraten oder organischen Säuren substituiert, aber auch lineare Homoxylane wurden beschrieben. Das Rückgrat von Heteroxylanen kann an der O-2 und O-3 Position der Xyloseeinheiten substituiert sein. Die möglichen Substitutionen enthalten D-Glucuronsäure (GlcA) oder 4-O-Methyl-D-Glucuronsäure (MeGlcA), L-Arabinose (Ara), Essigsäure und Oligosaccharide aus den Monomeren D-Xylose, L-Arabinose, D- oder L-Galactose und D-Glucose. Die Mono- und Oligosaccharide können wiederum mit Phenylpropansäuren wie Ferulasäure oder mit Essigsäure verestert sein (Chakdar *et al.*, 2016; Ebringerová *et al.*, 2005). Die Art und Häufigkeit der Substitutionen variiert stark und ist abhängig von der Pflanzenart. Anhand der Substitutionen werden Xylane grob in vier Gruppen eingeteilt: lineares Homoxylan, Arabinoxylan, Glucuronoxyylan und Glucuronoarabinoxylan (Chakdar *et al.*, 2016; Saha, 2003).

Homoxylane enthalten ausschließlich Xyloseeinheiten und können linear oder verzweigt sein (Chakdar *et al.*, 2016). Arabinoxylane sind die Hauptkomponenten der Hemicellulose in den Zellwänden von Gräsern und Getreiden. Das lineare Xylanrückgrat ist teilweise mit α -L-Arabinofuranosyleinheiten substituiert, die entweder am O-3 oder O-2 (Monosubstitution) oder am O-3 und O-2 (Disubstitution) der Xylopyranose verknüpft sind. Zusätzlich sind einige α -L-Arabinofuranosyleinheiten am O-5 mit Ferulasäure oder Cumarsäure verestert. Durch die Esterbindung zwischen zwei Ferulasäuren kann Arabinoxylan kovalente Bindungen mit Hemicellulose, Pektin oder Lignin bilden und trägt so zur Quervernetzung der Zellwandpolymere bei. Das Verhältnis von Arabinose zu Xylose variiert zwischen 0,2 und 1,2. Glucuronoarabinoxylane enthalten neben den Arabinosylierungen einige Substitutionen mit GlcA und MeGlcA (Abbildung 1.2) (Ebringerová *et al.*, 2005).

Glucuronoxylane oder auch 4-*O*-Methyl-Glucuronoxylane sind der Hauptbestandteil der Hemicellulose in Laubhölzern. Das Xylanrückgrat ist am *O*-2 der Xylopyranose teilweise mit MeGlcA oder auch GlcA substituiert. Das Verhältnis von Xylose zu MeGlcA liegt zwischen 4:1 bis 16:1 und beträgt durchschnittlich etwa 10:1. Xylan aus Nadelhölzern enthält neben MeGlcA auch Arabinosylierungen am *O*-2 und *O*-3 der Xylopyranose und wird daher als Arabinoglucuronoxylan bezeichnet. Gewöhnlich ist Arabinoglucuronoxylan stärker mit MeGlcA substituiert als Glucuronoxylan. Komplexe Heteroxylane sind noch stärker substituiert und besitzen, neben den Substitutionen mit D-Glucuronsäure und L-Arabinose, Substitutionen aus kurzen Oligosacchariden (Ebringerová *et al.*, 2005). Etwa 80 % des Xylanrückgrats sind mit Seitenketten substituiert. Feruloylierte Heteroxylane sind durch Ferulasäure-Dimere quervernetzt und bilden ein unlösliches Netzwerk (Saha, 2003).

Der Polymerisationsgrad von Laubholzxytan ist mit 150–200 Xyloseeinheiten höher als der von Nadelholzxytan (70–130 Xyloseeinheiten) (Chakdar *et al.*, 2016; Saha, 2003). Die meisten Xylane sind acetyliert, wobei der Grad der Acetylierung bei Xylanen unterschiedlicher Herkunft variiert. Acetylgruppen sind am *O*-3 und seltener auch am *O*-2 der Xylopyranose gebunden (de Vries und Visser, 2001; Scheller und Ulvskov, 2010). In Laubholzxytan sind 60–70 % der Xyloseeinheiten acetyliert, der Acetylierungsgrad von Nadelhölzern ist sehr viel niedriger (Alvarez *et al.*, 2016; Saha, 2003).

Die vollständige, enzymatische Hydrolyse von Xylanen erfordert eine Endo- β -1,4-Xylanase und eine β -Xylosidase zur Hydrolyse der Hauptkette und verschiedene akzessorische Enzyme, wie Arabinoxylan Arabinofuranohydrolasen, α -L-Arabinofuranosidasen, α -Glucuronidasen, Acetylxytan Esterasen, und Feruloylsterasen, zur Hydrolyse der Substitutionen. Die Endo- β -1,4-Xylanase spaltet das β -(1,4)-Xylopyranose-Rückgrat der Xylane in Oligosaccharide, die von der β -Xylosidase zu Xylose hydrolysiert werden. Viele Endo-Xylanasen spalten keine glycosidischen Bindungen zwischen substituierten Xyloseeinheiten, daher müssen die Substitutionen zunächst abgespalten werden, bevor das Rückgrat vollständig hydrolysiert werden kann. Einige akzessorische Enzyme spalten hingegen nur Substitutionen von Xylooligosacchariden ab, dies erfordert zuvor eine partielle Hydrolyse des Xylans (Biely *et al.*, 2016; de Vries und Visser, 2001; Saha, 2003).

1.2.2 β -Glucane

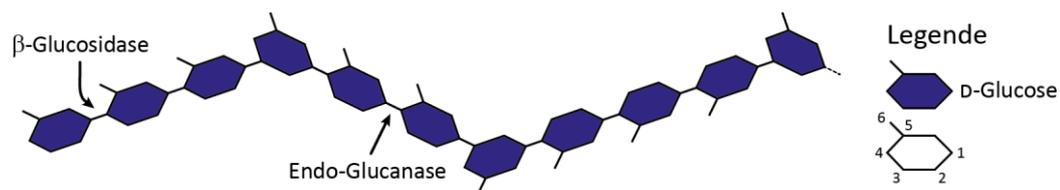


Abbildung 1.3 Schematische Struktur von β -Glucan mit gemischten Bindungen mit Enzymaktivitäten für die Hydrolyse. Strukturinformationen und Enzymaktivitäten wurden abgeleitet aus: Scheller und Ulvskov (2010), Ebringerová *et al.* (2005) und Edashige und Ishii (1998).

Hemicellulose β -Glucane sind unverzweigte Homopolysaccharide mit einem β -(1,4)-D-Glucopyranose-Rückgrat, das durch einzelne β -(1,3)-Bindungen unterbrochen wird (Abbildung 1.3). Die β -Glucane mit gemischten Bindungen können aus Gräsern, insbesondere aus der Ordnung der Süßgrasartigen (*Poales*), isoliert werden (Scheller und Ulvskov, 2010). Hafer und Gerste enthalten durchschnittlich 3–5 % β -Glucan, wobei einzelne Gerstearten bis zu 12 % β -Glucan enthalten können. Etwa 70 % der Glucoseeinheiten im Glucoserückgrat sind durch β -(1,4)-glycosidische Bindungen verknüpft. Cellotriosyl- (C_3) und Cellotetraosyl-Einheiten (C_4) werden durch einzelne β -(1,3)-glycosidische Bindungen verbunden. Mit einer geringen Häufigkeit treten auch längere β -(1,4)-verknüpfte Bereiche mit 9–14 Glucoseeinheiten auf. Das Verhältnis von C_3 zu C_4 in β -Glucanen variiert zwischen 2,3 für Hafer, 3,1 für Gerste und 4,4 für Weizen (Ebringerová *et al.*, 2005).

Bei der enzymatischen Hydrolyse von β -Glucanen mit gemischten Bindungen wird das β -(1,4)-Glucoserückgrat von einer Endo- β -1,4-Glucanase in Glucose, Cellobiose und kurze Glucoligosaccharide mit β -(1,4)- und β -(1,3)-glycosidischen Bindungen hydrolysiert. Die Oligosaccharide werden von β -Glucosidasen zu D-Glucose hydrolysiert (Edashige und Ishii, 1998).

1.2.3 Mannane

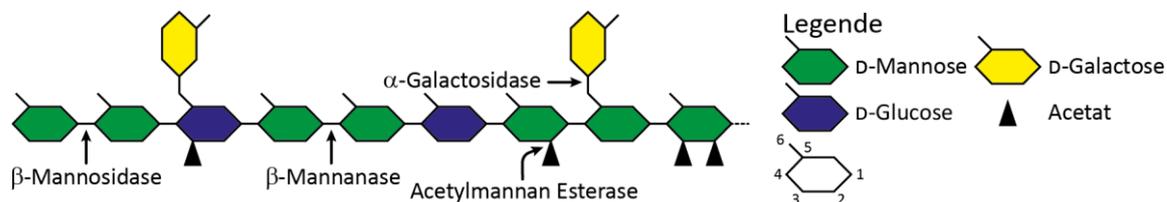


Abbildung 1.4 Schematische Struktur von Galactoglucomannan mit Enzymaktivitäten für die Hydrolyse. Strukturinformationen und Enzymaktivitäten wurden abgeleitet aus: Scheller und Ulvskov (2010), Ebringerová *et al.* (2005) und Moreira und Filho (2008).

Mannan-basierte Polysaccharide sind ein wichtiger Bestandteil der Hemicellulosefraktion pflanzlicher Zellwände und werden grob in Galactomannane und Glucomannane unterteilt. Das lineare

Rückgrat von Galactomannan besteht ausschließlich aus β -(1,4)-verknüpften D-Mannopyranoseeinheiten, während Glucomannan ein lineares Rückgrat aus β -(1,4)-verknüpften D-Mannopyranoseeinheiten und β -(1,4)-verknüpften D-Glucopyranoseeinheiten besitzt. Beide Mannantypen sind, in unterschiedlichen Verhältnissen, am O-6 der Mannose- oder Glucoseeinheiten im Rückgrat mit α -D-Galactopyranose substituiert. Glucomannane mit einem Galactoseanteil über 15 % werden als Galactoglucomannane bezeichnet und sind die häufigsten Hemicellulosen in Nadelhölzern (Ebringerová *et al.*, 2005). Mannan-basierte Polysaccharide mit einem Galactoseanteil unter 5 % werden entsprechend Mannane genannt (Moreira und Filho, 2008). In Galactomannan können bis zu 96 % der Mannoseeinheiten mit Galactose substituiert sein (Ebringerová *et al.*, 2005). Galactoglucomannane und Glucomannane enthalten Mannose, Glucose und Galactose in einem durchschnittlichen Verhältnis von 3:1:1 bzw. 3:1 (Moreira und Filho, 2008). Etwa 20–30 % der Mannose- und/oder Glucoseeinheiten im Rückgrat Mannan-basierter Polysaccharide sind am O-2 oder O-3 acetyliert (de Vries und Visser, 2001). In einigen Pflanzenarten besitzen Mannane zusätzlich eine Speicherfunktion und werden als nicht stärkehaltige Kohlenhydratvorräte in Samen oder vegetativen Geweben produziert und in Vakuolen gespeichert (Moreira und Filho, 2008).

Die enzymatische Hydrolyse von Mannan-basierten Hemicellulosen erfordert β -Mannanasen, β -Mannosidasen und gegebenenfalls auch β -Glucosidasen. Das Mannanrückgrat wird von einer β -Mannanase in Oligosaccharide hydrolysiert. Die β -Mannosidase setzt D-Mannose vom nicht reduzierenden Ende des Mannans frei und hydrolysiert Oligosaccharide zu D-Mannose. β -Glucosidasen spalten die D-Glucoseeinheiten von Oligosacchariden ab und akzessorische Enzyme, wie Acetylmannan Esterasen und α -Galactosidasen hydrolysieren die Substitutionen und ermöglichen so die vollständige Hydrolyse des Polysaccharids (Moreira und Filho, 2008).

1.2.4 Xyloglucane

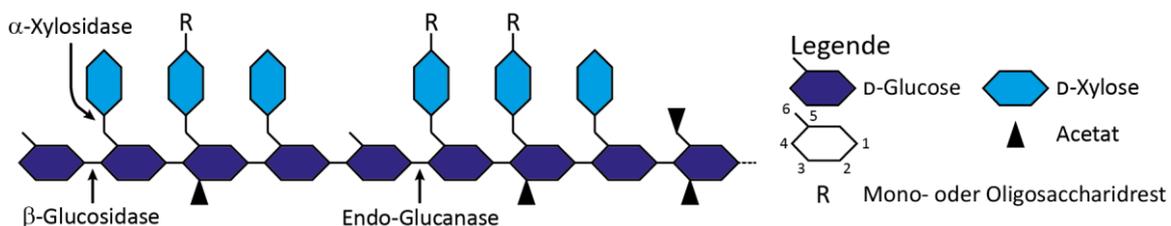


Abbildung 1.5 Schematische Struktur von Xyloglucan (Typ XXXG) mit Enzymaktivitäten für die Hydrolyse. Strukturinformationen und Enzymaktivitäten wurden abgeleitet aus: Ebringerová *et al.* (2005), de Vries und Visser (2001) und Scheller und Ulvskov (2010).

Xyloglucane sind Heteropolysaccharide und ein wichtiger Bestandteil der primären Zellwand höherer Pflanzen. Xyloglucane besitzen ein lineares β -(1,4)-D-Glucopyranose-Rückgrat, das mit

α -(1,6)-D-Xylopyranoseeinheiten substituiert ist (Abbildung 1.5). In Dikotylen sind in etwa 60–75 % der Glucopyranoseeinheiten substituiert, während in Gräsern nur etwa 30–40 % substituiert sind (Ebringerová *et al.*, 2005). Eine regelmäßige Verteilung der Substitutionen ermöglicht die Identifizierung von zwei Haupttypen. Xyloglucane von Typ XXXG bestehen aus sich wiederholenden Einheiten von drei mit Xylose substituierten Glucoseeinheiten (X) die durch eine nicht substituierte Glucoseeinheit (G) getrennt werden. In Xyloglucan von Typ XXGG werden hingegen zwei Xylose-substituierte Glucoseeinheiten von zwei nicht substituierten Glucoseeinheiten getrennt (de Vries und Visser, 2001). Die Xylopyranoseeinheiten können darüber hinaus mit β -(1,2)-D-Xylopyranose, β -(1,2)-D-Galactopyranose, α -(1,2)-L-Arabinofuranose oder Disacchariden aus diesen drei Monosacchariden und α -L-Fucose substituiert sein. Zusätzlich sind viele Xyloglucane am O-3, O-4 oder O-6 der Glucoseeinheit im Rückgrat acetyliert (Ebringerová *et al.*, 2005).

Für die Hydrolyse von Xyloglucanen wird, wegen der komplexen Struktur mit verschiedenen Seitenketten, eine Vielzahl unterschiedlicher Enzyme benötigt. Endo- β -1,4-Glucanasen können das Rückgrat von Xyloglucanen spalten, freigesetzte Glucopolysaccharide werden von β -Glucosidasen zu D-Glucose hydrolysiert. Akzessorische α/β -Glycosidasen hydrolysieren einzeln die Substitutionen und ermöglichen so die vollständige Hydrolyse (de Vries und Visser, 2001).

1.2.5 Hemicellulose-assoziierte Polysaccharide

Die Polysaccharide Arabinan, Galactan und Arabinogalactan sind als Seitenketten von Rhamnogalacturonan I über Ferulasäure-Dimere und Esterbindungen mit den Hemicellulosen assoziiert und tragen zur Quervernetzung der Polysaccharide bei. Im Rückgrat des Pektins Rhamnogalacturonan I sind die Seitenketten am O-4 der L-Rhamnopyranose verknüpft. Der Polymerisationsgrad der Seitenketten variiert und liegt zwischen einer und 50 Glycosideinheiten. Zusätzlich können α -(1,5)-verknüpfte Arabinane auch als freie Polymere ohne Bindung an Pektine existieren (de Vries und Visser, 2001; Verhertbruggen *et al.*, 2009).

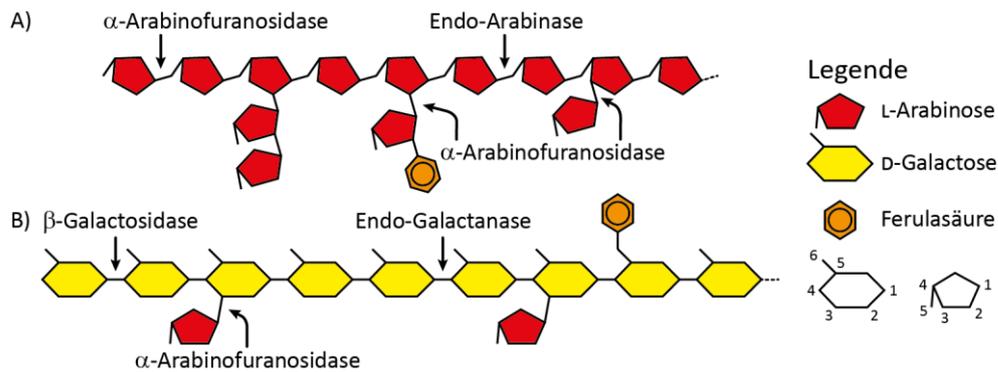


Abbildung 1.6 Schematische Struktur von (A) Arabinan und (B) Arabinogalactan mit Enzymaktivitäten für die Hydrolyse. Strukturinformationen und Enzymaktivitäten wurden abgeleitet aus: Ridley *et al.* (2001), Verhoef *et al.* (2009) und de Vries und Visser (2001).

Arabinane

Arabinane sind lineare oder verzweigte Polysaccharide mit einem α -(1,5)-L-Arabinofuranose-Rückgrat. Verzweigte Arabinane sind an den Positionen O-2 oder O-3 der L-Arabinofuranose mit α -(1,2)- und/oder α -(1,3)-verknüpften L-Arabinofuranosen oder kurzen Arabinooligosacchariden verzweigt (Abbildung 1.6) (Verhoef *et al.*, 2009). Die endständigen L-Arabinofuranoseeinheiten können am O-2 mit Ferulasäure substituiert sein (de Vries und Visser, 2001).

Bei der enzymatischen Hydrolyse von Arabinanen wird das Rückgrat von Endo-Arabinanasen zu Oligosacchariden hydrolysiert. Auch einige α -Arabinofuranosidasen besitzen die Fähigkeit, das Polysaccharid zu spalten. Die freigesetzten Oligosaccharide werden von α -Arabinofuranosidasen zu L-Arabinose hydrolysiert (de Vries und Visser, 2001).

Galactane

Galactane sind überwiegend lineare Polysaccharide mit einem Rückgrat aus β -(1,4)-verknüpften D-Galactopyranoseeinheiten. Sind die Galactane am O-3 der Galactopyranose mit α -L-Arabinofuranose substituiert, werden sie als Arabinogalactane (AG I) bezeichnet (Abbildung 1.6). Galactane können am O-6 der Galactoseeinheit mit Ferulasäure substituiert sein (de Vries und Visser, 2001; Verhoef *et al.*, 2009).

Die enzymatische Hydrolyse von Galactan und Arabinogalactan erfordert Endo-Galactanasen, Exo-Galactanasen, β -Galactosidasen und gegebenenfalls α -Arabinofuranosidasen. Die Galactanasen hydrolysieren das Galactanrückgrat und setzen Galactobiose und Galactose frei. Exo-Galactanase und β -Galactosidase spalten D-Galactose vom Polysaccharid ab und die β -Galactosidase hydro-

lysiert Galactobiose. Die Arabinosylierungen werden von α -Arabinofuranosidasen hydrolysiert (de Vries und Visser, 2001).

1.2.6 Isolierung hemicellulosischer Polysaccharide

Die Isolierung der Hemicellulosefraktion aus lignocellulosischer Biomasse wird gewöhnlich durch eine alkalische Extraktion mit NaOH oder KOH erreicht. Um die komplexe Struktur zu schwächen und die chemische Reaktivität zu erhöhen, wird die Lignocellulose zuvor durch eine Vorbehandlung delignifiziert (Hongzhang und Liying, 2007; Sun *et al.*, 2005). Bei einer alkalischen Delignifizierung mit NaOH (3–8 % der Trockenmasse) können die Delignifizierung und die Extraktion der Hemicellulosefraktion parallel in einer Reaktion stattfinden (Pihlajaniemi *et al.*, 2016). Zur Fraktionierung, Solubilisierung und Trennung von Lignocellulose werden verschiedene mechanische, thermo-mechanische und chemische Vorbehandlungen eingesetzt. Die physikalische Struktur der Lignocellulose kann durch Vorbehandlung mit Laugen, konzentrierten oder verdünnten Säuren (z.B. H_2SO_4) und organischen Lösungsmitteln (*organosolv* Verfahren) oder durch Dampfexplosion (*steam explosion*) geöffnet werden. Bei der Dampfexplosion und der Vorbehandlung mit Säuren werden die glycosidischen Bindungen der Hemicellulosen meist hydrolysiert, weshalb beide Methoden nicht für die Isolierung von hemicellulosischen Polysacchariden geeignet sind (Saha, 2003). Bei der Verwendung von Säuren entstehen zusätzlich Furfural und HMF, die eine spätere enzymatische Hydrolyse inhibieren können (Girio *et al.*, 2010). Die alkalische Extraktion hat den Nachteil, dass Esterbindungen mit phenolischen Säuren und auch Acetylierungen gespalten werden und somit verloren gehen. Eine weitere Möglichkeit ist die Extraktion von hemicellulosischen Polysacchariden mit Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Hemicellulosen werden durch DMSO nicht verändert und behalten ihre natürliche Struktur, DMSO ist jedoch teuer und lässt sich nur schwer von der Hemicellulosefraktion trennen. Hemicellulosische Polysaccharide werden nach der Extraktion durch Präzipitation in 60–75 % Ethanol isoliert (Haimer *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2005).

1.3 Mikrobielle Hydrolyse lignocellulosischer Biomasse

Lignocellulose wird infolge der bereits beschriebenen, komplexen und unlöslichen Struktur und der daraus folgenden Widerstandsfähigkeit gegenüber mikrobiellen Angriffen nur von wenigen Mikroorganismen effizient hydrolysiert. Die meisten Vertreter dieser saccharolytischen Mikroorganismen sind Pilze und anaerobe Bakterien. Saccharolytische Bakterien hydrolysieren lignocellulosische Biomasse in mesophilen sowie thermophilen Ökosystemen, wie z.B. Waldböden,

heißen Quellen und verrottenden Pflanzenresten (Himmel *et al.*, 2010). Auch im Verdauungstrakt von Termiten und Wiederkäuern hydrolysieren anaerobe Bakterien die pflanzliche Biomasse (Zverlov und Schwarz, 2008). Saccharolytische Bakterien sind hervorragend an ihre speziellen Nischen angepasst und hydrolysieren lignocellulose Biomasse durch die Sekretion einer großen Anzahl von hydrolytischen Enzymen in die extrazelluläre Umgebung. Zu ihren Enzymsystemen gehören Cellulasen, Hemicellulasen, Pektinasen und weitere kohlenhydrataktive Enzyme wie Polysaccharidlyasen und Esterasen (Himmel *et al.*, 2010; Koeck *et al.*, 2014).

Die hydrolytischen Enzyme können als Werkzeuge für eine effiziente industrielle Hydrolyse lignocellulose Biomasse eingesetzt werden. Speziell die Enzyme von thermophilen Bakterien sind von großem Interesse für die industrielle Biotechnologie, da sie thermostabiler als die Enzyme mesophiler Bakterien sind und somit höhere Prozesstemperaturen ermöglichen. Höhere Temperaturen minimieren das Risiko einer mikrobiellen Kontamination, reduzieren die Viskosität der Substrate und erhöhen gleichzeitig die Löslichkeit der Substrate sowie die Reaktionsrate der Enzyme (Blumer-Schuetz *et al.*, 2014). Die effiziente Hydrolyse von Lignocellulose erfordert die gleichzeitige Anwesenheit einer Vielzahl von synergistischen Enzymaktivitäten in hohen lokalen Konzentrationen. Um dies zu erreichen haben saccharolytische Bakterien verschiedene Enzymsysteme entwickelt (Zverlov und Schwarz, 2008).

1.3.1 Enzymsysteme saccharolytischer Bakterien

Die saccharolytischen Bakterien haben drei dominante Enzymsysteme zur Hydrolyse von lignocellulose Biomasse entwickelt. Diese bestehen aus freien Einzelenzymen, multifunktionalen Enzymen oder einem Multienzymkomplex (Cellulosom) (Koeck *et al.*, 2014). Enzymsysteme mit freien Einzelenzymen werden hauptsächlich von Pilzen und aeroben Bakterien verwendet, aber auch anaerobe Bakterien produzieren Einzelenzyme. Die spezifischen Einzelenzyme werden in großen Mengen sekretiert und wirken synergistisch zusammen, um pflanzliche Zellwandpolysaccharide zu hydrolysieren. Neben ihrem katalytischen Modul besitzen freie Enzyme häufig ein Kohlenhydrat-Bindungsmodul (CBM), welches die Enzyme an die Oberfläche der Polysaccharide bindet. (Himmel *et al.*, 2010; Schwarz, 2001). Multifunktionale Enzyme bestehen aus mehreren katalytischen Modulen sowie zusätzlichen CBMs und sind sowohl in freien Enzymsystemen als auch in cellulosomalen Systemen vertreten. Dank einer räumlichen Nähe und dem intramolekularen Synergismus der benachbarten katalytischen Module, können multifunktionale Enzyme Polysaccharide sehr effektiv hydrolysieren (Himmel *et al.*, 2010).

Einige anaerobe Bakterien produzieren einen extrazellulären Enzymkomplex, ein sogenanntes Cellulosom, zur Hydrolyse von pflanzlichen Polysacchariden. Cellulosomen bestehen aus einer nicht-katalytischen Untereinheit, dem Scaffoldin, und einer variablen Anzahl von enzymatischen Untereinheiten, die über hochspezifische Protein-Protein Interaktionen an das Strukturprotein gebunden sind. Die Strukturproteine binden über ein eigenes CBM an die Substratoberfläche und können sich zusätzlich an die Zelloberfläche binden. Durch die räumliche Nähe wirken die einzelnen Enzyme der Cellulosomen synergistisch zusammen und bilden das effektivste Enzymsystem für die Hydrolyse pflanzlicher Zellwandpolysaccharide (Himmel *et al.*, 2010; Schwarz, 2001).

Viele Bakterien der Klasse *Clostridia* besitzen Enzymsysteme zur Hydrolyse von pflanzlichen Zellwandpolysacchariden. Das Cellulosom von *Clostridium thermocellum* ist eines der effektivsten und am besten charakterisierten cellulosomalen Systeme für die Hydrolyse von kristalliner Cellulose, während *Clostridium stercoarium* pflanzliche Polysaccharide sehr effektiv mit einem System aus freien Einzelenzymen hydrolysiert (Koeck *et al.*, 2014; Zverlov und Schwarz, 2008).

1.3.2 Kohlenhydrataktive Enzyme (CAZymes)

Die Komplexität und Heterogenität der pflanzlichen Zellwandpolysaccharide spiegelt sich in der Vielfalt der Enzyme wieder, die saccharolytische Organismen zur Hydrolyse von Polysacchariden produzieren (Blumer-Schuetz *et al.*, 2014). Enzyme, die glycosidische Bindungen spalten, modifizieren oder erzeugen, werden als kohlenhydrataktive Enzyme (*Carbohydrate-Active Enzymes*; CAZymes) in der CAZy-Datenbank gesammelt. Die katalytischen Module dieser Enzyme werden in fünf funktionelle Gruppen eingeteilt: Glycosidhydrolasen (GH), Kohlenhydraterasen (CE), Polysaccharidlyasen (PL), Glycosyltransferasen (GT) und Hilfsaktivitäten (AA). In vielen Enzymen haben zusätzliche nicht-katalytische Kohlenhydrat-Bindungsmodule (CBM) eine wichtige Funktion. Basierend auf ihrer Aminosäuresequenz und der daraus resultierenden Faltung werden diese Module in Familien unterteilt (Lombard *et al.*, 2014). Die Zugehörigkeit zu einer Familie liefert Einblicke in die Strukturmerkmale, die evolutionäre Beziehung zu anderen Familienmitgliedern und den Wirkmechanismus des Moduls (Himmel *et al.*, 2010).

Die Glycosidhydrolasen sind die größte Gruppe der kohlenhydrataktiven Module. GH-Module spalten die glycosidische Bindung zwischen zwei Kohlenhydraten oder einem Kohlenhydrat und einem Nicht-Kohlenhydrat. Die CAZy-Datenbank unterteilt die Glycosidhydrolasen aktuell in 163 Familien (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>; am 11.06.2019). Nicht klassifizierte GH-Module (GHnc) können keiner Familie zugeordnet werden; neue Familien werden basierend auf der publizierten Aktivität von mindestens einem Enzym der Familie erstellt (Lombard *et al.*,

2014). Im Gegensatz zu den EC-Nummern (*Enzyme Commission number*) der EC-Klassifikation, die Enzyme einer spezifischen enzymatischen Reaktion zuordnen, sind viele der sequenzbasierten GH-Familien polyspezifisch und enthalten Enzyme mit unterschiedlichen Substratspezifitäten. Gleichzeitig sind Enzyme mit identischer Enzymaktivität auf verschiedene Familien verteilt (Henrissat und Davies, 1997). So sind Xylanasen z.B. in mehreren Familien vertreten: Die Familien GH10, GH5, GH8 und GH43 sind polyspezifisch, die Familie GH11 ist hingegen monospezifisch und enthält ausschließlich Endo- β -1,4-Xylanasen, mit Ausnahme einiger Endo- β -1,3-Xylanasen (Chakdar *et al.*, 2016; Lombard *et al.*, 2014). Glycosidhydrolasen spalten glycosidische Bindungen durch eine säurekatalysierte Hydrolyse, bei der es zu einer Beibehaltung (*retention*) oder Umkehr (*inversion*) der Konfiguration des anomeren Kohlenstoffatoms kommt. Basierend auf der Position der Spaltung wird zwischen Endo-Glycosidhydrolasen, die Bindungen innerhalb der Polymerkette hydrolysieren, und Exo-Glycosidhydrolasen, die Kohlenhydrate vom reduzierenden oder nicht reduzierenden Ende eines Poly- oder Oligosaccharids abspalten, unterschieden (Henrissat und Davies, 1997).

Kohlenhydraterasen katalysieren die Hydrolyse von Carbonsäureestern und sind neben den Glycosidhydrolasen die wichtigsten Enzyme für die Hydrolyse von acetylierten oder feruloylierten Zellwandpolysacchariden, wie z.B. Xylanen (Biely *et al.*, 2016). Polysaccharidlyasen spalten glycosidische Bindungen in Uronsäure-haltigen Polysacchariden durch den Mechanismus der β -Eliminierung und produzieren einen ungesättigten Uronsäurerest sowie ein neues reduzierendes Ende am Polysaccharid.

Glycosyltransferasen erzeugen neue glycosidische Bindungen und katalysieren den Transfer eines Kohlenhydratrestes von einem aktivierten Donormolekül auf einen spezifischen Akzeptor. Die Gruppe der Hilfsaktivitäten fasst ligninolytische Enzyme und lytische Polysaccharid-Monooxygenasen (LPMO) zusammen. Ligninolytische Enzyme sind nicht an der Spaltung von Kohlenhydraten beteiligt, da Lignin jedoch mit Zellwandpolysacchariden assoziiert ist, kooperieren ligninolytische und kohlenhydrataktive Enzyme miteinander (Lombard *et al.*, 2014). Lytische Polysaccharid-Monooxygenasen unterstützen den Abbau von Polysacchariden durch die oxidative Spaltung von glycosidischen Bindungen (Horn *et al.*, 2012). Kohlenhydrat-Bindungsmodule sind häufig mit Glycosidhydrolasen assoziiert und erleichtern die Hydrolyse von unlöslichen Polysacchariden. Die CBMs binden selektiv an Oligo- oder Polysaccharide und fördern so die Assoziation des Enzyms an das Substrat (Boraston *et al.*, 2004).

1.3.3 Synergistische Hydrolyse von Polysacchariden

Wie in Kapitel 1.2 beschrieben wurde, erfordert die Hydrolyse von heterogenen Polysacchariden jeweils mehrere hydrolytische Enzyme mit unterschiedlichen Aktivitäten. In einem effektiven Enzymsystem wirken die Enzymaktivitäten darüber hinaus bei der Hydrolyse der Polysaccharide synergistisch zusammen. Enzyme, die einen Synergismus zeigen, produzieren in Kombination mehr Endprodukte, als die einzelnen Enzyme in Summe produzieren könnten. Der Grad der synergistischen Wirkung ist als das Verhältnis der Aktivität der kombinierten Enzyme zu der Summe der individuellen Aktivitäten definiert und ermöglicht eine quantitative Bewertung des Synergismus (Riedel *et al.*, 1997). Zum Beispiel wurden bei der Hydrolyse von Xylan Synergismen zwischen Xylanasen und Acetylxylan Esterasen, α -L-Arabinofuranosidasen und β -Glucuronidasen nachgewiesen (Biely *et al.*, 2016; Himmel *et al.*, 2010).

1.4 *Clostridium stercoarium*

Clostridium stercoarium ist ein thermophiles, obligat anaerobes, cellulolytisches Bakterium, das effizient pflanzliche Polysaccharide abbaut und auf die Hydrolyse von Hemicellulose spezialisiert ist. Das ubiquitäre, sporenbildende Bakterium mit einem Temperaturoptimum von 65 °C und einem pH-Optimum von pH 7,3 wurde ursprünglich aus Kompost isoliert und als eines der ersten cellulolytischen Bakterien beschrieben (Madden, 1983). Es gehört zu den wichtigsten Bakterien bei dem Abbau von pflanzlicher Biomasse und wurde wiederholt aus Biogasanlagen isoliert (Zverlov *et al.*, 2010). *C. stercoarium* hydrolysiert mit hoch aktiven, hemicellulolytischen Einzelenzymen sehr effizient Hemicellulosen, verwertet die Abbauprodukte, Hexosen wie Pentosen, und produziert Ethanol, Laktat, Acetat, CO₂ und H₂. Cellulose wird von *C. stercoarium* hingegen nur langsam und unvollständig hydrolysiert (Zverlov *et al.*, 2010; Zverlov und Schwarz, 2008). In Kokultur mit *C. thermocellum* hydrolysiert *C. stercoarium* Lignocellulose jedoch schneller, als es eine der Clostridien-Spezies alleine vermag (Zverlov *et al.*, 2010). *C. stercoarium* gehört zur Familie der *Ruminococcaceae* in der phylogenetischen Ordnung der *Clostridiales* (Ludwig *et al.*, 2009). Im Jahr 2013 wurde vorgeschlagen, *C. stercoarium* in die neue Gattung *Ruminiclostridium* einzuordnen. Die Reklassifizierung entsprach jedoch nicht den Nomenklaturregeln und wurde nicht im *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* veröffentlicht. In einer aktuellen, gültigen Publikation wird vorgeschlagen *C. stercoarium* der neuen Gattung *Thermoclostridium* zuzuordnen und in *Thermoclostridium stercoarium* umzubenennen (Yutin und Galperin, 2013; Zhang *et al.*, 2018).

Das Genom von *C. stercorarium* enthält eine große Anzahl von Genen, die kohlenhydrataktive Enzyme für den Abbau von Zellwandpolysacchariden, insbesondere für die Hydrolyse von Hemicellulosen, kodieren (Poehlein *et al.*, 2013). Die Gene sind über das Genom verteilt und nicht in Genclustern angeordnet (Schwarz *et al.*, 1995b). Siebzehn *C. stercorarium* Enzyme mit kohlenhydrataktiven Modulen wurden bereits in früheren Publikationen charakterisiert (Tabelle 1.3).

C. stercorarium produziert zwei Cellulasen: Cel9Z (Avicelase I) und Cel48Y (Avicelase II). Dieses Zweikomponenten-Enzymsystem dient als Modell für das einfachste anaerobe Cellulase-System zum Abbau kristalliner Cellulose (Koeck *et al.*, 2014). Cel9Z, das Endo-Glucanase und Exo-Glucanase Aktivität kombiniert, und die Exo-Glucanase Cel48Y zeigen bei der Hydrolyse von kristalliner Cellulose einen synergistischen Effekt (Riedel *et al.*, 1997).

Tabelle 1.3 In der Literatur beschriebene kohlenhydrataktive Enzyme von *C. stercorarium*.

Enzym	Enzymaktivität	Familie	Literatur
Glycosidhydrolasen (GH):			
Bxl3B	β -D-Xylosidase	GH3	(Adelsberger <i>et al.</i> , 2004; Schwarz <i>et al.</i> , 1990)
Bgl3Z	β -D-Glucosidase	GH3	(Adelsberger <i>et al.</i> , 2004)
Cel9Z	Endo- β -(1,4)-Glucanase	GH9	(Bronnenmeier und Staudenbauer, 1990; Jauris <i>et al.</i> , 1990)
Xyn10C	Endo- β -1,4-Xylanase	GH10	(Ali <i>et al.</i> , 1999; Schwarz <i>et al.</i> , 1990)
Xyn10B	Endo- β -1,4-Xylanase	GH10	(Fukumura <i>et al.</i> , 1995; Schwarz <i>et al.</i> , 1990)
Xyn11A	Endo- β -1,4-Xylanase	GH11	(Sakka <i>et al.</i> , 1993a; Schwarz <i>et al.</i> , 1990)
Aga36A	α -D-Galactosidase	GH36	(Suryani <i>et al.</i> , 2003)
Bxl39A	β -D-Xylosidase	GH39	(Adelsberger <i>et al.</i> , 2004; Schwarz <i>et al.</i> , 1990)
Arf43A	α -L-Arabinofuranosidase	GH43	(Adelsberger <i>et al.</i> , 2004; Schwarz <i>et al.</i> , 1990)
Xyl43B	β -D-Xylosidase	GH43	(Suryani <i>et al.</i> , 2004)
Xyl43A	β -D-Xylosidase	GH43	(Sakka <i>et al.</i> , 1993b)
Cel48Y	Exo- β -1,4-Glucanase	GH48	(Bronnenmeier <i>et al.</i> , 1997; Bronnenmeier <i>et al.</i> , 1991)
Arf51B	α -L-Arabinofuranosidase	GH51	(Schwarz <i>et al.</i> , 1990; Schwarz <i>et al.</i> , 1995a; Zverlov <i>et al.</i> , 1998)
Agu67A	α -D-Glucuronidase	GH67	(Bronnenmeier <i>et al.</i> , 1995)
Ram78A	α -L-Rhamnosidase	GH78	(Zverlov <i>et al.</i> , 2000)
Kohlenhydratesterasen (CE):			
–	Ferulylesterase	–	(Donaghy <i>et al.</i> , 2000)
Polysaccharidlyasen (PL):			
Pel9A	Pektatlyase	PL9	(Si Si <i>et al.</i> , 2005)

–: In der Publikation zu der Ferulylesterase wird kein Enzymname und keine CE-Familie genannt.

Durch das Screening einer genomischen Bibliothek wurden sieben Gene identifiziert, die mit der Hydrolyse von Arabinoxylan in Zusammenhang stehen und drei Endo-Xylanasen (Xyn11A, Xyn10B,

Xyn10C), zwei α -L-Arabinofuranosidasen (Arf43A, Arf51B) und zwei β -D-Xylosidasen (Bxl39A, Bxl3B) kodieren (Schwarz *et al.*, 1990). Alle drei Xylanasen wurden ausführlich beschrieben (Ali *et al.*, 1999; Fukumura *et al.*, 1995; Sakka *et al.*, 1993a). Ein komplexes Enzymsystem für die Hydrolyse von Arabinoxylan zu D-Xylose und L-Arabinose aus drei rekombinant produzierten Enzymen, Xyn11A oder Xyn10C, Arf51B und Bxl3B, wurde rekonstituiert (Adelsberger *et al.*, 2004). Die α -L-Arabinofuranosidase Arf51B hydrolysierte dabei die Arabinosesubstitutionen und ermöglichte so die vollständige Hydrolyse des Arabinoxylan (Schwarz *et al.*, 1995a). Die α -L-Rhamnosidase Ram78A hydrolysiert Naringin zu Prunin und Rhamnose und wurde zur Herstellung von Rhamnose aus Zitruschalen eingesetzt (Kaur *et al.*, 2010; Zverlov *et al.*, 2000). Neben den Glycosidhydrolasen wurden bisher eine extrazelluläre Feruloylsterase, eine Pektatlyase (Pel9A), sowie eine Cellobiosephosphorylase (CepA) und eine Cellodextrinphosphorylase (CepB) charakterisiert (Donaghy *et al.*, 2000; Reichenbecher *et al.*, 1997; Si Si *et al.*, 2005).

Obwohl *C. stercorarium* einer der Modellorganismen für kohlenhydratabbauende Bakterien ist, wurden bisher nur wenige Einzelenzyme und die Enzymsysteme für die Hydrolyse von Cellulose und Xylan ausführlich charakterisiert. *C. stercorarium* produziert eine große Anzahl mutmaßlich hemicellulolytischer Enzyme mit bisher unidentifizierten Aktivitäten, die auf eine Charakterisierung für mögliche Anwendungen warten (Koeck *et al.*, 2014).

1.5 Zielsetzung der Dissertation

Hemicellulolytische Polysaccharide werden bei der industriellen Hydrolyse von lignocellulose Biomasse oft vernachlässigt, wodurch über ein Drittel der enthaltenen Kohlenhydrate ungenutzt bleibt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der hemicellulolytischen Enzyme von *C. stercorarium* und der Frage, wie diese Enzyme für eine effiziente und vollständige Hydrolyse von Hemicellulosen eingesetzt werden können. Die Arbeit gliedert sich im Wesentlichen in zwei Teile: die biochemische Charakterisierung der hemicellulolytischen Enzyme und die Kombination der charakterisierten Enzyme zur vollständigen Hydrolyse ausgewählter hemicellulose Polysaccharide und natürlicher Hemicellulose.

Im ersten Teil der Arbeit sollte zunächst das hemicellulolytische Potential von *C. stercorarium* ermittelt werden, um zu identifizieren, welche Polysaccharide hydrolysiert werden und sich somit für die Charakterisierung der Enzyme eignen. Die hemicellulolytischen Glycosidhydrolasen und Kohlenhydratesterasen von *C. stercorarium* sollten identifiziert und anschließend rekombinant in *Escherichia coli* produziert werden. Dazu wurden alle Gene, die ein GH- oder CE-Modul kodieren,

für welches hemicellulolytische Enzymaktivitäten beschrieben sind, aus dem *C. stercorarium* Genom amplifiziert und in *E. coli* kloniert. Die Aktivität der gereinigten, rekombinanten Enzyme sollte mit gereinigten Polysacchariden und Arylglycosiden bestimmt werden. Abschließend sollten die Polysaccharid-hydrolysierenden Glycosidhydrolasen biochemisch charakterisiert werden, um die für einzelne Abbauschritte verantwortlichen Enzyme zu identifizieren und optimale Bedingungen für die folgende, möglichst vollständige Hydrolyse von Hemicellulosen zu bestimmen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die zuvor charakterisierten Enzyme kombiniert werden, um Polysaccharide nach Möglichkeit vollständig zu Monosacchariden zu hydrolysieren. Zusätzlich sollte Hemicellulose aus Weizenstroh isoliert werden, um die Enzyme auf einer industrienahen Hemicellulosepräparation zu testen. Dazu wurden Polysaccharide ausgewählt, für deren Hydrolyse Enzyme mit unterschiedlichen Enzymaktivitäten gefunden wurden, und es wurde Hemicellulose alkalisch aus Weizenstroh extrahiert. Zur Optimierung der Enzymkombinationen sollten mögliche Enzymsynergismen und die optimalen Reaktionsbedingungen, wie pH, Temperatur und Inkubationszeit, identifiziert werden. Abschließend sollte die Hemicellulosepräparation mit der besten Enzymkombination im Prototyp Maßstab (5 l) getestet werden.

Zusammengefasst sollte durch diese Arbeit eine gut charakterisierte *Toolbox* aus Hemicellulasen von *C. stercorarium* für die effektive und vollständige Hydrolyse unterschiedlicher hemicellulolytischer Polysaccharide und natürlicher Hemicellulose zur Verfügung gestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien, Nährmedien, Bakterienstämme und Substrate

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), GE Healthcare (Little Chalfont, England), J.T.Baker (Denventer, Niederlande), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Ipswich, USA), Serva Electrophoresis (Heidelberg), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) und VWR International (Radnor, USA) bezogen.

Tabelle 2.1 Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller
Aceton (für UV, IR, HPLC, GPC, ACS) (99,9 %)	AppliChem (Darmstadt)
Acetonitril (HPLC Ultra Gradient Grade) (≥ 99,95 %)	Carl Roth (Karlsruhe)
H ₂ SO ₄ (1 M)	Carl Roth (Karlsruhe)
NaOH (50 %ige Lösung)	VWR International (Radnor, USA)
Natriumacetat (≥ 99 %)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Tabelle 2.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
1 ml HisTrap™ FF-Säulen	GE Healthcare (Little Chalfont, England)
Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel (4–15 %)	Bio-Rad (Hercules, USA)
TLC Silica gel 60/ DC Kieselgel 60	Merck (Darmstadt)
Whatman™ Filter Paper Grade 1	GE Healthcare (Little Chalfont, England)

Tabelle 2.3 Verwendete Enzyme, Kits und Längenstandards

Name	Hersteller
DreamTaq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Restriktionsenzyme (BamHI-HF, MluI, NdeI, XhoI, PvuI-HF)	New England Biolabs (Ipswich, USA)
CutSmart® Buffer	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Gibson Assembly® Master Mix	New England Biolabs (Ipswich, USA)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Material und Methoden

Name	Hersteller
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad (Hercules, USA)
cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz)
Lysozym	AppliChem (Darmstadt)
Glycosidhydrolasen:	ASA Spezialenzyme (Wolfenbüttel)
- Xylanase Xyn11A (6.059 U/g)	
- Xylanase Xyn10B (7.536 U/g)	
- α -Arabinofuranosidase Arf51B (36 U/g)	
- Arabinoxylan-Arabinofuranohydrolase Axh43A (4.242 U/g)	
- β -Xylosidase Bxl3B (22 U/g)	
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAquick Purification Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden)
Acetic Acid Assay Kit (K-ACETRM)	Megazyme (Bray, Ireland)
L-Arabinose/D-Galactose Assay Kit (K-ARGA)	Megazyme (Bray, Ireland)
D-Xylose Assay Kit (K-XYLOSE)	Megazyme (Bray, Ireland)
Xylanase Assay Kit (Azo-Wax) (K-AZOWAX)	Megazyme (Bray, Ireland)

2.1.2 Geräte und Software

Tabelle 2.4 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Bioreaktor:	
BIOSTAT® B Single Benchtop-Bioreaktor	Sartorius (Göttingen)
UniVessel® Glass 5 L	Sartorius (Göttingen)
Pt100 Temperatursensor	Sartorius (Göttingen)
Easyferm Plus VP 325 pH-Elektrode	Hamilton Company (Bonaduz, Schweiz)
Chromatographie:	
ChromaJet DS 20 - 230 V	biostep (Burkhardtsdorf)
ÄKTA pure 25 L1 mit Sample Pump P9-S	GE Healthcare (Little Chalfont, England)
FPLC	Pharmacia LKB (Uppsala, Schweden)
- HPLC	
AZURA HPLC System	Knauer (Berlin)
AZURA Column Thermostat CT 2.1	Knauer (Berlin)
Smartline Autosampler KNAUER Optimas	Knauer (Berlin)
RefractoMax520 (RI-Detektor)	ERC (Riemerling)
Eurokat H, 10 μ m, 8 x 30 mm (Vorsäule)	Knauer (Berlin)
Eurokat H, 10 μ m, 8 x 300 mm (Trennsäule)	Knauer (Berlin)

Gerät	Hersteller
- HPAEC-PAD	
Dionex ICS-3000 Ion Chromatography System	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
ICS-3000 Eluent Organizer (EO)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
AS40 Automated Sampler	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
CarboPac™ PA1, 10 µm, 4 x 50 mm (Vorsäule)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
CarboPac™ PA1, 10 µm, 4 x 250 mm (Trennsäule)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Elektrophorese:	
Mini-PROTEAN® Tetra Cell (SDS-PAGE)	Bio-Rad (Hercules, USA)
2297 MACRODRIVE 5 Constant Power Supply	LKB Bromma (Stockholm, Schweden)
EPS 600 Electrophoresis Power Supply	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Sonifikator:	
Ultraschallprozessor UP200S	Hielscher Ultrasonics (Teltow)
Thermocycler:	
Biometra TAdvanced 96 G	Analytik Jena (Jena)
UV/VIS-Spektrometer:	
BioSpectrometer® fluorescence µCuvette G1.0	Eppendorf (Hamburg)
Lambda 35 UV/Vis Spectrophotometer	PerkinElmer (Waltham, USA)
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop Technologies (Wilmington, USA)
Ultrospec PLUS 4054 UV-Visible Spectrophotometer	Pharmacia LKB (Uppsala, Schweden)

Tabelle 2.5 Verwendete Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS2	Adobe Systems (San José, USA)
Chromeleon 7 Chromatography Data System (Version 7.2 SR3)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Clone Manager 9 Professional	Scientific & Educational Software (Denver, USA)
GraphPad Prism 6 (Version 6.01)	GraphPad Software (La Jolla, USA)
ImageJ (Version 1.48)	Wayne Rasband (NIH, Bethesda, USA)
SigmaPlot® 11	Systat Software (San José, USA)
UNICORN (Version 5.31)	GE Healthcare (Little Chalfont, England)

2.1.3 Nährmedien und Medienzusätze

Medien und Medienzusätze wurden 20 min bei 121 °C und 1,21 bar autoklaviert. Thermolabile Lösungen, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden steril filtriert (0,22 µm).

Material und Methoden

LB-Medium (lysogeny broth) (Bertani, 1951):

Tabelle 2.6 LB-Medium

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
pH 7,0 mit NaOH einstellen	
ddH ₂ O	auf 1.000 ml auffüllen
Festmedium	
Agar	15,0 g/l

SOC-Medium (Super optimal broth with catabolite repressor) (Hanahan, 1983)

Tabelle 2.7 SOC-Medium

Trypton	20,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
KCl	2,5 mM
ddH ₂ O	auf 900 ml auffüllen
Glucose	20,0 mM

Glucose wurde nach dem Autoklavieren aus einer sterilen Stammlösung (200 mM) hinzugegeben.

ZYP-5052-Medium zur Autoinduktion (Studier, 2005)

Tabelle 2.8 ZYP-5052-Medium

ZY	928 ml
20x NPS	50 ml
50x 5052	20 ml
1 M MgSO ₄	1 ml

Tabelle 2.9 Einzelkomponenten des ZYP-5052-Medium

ZY		50x 5052	
Trypton (Z)	10,0 g	Glycerin	250,0 g
Hefeextrakt (Y)	5,0 g	Glucose	25,0 g
pH 7,0 mit NaOH einstellen		Lactose	100,0 g
ddH ₂ O	auf 928 ml auffüllen	ddH ₂ O	auf 1.000 ml auffüllen
20x NPS		1 M MgSO₄	
(NH ₄) ₂ SO ₄	66,0 g	MgSO ₄ • 7 H ₂ O	24,65 g
KH ₂ PO ₄	136,0 g	ddH ₂ O	auf 100 ml auffüllen
Na ₂ HPO ₄	142,0 g		
pH 6,75 mit NaOH einstellen			
ddH ₂ O	auf 1.000 ml auffüllen		

GS2-Medium (Johnson et al., 1981)

Tabelle 2.10 GS2-Medium

Grundmedium		100x GS2-Salzlösung	
K ₂ HPO ₄	2,9 g	MgCl ₂ • 6 H ₂ O	10,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g	CaCl ₂ • 2 H ₂ O	150,0 mg
MOPS	10,0 g	FeSO ₄ • 7 H ₂ O	10,25 mg
Hefeextrakt	6,0 g	ddH ₂ O	auf 100 ml auffüllen
Harnstoff	2,1 g		
Na-Citrat • 2 H ₂ O	2,9 g		
L-Cystein	1,0 g		
Resazurin	2,0 mg		
pH 7,2 mit NaOH einstellen			
ddH ₂ O	auf 990 ml auffüllen		

Es wurden jeweils 0,5 % (w/v) der entsprechenden Kohlenstoffquelle vor (Cellulose, Xylan) oder nach (Cellobiose) dem Autoklavieren zugegeben. Die GS2-Salzlösung wurde steril filtriert und nach dem Autoklavieren zugegeben.

GS2-Medium wurde zunächst entgast und in einem Anaerobenzelt unter anaeroben Bedingungen in N₂/H₂-Atmosphäre (98:2 %, v/v) mit einem Butylgummistopfen und einem Aluminium Crimp-Verschluss verschlossen. Der im Medium vorhandene Restsauerstoff wurde durch Cystein zu Wasser reduziert. Resazurin, welches bei Kontakt mit Sauerstoff von farblos zu violett umschlägt, wurde als Redoxindikator eingesetzt.

Kohlenstoffquellen

Tabelle 2.11 Kohlenstoffquellen für GS2-Medium

10 % (w/v) Cellobiose		unlösliche Polysaccharide	
Cellobiose	10,0 g	Cellulose (Filterpapier Whatman™ Grade 1)	
ddH ₂ O	auf 100 ml auffüllen	Xylan (Haferspelzen)	

Tabelle 2.12 Glucose-Stammlösung für SOC-Medium

200 mM Glucose	
Glucose	36,0 g
ddH ₂ O	auf 1.000 ml auffüllen

Material und Methoden

Antibiotika-Stammlösung

Tabelle 2.13 Kanamycin-Stammlösung

Antibiotika-Stammlösung (50 mg/ml)

Kanamycin	500,0 mg
ddH ₂ O	auf 10 ml auffüllen

(Endkonzentration: 50 µg/ml)

2.1.4 Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 2.14 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Quelle
<i>Clostridium stercorarium</i> DSM-8532	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)
<i>Escherichia coli</i> DH10B	Invitrogen – Life Technologies (Carlsbad, USA)
<i>E. coli</i> BL21 Star (DE3)	Invitrogen – Life Technologies (Carlsbad, USA)

Die in dieser Arbeit verwendete genomische DNA von *C. stercorarium* DSM-8532 wurde von Daniela Köck isoliert und zur Verfügung gestellt.

Der pET-24c(+) Vektor von Novagen, Merck (Darmstadt) wurde für Klonierungen und zur heterologen Genexpression in *Escherichia coli* eingesetzt. Der Vektor trägt einen T7-Promotor, den Operator des *lac*-Operons, Gene für den *lac*-Repressor (*lacI*) und eine Kanamycin-Resistenz, sowie Sequenzen für einen N-terminalen T7-Tag und einen C-terminalen Polyhistidin-Tag (His₆-Tag).

2.1.5 Enzymsubstrate

Alle zur Bestimmung der Enzymaktivitäten verwendeten Substrate sowie deren Bezugsquellen sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst. Die *para*-Nitrophenol-Glycoside (*p*NP-Glycoside) wurden mit einer Endkonzentration von 0,1 M in Dimethylformamid (DMF) gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 2.15 Verwendete *para*-Nitrophenol Glycoside

<i>p</i> NP-Glycosid	Hersteller
<i>p</i> NP- α -L-Arabinofuranosid	Carbosynth (Compton, England)
<i>p</i> NP- α -D-Glucopyranosid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
<i>p</i> NP- β -D-Glucopyranosid	Alfa Aesar (Ward Hill, USA)
<i>p</i> NP- α -D-Galactopyranosid	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
<i>p</i> NP- β -D-Galactopyranosid	Carbosynth (Compton, England)

pNP-Glycosid	Hersteller
pNP- α -D-Mannopyranosid	Carbosynth (Compton, England)
pNP- β -D-Mannopyranosid	Carbosynth (Compton, England)
pNP- α -L-Rhamnopyranosid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
pNP- α -D-Xylopyranosid	Carbosynth (Compton, England)
pNP- β -D-Xylopyranosid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
pNP- β -D-Glucuronid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
pNP-N-acetyl- β -D-Glucosaminid	AppliChem (Darmstadt)

Oligosaccharide wurden mit einer Konzentration von 10 g/l (1 %) in ddH₂O gelöst und bei Bedarf weiter verdünnt. Die Polysaccharide wurden, sofern vorhanden, nach Herstellerangaben gelöst und vor der Verwendung auf eine Endkonzentration von 1 % (w/v) verdünnt. Von den übrigen Polysacchariden wurden 1 %ige (w/v) Stammlösungen in ddH₂O erstellt, mit Abweichungen für mikrokristalline Cellulose (0,5 %) und Glucomannan (0,25 %), die aufgrund hoher Viskosität in niedrigeren Konzentrationen verwendet wurden. Alle Polysaccharid-Stammlösungen wurden mit 0,02 % (w/v) NaN₃ bei 4 °C aufbewahrt.

Tabelle 2.16 Verwendete Oligosaccharide

Oligosaccharid	Hersteller
Arabinoxyloligosaccharide (Tabelle 2.45)	Megazyme (Bray, Ireland)
Glucosyl-/Cellooligosaccharide (G ₁ –G ₆)	Megazyme (Bray, Ireland)
Xylooligosaccharide (X ₁ –X ₅)	Megazyme (Bray, Ireland)
Xylo-oligosaccharide XOS95P	Shandong Longlive Bio-Tech (Yucheng, China)

Tabelle 2.17 Verwendete Polysaccharide

Polysaccharid	Hersteller
Arabinan (Zuckerrübe)	Megazyme (Bray, Ireland)
Arabinogalactan (Lärche)	Megazyme (Bray, Ireland)
Arabinoxylan (Weizen, mittlere Viskosität)	Megazyme (Bray, Ireland)
Arabinoxylan (Weizen, unlöslich)	Megazyme (Bray, Ireland)
β -Glucan (Gerste, mittlere Viskosität)	Megazyme (Bray, Ireland)
mikrokristalline Cellulose (Avicel)	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Chitosan	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Curdlan	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Galactan (Kartoffel)	Megazyme (Bray, Ireland)
Galactan (Lupine)	Megazyme (Bray, Ireland)
pektisches Galactan (Kartoffel)	Megazyme (Bray, Ireland)
pektisches Galactan (Lupine)	Megazyme (Bray, Ireland)
Galactomannan (Guarbohne, mittlere Viskosität)	Megazyme (Bray, Ireland)

Material und Methoden

Polysaccharid	Hersteller
Glucomannan (Konjakwurzel, hohe Viskosität)	Megazyme (Bray, Ireland)
Gummi arabicum (Akazie)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Inulin (Dahlienknollen)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Laminarin	Alfa Aesar (Ward Hill, USA)
Lichenin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Mannan	Megazyme (Bray, Ireland)
Mannan (Steinnuss)	Megazyme (Bray, Ireland)
4- <i>O</i> -Methyl-D-Glucurono-D-xylan	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	Carbosynth (Compton, England)
Pachyman	Megazyme (Bray, Ireland)
Polygalacturonsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Pullulan	ICN Biomedicals (Cleveland, USA)
Rhamnogalacturonan I	Megazyme (Bray, Ireland)
Sinistrin	Fresenius Kabi (Bad Homburg)
Xylan (Birke)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Xylan (Haferspелzen)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Xyloglucan (Tamarinde)	Megazyme (Bray, Ireland)
Aus Weizenstroh präparierte Hemicellulosen:	
Hemicellulosepräparation HP1	Eigene Präparation mit 1 % (w/v) NaOH isoliert
Hemicellulosepräparation HP2	Eigene Präparation mit 1 % (w/v) NaOH isoliert
Hemicellulosepräparation HP3	Eigene Präparation mit ddH ₂ O isoliert
Hemicellulosepräparation HP4	In Kooperation mit Dr. Karnik Tarverdi am Wolfson Centre for Materials Processing hergestellt. Institute of Materials and Manufacturing, Brunel University London (Uxbridge, England)

Acetylierte Monosaccharide zur Bestimmung der Enzymaktivität von Esterasen wurden mit einer Konzentration von 2,5 mM in 10 mM MOPS-Reaktionspuffer (5 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 6,5) gelöst. Feruloylierte *p*NP-Glycoside wurden mit einer Konzentration von 56 mM in DMF gelöst.

Tabelle 2.18 Verwendete Esterase Substrate

Substrat	Hersteller
Acetylierte Monosaccharide	
β-D-Glucose-pentaacetat (GPA)	Merck (Darmstadt)
1,2,3,4-Tetra- <i>O</i> -acetyl-D-xylopyranose (XTA)	Carbosynth (Compton, England)
Feruloylierte <i>p</i>NP-Glycoside	
<i>p</i> NP-2- <i>O</i> - <i>trans</i> -feruloyl-α-L-Arabinofuranosid	Peter Biely, PhD, DSc (institute of Chemistry, Slovak Academy of Science, Slowakei)
<i>p</i> NP-5- <i>O</i> - <i>trans</i> -feruloyl-α-L-Arabinofuranosid	

2.2 Bioinformatische Methoden

2.2.1 *In silico* Klonierung

Die Genomsequenz von *Clostridium stercorarium* DSM-8532 (NC_020134.1) wurde aus der NCBI Nukleotid-Datenbank (National Center for Biotechnology Information; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>; am 24.07.2014) heruntergeladen. Klonierungen in den pET-24c(+) Vektor wurden zunächst *in silico* mit dem Programm Clone Manager 9 Professional (Scientific & Educational Software) durchgeführt. Die Klonierungs- und Sequenzierungsprimer wurden ebenfalls mit Clone Manager 9 entworfen.

2.2.2 Berechnung von Signalpeptiden und Protein Parametern

N-terminale Signalpeptide wurden mit dem SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) und einem Cutoff-Wert von 0,3 vorhergesagt (Petersen *et al.*, 2011). Die molekulare Masse und der Extinktionskoeffizient ϵ der rekombinanten Proteine wurden mit dem ExpASY ProtParam Tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) bestimmt (Gasteiger *et al.*, 2005).

2.2.3 Identifizierung von Protein-Modulen

C. stercorarium Proteine mit GH-Modul wurden mit der CAZy-Datenbank (Carbohydrate Active Enzymes database; <http://www.cazy.org/>; am 24.07.2014) identifiziert (Lombard *et al.*, 2014). Weiter Module der Proteine wurden mit der Pfam-Datenbank (<https://pfam.xfam.org/>), der CAZy-Datenbank oder dem NCBI Protein BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) identifiziert (Finn *et al.*, 2016).

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von *Clostridium stercorarium*

C. stercorarium wurde anaerob bei 60 °C in GS2-Medium kultiviert. 50 ml GS2-Medium mit 0,5 % (w/v) Cellobiose wurden mit 1 ml *C. stercorarium* Kultur inokuliert und für 48–72 h inkubiert.

2.3.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

E. coli wurde aerob bei 37 °C in Flüssigmedium und auf Festmedium kultiviert. 5 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie oder 50 μ l Flüssigkultur inokuliert und bei 180 rpm über Nacht inkubiert. *E. coli* Glycerin-Stocks und Flüssigkulturen wurden auf LB-Festmedium ausgestrichen, über Nacht

inkubiert und bei 4 °C aufbewahrt. Medien zur Kultivierung von *E. coli* mit dem pET-24c(+) Vektor wurden 50 µg/ml Kanamycin zugegeben.

2.3.3 Bestimmung der optischen Dichte (OD₆₀₀)

Die optische Dichte von Bakterienkulturen wurde im UV/VIS-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) gemessen. Bakteriensuspensionen mit einer OD₆₀₀ über 0,5 wurden zunächst im Verhältnis 1:2 bis 1:20 im entsprechenden Medium verdünnt. Zur Bestimmung des Nullwertes wurde die OD₆₀₀ des entsprechenden Mediums als Referenz gemessen.

2.3.4 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* DH10B und BL21 Star Zellen für die Transformation wurden 250 ml LB-Medium in einem 1 l Kolben mit 5 ml einer Übernachtskultur inokuliert. Die Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,5–0,7 bei 37 °C und 180 rpm kultiviert und anschließend auf Eis gekühlt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis ausgeführt. 50 ml Bakterienkultur wurden 5 min bei 1.650 g zentrifugiert (4 °C) und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 25 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert (1.650 g, 5 min, 4 °C) und in 40 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert. Nach Zugabe von 8 ml Glycerin (99 %) wurden die Zellen gut durchmischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in 50 µl Aliquots aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.3.5 Glycerin-Stocks von *E. coli* Stämmen

Zur Aufrechterhaltung von Expressionsstämmen wurden Glycerin-Stocks der entsprechenden *E. coli* BL21 Star Stämme erstellt. 1 ml einer *E. coli* Kultur im exponentiellen Wachstum (OD₆₀₀: 0,6–0,8) oder einer Übernachtskultur (LB-Medium) wurden zu 500 µl Glycerin (99 %) gegeben, gut durchmischt und bei -80 °C eingefroren.

2.4 Gentechnische Methoden

2.4.1 Primer

Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert, in sterilem ddH₂O auf eine Konzentration von 10 pmol/µl verdünnt und bei -20 °C aufbewahrt. Alle Primer wurden so entworfen, dass ihre Schmelztemperatur in etwa 60 °C betrug.

Tabelle 2.19 Klonierungsprimer für Gibson-Assembly

Protein ID	Protein	Primer	Sequenz (5' → 3')
AGC67981.1	Bga2B	Cst-09830-F Cst-09830-R	...AACAGGAAAAGTGTGTTCAA ...TTTCTCAAACCTTAAACCATCCG
AGC67186.1	Bga2E	Cst-01600-F Cst-01600-R	...GACGTAAATACCATATCC ...GCCAAGCACTGTTTCAGGAT
AGC67268.1	Bga2D	Cst-LacZ1-F Cst-LacZ1-R	...AATAGAGAAATTTTGCATC ...AAAACCGTTTTTTACAGGTATTA
AGC67637.1	Bga2C	Cst-LacZ2-F Cst-LacZ2-R	...CTGCCCGTAAAAAATACTG ...TTCTATCTGTTTCACGAATAATG
AGC68382.1	Uid2A	Cst-UidA-F Cst-UidA-R	...GATACGAAGCATGTGG ...ATCTTTTATAGAAGCATAAAAATTC
AGC67275.1	Bxl3B	Cst-BxlB-F Cst-BxlB-R	...GAAAACAAACCTGTTTATCT ...CTGCACGCGCAGCACGG
AGC67337.1	Bgl3Z	Cst-BglZ-F Cst-BglZ-R	...GTAATACCAATTGTTGCAAG ...TTAATATTTGCATTCAAGTGTATC
AGC67350.1	-	Cst-03260-F Cst-03260-R	...ACTTTGAAGGAAAAGATAG ...ATACATGCCATCATTTTTTCAGTA
AGC68204.1	-	Cst-CbG-F Cst-CbG-R	...ACGGTAAATAACAAAAGCCG ...TGTAATTTAAAATTACTGATATTGGC
AGC68338.1	Nag3A	Cst-13470-F-ohneSP Cst-13470-R	...GAACATGAAAATTTCCGACTG ...GTTACCGAAATTTCTCACTCTT
AGC68873.1	Cel9Z	Cst-CelZ-F Cst-CelZ-R	...GCAGGATATAATTATGGGG ...CGGTTCAATTCCACTGACCA
AGC67515.1	Xyn10E	Cst-04930-F Cst-04930-R	...TTGACGGTAAAGGTTAAAAT ...TTTACCCATGATTACTTTCTTC
AGC67677.1	Xyn10C	Cst-D29-XynC1-F Cst-XynC1-R	...GAAACAACGGTTTATCATGAG ...TCTTAATCTTAAAAATGCCTC
AGC67715.1	Xyn10B	Cst-D34-XynB-F Cst-XynB-R	...TTTAACGATCAAACCTCTGCTG ...TTCCCGCAACCGTGAAGGA
AGC67759.1	Xyn10D	Cst-07550-F Cst-07550-R	...GAAAATAAACAGGCGGC ...ACTGTTTTAAAATTATTTTTCTCA
AGC68909.1	Xyn11A	Cst-D30-XynA-F Cst-XynA-R	...GGGCGAATAATTTACGACAATG ...AGTTCCTGATTTTGAGAATACAA
AGC68130.1	Man26A	Cst-D26-ManA1-F Cst-ManA1-R	...ACCGGGAGGCAAAAAGGTTT ...TTTTCCGCGATATTTTTCAAATC
AGC68671.1	-	Cst-16870-F Cst-16870-R	...GACAAAAACAAGGTTGC ...GTCGATTTTTGTAAGCTTATAAA
AGC67830.1	-	Cst-08310-F Cst-08310-R	...GGAAAAGTAAATATCGAAC ...TATGCCTTCCATTTTTCTACC
AGC67947.1	-	Cst-09490-F Cst-09490-R	...AGCTATACTACGGTTTT ...CTCAGTGCAGTCGGTTAATC
AGC67128.1	-	Cst-00970-F Cst-00970-R	...GACCGGAAAAAATATCTTG ...GTCCACCTGAATCTTAAACAC

Material und Methoden

Protein ID	Protein	Primer	Sequenz (5' → 3')
AGC68208.1	Bxl31D	Cst-12130-F Cst-12130-R	...AAATTCAGTGATGGTACTG ...GAACCGTTCATTAACCGTTAT
AGC69232.1	Bga35A	Cst-BgA-F Cst-BgA-R	...GCGGTTTATCATTGGA ...CATTATTTAAAACTGCTTCATG
AGC68033.1	-	Cst-10350-F Cst-10350-R	...CCGTTTCAGTAAGGAATGGG ...GGATTTTATCCTGAGCCTTAA
AGC67890.1	Bxl39A	Cst-BxlA-F Cst-BxlA-R	...GCAAGGGAAATCACAATA ...TTCAAGTCCAAAAAATTCATCC
AGC67716.1	Axh43A	Cst-D29-XynD-F Cst-XynD-R	...AATAAATACCGGGAAACATCC ...TTCGCTGAAATACAGTAATC
AGC67945.1	Arf43A	Cst-ArfA-F Cst-ArfA-R	...TTGAAAAATAACTCTTCAGAACC ...TCCTCTGCCGGTACTACC
AGC68110.1	Arf43C	Cst-11140-F Cst-11140-R	...CAGAATTCGAACATAAGAAC ...TTCATAAACCTGTTTTGATACTC
AGC68111.1	Abn43A	Cst-D31-11150-F Cst-11150-R	...GAAACGAAGGATAATCGTGC ...TTCAATGGCCAAATACCGC
AGC67521.1	Xyl43B	Cst-Xyl-F Cst-Xyl-R	...CAGCCTGACAACAAAC ...TTCAAATTCATATCTGAACCAG
AGC67885.1	Xyl43A	Cst-XylA1-F Cst-XylA1-R	...AGAAAACAGAGATTCAACC ...GTCAGTACACAGAGTGAATG
AGC69509.1	Bxl43C	Cst-XylB2-F Cst-XylB2-R	...CGTTACCATAATCCTAT ...CAGACTTATATCTTCTCTGTC
AGC67626.1	Arf51B	Cst-ArfB-F Cst-ArfB-R	...GCCAAATACGTAATCAAC ...GTCAACCGTAATGCTGACTAC
AGC68692.1	Gal53A	Cst-17100-F_kurz2 Cst-17100-R_kurz	...TACTGCGAAGGAAAGGAGG ...TTCAGTTTCAGGTTTCAGTTTC
AGC69355.1	Agu67A	Cst-AguA-F Cst-AguA-R	...AAACTGCCAAATTTCCGGA ...ATAAATTGTTCTCCCTTTTTCAT
AGC68061.1	Ram78A	Cst-10630-F Cst-10630-R	...AATCCTATGGGGTTTGTGATT ...TTCCACAGTAACCTTGTGAG
AGC69452.1	-	Cst-24950-F Cst-24950-R	...ATTGAAATTTCCGCACAG ...CCACAGAAGTATTCCAATTC
AGC67127.1	-	Cst-00960-F Cst-00960-R	...GCGGACGCTGAAGGG ...CGCATTAAAACCGGGATTTCAT
AGC68039.1	Xyn105F	Cst-10410-F Cst-10410-R	...GAAAATTATATTGATCTTGC ...TCCCCGCTGCCTAAAGC
AGC67892.1	-	Cst-08930-F Cst-08930-R	...CAGGAAAAAAAAGAAACC ...TTTCTTTGAAACGCTTTTCAGC
AGC67946.1	-	Cst-09480-F Cst-09480-R	...AAGAAATACGACAATAATTA ...TTTTCCATTCAGAGCATGC
AGC68044.1	-	Cst-10460-F Cst-10460-R	...GGTTATTATTTCCGGATG ...AATTCCTCCGTTATCAAGCC

Protein ID	Protein	Primer	Sequenz (5' → 3')
AGC68046.1	-	Cst-10480-F Cst-10480-R	...TCTGTAAACGTGGAAATG ...AATGAGCTCGGTCAGCATAA
AGC67967.1	-	Cst-09690-F Cst-09690-R	...GCTGAGATCCTGTTTCAGGG ...TCCGAGCAGCTTTTCCTTCA
AGC67053.1	-	Cst-00200-F Cst-00200-R	...GTGAAAATTATGGAGCATGTAT ...TCTGGCTCGTATCCATACCA
AGC67292.1	-	Cst-02680-F Cst-02680-R	...TTAACCAACACGGAAAAAT ...GCAGAAAGCAACAGGCAAC
AGC67072.1	RamB	Cst-00400-F Cst-00400-R	...TTTTTAAAAATAGCCGGG ...TTCAATATATATAAGCGGGGC
AGC68062.1	BglA	Cst-10640-F Cst-10640-R	...AATTCTGTGAGCGTGG ...ATATTGGCTACAGGTAATCAA
AGC69032.1	-	Cst-20590-F Cst-20590-R	...GAATCCACGAAGTTGG ...AACGGGATATATTTAACAGGC
AGC69275.1	ArfD	Cst-23150-F Cst-23150-R	...AGGAACTGGTCATTTACAG ...GTTTGTTCATATACCTTGACC
AGC69220.1	-	Cst-XynC2-F-neu Cst-XynC2-R(Marie)	...CTGAAAAGATTAACGGTTTTTA ...TTTTACAGCCCATTCAATCC
AGC67568.1	-	Cst-05460-F Cst-05460-R	...TTTCAAGCAAATTCAGTGGG ...TTCGGTTTCACCCCGCGC
AGC67840.1	AxeA	Cst-08410-F Cst-08410-R	...AGGACCATTTGTTTTTGT ...GAGGTATACAATTTCCCGG
AGC68379.1	-	Cst-PdaB-F Cst-PdaB-R	...GTGTCTTTGGTGTATGCCT ...CTGTTTTTTACCGGCGGGT
AGC69318.1	-	Cst-D28-23580-F Cst-23580-R	...ACGATGGAGAATGAGGAAAAC ...AAAATCAAGGCACTCTGAAAG
AGC68434.1	FaeA	Cst-CaH-F Cst-CaH-R	...GCTGTTTTTCAAATGCC ...TAAACCGAGCATAAACTGGTA
AGC69600.1	-	Cst-PemA-F Cst-PemA-R	...ATCGTCGAGCGGAC ...TTCCTGTCTGCCGCTCAG
AGC68045.1	-	Cst-10470-F Cst-10470-R	...TCTGAGACAAGGGTTA ...TTTTAAGTGTCCACAAGAGG

Es sind die Gen spezifischen Sequenzen angegeben, alle Primer beinhalten am 5'-Ende zusätzlich eine vektorspezifische Sequenz. *Forward*-primer (F): TTAAGAAGGAGATATACATATG... ; *Reverse*-primer (R): GTGGTGGTGGTGGTCTCGA... .

Tabelle 2.20 Sequenzierungsprimer

Primer	Beschreibung	Sequenz (5' → 3')
pET21a+ for	pET-24c(+) spezifisch; vorwärts	TCAAGACCCGTTTAGAGGCC
pET21a+ rev	pET-24c(+) spezifisch; rückwärts	ACGACTCACTATAGGGGAAT
Cst-09830-Seq1-F	Sequenzierungsprimer Bga2B	TTAAACTTAACGGCGTATGCG
Cst-09830-Seq1-R	Sequenzierungsprimer Bga2B	ACTGGAAATCTCGCCTTTGC
Cst-01600-Seq1-R	Sequenzierungsprimer Bga2E	ACCAAAGCCGTACCCTGAC
Cst-LacZ-Seq1-F	Sequenzierungsprimer Bga2D	GAGCCATAATCCGCATATGC

Primer	Beschreibung	Sequenz (5' → 3')
Cst-LacZ2-Seq1-R	Sequenzierungsprimer Bga2C	AAGTTCAAATTGTGCAAAGGC
Cst-BxlB-Seq1-F	Sequenzierungsprimer Bxl3B	ATCATGTTACGGCAACAGC
Cst-BglZ-Seq1-F	Sequenzierungsprimer Bgl3Z	AAACGGCGAGTATGCATCTG
Cst-03260-Seq1-F	Sequenzierungsprimer AGC67350.1	AAGCAACTATATGGAACAGG
Cst-CbG-Seq1-F	Sequenzierungsprimer AGC68204.1	TTACCGAAGAGGATATTGACC
Cst-CbG-Seq1-R	Sequenzierungsprimer AGC68204.1	AATCCATAATCGATGAAAGCTG
Cst-CelZ-Seq1-R	Sequenzierungsprimer Cel9Z	TAATTCCGTTCAAGGTATTGC
Cst-XynC1-Seq1-F	Sequenzierungsprimer Xyn10C	ACATCGGCAAGTTACG
Cst-XynC1-Seq1-R	Sequenzierungsprimer Xyn10C	AAGTTAACCTGTACTGGC
Cst-XynA-Seq1-F	Sequenzierungsprimer Xyn11A	ACAAGTGATTGGAACGC
Cst-12130-Seq1-R	Sequenzierungsprimer Bxl31D	CCAGCGCTTATATAAATCAGG
Cst-BgA-Seq1-R	Sequenzierungsprimer Bga35A	GGATTACTGACAACAACCTGC
Cst-10350-Seq1-F	Sequenzierungsprimer AGC68033.1	AAAGCCTTATACGCCAGTTC
Cst-XynD-Seq1-F	Sequenzierungsprimer Axh43A	TTATGGCGATGAAGAAGG
Cst-XynD-Seq1-R	Sequenzierungsprimer Axh43A	ATCGGTCCGGAACCTG
Cst-XynD-Seq2-F	Sequenzierungsprimer Axh43A	TGGCGATGCGTTATACC
Cst-17100-Seq1-F	Sequenzierungsprimer Gal53A	AAACAGGCTATAAATGGAATCC
Cst_17100-Seq1-R	Sequenzierungsprimer Gal53A	TTCATTGCCTGAAACGGCC
Cst-10630-Seq1-F	Sequenzierungsprimer Ram78A	AACTTGAGCCGAGAAGAAGC
Cst-10630-Seq1-R	Sequenzierungsprimer Ram78A	AGCATTGAATTCATCTCTCC
Cst-00960-Seq1-F	Sequenzierungsprimer AGC67127.1	AAAACGTTGACAGCCTGCC
Cst-10460-Seq1-F	Sequenzierungsprimer AGC68044.1	TTTTGTCATAAACCAAGTGTGG
Cst-00200-Seq1-F	Sequenzierungsprimer AGC67053.1	AACAGGATATCCCACTGG
Cst-02680-Seq1-F	Sequenzierungsprimer AGC67292.1	ATTCAGTGAAGAACGGC
Cst-00400-Seq1-F	Sequenzierungsprimer RamB	ATTCGGATGCAGTTTTCTTG
Cst-00400-Seq1-R	Sequenzierungsprimer RamB	TTCAGAAATTCGCCGTTATC
Cst-20590-Seq1-F	Sequenzierungsprimer AGC69032.1	AAAGATTATTGGGCCGCAGG
Cst-23150-Seq1-R	Sequenzierungsprimer ArfD	TACCGTATATTCCTGTTTCTC

F: *Forward*-primer; R: *Reverse*-primer.

2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR wurde zur Amplifikation von genomischer DNA und zur Überprüfung von Klonierungen (Kolonie-PCR) eingesetzt. Für Genamplifikationen wurde die Phusion DNA-Polymerase verwendet, während für analytische Kolonie-PCRs die DreamTaq DNA-Polymerase Verwendung fand.

Tabelle 2.21 Ansätze für die PCR

Art der PCR	Genamplifikation	Kolonie-PCR
ddH ₂ O	11,8 µl	15,5 µl
5x Phusion HF Buffer	4,0 µl	-
10x DreamTaq Buffer	-	2,0 µl
10 mM dNTPs	0,4 µl	0,4 µl
Forward-primer (10 pmol/µl)	1,0 µl	1,0 µl
Reverse-primer (10 pmol/µl)	1,0 µl	1,0 µl
DNA (<i>Template</i>) (20–100 ng)	1,0 µl	etwas Zellmaterial
DMSO	0,6 µl	-
Phusion DNA Polymerase (2 U/µl)	0,2 µl	-
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl)		0,1 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl	20,0 µl

Tabelle 2.22 PCR Programm Phusion DNA Polymerase

Zyklus Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1x
Denaturierung	98 °C	10 s	
Annealing	48–54 °C	30 s	30x
Elongation	72 °C	30 s/kb	
Abschließende Elongation	72 °C	5 min	1x

Tabelle 2.23 PCR Programm DreamTaq DNA Polymerase

Zyklus Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	1 min	1x
Denaturierung	95 °C	30 s	
Annealing	54 °C	30 s	30x
Elongation	72 °C	60 s/kb	
Abschließende Elongation	72 °C	5 min	1x

2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) aus einer 5 ml *E. coli* DH10B Übernachtskultur (LB-Medium) entsprechend dem Protokoll des Herstellers isoliert. Es wurden alle empfohlenen Waschschriffe durchgeführt. Um die Ausbeute der Plasmid-DNA zu erhöhen, wurde die QIAprep Säule, entgegen dem Protokoll, nach den Waschschriffen 2 min leer zentrifugiert und 5 min an der Luft getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 30 µl vorgewärmtes ddH₂O (60 °C) eluiert und bei -20 °C eingefroren.

2.4.4 Spaltung von DNA (Restriktionsverdau)

Plasmid-DNA wurde für Klonierungen und zur Überprüfung klonierter Vektoren mit Restriktionsendonukleasen gespalten. In einer Reaktion wurden bis zu drei Restriktionsenzyme eingesetzt. Die Reaktion wurde 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Restriktionsfragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt.

Tabelle 2.24 Ansatz für den Restriktionsverdau

DNA	1,0 µg
Restriktionsenzym (10 U)	0,5 µl
10x CutSmart Buffer	5,0 µl
ddH ₂ O	auf 50 µl auffüllen

Bei größeren DNA Mengen wurde der Ansatz multipliziert.

2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur analytischen oder präparativen Auftrennung von DNA-Proben eingesetzt. Zur Auftrennung wurden 1 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Agarose wurde mit 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht (2x) und zu einem Gel gegossen. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden 5 µl eines DNA-Längenstandards aufgetragen. Bei 120 V wurden die DNA-Fragmente für 35–45 min aufgetrennt. Zum Anfärben der DNA wurde das Agarosegel 15 min in eine 0,01 %ige (w/v) Ethidiumbromid-Lösung gegeben und anschließend kurz im Wasserbad abgespült. Unter UV-Licht wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht. Bei einer präparativen Auftrennung wurde die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten.

Tabelle 2.25 TAE-Puffer und DNA-Auftragspuffer

TAE-Puffer (50x)		DNA-Auftragspuffer (6x)	
TRIS pH 8,8	2,0 M	Glycerin	50,0 % (v/v)
Eisessig	1,0 M	ETDA	0,5 M
EDTA	0,1 M	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
ddH ₂ O	auf 1.000 ml auffüllen	Xylencyanol	0,25 % (w/v)

2.4.6 Aufreinigung von DNA

Restriktionsfragmente und PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick Purification Kit (QIAGEN) gereinigt, während zur Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel das QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) verwendet wurde. Die Aufreinigung erfolgte jeweils nach dem Protokoll des

Herstellers. Es wurden alle empfohlenen Waschschrirte durchgeföhrt. Die DNA wurde in 30 µl vorgewärmtem ddH₂O (60 °C) eluiert.

2.4.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA-Molekülen wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm im UV/VIS-Spektrometer (BioSpectrometer, NanoDrop) bestimmt. Zunächst wurde ein Nullabgleich mit 1,5 µl ddH₂O vorgenommen. Anschließend wurden 1,5 µl DNA-Lösung auf die Messfläche pipettiert, die Absorption gemessen und die DNA-Konzentration in ng/µl bestimmt.

2.4.8 Klonierung mittels Gibson Assembly (Gibson, 2009)

Die Klonierung von PCR-Produkten in den pET-24c(+) Vektor erfolgte nach der Gibson Assembly Methode mit dem Gibson Assembly Master Mix (New England Biolabs). Gibson Assembly Master Mix, lineare Plasmid-DNA und PCR-Produkt wurden gemischt und für 60 min bei 50 °C inkubiert. Für eine optimierte Klonierungseffizienz wurden 50–100 ng Plasmid-DNA mit einem 2–3-fachen, molaren Überschuss an PCR-Produkt (pmol) eingesetzt. Anschließend wurde die Reaktion direkt in *E. coli* DH10B transformiert oder bei -20 °C eingefroren. Die DNA-Konzentration des PCR-Produkts wurde anhand der Intensität der entsprechenden DNA-Bande auf einem Agarosegel abgeschätzt. Die molare DNA-Konzentration wurde mit der folgenden Formel berechnet.

$$\text{pmol (DNA)} = \mu\text{g (DNA)} \cdot \frac{\text{pmol}}{660 \text{ pg} \times 10^{-6}} \cdot \frac{1}{N}$$

600 pg/pmol : durchschnittliches Molekulargewicht eines Nukleotidpaares

N: Anzahl der Nukleotide

Formel 2.1 Berechnung der molaren DNA-Konzentration

Tabelle 2.26 Ansatz für Gibson Assembly

2x Gibson Assembly Master Mix	5,0 µl
DNA	(0,02–0,5 pmol)
- Plasmid-DNA	0,02–0,03 pmol
- PCR-Produkt	0,04–0,09 pmol
ddH ₂ O	auf 10 µl auffüllen

2.4.9 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* DH10B oder BL21 Star wurden chemisch kompetente Zellen des entsprechenden *E. coli* Stammes auf Eis aufgetaut. 1 µl Plasmid oder 5 µl

Gibson Assembly Reaktion wurden zu 50 µl der kompetenten Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 s bei 42 °C wurden die Zellen 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in 250 µl vorgewärmtes SOC-Medium (37 °C) aufgenommen und 1 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden 50 µl der Bakteriensuspension auf LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin ausplattiert, das Volumen wurde durch Zentrifugation auf 50 µl reduziert und das resuspendierte Zellpellet wurde ebenfalls ausplattiert. Die transformierten *E. coli* wurden über Nacht bei 37 °C kultiviert.

2.4.10 DNA-Sequenzierung

Plasmid-DNA wurde von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) sequenziert. DNA und Primer wurden in einem DNA-Primer-Mix gemischt und an Eurofins versendet.

Tabelle 2.27 Ansatz für den DNA-Primer-Mix

Plasmid-DNA	50–100	ng/µl
Primer (10 pmol/µl)	2,0	µl
ddH ₂ O	auf 17 µl auffüllen	

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Präparation sekretierter *C. stercorarium* Proteine

Für die Isolierung sekretierter Proteine wurde *C. stercorarium* in 500 ml GS2-Medium mit 0,2 % (w/v) Cellobiose und 0,5 % (w/v) Polysaccharid bis zur vollständigen Hydrolyse des Polysaccharids kultiviert. Die Hauptkultur wurde mit 25 ml *C. stercorarium* Kultur inokuliert und 3–5 Tage bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur 30 min bei 10.000 g (4 °C) zentrifugiert, die Zellen verworfen und der Kulturüberstand erneut zentrifugiert. Die Proteine im Überstand wurden durch tröpfchenweise Zugabe gesättigter Ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄) Lösung, bis zu einer Endkonzentration von 60 % (v/v), unter Rühren über Nacht bei 4 °C gefällt. Die gefällten Proteine wurden 30 min bei 10.000 g abzentrifugiert (4 °C), das Proteinpellet in 15 ml gesättigter (NH₄)₂SO₄-Lösung resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Bei Bedarf wurden 2 ml Proteinsuspension 20 min bei 16.000 g abzentrifugiert und die gefällten Proteine wurden in 200 µl 0,1 M MOPS-Reaktionspuffer (Tabelle 2.35) gelöst. Die Proteinlösung wurde erneut zentrifugiert und das Pellet verworfen.

2.5.2 Proteinproduktion in *E. coli*

Rekombinante *C. stercorarium* Proteine wurden in *E. coli* BL21 Star mit dem entsprechenden pET-24c(+) Expressionsvektor produziert. 250 ml ZYP-5052-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin wurden in einem 1 l Erlenmeyerkolben mit 3 ml *E. coli* Vorkultur (LB-Medium, OD₆₀₀: 0,6–0,8) inokuliert und 18 h bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Anschließend wurde die Bakterienkultur 10 min bei 3.500 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 40 ml Kulturüberstand resuspendiert und erneut 15 min bei 5.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.5.3 Native His₆-Affinitätsreinigung

Zellaufschluss

Die *E. coli* Zellen wurden für die Affinitätsreinigung der Proteine mit Ultraschall aufgeschlossen. Zunächst wurde das Zellpellet in 20 ml Lysepuffer resuspendiert und es wurden 200 µl 100 mg/ml Lysozym-Lösung und eine halbe Tablette Protease Inhibitor cOmplete™ Mini (Roche Diagnostics) hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, in Eiswasser gekühlt, zweimal 4 min mit Ultraschall aufgeschlossen (Amplitude: 60 %, Intervall: 0,25). Der Zellextrakt wurde 20 min bei 38.500 g zentrifugiert und der Überstand für die native His₆-Affinitätsreinigung in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde für eine spätere Analyse in 20 ml Lysepuffer resuspendiert.

Tabelle 2.28 Lysozym-Stammlösung

Lysozym-Stammlösung (100 mg/ml)	
Lysozym	100,0 mg
ddH ₂ O	auf 1 ml auffüllen
(Endkonzentration: 1 mg/ml)	

Native His₆-Affinitätsreinigung

Die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte mittels *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) mit 1 ml HisTrap™ FF Säulen (GE Healthcare) und wurde mit einer ÄKTA pure mit *Sample Pump* (GE Healthcare) oder einer FPLC (Pharmacia LKB) durchgeführt. Der C-terminale His₆-Tag, den die rekombinanten Proteine durch die Klonierung der kodierenden Gene in den pET-24c(+) Vektor erhielten, bindet reversibel an die Ni²⁺-Ionen der HisTrap FF Säule und bildet mit diesen einen Chelatkomplex. Bei der Elution mit Imidazol wird der His₆-Tag aus dem Chelatkomplex verdrängt. Die Affinitätsreinigung wurde mit einer konstanten Flussrate von 1 ml/min durch-

Material und Methoden

geführt. Die HisTrap FF Säulen wurden zunächst mit Wasser gewaschen und mit Lysepuffer equilibriert. Der Überstand aus dem Zellaufschluss wurde komplett auf die Säule aufgetragen und die Säule wurde mit Lysepuffer gewaschen. Während dem Auftragen des Überstands wurde eine kleine Menge des Durchlaufs aufgefangen. Die rekombinanten Proteine wurden eluiert und das Eluat in Fraktionen von 0,75 ml aufgefangen. Anschließend wurden die HisTrap FF Säulen erneut mit Lysepuffer equilibriert und mit Wasser und 20 % (v/v) Ethanol gewaschen. Ein detailliertes Protokoll der Proteinreinigung inklusive der verwendeten Volumen ist in Tabelle 2.29 zusammengefasst.

Tabelle 2.29 Protokoll für die nativen His₆-Affinitätsreinigung

Säulen waschen	3 SV ddH ₂ O
Säulen equilibrieren	3 SV Lysepuffer
Überstand auftragen	kompletter Überstand
Säulen waschen	3 SV Lysepuffer
Elution	7 SV Elutionspuffer
Säulen equilibrieren	3 SV Lysepuffer
Säulen waschen	3 SV ddH ₂ O
Säulen waschen	3 SV 20 % (v/v) Ethanol

SV: Säulenvolumen

Tabelle 2.30 Lysepuffer und Elutionspuffer

Lysepuffer		Elutionspuffer	
MOPS pH 7,3	50,0 mM	MOPS pH 7,3	50,0 mM
Imidazol	20,0 mM	Imidazol	500,0 mM
NaCl	300,0 mM	NaCl	100,0 mM
CaCl ₂	20,0 mM	CaCl ₂	20,0 mM
ddH ₂ O	auf 1.000 ml auffüllen	ddH ₂ O	auf 1.000 ml auffüllen

Hitzenaturierung nativer Proteine

Proteine mit Histidin-Resten oder negativer Ladung können auch ohne His₆-Tag in geringer Menge an die Ni²⁺-Ionen der HisTrap FF Säulen binden. Um native *E. coli* Proteine zu denaturieren und das rekombinante, thermostabile Protein weiter zu reinigen, wurde das Eluat in 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und im Wasserbad 15 min bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung 15 min bei 16.000 g zentrifugiert und die Überstände wurden vereinigt. Zu der Proteinlösung wurden 20 % (v/v) Glycerin und 0,02 % (w/v) NaN₃ gegeben. Die Proteinlösung wurde gemischt, in 0,5 ml aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Das Pellet mit den denaturierten Proteinen (Niederschlag) wurde für eine spätere Analyse in 1 ml Elutionspuffer resuspendiert.

Die Proteinproduktion in *E. coli* und die Proteinreinigung wurden nachfolgend durch eine Auftrennung der einzelnen Proteinfractionen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Dazu wurden jeweils 10 µl der Proteinfractionen Zellextrakt, Pellet, Überstand, Durchlauf, Eluat, Niederschlag und Proteinlösung entnommen.

Regeneration der HisTrap FF Säulen

Nach der Verwendung wurden die HisTrap FF Säulen gereinigt und regeneriert, um verbliebene Proteine von der Säule zu entfernen. Zunächst wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen (SV) ddH₂O gewaschen. Die Ni²⁺-Ionen wurden mit 10 SV Stripping-Puffer von der Säule gespült, dabei wurden die Ni²⁺-Ionen von EDTA komplexiert und aus der Sepharose-Matrix gelöst. Die Säule wurde erneut mit 10 SV ddH₂O gewaschen und durch 5 SV Regenerationslösung wieder mit Ni²⁺-Ionen beladen. Anschließend wurde die Säule mit 5 SV ddH₂O und 10 SV 20 % (v/v) Ethanol gewaschen. Es wurden jeweils bis zu 3 Säulen gleichzeitig regeneriert. Die regenerierten HisTrap FF Säulen wurden bis zur nächsten Verwendung bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2.31 Stripping Puffer und Regenerationslösung

Stripping-Puffer		Regenerationslösung	
MOPS pH 7,3	50,0 mM	NiSO ₄	100,0 mM
EDTA	50,0 mM	ddH ₂ O	auf 1.000 ml auffüllen
NaCl	100,0 mM		
ddH ₂ O	auf 1.000 ml auffüllen		

2.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Gesamtproteinkonzentration

Die Gesamtproteinkonzentration einer Proteinlösung wurde photometrisch mit dem Bradford-Assay und dem Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Dazu wurden 5–50 µl Proteinlösung zu 1 ml Bradford-Reagenz gegeben, die Lösung wurde gemischt und 5 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proteinprobe bei 595 nm im UV/VIS-Spektrometer gegen eine Nullprobe mit H₂O gemessen. Pro Charge Bradford-Reagenz wurde einmalig eine Referenzgerade mit *Bovine serum albumin* (BSA) erstellt (Abbildung 6.6). Die Proteinkonzentration wurde anhand der Referenzgerade mit folgender Formel berechnet.

$$\text{Gesamtproteinkonzentration } (\mu\text{g/ml}) = \left(\frac{OD_{595} - b}{m} \right) \cdot \frac{V_{\text{Standard}} (\mu\text{l})}{V_{\text{Probe}} (\mu\text{l})}$$

m : Steigung der Referenzgeraden

b : y-Achsenabschnitt der Referenzgeraden

V_{Standard} : Volumen der Standards (50 μl) V_{Probe} : Volumen der Proteinprobe

Formel 2.2 Berechnung der Gesamtproteinkonzentration

Proteinkonzentration rekombinanter Proteine

Die Konzentration eines gereinigten Proteins in Lösung wurde photometrisch durch die Absorption aromatischer Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Zunächst wurden die molekulare Masse und der Extinktionskoeffizient des reduzierten Proteins mit dem ExPASy ProtParam Tool bestimmt (Kapitel 2.2.2). Jeweils 20 μl , 30 μl und 40 μl der Proteinlösung wurden in Quarzküvetten zu 600 μl 8 M Harnstoff gegeben und mehrfach invertiert. Anschließend wurde die Absorption der Proteinlösung bei 280 nm im UV/VIS-Spektrometer gegen 600 μl 8 M Harnstoff ohne Proteinlösung gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mit folgender Formel berechnet.

$$\text{Proteinkonzentration } (\text{mg/ml}) = \frac{OD_{280}}{\varepsilon (\text{l} \cdot \text{mol}^{-1})} \cdot M (\text{g/mol})$$

Formel 2.3 Berechnung der Proteinkonzentration rekombinanter Proteine

Die Formel leitet sich bei einer Schichtdicke (d) der Quarzküvette von 1 cm wie folgt aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz ab.

$$E = \varepsilon (\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot c (\text{mol/l}) \cdot d (\text{cm})$$

$$d = 1 \text{ cm} \rightarrow c (\text{mol/l}) = \frac{E}{\varepsilon (\text{l} \cdot \text{mol}^{-1})}$$

$$\text{und } c (\text{g/l}) = c (\text{mol/l}) \cdot M (\text{g/mol})$$

E : Extinktion, OD_{280}

ε : Extinktionskoeffizient

c : Konzentration

d : Schichtdicke

M : molare Masse

Formel 2.4 Lambert-Beer'sches Gesetz

2.5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-PAGE wurden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, um das Molekulargewicht und die Reinheit der rekombinanten Proteine zu analysieren. Für eine bessere Auftrennung wurden diskontinuierliche SDS-Gele mit einem 4 %igen Sammelgel und einem 10 %igen

Trenngel verwendet (Tabelle 2.32). Zunächst wurde das Trenngel (ca. 3,5 ml) gegossen und mit 1 ml Wasser überschichtet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Wasser abgeschüttet und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Anschließend wurde der Probenkamm in das Gel gesteckt. Für die Auftrennung von Proteinen unterschiedlichster Größen wurden Mini-PROTEAN® TGX Gradientengele (Bio-Rad) mit 4–15 % Acrylamid verwendet. Das SDS-Gel wurde in die Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad) eingebaut und mit Laufpuffer überschichtet. 5–10 µl Proteinprobe wurden mit 6 µl ddH₂O und 4 µl 4x SDS-Auftragspuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proteinproben und 5 µl Protein-Größenstandard auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden bei einer Spannung von 20 mV aufgetrennt, bis die blaue Bande mit dem Farbstoff aus dem Auftragspuffer das Gel verlassen hatte. Das Gel wurde 30 min in Färbelösung gefärbt und anschließend zweimal 15 min in Entfärbelösung entfärbt. Um die Proteinbanden hervorzuheben wurde das Gel anschließend über Nacht in H₂O entfärbt.

Tabelle 2.32 Ansatz für ein SDS-Gel

Komponenten	Sammelgel (4 %)	Trenngel (10 %)
Sammelgel-Puffer	0,625 ml	-
Trenngel-Puffer	-	1,25 ml
Acrylamid 4K (30 % w/v)	0,33 ml	1,66 ml
ddH ₂ O	1,55 ml	2,08 ml
APS (100 mg/ml in ddH ₂ O)	25,0 µl	35,0 µl
TEMED	3,0 µl	5,0 µl

Tabelle 2.33 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

SDS-Auftragspuffer (4x)		SDS-Laufpuffer (10x)	
TRIS pH 6,8	250,0 mM	TRIS pH 8,8	250,0 mM
β-Mercaptoethanol	570,0 mM	Glycin	1,92 M
Glycerin	40,0 % (v/v)	SDS	1,0 % (w/v)
SDS	8,4 % (w/v)	ddH ₂ O	auf 1.000 ml auffüllen
Bromphenolblau	200,0 µl		
ddH ₂ O	auf 50 ml auffüllen	Färbelösung	
Sammelgel-Puffer		Coomassie-Brillant-Blau G-250	0,1 %
TRIS pH 8,8	1,5 M	Essigsäure (100 %)	10,0 %
SDS	0,4 % (w/v)	Methanol	45,0 %
ddH ₂ O	auf 500 ml auffüllen	ddH ₂ O	auf 1.000 ml auffüllen
Trenngel-Puffer		Entfärbelösung	
TRIS pH 6,8	0,5 M	Essigsäure (100 %)	10,0 %
SDS	0,4 % (w/v)	Methanol	45,0 %
ddH ₂ O	auf 500 ml auffüllen	ddH ₂ O	auf 2.500 ml auffüllen

2.5.6 Enzymatische Hydrolyse von Polysacchariden

Zum Nachweis der hydrolytischen Aktivität wurden sekretierte und rekombinante Enzyme mit verschiedenen Polysacchariden (Tabelle 2.17) inkubiert und die Enzymaktivität anschließend mit dem DNSA- (Kapitel 2.5.7), Xylose- oder Arabinose-Assay (Kapitel 2.5.8) bestimmt. Die Hydrolysen wurden in einem Gesamtvolumen von 150 μl in 96-well PCR-Platten (Tabelle 2.34) mit 0,5 % (w/v) Polysaccharid durchgeführt. Glucomannan (0,125 %) und mikrokristalline Cellulose (Avicel, 0,25 %) wurden aufgrund hoher Viskosität in abweichenden Konzentrationen eingesetzt. Für einen qualitativen Nachweis der Enzymaktivität wurden alle 29 Polysaccharide und die eigene Hemicellulosepräparation HP1 mit jeweils 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Enzym in 100 mM MOPS-Reaktionspuffer (Tabelle 2.35) 16 h bei 60 °C inkubiert. Die quantitative Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte anschließend mit 0,05–24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Enzym und Inkubationszeiten zwischen 30 min und 2 h im Thermocycler (TAdvanced 96 G). Die Hydrolyse von Polysacchariden wurde jeweils in Triplikaten und mit einer Negativkontrolle ohne Enzym durchgeführt. Nach der Inkubation wurde die Enzymreaktion durch 5 min Inkubation auf Eis gestoppt und das Hydrolysat wurde 5 min bei 2.000 g (4 °C) zentrifugiert, um unlösliche Substratbestandteile zu sedimentieren. Für den Nachweis von Synergismen zwischen Enzymen und die Bestimmung der Aktivität von Enzymkombinationen wurden Polysaccharide mit bis zu fünf Enzymen gleichzeitig hydrolysiert. Für eine chromatographische Trennung und Analyse des Hydrolysats wurden Polysaccharide in größeren Gesamtvolumen von 500 μl oder 1.000 μl in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit Schraubdeckel hydrolysiert (Tabelle 2.34).

Die spezifische Aktivität der Enzyme wurde mit 100 mM MOPS-Puffer (Tabelle 2.39) bei pH 6,0 und dem Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms bestimmt.

Tabelle 2.34 Ansatz für die Hydrolyse von Polysacchariden

Gesamtvolumen	150 μl	500 μl	1.000 μl
1 %ige Polysaccharidlösung	75 μl	250 μl	500 μl
10x Reaktionspuffer (MOPS)	15 μl	50 μl	100 μl
Enzymlösung (0,05–24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Enzym im Ansatz)	x μl	x μl	x μl
ddH ₂ O	60 - x μl	200 - x μl	400 - x μl

Tabelle 2.35 MOPS-Reaktionspuffer

MOPS-Puffer (10x)	
MOPS	1,0 M
NaCl	0,5 M
CaCl ₂	100,0 mM
pH 6,5 mit NaOH einstellen	
ddH ₂ O	auf 100 ml auffüllen

Die pH-Werte des 10x und 1x MOPS-Reaktionspuffers wurden bei Raumtemperatur (RT) und 60 °C bestimmt. Der pH-Wert des 10x Puffers wurde bei RT eingestellt, bei 60 °C wurde pH 5,83 gemessen. Der pH-Wert des 1x Puffer entsprach bei RT pH 6,35 und bei 60 °C pH 5,70.

2.5.7 Bestimmung der Enzymaktivität mit DNSA (Wood und Bhat, 1988)

Nach der enzymatischen Hydrolyse von Polysacchariden wurde die Enzymaktivität photometrisch mit dem DNSA-Assay bestimmt. 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNSA) wird von der freien Aldehydgruppe reduzierender Zucker zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure reduziert. Bei dieser Reaktion ändert sich die Farbe von orangegelb zu rotbraun und die Konzentration der reduzierenden Zucker kann anhand der Absorptionsänderung bei einer Wellenlänge von 540 nm proportional bestimmt werden. Die enzymatische Hydrolyse der eingesetzten Polysaccharide lässt sich so durch eine Zunahme der Konzentration an reduzierenden Zuckern im Hydrolysat messen. Der DNSA-Assay wurde in 96-well PCR-Platten durchgeführt. 75 µl DNSA-Lösung wurden vorgelegt und mit 50 µl Hydrolysat gemischt. Auf jeder PCR-Platte wurden zusätzlich acht Konzentrationen einer Xylose-Referenzgeraden (Tabelle 2.37) in Triplikaten mitgeführt. Die PCR-Platte wurde mit einer Aluminiumfolie verschlossen, 5 min bei 95 °C im Thermocycler inkubiert und 5 min auf Eis gekühlt. Nach 30 s Zentrifugation bei 1.000 g wurden 100 µl der Reaktion in eine 96-well Mikrotiterplatte überführt. Anschließend wurde die Absorption bei 540 nm im UV/VIS-Spektrometer gemessen und die Menge reduzierender Zucker wurde anhand der Xylose-Referenzgerade in Xyloseäquivalenten bestimmt (Abbildung 6.7). Die Xylosemenge in der Negativkontrolle wurde von der Xylosemenge im Hydrolysat subtrahiert und die Enzymaktivität wurde mit folgender Formel berechnet.

$$U(\mu\text{mol}/\text{min}) = \frac{m_{\text{Xyl}}(\mu\text{g})}{M_{\text{Xyl}}(\mu\text{g}/\mu\text{mol}) \cdot t(\text{min})} \cdot \frac{V_{\text{gesamt}}(\mu\text{l})}{V_{\text{gemessen}}(\mu\text{l})}$$

$$\text{Spezifische Aktivität (U/mg)} = \frac{m_{\text{Xyl}}(\mu\text{g}) \cdot 1.000}{M_{\text{Xyl}}(\mu\text{g}/\mu\text{mol}) \cdot V_E(\mu\text{l}) \cdot c_E(\mu\text{g}/\mu\text{l}) \cdot t(\text{min})} \cdot \frac{V_{\text{gesamt}}(\mu\text{l})}{V_{\text{gemessen}}(\mu\text{l})}$$

U : Units m_{Xyl} : Masse der Xylose aus Referenzgerade

M_{Xyl} : molare Masse der Xylose t : Inkubationszeit

V_{gesamt} : Gesamtvolumen Hydrolysat V_{gemessen} : 50 μl

V_E : eingesetztes Enzymvolumen c_E : Enzymkonzentration

Formel 2.5 Berechnung der Enzymaktivität für den DNSA-Assay

Tabelle 2.36 DNSA-Lösung

DNSA-Lösung	
3,5-Dinitrosalicylsäure	15,0 g
NaOH	15,0 g
Kalium-Natrium-Tartrat	300,0 g
Na ₂ SO ₄	0,75 g
Phenol (flüssig)	3,0 g
ddH ₂ O	auf 1.500 ml auffüllen

DNSA wurde in 900 ml ddH₂O gelöst und die restlichen Bestandteile wurden hinzugefügt. Die Lösung wurde gerührt bis sich alle Bestandteile gelöst hatten und anschließend auf 1,5 l aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung durch einen Faltenfilter filtriert und bis zur weiteren Verwendung im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt.

Tabelle 2.37 Konzentrationen der Xylose-Referenzgerade

Konzentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0	100	300	600	800	1.000	1.400	1.600
m_{Xyl} in 50 μl (μg)	0	5	15	30	40	50	70	80

Die einzelnen Konzentrationen wurden aus einer Xylose-Stammlösung mit 10 g/l Xylose hergestellt.

Bei der qualitativen Bestimmung der Enzymaktivität wurde die Aktivität mit einer linearen Referenzgerade berechnet, während bei der quantitativen Bestimmung der Enzymaktivität mit kürzeren Inkubationszeiten eine sigmoidale Funktion herangezogen wurde. Die sigmoidale Referenzfunktion wurde mit dem Programm SigmaPlot® 11 erstellt (Abbildung 6.8).

$$y = d + (ax^b / (c^b + x^b))$$

Formel 2.6 Sigmoidale Referenzfunktion

2.5.8 Bestimmung der Enzymaktivität mit Xylose- und Arabinose-Assay

Für die Bestimmung der Enzymaktivität anhand der freigesetzten Menge Xylose oder Arabinose und zur Quantifizierung dieser beiden Monosaccharide wurden das D-Xylose Assay Kit und das L-Arabinose/d-Galactose Assay Kit (Megazyme) verwendet. Der Assay wurde jeweils in 96-well Mikrotiterplatten nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Für die Quantifizierung wurde aus dem mitgelieferten Standard eine Referenzgerade mit vier Punkten erstellt (Abbildung 6.9).

2.5.9 Bestimmung der pH- und Temperaturabhängigkeit von Enzymen

Das pH- und Temperaturoptimum eines Enzyms wurde bestimmt, indem die Enzymaktivität bei unterschiedlichen pH- und Temperatur-Werten gemessen wurde (Aktivitätsprofil) (Tabelle 2.38). Für die Messung der Aktivitätsprofile wurde 100 mM Citrat-Phosphat-Puffer (Tabelle 2.39) verwendet, da dieser Puffer eine sehr geringe Temperaturabhängigkeit zeigt. Zunächst wurde die Aktivität des Enzyms bei neun pH-Werten zwischen pH 4,0 und pH 8,0 (Tabelle 2.40) und bei 60 °C gemessen (pH-Aktivitätsprofil). Anschließend wurde die Temperaturabhängigkeit beim pH-Optimum des Enzyms bestimmt. Die Enzymaktivität wurde bei zehn Temperaturen innerhalb eines Temperaturgradienten von 30 °C im Thermocycler gemessen (Temperatur-Aktivitätsprofil). Der Gradient wurde abhängig vom Temperaturoptimum des Enzyms gewählt. Das pH- und Temperaturoptimum für die Aktivität von Enzymkombinationen wurde mit einem pH-vs-Temperatur-Aktivitätsprofil bestimmt. Die Aktivität wurde in 96-well Mikrotiterplatten bei acht pH-Werten bei jeweils zehn Temperaturen gemessen (80 Bedingungen). Die Messung wurde in jeweils drei unabhängigen, technischen Replikaten durchgeführt (Herlet *et al.*, 2017).

Tabelle 2.38 Ansatz für die Bestimmung von pH- und Temperaturoptimum

Gesamtvolumen	150	µl
1 %ige Polysaccharidlösung	75	µl
3x Reaktionspuffer	50	µl
6x Enzymmastermix (in ddH ₂ O) (0,05–24 µg/ml Enzym in ddH ₂ O)	25	µl

Tabelle 2.39 Reaktionspuffer für die pH- und Temperaturkurven

MOPS-Puffer (3x)		Citrat-Phosphat-Puffer (3x)	
MOPS	300,0 mM	Citrat-Na ₂ HPO ₄	300,0 mM
NaCl	150,0 mM	NaCl	150,0 mM
CaCl ₂	30,0 mM	CaCl ₂	-
pH 6,0–7,5 mit NaOH einstellen		pH 4,0–8,0 mit H ₃ PO ₄ oder NaOH einstellen	
ddH ₂ O	auf 100 ml auffüllen	ddH ₂ O	auf 100 ml auffüllen

Die pH-Werte der 3x Puffer wurden bei 60 °C eingestellt. Der pH des Citrat-Phosphat-Puffers wurde über das Verhältnis von Citrat- zu Phosphat-Ionen grob eingestellt und anschließend mit H_3PO_4 oder NaOH korrigiert. Dazu wurden Stammlösungen (Tabelle 2.41) in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt (Tabelle 2.40).

Tabelle 2.40 Pipettierschema für Citrat-Phosphat-Puffer (3x) mit verschiedenen pH

pH	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Citrat-Lösung	62,0 %	53,7 %	49,0 %	42,2 %	34,5 %	27,9 %	13,8 %	4,6 %	3,0 %
Na₂HPO₄-Lösung	38,0 %	46,3 %	51,0 %	57,8 %	65,5 %	72,1 %	86,2 %	95,4 %	97,0 %

Tabelle 2.41 Stammlösungen für den Citrat-Phosphat-Puffer (3x)

Citrat-Lösung	Natriumhydrogenphosphat-Lösung		
	300,0 mM		600,0 mM
Citronensäure • H ₂ O	63,04 g	Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	106,79 g
ddH ₂ O	auf 1.000 ml auffüllen	ddH ₂ O	auf 1.000 ml auffüllen

2.5.10 Thermische Inaktivierung von Enzymen

Für die Bestimmung des Aktivitätsverlusts bei langen Inkubationszeiten wurde die thermische Inaktivierung der Enzyme in Abwesenheit von Substrat über die Zeit bestimmt. Dieser Assay wurde mit Polysacchariden oder Oligosacchariden durchgeführt. Bei der Verwendung von Polysacchariden wurde ein Mastermix mit der 6-fachen Konzentration des Enzyms, im Vergleich zum Assay, in ddH₂O 48 h bei 60 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 500 µl Mastermix entnommen und mit 0,5 % (w/v) Polysaccharid in 10 mM MOPS-Reaktionspuffer (5 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 6) 30 min bei 60 °C inkubiert (Tabelle 2.38). Die Enzymaktivität wurde direkt mit dem DNSA-Assay und einer linearen Xylose-Referenzgeraden bestimmt. Bei der Verwendung von Oligosacchariden wurde ein Mastermix mit der zweifachen Konzentration des Enzyms in 10 mM MOPS-Reaktionspuffer 48 h bei 60 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 250 µl Mastermix entnommen, mit 250 µl 1 % (w/v) Oligosaccharid in 10 mM MOPS-Reaktionspuffer gemischt und 30 min bei 60 °C inkubiert. Die Reaktion wurde auf Eis gestoppt und die Enzymaktivität anschließend mit dem Xylose-Assay (Kapitel 2.5.8) bestimmt.

2.5.11 Bestimmung der Enzymaktivität mit *para*-Nitrophenyl-Glycosiden

Die Enzymaktivität von Glycosidhydrolasen wurde, neben der Hydrolyse von Polysacchariden, durch die Hydrolyse von *para*-Nitrophenyl-Glycosiden (*p*NP-Glycosiden) bestimmt. Bei der Hydrolyse der glycosidischen Bindung wird das gelbe *para*-Nitrophenol (*p*NP) freigesetzt, das Licht einer

Wellenlänge von 405 nm absorbiert. Die Enzymaktivität wird photometrisch durch Quantifizierung des *p*NP bestimmt. Der *p*NP-Assay wurde in Gesamtvolumen von 50 µl oder 500 µl (Tabelle 2.42) in Triplikaten mit 100 mM MOPS-Reaktionspuffer (Tabelle 2.35) und 4 mM *p*NP-Glycosid (Tabelle 2.15) durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle ohne Enzym mitgeführt. Für die qualitative Bestimmung der Enzymaktivität wurden 10 µg/ml Enzym mit *p*NP-Glycosid über Nacht bei 60 °C inkubiert. Die spezifische Aktivität wurde anschließend mit 0,05–10 µg/ml Enzym und Inkubationszeiten von 5 min bis 2 h bei 60 °C im Wasserbad bestimmt. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe des doppelten Volumens 1 M Na₂CO₃ gestoppt und 5 min bei 2.000 g zentrifugiert. Anschließend wurden 100 µl in eine Mikrotiterplatte überführt und im UV/VIS-Spektrometer wurde die Absorption bei 405 nm gemessen. Die *p*NP-Konzentration wurde anhand einer Referenzgeraden bestimmt (Abbildung 6.10). Die freigesetzte *p*NP-Stoffmenge in der Negativkontrolle wurde von der *p*NP-Stoffmenge im Hydrolysat subtrahiert und die Enzymaktivität wurde mit folgender Formel berechnet.

$$n_{pNP}(\text{mol}) = \frac{c_{pNP}(\mu\text{mol/l})}{V_{gemessen}(\text{l})}$$

$$U(\mu\text{mol/min}) = \frac{n_{pNP}(\text{mol})}{t(\text{min})}$$

$$\text{Spezifische Aktivität (U/mg)} = \frac{n_{pNP}(\text{mol}) \cdot 1.000}{V_E(\mu\text{l}) \cdot c_E(\mu\text{g}/\mu\text{l}) \cdot t(\text{min})}$$

n_{pNP} : Stoffmenge *para*-Nitrophenol

c_{pNP} : Konzentration *para*-Nitrophenol

$V_{gemessen}$: 50 µl

U : Units

V_E : eingesetztes Enzymvolumen

c_E : Enzymkonzentration

t : Inkubationszeit

Formel 2.7 Berechnung der Enzymaktivität für den *p*NP-Assay

Tabelle 2.42 Ansatz für den *p*NP-Assay

Gesamtvolumen	500	µl	50	µl
100 mM MOPS-Reaktionspuffer	480 – x	µl	48 – x	µl
Enzymlösung (0,5–10 µl) (0,05–10 µg/ml Enzym im Ansatz)	x	µl	x	µl
0,1 M <i>p</i> NP-Glycosid in DMF	20	µl	2	µl

2.5.12 Bestimmung der Produktspezifität

Für die Bestimmung der Produktspezifität wurden ausgewählte Polysaccharide mit 1,5–15 µg/ml Enzym in ddH₂O (ohne Puffer) 20–24 h bei 60 °C hydrolysiert. Die Hydrolyse wurde in einem Gesamtvolumen von 1.000 µl (Kapitel 2.5.6) im Wasserbad durchgeführt. Anschließend wurde das Hydrolysat mittels HPAEC-PAD analysiert und die Produktspezifität wurde anhand der enzymatisch freigesetzten Mono- und Oligosaccharide bestimmt (Kapitel 2.6.3).

2.5.13 Bestimmung der Produktinhibition

Die Produktinhibition von β-Xylosidasen, α-Arabinofuranosidasen und Arabinofuranohydrolasen wurde mittels Hydrolyse von pNP-Glycosiden (Kapitel 2.5.11) in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen Xylose oder Arabinose bestimmt. Die Hydrolysen wurden mit 10 mM MOPS-Reaktionspuffer (5 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 6,5) in einem Volumen von 500 µl durchgeführt. Die eingesetzten Zuckerkonzentrationen (Tabelle 2.43) wurden aus einer Stammlösung mit 100 g/l Xylose oder Arabinose in Reaktionspuffer verdünnt. Reaktionspuffer mit Xylose/Arabinose, Enzymlösung und Substrat wurden gemischt und 10 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Die Enzymaktivität wurde anschließend durch Quantifizierung des freigesetzten pNP bestimmt.

Die Produktinhibition von Xylanasen durch Xylose wurde mit dem Xylanase Assay Kit (Megazyme) in Anwesenheit von 50 g/l Xylose bestimmt. Die Hydrolysen wurden ebenfalls mit 10 mM MOPS-Reaktionspuffer in einem Volumen von 300 µl durchgeführt. Die eingesetzte Xylosekonzentration wurde aus einer Stammlösung mit 100 g/l Xylose in Reaktionspuffer verdünnt. Für eine Reaktion wurden 150 µl des Azo-Wax (1 % w/v) zu 150 µl 10 mM MOPS-Reaktionspuffer mit 50 g/l Xylose und 3 µg/ml Xylanase gegeben, gemischt und direkt 10 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 750 µl Ethanol (99,8 %) zugegeben, die Lösung wurde gut gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nicht hydrolysiertes Azo-Wax wurde 10 min bei 1.500 g abzentrifugiert und 100 µl Überstand wurden in eine Mikrotiterplatte überführt. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen eine Nullprobe ohne Enzym gemessen. Die relative Enzymaktivität wurde durch Division der Absorption der Hydrolysate mit Xylose durch die Absorption des Hydrolysats ohne Xylose berechnet.

Tabelle 2.43 Eingesetzte Konzentrationen für die Produktinhibition

Arabinose	0 g/l	1 g/l	5 g/l	10 g/l	20 g/l	50 g/l	80 g/l
Xylose	0 g/l	1 g/l	5 g/l	10 g/l	20 g/l	50 g/l	80 g/l

2.5.14 Bestimmung der Enzymaktivität von Esterasen

Die Enzymaktivität von Acetylerasen wurde durch die Hydrolyse von β -D-Glucose-pentaacetat (GPA), 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-D-xylopyranose (XTA) oder Polysacchariden anhand der freigesetzten Menge Acetat bestimmt. Die Quantifizierung von Acetat erfolgte mit dem Acetic Acid Assay Kit (Megazyme) in 96-well Mikrotiterplatten nach dem Protokoll des Herstellers. Für die Hydrolyse von acetylierten Monosacchariden wurden 0,2–5 $\mu\text{g/ml}$ Enzym zu 500 μl 10 mM MOPS-Reaktionspuffer (5 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , pH 6,5) mit 2,5 mM GPA oder XTA gegeben und 30 min bis 6 h bei 60 °C inkubiert. Da die acetylierten Monosaccharide bei basischem pH nicht stabil sind, wurden, zusätzlich zu Negativkontrollen ohne Enzym, Negativkontrollen mit dem entsprechenden Volumen Elutionspuffer (Tabelle 2.30) statt Proteinlösung mitgeführt, um den Effekt des Imidazol im Elutionspuffer zu berücksichtigen. Anschließend wurde die Acetatkonzentration im Hydrolysat anhand einer Referenzkurve mit fünf Punkten aus dem mitgelieferten Standard bestimmt (Abbildung 6.11). Um die Aktivität der Acetylerasen auf Polysacchariden zu bestimmen, wurden 20 mg/ml Enzym in 100 mM MOPS-Reaktionspuffer (Tabelle 2.35) mit 2 % (w/v) Polysaccharid bei 60 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Acetatkonzentration im Hydrolysat bestimmt.

Die Enzymaktivität von Feruloylerasen wurde mit feruloylierten *p*NP- α -L-Arabinofuranosiden nachgewiesen. Vergleichbar zum 50 μl *p*NP-Assay (Tabelle 2.42), wurden 100 $\mu\text{g/ml}$ Enzym in 100 mM MOPS-Reaktionspuffer mit 2,24 mM *p*NP-Glycosid über Nacht bei 60 °C inkubiert. Die Aktivität wurde anschließend mittels Dünnschichtchromatographie (DC) analysiert. Zum Nachweis der Enzymaktivität anhand der freigesetzten Menge Arabinose wurden die feruloylierten *p*NP- α -L-Arabinofuranoside zusätzlich mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Arabinofuranosidase hydrolysiert. Die Arabinose wurde anschließend mittels HPAEC-PAD quantifiziert.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Dünnschichtchromatographie (DC) wurde verwendet, um die Produkte einer enzymatischen Hydrolyse, Mono- und Oligosaccharide, chromatographisch zu trennen und zu identifizieren. Das Hydrolysat wurde zunächst 10 min bei 16.000 *g* zentrifugiert, um unlösliche Substratbestandteile zu sedimentieren. Anschließend wurde das Hydrolysat schrittweise auf DC Kieselgel 60 Aluminiumfolien (Merck) aufgetragen. In einem Schritt wurde maximal 1 μl Hydrolysat aufgetragen und vor dem nächsten Schritt an der Luft getrocknet. Bei einer bekannten Konzentration an Produkten, z.B. durch Bestimmung mit dem DNSA-Assay, wurde das entsprechende Volumen für 1 μg

Saccharid oder Xyloseäquivalent (max. 6 µl) aufgetragen. Bei einer unbekanntem Konzentration wurden 1–6 µl des Hydrolysats aufgetragen (2 cm vom Rand; 0,75 cm zwischen den Proben). Zusätzlich wurde jeweils 1 µg (1 µl 0,1 %ig in H₂O) bekannter Mono- und Oligosaccharide als Standard aufgetragen. Die Hydrolyseprodukte wurden mit Acetonitril und ddH₂O im Verhältnis 8:2 (v/v) als mobile Phase (Füllhöhe: 1 cm) getrennt. Anschließend wurde die trockene DC-Folie zur Detektion der Saccharide im ChromaJet DS 20 (biostep) zweifach mit DC-Färbelösung (Tabelle 2.44) besprüht und 15 min bei 120 °C inkubiert. Die gefärbten DC-Folien wurden eingescannt, bei Bedarf wurden Helligkeit und Kontrast mit dem Programm Adobe Photoshop CS2 bearbeitet. Die qualitative Identifizierung der Hydrolyseprodukte erfolgte anhand der Laufweite bzw. des Retentionsfaktors (*R_f*-Wert) der Produkte und bekannter Mono- und Oligosaccharid-Standards (Tabelle 2.45).

Für die Quantifizierung der mittels DC aufgetrennten Hydrolyseprodukte wurde das Programm ImageJ verwendet. Zunächst wurde die Bilddatei in ein 8-bit schwarz-weiß Bild umgewandelt und der Hintergrund subtrahiert (*Rolling ball radius*: 120–150). Für jede aufgetragene Probe wurden die Intensitäten der aufgetrennten Produkte graphisch in ein Chromatogramm übertragen und die Intensität anhand des Flächenintegrals der Peaks bestimmt. Die Quantifizierung der Produkte erfolgte anschließend mit einer, auf der DC-Folie mitgeführten, Referenzgerade des entsprechenden Standards. Produkte ohne entsprechenden Standard wurden nicht quantifiziert.

Tabelle 2.44 DC-Färbelösung

DC-Färbelösung	
Diphenylamin	1,0 g
Anilin	1,0 ml
Aceton (99,9 %)	100,0 ml
Zugabe von 10 % (v/v) H ₃ PO ₄ (85 %) vor Anwendung	

Tabelle 2.45 Mono- und Oligosaccharid-Standards für die Zuckeranalytik

Mono-/Oligosaccharide	Abkürzung	Oligosaccharide	Abkürzung
Arabinose	Ara; A	Xylooligosaccharide	
Galactose	Gal	Xylobiose	X ₂
Glucose	Glu; G ₁	Xylotriose	X ₃
Xylose	Xyl; X ₁	Xylotetraose	X ₄
		Xylopentaose	X ₅

Mono-/Oligosaccharide	Abkürzung	Oligosaccharide	Abkürzung
Gluco-/Cellooligosaccharide		Arabinoxyloligosaccharide	
Glucobiose	G ₂	3 ² -α-L-Arabinofuranosyl-xylobiose	A ³ X
Glucotriose	G ₃	2 ³ -α-L-Arabinofuranosyl-xylotriase	A ² XX
Glucotetraose	G ₄	2 ³ ,3 ³ -di-α-L-Arabinofuranosyl-xylotriase	A ²⁺³ XX
Glucopentaose	G ₅	3 ³ -α-L-Arabinofuranosyl-xylotriase	XA ³ XX
Glucohexaose	G ₆	3 ³ -α-L-Arabinofuranosyl-xylotriase + 2 ³ -α-L-Arabinofuranosyl-xylotriase	XA ³ XX/XA ² XX
		2 ³ ,3 ³ -di-α-L-Arabinofuranosyl-xylotriase	XA ²⁺³ XX

Die Monosaccharide wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Serva Electrophoresis (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen. Die Oligosaccharide wurden bei der Firma Megazyme (Bray, Ireland) gekauft.

AXOS wurden nach der von Fauré *et al.* (2009) entwickelten Nomenklatur abgekürzt, bei der Oligosaccharide durch eine Reihe einzelner Buchstaben beschrieben werden, beginnend mit der nicht reduzierenden D-Xyloseeinheit. Unsubstituierte Xyloseeinheiten werden durch den Buchstaben X dargestellt, substituierte Xyloseeinheiten werden durch abweichende Buchstaben gekennzeichnet, z.B. A für arabinosylierte Xylosen. Die Verknüfungsposition der Substitutionen wird am jeweiligen Buchstaben durch Hochzahlen angegeben (Fauré *et al.*, 2009).

2.6.2 HPLC

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde verwendet, um die Monosaccharide in Hydrolysaten chromatographisch zu trennen und zu quantifizieren. Die HPLC wurde mit einem AZURA HPLC System von Knauer und einem RI-Detektor (ERC) durchgeführt. Für die Trennung von Monosacchariden wurde eine Eurokat H Chromatographiesäule (Knauer) verwendet und auf 60 °C temperiert. Das Hydrolysat wurde zur Probenvorbereitung zunächst zweimal 10 min bei 16.000 g zentrifugiert und 1:5 oder 1:10 in ddH₂O verdünnt. Anschließend wurden 10 µl der Probe isokratisch mit 5 mM H₂SO₄ und einer Flussrate von 0,8 ml/min in 30 min getrennt. Die Quantifizierung der Monosaccharide erfolgte mit einer linearen Referenzgerade des entsprechenden Standards (Abbildung 6.12). Der Messbereich für die Quantifizierung lag bei 0,2–5 µg/µl Monosaccharid.

Zur Regeneration wurde die Eurokat H Chromatographiesäule zunächst mit 0,2 ml/min 5 mM H₂SO₄ im Umkehrfluss über Nacht bei 60 °C und 1 h im Normalfluss bei 75 °C gespült. Die Säule wurde 30 min mit 0,2 ml/min 10 % (v/v) Acetonitril gewaschen und anschließend mit 0,2 ml/min 25 mM H₂SO₄ 5 h regeneriert.

2.6.3 HPAEC-PAD (Mechelke *et al.*, 2017a)

Hochleistungs-Anionenaustausch-Chromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) wurde eingesetzt, um enzymatische Hydrolysate von Oligo- und Polysacchariden chromatographisch zu trennen und die Produkte, Mono- und Oligosaccharide, zu analysieren. Die HPAEC-PAD wurde mit einem Dionex ICS-3000 Ionenchromatographie-System von Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Die Mono- und Oligosaccharide wurden im basischen Laufmittel deprotoniert und durch unterschiedliche Wechselwirkungen mit der stationären Phase der verwendeten CarboPac™ PA1 Chromatographiesäule (Thermo Fisher Scientific) getrennt. Vor- und Hauptsäule wurden auf 30 °C temperiert. Die Detektion der Saccharide erfolgte durch Oxidation der Hydroxylgruppen an der Oberfläche einer Goldelektrode und der Messung des resultierenden elektrischen Stroms.

Hydrolysate von Polysacchariden wurden zur Probenvorbereitung zunächst 10 min bei 16.000 g zentrifugiert, 1:5 bis 1:200 in ddH₂O verdünnt und mit 2 mg/l D-Mannitol (Tabelle 2.46) als Internem Standard (ISTD) supplementiert. Die Proben wurden anschließend mit einem linearen Natriumacetat-Gradienten (7,5–100 mM) und einer Flussrate von 1 ml/min in 90 min getrennt (Tabelle 2.48). Das Injektionsvolumen betrug 25 µl und zwischen den Proben wurde die Probenschleife mit 700 µl ddH₂O gespült. Für die Identifizierung der Hydrolyseprodukte anhand der Retentionszeiten wurde vor jeder Probensequenz und jeweils nach 10 Proben ein Arabinoxylo-oligosaccharid-Standard (AXOS-Standard; Tabelle 2.49) getrennt. Zur Überprüfung der Stabilität des Detektorsignals und der Konstanz der Retentionszeiten wurden in regelmäßigen Abständen Checkstandards mit 9 mg/l Glucuronsäure und 2 mg/l D-Mannitol gemessen. Die quantitative Bestimmung von Monosacchariden erfolgte mit einer linearen Referenzgerade des entsprechenden Monosaccharid-Standards (Abbildung 6.13). Die Auswertung der Chromatographiedaten erfolgte mit den Programmen Chromeleon 7.2 und GraphPad Prism 6.

Tabelle 2.46 Interner Standard (ISTD) für die HPAEC-PAD

D-Mannitol-Stammlösung (20 mg/l)
(Endkonzentration: 2 mg/l)

Tabelle 2.47 Laufmittel für die HPAEC-PAD

Laufmittel	A	B	C
NaOH	100,0 mM	100,0 mM	100,0 mM
Natriumacetat (NaOAc)	0,0 mM	150,0 mM	1.000,0 mM
50 % (w/v) NaOH	20,80 ml	8,84 ml	10,40 ml
Natriumacetat (wasserfrei)	-	-	164,06 g
Laufmittel C	-	150,0 ml	-
Mit ddH ₂ O auffüllen auf	4.000,0 ml	2.000,0 ml	2.000,0 ml

Tabelle 2.48 Gradient für die HPAEC-PAD

Schritt	Zeit	NaOAc-Gradient	Laufmittelgradient
Probeninjektion	-2,3–0,0 min		100 % A
Probentrennung	0,0–67,5 min	7,5–100 mM NaOAc	95–33,3 % A 5–66,7 % B
	67,5–69,0 min	0,0–650 mM NaOAc	100–35 % A 0–65 % B
Waschen	69,0–73,0 min	650 mM NaOAc	35 % A 65 % B
	73,0–73,5 min	650–0,0 mM NaOAc	35–100 % A 65–0 % B
Regeneration	73,5–87,5 min		100 % A

Alle angegebenen Gradienten sind linear. Die Flussrate beträgt 1 ml/min. NaOAc: Natriumacetat

Tabelle 2.49 Zusammensetzung des AXOS-Standards für die HPAEC-PAD

Mono/Oligosaccharid	Abkürzung	Konzentration
Arabinose	A	20 mg/l
Xylose	X	20 mg/l
Xylobiose	X ₂	100 mg/l
Xylotriase	X ₃	100 mg/l
Xylotetraose	X ₄	100 mg/l
Xylopentaose	X ₅	100 mg/l
3 ² -α-L-Arabinofuranosyl-xylobiose	A ³ X	100 mg/l
2 ³ -α-L-Arabinofuranosyl-xylotriase	A ² XX	100 mg/l
2 ³ ,3 ³ -di-α-L-Arabinofuranosyl-xylotriase	A ²⁺³ XX	100 mg/l
3 ³ -α-L-Arabinofuranosyl-xylotetraose + 2 ³ -α-L-Arabinofuranosyl-xylotetraose	XA ³ XX/XA ² XX	200 mg/l
2 ³ ,3 ³ -di-α-L-Arabinofuranosyl-xylotetraose	XA ²⁺³ XX	100 mg/l

Die Benennung der AXOS erfolgte nach der Nomenklatur von Fauré *et al.* (2009).

2.6.4 Kohlenhydrat-Analyse von Polysacchariden

Die Monosaccharidzusammensetzung von ausgewählten Polysacchariden und Hemicellulosepräparationen wurde am Lehrstuhl für Chemie Biogener Rohstoffe der TU München in Straubing

bestimmt. Die Substrate wurden zunächst chemisch hydrolysiert und anschließend wurden die Monosaccharide quantifiziert. Arabinoxylan und Hemicellulosepräparationen wurden in einer zweistufigen sauren Hydrolyse mit H₂SO₄ (72 % & 4 %) hydrolysiert. Arabinose und Xylose wurden mit Ionenausschluss-Chromatographie (HPLC) quantifiziert (Schwarz *et al.*, 2016), die restlichen Monosaccharide wurden mittels HPLC (C18 Säule) getrennt und im Massenspektrometer (MS) quantifiziert (Ruhmann *et al.*, 2014). Polysaccharide ohne Arabinose wurden mit 4 M Trifluoressigsäure im Verhältnis 1:1 (v/v) hydrolysiert, anschließend wurden die Monosaccharide derivatisiert und ebenfalls im MS quantifiziert (Ruhmann *et al.*, 2014).

2.7 Präparation und Hydrolyse von Hemicellulose

2.7.1 Präparation von Hemicellulose aus Weizenstroh

Hemicellulose Präparation im Autoklaven

Für die Isolierung von Hemicellulose wurden 90 g Weizenstroh in 1.000 ml ddH₂O oder 1 % (w/v) NaOH in einem Glasgefäß mit Schraubdeckel 20 min bei 121 °C und 1,21 bar autoklaviert. Das Weizenstroh wurde anschließend ausgepresst, gewogen und 72 h bei 60 °C getrocknet. Die Flüssigkeit wurde durch ein Nylogewebe gefiltert und 30 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde zusammen mit dem Stroh getrocknet. Der pH des Hydrolysats (Überstand) wurde mit 37 %iger HCl auf pH 5,5 eingestellt. Die Hemicellulose im Hydrolysat wurde durch Zugabe des zweifachen Volumens Ethanol (95 % v/v) und Inkubation über Nacht bei 4 °C gefällt. Anschließend wurde die gefällte Hemicellulose 20 min bei 4.000 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Hemicellulose wurde in 200 ml 66 % (v/v) Ethanol resuspendiert und zum Waschen 1 h mit 200 rpm gerührt. Die Suspension wurde 20 min bei 8.500 g zentrifugiert und das Pellet im Exsikkator getrocknet. Anschließend wurde die trockene Hemicellulosepräparation (Pellet) gewogen und für die enzymatischen Hydrolysen fein gemahlen. Die prozentuale Ausbeute an Hemicellulose wurde mit folgender Formel berechnet.

$$\text{Anteil am Stroh (\%)} = \frac{m_{HP}(\text{g})}{m_{Stroh}(\text{g})} \cdot 100 (\%)$$

$$\text{Ausbeute Hemicellulose (\%)} = \frac{\text{Anteil vom Stroh (\%)}}{\text{Hemicelluloseanteil in Stroh (\%)}}$$

m_{HP} : Masse der Hemicellulosepräparation m_{Stroh} : Masse des eingesetzten Weizenstroh

Der Hemicelluloseanteil in Weizenstroh beträgt um die 23– 31 % (Van Dyk und Pletschke, 2012)

Formel 2.8 Berechnung der prozentualen Ausbeute an Hemicellulose

Zur Ermittlung des tatsächlichen Hemicelluloseanteils in den Hemicellulosepräparationen wurde die Monosaccharidzusammensetzung der Präparationen bestimmt (Kapitel 2.6.4). Um die Berechnung zu vereinfachen, wurde der Hemicelluloseanteil als Summe der quantifizierten Hexosen und Pentosen definiert. Der Kohlenhydratgehalt wurde anschließend mit folgender Formel aus der Zusammensetzung der Pentosen und Hexosen berechnet.

$$\text{Kohlenhydratgehalt (\%)} = \frac{(m_{\text{Hexosen}}(\text{mg}) \cdot 0,90) + (m_{\text{Pentosen}}(\text{mg}) \cdot 0,88)}{m_{\text{HP}}(\text{mg})}$$

m_{Hexosen} : Masse der Hexosen (Summe) m_{Pentosen} : Masse der Pentosen (Summe)

m_{HP} : eingesetzte Menge Hemicellulosepräparation für Kohlenhydrat-Analyse (1.000 mg)

0,90 bzw. 0,88: Korrekturfaktor, um die Addition eines Wassermoleküls während der Hydrolyse zu kompensieren

Formel 2.9 Berechnung des Kohlenhydratgehalts von Hemicellulosepräparationen

Hemicellulose Präparation im Extruder (an der Brunel University London)

Die Hemicellulosepräparation HP4 wurde in Kooperation mit Dr. Karnik Tarverdi in den Laboren des Wolfson Centre for Materials Processing der Brunel Universität London (Uxbridge, England) unter Verwendung eines gleichläufigen Doppelschneckenextruders hergestellt (Abbildung 2.1). Der entwickelte Prozess basiert auf einem publizierten Prozess für die Vorbehandlung von lignocelluloseischer Biomasse (Liu *et al.*, 2013). Vor der Extrusion wurden 1.000 g Weizenstroh über Nacht in 4.000 ml 6 % (w/v) NaOH inkubiert. Das inkubierte Weizenstroh wurde im Extruder auf 100 °C erhitzt und bei 150 rpm durchmischt und zerkleinert (Retentionszeit ca. 50 s). Anschließend wurde das prozessierte Stroh in einem geschlossenen Behälter 2 h bei 95 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die enthaltene Flüssigkeit mit einer mechanischen Presse vom Stroh getrennt und in drei Schritten durch Analysensiebe, mit Maschenweiten von 36 mm, 600 µm und 63 µm, filtriert. Der pH der Lösung wurde mit 32 %iger HCl auf pH 5,5 eingestellt und die Hemicellulose wurde durch Zugabe des zweifachen Volumens Ethanol (95 % v/v) und 3 h Inkubation bei 0 °C gefällt. Die Lösung mit der gefällten Hemicellulose wurde durch Glas-Mikrofaserfilter (Whatman® Grade GF/B; GE Healthcare) filtriert und die Hemicellulose wurde auf den Filtern bei 40 °C getrocknet. Anschließend wurde die Hemicellulosepräparation vom Filter getrennt, eingewogen und fein gemahlen. Die prozentuale Ausbeute an Hemicellulose wurde mit der Formel 2.8 berechnet.



Abbildung 2.1 Gleichläufiger Doppelschneckenextruder des Wolfson Centre for Materials Processing bei der Extrusion von Weizenstroh mit 6 % (w/v) NaOH zur Isolierung von Hemicellulose. Technische Daten: Doppelschneckenextruder mit fünf Heizzonen, Länge: 800 mm, Durchmesser der Schrauben: 35 mm.

2.7.2 Prototyp Hydrolyse von Hemicellulosepräparationen

Die Hydrolyse von Hemicellulosepräparationen mit einer Kombination aus Enzymen wurde in größeren Volumen von 40 ml und 5 l durchgeführt. Dies ermöglichte eine Entnahme von Proben während der Hydrolyse und die Anwendung industrienäherer Bedingungen.

40 ml Maßstab

Die Hydrolysen im 40 ml Maßstab wurde in 50 ml Reaktionsgefäßen im Inkubator durchgeführt. Zunächst wurden 0,4 g (1 %) oder 2,0 g (5 %) Hemicellulosepräparation in 35 ml 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (Tabelle 2.50) bei 70 °C und 200 rpm in 2 h gelöst. 500 µl der Substratlösung wurden als Nullprobe entnommen. Anschließend wurden 0,7–1.100 mU/ml der einzelnen Enzyme zugegeben und das Volumen wurde mit Kaliumphosphat-Puffer auf 40 ml aufgefüllt. Die Hydrolyse wurde 24 h bei 62 °C und 120 rpm inkubiert. Während der Hydrolyse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten 500 µl Proben entnommen und bei -20 °C eingefroren, um die Reaktion zu stoppen. Nach 24 h wurde die Hydrolyse beendet und auf Eis gekühlt. Das Hydrolysat wurde mittels DC chromatographisch getrennt und analysiert. Wurden im Hydrolysat nach 24 h Hydrolyse noch hohe Oligosaccharid-Konzentrationen nachgewiesen, wurden erneut Enzyme zugegeben und die Hydrolyse wurde für 4 h fortgesetzt. Anschließend wurde das Hydrolysat bei -20 °C eingefroren. Das Hydrolysat und die entnommenen Proben wurden mittels DC und HPLC analysiert.

Tabelle 2.50 Reaktionspuffer für die Hydrolyse im 40 ml und 5 l Maßstab

Kaliumphosphat-Puffer (1x)

50 mM KH_2PO_4	87,7 %
50 mM K_2HPO_4	12,3 %
NaCl	5,0 mM
pH 6,0 bei 62 °C mit H_3PO_4 / KOH einstellen	

5 l Maßstab im Bioreaktor

Die Hydrolyse im 5 l Maßstab wurde mit dem BIOSTAT B Bioreaktor (Sartorius) im 5 l UniVessel Glass Rührkessel durchgeführt. Während der Hydrolyse wurde die Temperatur konstant bei 62 °C gehalten und Änderungen des pH wurden aufgezeichnet. 250 g Hemicellulosepräparation wurden in 4.500 ml 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (Tabelle 2.50) bei 62 °C und 750 rpm über Nacht gelöst. Der pH-Wert wurde mit H_3PO_4 auf pH 6,0 eingestellt und die Substratlösung wurde auf ein Volumen von 5 l aufgefüllt. Nach der Entnahme von 5 ml Nullprobe, wurden 10–1.100 U/l der einzelnen Enzyme zugegeben und die Hydrolyse wurde 30 h bei 62 °C und 750 rpm inkubiert. Nach 24 h wurden erneut 15 U/l Enzym (β -Xylosidase) zugegeben. Während der Hydrolyse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten 5 ml Hydrolysat entnommen und bei -20 °C eingefroren. Nach 30 h wurde die Hydrolyse beendet. Das Hydrolysat wurde 45 min bei 8.000 g zentrifugiert und ein Teil des Überstands wurde bei -20 °C eingefroren. Das Hydrolysat und die entnommenen Proben wurden anschließend mittels HPLC und HPAEC-PAD analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Hemicellulolytische Aktivität sekretierter *C. stercorarium* Enzyme

Clostridium stercorarium ist spezialisiert auf die Hydrolyse von Hemicellulose und produziert eine große Anzahl hemicellulolytischer Enzyme (Zverlov und Schwarz, 2008). Da die Hemicellulosen außerhalb der Zelle liegen, sekretiert *C. stercorarium* kohlenhydrataktive Enzyme (CAZymes), hauptsächlich Glycosidhydrolasen, in die extrazelluläre Umgebung. Um die Aktivitäten der sekretierten Enzyme und somit das hemicellulolytische Potential von *C. stercorarium* zu bestimmen, wurden die sekretierten Proteine (das Sekretom) aus dem Kulturüberstand isoliert. Dazu wurde *C. stercorarium* mit Cellulose (Filterpapier) oder Xylan aus Haferspelzen als Kohlenstoffquelle kultiviert. Die hydrolytischen Aktivitäten der Xylan- und der Cellulose-Proteinpräparation wurden mit verschiedenen Polysacchariden bestimmt. (Abbildung 3.1).

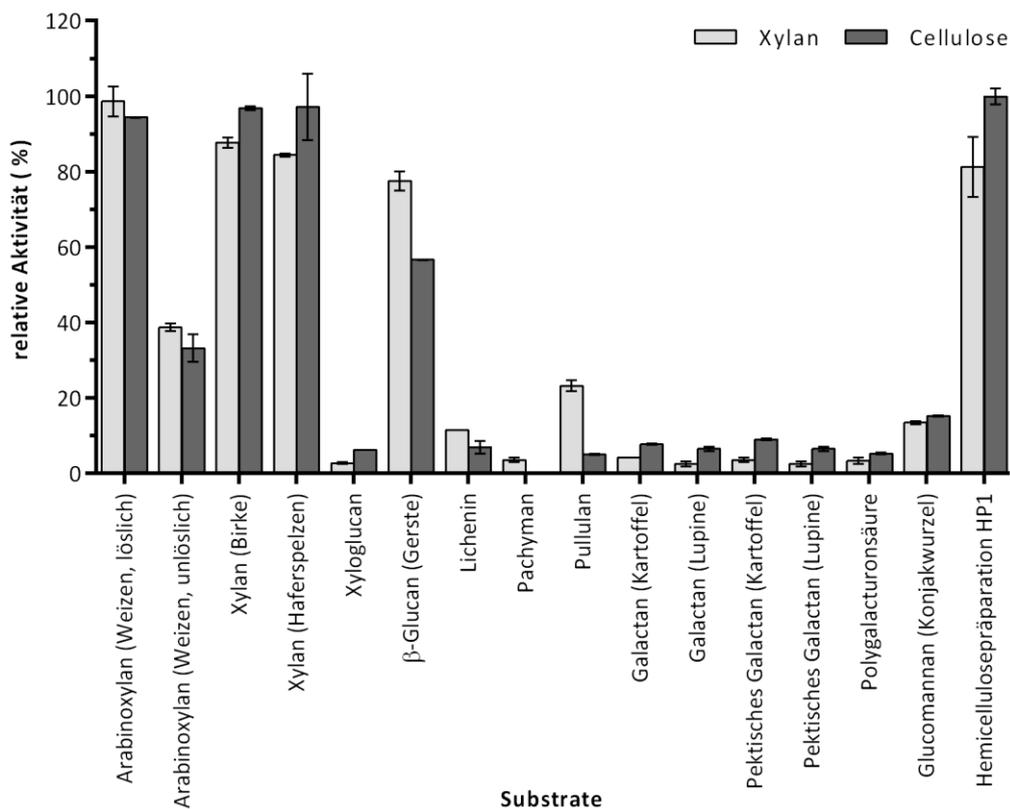


Abbildung 3.1 Relative Aktivität der sekretierten Enzyme von *C. stercorarium* kultiviert auf Haferspelzen Xylan (hellgrau) oder Cellulose (dunkelgrau). 5,0 mg/l Proteinpräparation wurden mit 0,5 % (w/v) Polysaccharid bei pH 6,5 und 60 °C in 0,1 M MOPS-Reaktionspuffer 16 h inkubiert. Die enzymatische Aktivität wurde mit dem DNSA-Assay bestimmt. Die hydrolytische Aktivität der Cellulose-Proteinpräparation mit der Hemicellulosepräparation HP1 als Substrat wurde auf 100 % festgesetzt. Getestete Polysaccharide, für die keine Aktivität festgestellt werden konnte: Arabinan, Arabinoxylan (Lärche), Curdlan, Galactomannan (Guarbohne), Gummi arabicum (Akazie), Inulin (Dahlienknollen), Laminarin, Mannan, Mannan (Steinnuss), Rhamnogalacturonan I, Sinistrin.

Beide Proteinpräparationen hydrolysierten 15 der 26 getesteten Polysaccharide und die eigene Hemicellulosepräparation HP1. Die höchste Aktivität wurde für die Hydrolyse von HP1 mit der Cellulose-Proteinpräparation gemessen (auf 100 % festgesetzt). Vergleichbar hohe Aktivitäten zeigten die Xylan- und die Cellulose-Proteinpräparation auf löslichem Arabinoxylan aus Weizen und Xylan aus Birken oder Haferspelzen. Die Aktivität auf unlöslichem Arabinoxylan war 60 % niedriger als die Aktivität auf löslichem Arabinoxylan. Beide Proteinpräparationen zeigten zudem eine hohe Aktivität für β -Glucan aus Gerste, während die Aktivitäten für weitere Glucane, Glucomannan, verschiedene Galactane und Polygalacturonsäure vergleichsweise niedrig waren. Die Xylan-Proteinpräparation zeigte eine höhere relative Aktivität für Glucane mit gemischten Bindungen, insbesondere für β -Glucan aus Gerste (79 %) und Pullulan (24 %), verglichen mit der Cellulose-Proteinpräparation (57 % und 5 %). Im Gegensatz dazu war die Cellulose-Proteinpräparation aktiver mit Xylan aus Birken oder Haferspelzen und HP1 als Substrat. *C. stercorarium* wuchs signifikant schneller und erreichte eine höhere Zelldichte mit Xylan aus Haferspelzen als Kohlenstoffquelle und sekretierte mit 3,62 mg/l 3,1-mal mehr Protein als mit Cellulose als Kohlenstoffquelle (1,17 mg/l). Die Polysaccharide für die Charakterisierung der rekombinanten *C. stercorarium* Enzyme wurden basierend auf den Aktivitäten der sekretierten Enzyme ausgewählt.

3.2 Heterologe Produktion hemicellulolytischer *C. stercorarium* Enzyme

3.2.1 Auswahl hemicellulolytischer Glycosidhydrolasen und Kohlenhydratesterasen

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung hemicellulolytischer *C. stercorarium* Enzyme und die Hydrolyse von Hemicellulosen und Hemicellulose-assoziiierter Polysaccharide sowie die Identifizierung der für die einzelnen Abbauschritte verantwortlichen Enzyme. Von der großen Anzahl kohlenhydrataktiver Enzyme, die *C. stercorarium* besitzt, wurden daher nur die hemicellulolytischen Enzyme für eine Charakterisierung ausgewählt. Der Schwerpunkt wurde dabei auf die Glycosidhydrolasen (GH) gelegt, da diese die glycosidischen Bindungen zwischen den Kohlenhydraten hydrolysieren und somit die wichtigste Enzymklasse für die Hydrolyse von Polysacchariden darstellen. Zusätzlich wurden hemicellulolytische Kohlenhydratesterasen (CE) ausgewählt, die durch die Hydrolyse von Carbonsäureestern die Zugänglichkeit der Polysaccharide für die Glycosidhydrolasen erhöhen. In der CAZy-Datenbank wurden für *C. stercorarium* 71 Proteine mit einem oder zwei Proteinmodulen für eine Glycosidhydrolase und 10 Proteine mit einem Kohlenhydratesterase-Proteinmodul aufgelistet (<http://www.cazy.org/b2478.html>; am 24.07.2014). Die 71 GH- und 10 CE-Module verteilten sich auf 34 GH- sowie 6 CE-Familien. Basierend auf der

sequenzbasierten Annotation und bekannten hemicellulolytischen Aktivitäten charakterisierter Enzyme aus diesen Enzym-Familien wurden 24 GH- und 5 CE-Familien ausgewählt, in denen hemicellulolytische Enzyme vorkommen (Tabelle 3.1). Zusätzlich wurden vier Proteine mit bisher nicht klassifizierten GH-Modulen (GHnc) und daher unbekanntes Aktivitäten ausgewählt.

Tabelle 3.1 Glycosidhydrolase (GH) und Kohlenhydratesterase (CE) Familien im *C. stercorarium* Genom

	ausgewählte Familien	ausgeschlossene Familien
GH-Familien:	GH2 (5), GH3 (5), GH9, GH10 (4), GH11, GH26, GH27, GH28 (2), GH29, GH31, GH35, GH38, GH39, GH43 (7), GH51, GH53, GH67, GH78, GH88, GH95, GH105 (5), GH115, GH127 (2), GHnc (4)	GH4, GH13 (5), GH15, GH18 (3), GH23 (2), GH36 (2), GH48, GH94 (2), GH112, GH130
CE-Familien:	CE1, CE4 (4), CE7, CE8, CE12	CE9 (2)

Die Enzyme von 24 der 34 GH-Familien und 5 der 6 CE-Familien wurden aufgrund hemicellulolytischer Aktivitäten in der Familie ausgewählt (CAZy-Datenbank). Bei mehr als einem Enzym in der Familie ist die Anzahl in Klammern hinter der GH/CE-Familie angegeben. GHnc: nicht klassifizierte Glycosidhydrolase. Die aktuelle Annotation der Glycosidhydrolasen und Kohlenhydratesterasen von *C. stercorarium* enthält im Vergleich mit der in dieser Arbeit verwendeten Annotation vom 24.07.2014 einige Änderungen. So wurden drei Enzyme mit nicht klassifizierten GH-Modulen (GHnc) der GH-Familie 106 zugeordnet und zwei Enzyme der neuen Familie GH154 hinzugefügt. Jeweils ein Enzym der CE-Familien 1 und 4 wird nicht mehr den Kohlenhydratesterasen zugeordnet (<http://www.cazy.org/b2475.html>; am 11.06.2019).

Zehn GH-Familien wurden ausgeschlossen, da die bekannten Enzyme dieser Familien NAD⁺ (GH4) benötigen, den Abbau von Stärke (GH13, GH15), Chitin (GH18), Peptidoglycan (GH23) oder Cellulose (GH48) katalysieren, oder Kohlenhydrate phosphorylieren (GH94, GH112, GH130). Zwei Enzyme der GH-Familie 36, die häufig zu den α -Galactosidasen zählen, wurden ebenfalls ausgeschlossen. Von den Kohlenhydratesterasen wurden nur zwei Enzyme der CE-Familie 9 nicht ausgewählt, da alle charakterisierten Enzyme dieser Familie *N*-Acetylglucosamin-6-phosphat deacetylieren. Insgesamt wurden 50 Glycosidhydrolasen und 8 Kohlenhydratesterasen für die heterologe Produktion in *E. coli* und die Charakterisierung ausgewählt.

3.2.2 Produktion der rekombinanten Enzyme in *E. coli*

Wie zuvor gezeigt wurde (Kapitel 3.1), sekretiert *C. stercorarium* kohlenhydrataktive Enzyme in die extrazelluläre Umgebung. Da *E. coli* Proteine nicht sekretieren kann und die entsprechenden Signalpeptide spezifisch für *C. stercorarium* sind, wurden die Aminosäuresequenzen der ausgewählten Proteine auf Signalpeptide untersucht. Für 15 Proteine wurde ein Signalpeptid vorhergesagt (Tabelle 3.2). Die kodierenden Gene für die 50 Glycosidhydrolasen und 8 Kohlenhydratesterasen wurden, ohne die DNA-Sequenzen für die identifizierten Signalpeptide, aus dem Genom von *Clostridium stercorarium* DSM-8532 amplifiziert. Mit Ausnahme des *galA* Gens für die Endo- β -1,4-Galactanase Gal53A konnten die Gene erfolgreich in den pET-24c(+) Expressionsvektor

kloniert werden (Abbildung 6.1). Das *galA* Gen wurde in einer PCR um 1.296 bp am 5'-Ende und 1.329 bp am 3'-Ende verkürzt und die verkürzte Version des *galA* Gens wurde in den pET-24c(+) Vektor kloniert. Das verkürzte Gal53A Protein, mit 909 AS statt der 1.784 AS des nativen Proteins, enthielt das komplette GH53 Modul und vier regulatorische Domänen (CDP), während ein 443 Aminosäuren langer Abschnitt am C-Terminus mit drei S-Layer Homologie Domänen (SLH) und ein 432 Aminosäuren langer N-terminaler Sequenzabschnitt ohne identifiziertes Modul fehlten (Abbildung 3.2). In allen 58 *E. coli* Klonen konnten die korrekten *C. stercorarium* Gene durch DNA-Sequenzierung bestätigt werden (Abbildung 6.3). Die rekombinanten Gene wurden heterolog in *E. coli* exprimiert und unter Verwendung des rekombinanten His₆-Tag durch Affinitätschromatographie gereinigt (Abbildung 6.2 und Abbildung 6.4). Alle 58 rekombinanten *C. stercorarium* Proteine konnten erfolgreich produziert und gereinigt werden (Tabelle 3.2). Die erhaltene Proteinmenge der einzelnen gereinigten Proteine reichte von 1,8 mg/l für BglA bis zu 253,0 mg/l für Bxl39B (Tabelle 6.2).

Ergebnisse

Tabelle 3.2 Produzierte Glycosidhydrolasen und Kohlenhydratesterasen von *C. stercorarium*

Proteinnummer	Proteinname	Module	SP	Proteinnummer	Proteinname	Module	SP
AGC67981.1	Bga2B	GH2	-	AGC67945.1	Arf43A	GH43	-
AGC67186.1	Bga2E	GH2	-	AGC68110.1	Arf43C	GH43	-
AGC67268.1	Bga2D	GH2	-	AGC68111.1	Abn43A	GH43	31 AS
AGC67637.1	Bga2C	GH2	-	AGC67521.1	Xyl43B	GH43	-
AGC68382.1	Uid2A	GH2	-	AGC67885.1	Xyl43A	GH43	-
AGC67275.1	Bxl3B	GH3	-	AGC69509.1	Bxl43C	GH43	-
AGC67337.1	Bgl3Z	GH3	-	AGC67626.1	Arf51B	GH51	-
AGC67350.1	-	GH3	-	AGC68692.1	Gal53A	GH53, 4x CBM61	33 AS
AGC68204.1	-	GH3, CBM6	-	AGC69355.1	Agu67A	GH67	-
AGC68338.1	Nag3A	GH3	22 AS	AGC68061.1	Ram78A	GH78	13 AS
AGC68873.1	Cel9Z	GH9, 2x CBM3, 2x CBMX2	27 AS	AGC69452.1	-	GH88	-
AGC67515.1	Xyn10E	GH10	-	AGC67127.1	-	GH95	-
AGC67677.1	Xyn10C	GH10, CBM9, 2x CBM22	29 AS	AGC68039.1	Xyn105F	GH105	-
AGC67715.1	Xyn10B	GH10	34 AS	AGC67892.1	-	GH105	-
AGC67759.1	Xyn10D	GH10	-	AGC67946.1	-	GH105	-
AGC68909.1	Xyn11A	GH11, 3x CBM6	30 AS	AGC68044.1	-	GH105	-
AGC68130.1	Man26A	GH10, CBM35	26 AS	AGC68046.1	-	GH105	-
AGC68671.1	-	GH10	-	AGC67967.1	-	GH115	25 AS
AGC67830.1	-	GH27	-	AGC67053.1	-	GH127	-
AGC67947.1	-	GH28	-	AGC67292.1	-	GH127	-
AGC67128.1	-	GH28	-	AGC67072.1	RamB	GHnc*	-
AGC68208.1	Bxl31D	GH29	-	AGC68062.1	BglA	GHnc	-
AGC69232.1	Bga35A	GH31	-	AGC69032.1	-	GHnc*	-
AGC68033.1	-	GH35	-	AGC69275.1	ArfD	GHnc*	-
AGC67890.1	Bxl39A	GH38	-	AGC69220.1	-	CE1*	12 AS
AGC67716.1	Axh43A	GH39	-	AGC67568.1	-	CE4	24 AS
		2x GH43, CBM6	29 AS	AGC67840.1	Axe4A	CE4*	-
				AGC68379.1	-	CE4	13 AS
				AGC69318.1	-	CE4	28 AS
				AGC68434.1	Axe7B	CE7	-
				AGC69600.1	-	CE8	-
				AGC68045.1	-	CE12	-

Nur Enzyme mit nachgewiesener Aktivität wurden benannt. Die Proteinnummer (GenBank accession number), die Proteinmodule sowie, falls vorhanden, das vorhergesagte Signalpeptid (SP) sind angegeben. Die Signalpeptide wurden mit dem SignalP 4.1 Server und einem Cutoff-Wert von 0,3 vorhergesagt (Petersen *et al.*, 2011). *: In der aktuellen Annotation der Glycosidhydrolasen und Kohlenhydratesterasen von *C. stercorarium* werden RamB, AGC69032.1 und ArfD der GH-Familie 106 zugeordnet. AGC69220.1 und Axe4A werden nicht mehr als Kohlenhydratesterasen klassifiziert und keiner CE-Familie zugeordnet (<http://www.cazy.org/b2475.html>; am 11.06.2019).

Sieben der ausgewählten Glycosidhydrolasen enthielten neben dem GH-Modul ein oder mehrere Kohlenhydrat-Bindungsmodule (CBMs) (Tabelle 3.2, Abbildung 3.2 und Abbildung 6.5).

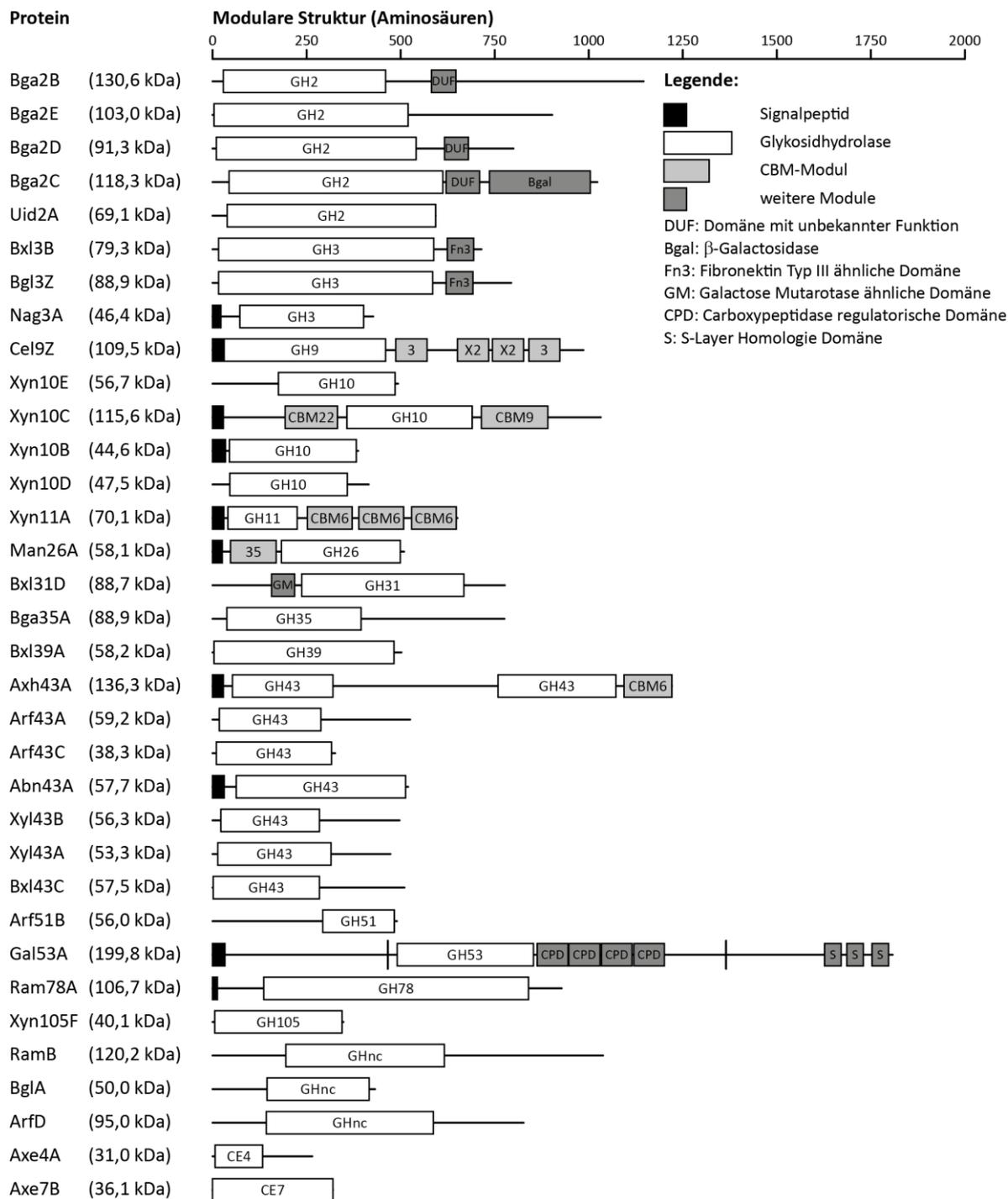


Abbildung 3.2 Schematische Struktur der *C. stercorarium* Glycosidohydrolasen (GH) und Kohlenhydratesterasen (CE) mit nachgewiesener Aktivität. Die Molekulare Masse der nativen Proteine ist in Klammern angegeben. Die Größe der Enzyme und Module ist entsprechend der Anzahl an Aminosäuren skaliert. Die Klassifizierung von GH- und CBM-Modulen wurde mit der CAZy-Datenbank ermittelt (Lombard *et al.*, 2014). Die Modulstruktur wurde mit der Pfam-Datenbank ermittelt (Finn *et al.*, 2016). Die CAZy-Datenbank listet nur zwei CBM3 Module für Cel9Z auf, während die vier aufgelisteten CBM61 Module von Gal53A und das zweite CBM22 Modul von Xyn10C mit der Pfam-Datenbank nicht identifiziert werden konnten. Das Protein Gal53A wurde an den angegebenen Stellen (I) mittels PCR verkürzt.

3.3 Charakterisierung der *C. stercorarium* Glycosidhydrolasen

3.3.1 Hemicellulolytische Aktivität auf *p*NP-Glycosiden und Polysacchariden

Mithilfe von Aktivitätsassays wurden 20 neue *C. stercorarium* Glycosidhydrolasen entdeckt, die in dieser Arbeit zum ersten Mal charakterisiert wurden, einschließlich drei Enzymen mit nicht klassifizierten GH-Modulen (Vergleich mit CAZy-Annotation vom 24.07.2014). In der Summe zeigten die rekombinanten Glycosidhydrolasen Aktivität für die gleichen Polysaccharide wie die sekretierten *C. stercorarium* Proteine, mit Ausnahme von Pachyman, Pullulan und Polygalacturonsäure. Zusätzlich hydrolysierten die Glycosidhydrolasen Abn43A und Man26A Arabinan und Mannan. Ein Enzym der GH-Familie 31, Bxl31D, wurde als β -Xylosidase charakterisiert, die erste Beschreibung dieser Aktivität für die GH-Familie 31.

Die enzymatischen Aktivitäten der 50 ausgewählten Glycosidhydrolasen wurden mit verschiedenen *p*NP-Glycosiden und Polysacchariden bestimmt (Tabelle 2.15 und Tabelle 2.17). Die Aktivitäten wurden zunächst qualitativ bestimmt, anschließend wurden die Reaktionszeit und die eingesetzte Enzymmenge reduziert bis die Enzymaktivität im linearen Bereich der Enzymkinetik quantitativ gemessen werden konnte. Abhängig von der Höhe der gemessenen Aktivität, wurden die Aktivitätsassays mit unterschiedlichen Enzymkonzentrationen und Reaktionszeiten für die einzelnen Enzyme durchgeführt. 32 der 50 Glycosidhydrolasen zeigten hydrolytische Aktivität für die verwendeten Substrate. Für 11 Proteine mit Proteinmodulen der GH-Familien 27, 28, 29, 38, 88, 115 oder 127 wurde keine Aktivität gefunden. Zwei Proteine der GH-Familie 3, vier Proteine der GH-Familie 105 und ein Protein mit einem nicht klassifizierten GH-Modul zeigten ebenfalls keine Aktivität. In dieser Arbeit zum ersten Mal charakterisierte Enzyme wurden, wie in der Literatur für Glycosidhydrolasen üblich, entsprechend ihrer Hauptaktivität benannt (Schwarz *et al.*, 2018). Die Enzymnamen setzen sich aus drei Buchstaben für die Hauptaktivität des Enzyms (z.B.: Bga für β -Galactosidase), der Nummer der GH- oder CE-Familie und einem fortlaufenden Großbuchstaben für die Unterscheidung von Enzymen mit gleicher Hauptaktivität zusammen (z.B.: Bga2B).

27 der 32 Glycosidhydrolasen mit nachgewiesener Aktivität hydrolysierten die glycosidische Bindung von *p*NP-Glycosiden (Tabelle 3.3). Anhand der Aktivitätsassays wurden 19 Enzyme mit Hauptaktivität für *p*NP-Glycoside identifiziert: drei α -L-Arabinofuranosidasen (Arf51B, Arf43C, ArfD), zwei β -D-Glucosidasen (BglA, Bgl3Z), drei β -D-Galactosidasen (Bga2C, Bga2D, Bga2E), zwei α -L-Rhamnosidasen (Ram78A, RamB), sieben β -D-Xylosidasen (Arf43A, Bxl39A, Bxl3B, Bxl43C,

Bxl31D, Xyl43A, Xyl43B), eine β -D-Glucuronidase (Uid2A), und eine *N*-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (Nag3A). Die mit Abstand höchste Aktivität wurde für Arf51B bestimmt, 208 U/mg für *p*NP- α -L-Arabinofuranosid, gefolgt von der Aktivität von Bgl3Z für *p*NP- β -D-Glucopyranosid (19,7 U/mg). Mehr als die Hälfte der Enzyme zeigte Nebenaktivitäten für weitere *p*NP-Glycoside.

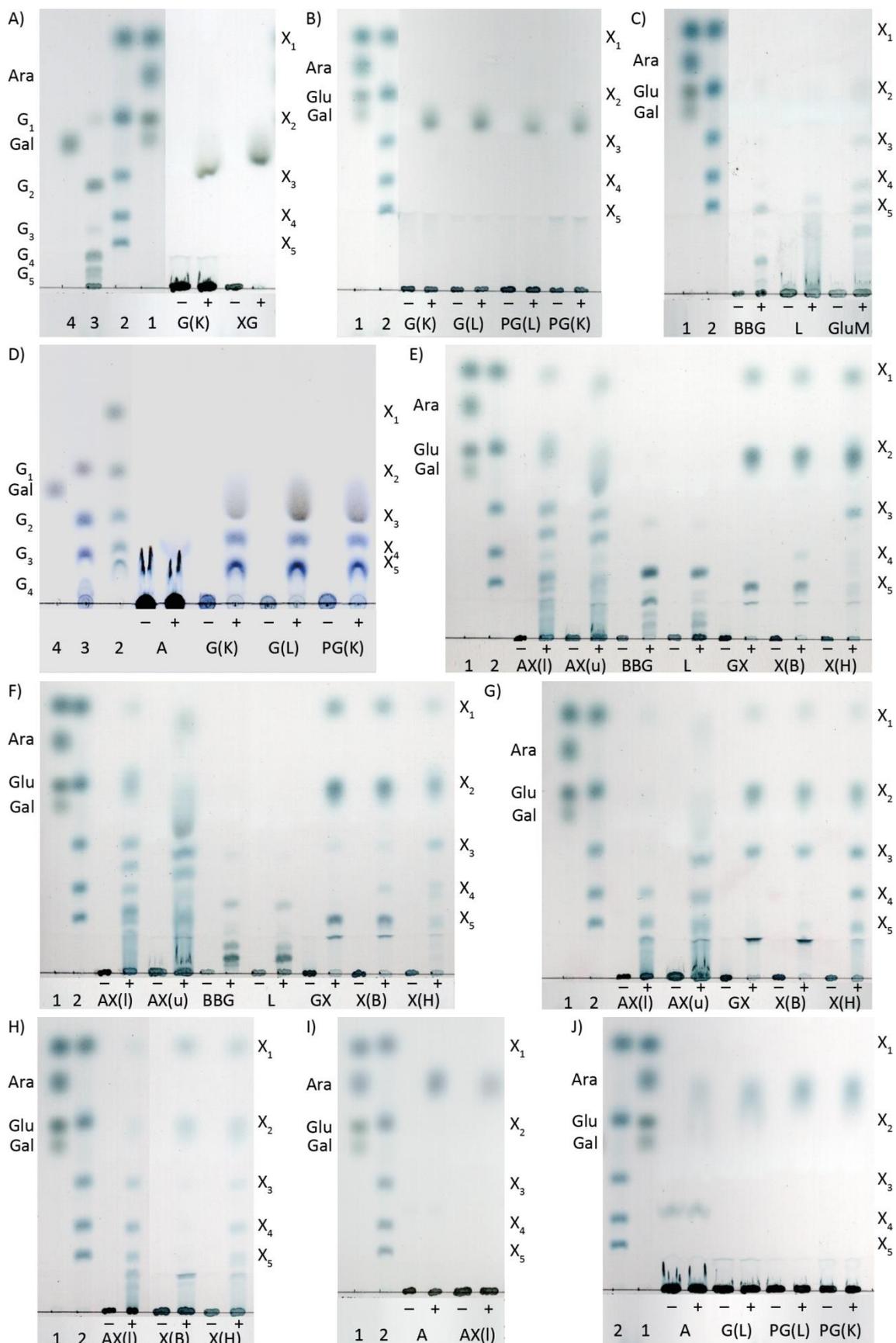
Tabelle 3.3 Enzymaktivität der Glycosidhydrolasen auf *p*NP-Glycosiden

Enzyme	Spezifische Aktivität (U/mg)							
	<i>para</i> -Nitrophenyl-							
	α -L-Arabinofuranosid	α -D-Glucopyranosid	β -D-Glucopyranosid	β -D-Galactopyranosid	α -L-Rhamnopyranosid	β -D-Xylopyranosid	β -D-Glucuronid	<i>N</i> -acetyl- β -D-Glucosaminid
Bga2B	-	-	-	2,89	-	-	-	ng
Bga2E	-	-	-	0,08	-	-	-	ng
Bga2D	-	-	-	0,22	-	-	-	ng
Bga2C	-	-	-	1,36	-	-	-	ng
Uid2A	+	-	0,10	0,15	-	+	16,5	ng
Bxl3B	1,65	-	0,31	-	-	8,18	-	-
Bgl3Z	0,16	+	19,67	0,10	-	5,41	-	-
Nag3A	-	-	-	-	-	-	0,05*	0,29
Xyn10E	-	-	-	+	-	+	-	ng
Xyn10C	+	-	+	-	-	0,11	-	ng
Xyn10B	+	-	+	+	-	1,08	-	ng
Xyn10D	-	-	-	-	-	+	-	ng
Bxl31D	-	-	-	-	-	0,24	-	ng
Bxl39A	0,09	-	-	-	-	0,09	-	ng
Axh43A	1,43	-	-	-	-	-	-	ng
Arf43A	+	-	+	-	-	1,01	-	ng
Arf43C	4,17	-	-	-	-	+	-	ng
Abn43A	+	-	-	-	-	-	-	ng
Xyl43B	-	-	-	-	-	0,06	-	ng
Xyl43A	+	-	-	-	-	+	-	ng
Bxl43C	0,29	-	-	-	-	0,51	-	ng
Arf51B	208	-	-	-	-	0,23	-	ng
Ram78A	+	-	0,16	-	6,34	-	-	ng
Xyn105F	-	-	-	+	-	-	-	ng
RamB	-	-	-	-	+	-	-	ng
BglA	-	-	0,40	-	-	+	-	ng
ArfD	0,23	-	+	0,16	-	-	-	ng

Die Hydrolysen wurden in Triplikaten in 0,1 M MOPS Reaktionspuffer bei pH 6,5 und 60 °C in 10–120 min durchgeführt. Die Enzymaktivität wurde durch die Quantifizierung von freigesetztem *p*NP bestimmt. Die angegebenen Aktivitäten sind Mittelwerte der Dreifachbestimmungen, die Standardabweichungen (nicht gezeigt) lagen im Bereich \pm 51 % der angegebenen Aktivitätswerte. Für 22 von 49 Enzymen (nicht aufgeführt) konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Gal53A wurde nicht getestet. Getestete *p*NP-Glycoside für die keine Aktivität festgestellt werden konnte: *p*NP- α -D-Galactopyranosid, *p*NP- α -D-Mannopyranosid, *p*NP- β -D-Mannopyranosid, *p*NP- α -D-Xylopyranosid. ng: nicht gemessen; *: Inkubation über Nacht, +: nachweisbar, aber sehr geringe Aktivität nahe der Nachweisgrenze.

Für RamB, Xyl43A, die Arabinanase Abn43A und die Xylanasen Xyn10D, Xyn10E und Xyn105F, wurden mit den verwendeten Reaktionsbedingungen nur sehr geringe Aktivitäten gemessen. Während die Aktivitäten der Arabinanase und der Xylanasen durch die Hydrolyse von Polysacchariden bestätigt wurden, wurde die Aktivität von Xyl43A bereits in der Literatur beschrieben (Sakka *et al.*, 1993b). Um die Aktivität der Rhamnosidase RamB zu bestätigen, wurde *E. coli* Zell-extrakt mit RamB über Nacht bei drei verschiedenen Temperaturen mit *p*NP- α -L-Rhamnopyranosid inkubiert. Während bei 60 °C (0,04 U/mg) erneut eine sehr geringe Aktivität gemessen wurde, war die Aktivität bei 55 °C (0,10 U/mg) und 50 °C (0,43 U/mg) 2,3-fach bzw. 9,7-fach höher. 15 Glycosidhydrolasen zeigten ausschließlich Aktivität für *p*NP-Glycoside, während für 12 Enzyme zusätzlich Aktivitäten auf Polysacchariden nachgewiesen wurden.

17 Glycosidhydrolasen hydrolysierten Polysaccharide und katalysierten die Freisetzung von Mono- oder Oligosacchariden. Die rekombinanten Enzyme, mit GH-Modulen der Familien 2, 3, 9, 10, 11, 26, 35, 43, 51, 53 oder 105, hydrolysierten alle Xylane, Glucan-, Galactan- und Mannan-basierte Polysaccharide sowie Xyloglucan und die Hemicellulosepräparation HP1. Insgesamt wurden 17 der 30 getesteten Polysaccharide hydrolysiert. Die hydrolysierten Polysaccharide wurden mittels DC analysiert und anhand der freigesetzten Produkte wurden die Enzymaktivitäten identifiziert. Es handelte sich um zwei β -D-Galactosidasen (Bga35A, Bga2B), zwei β -D-Xylosidasen (Bxl3B, Arf43A), eine Endo-Glucanase (Cel9Z), sechs Endo-Xylanasen (Xyn11A, Xyn10B, Xyn10C, Xyn10D, Xyn10E, Xyn105F), eine Mannanase (Man26A), eine Arabinoxylan-Arabinofuranohydrolase (Axx43A), zwei α -L-Arabinofuranosidasen (Arf51B, Arf43C), eine Arabinanase (Abn43A), und eine Endo-Galactanase (Gal53A) (Abbildung 3.3).



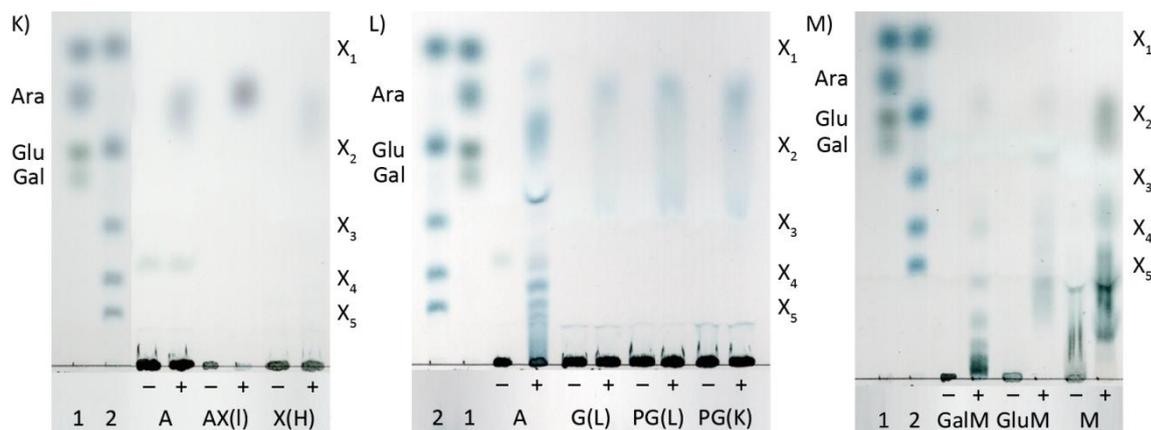


Abbildung 3.3 Dünnschichtchromatographien (DC) hydrolytischer Produkte verschiedener Polysaccharide, hydrolysiert mit (A) Bga2B, (B) Bga35A, (C) Cel9Z, (D) Gal53A, (E) Xyn10B, (F) Xyn10C, (G) Xyn11A, (H) Xyn10D, (I) Arf51B, (J) Arf43C, (K) Axh43A, (L) Abn43A, (M) Man26A. Die Hydrolysen wurden mit 5 µg/ml Enzym und 0,5 % (w/v) Polysaccharid in 0,1 M MOPS-Reaktionspuffer bei pH 6,5 und 60 °C über Nacht (16 h) durchgeführt. A: Arabinan, AX(l): lösliches Weizen-Arabinoxylan, AX(u): unlösliches Weizen-Arabinoxylan, BBG: Gersten-β-Glucan, G: Galactan aus Lupinen (L) oder Kartoffel (K), PG: pektisches Galactan aus Lupinen (L) oder aus Kartoffel (K), GalM: Galactomannan, GluM: Glucomannan, GX: 4-O-Methyl-Glucuronoxylan, L: Lichenin, M: Mannan, X: Xylan aus Birken (B) oder Haferspelzen (H), XG: Xyloglucan, -: Negativkontrolle, +: Hydrolysat. Standards: 1: Xylose, Arabinose, Glucose, Galactose; 2: Xylose bis Xylopentaose; 3: Glucose bis Glucohexaose; 4: Galactose.

Die spezifische Enzymaktivität der Glycosidhydrolasen mit Aktivität für Polysaccharide wurde bei dem Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms bestimmt (Tabelle 3.4 und Tabelle 3.5). Die Galactanase Gal53A hydrolysierte das β-(1,4)-Galactanrückgrat von Galactan aus Kartoffel und Lupinen und pektischem Galactan aus Kartoffel, während die β-D-Galactosidasen exo-wirkende Enzyme waren und Galactose als alleiniges Produkt freisetzen (Abbildung 3.3). Bga35A spaltete Galactose von Galactan aus Kartoffel und Lupinen und pektischem Galactan ab. Bga2B hingegen spaltete Galactose nur von Galactan aus Kartoffel ab, hydrolysierte aber die terminale β-(1,2)-verknüpfte Galactose von der α-(1,6)-verknüpften Galactosyl-Xylose-Seitenkette des Glucose-rückgrats von Xyloglucan. Cel9Z hydrolysierte Gersten-β-Glucan und Lichenin zu Oligosacchariden und spaltete das Rückgrat von Glucomannan, welches aus β-(1,4)-verknüpften D-Mannose- und D-Glucoseeinheiten besteht.

Alle sechs Xylanasen wurden als Endo-Xylanasen identifiziert und zeigten ihre höchste spezifische Aktivität für lösliches Arabinoxylan aus Weizen. Xyn10B und Xyn10C hydrolysierten zusätzlich das β-(1,3;1,4)-Rückgrat von Gersten-β-Glucan und Lichenin. Während die Aktivität von Xyn10B für Arabinoxylan 4,6-fach höher war als die von Xyn10C, waren die Aktivitäten für Glucan und Lichenin nahezu vergleichbar. Die von den Xylanasen freigesetzten Xylooligosaccharide unterscheiden sich in ihrer Länge: Xyn10B und Xyn10C produzierten hauptsächlich Xylose und Xylobiose, während Xyn11A hauptsächlich Xylobiose und Xylotriose produzierte. Alle drei Enzyme setzten bei der Hydrolyse von Arabinoxylan zusätzlich eine Reihe von weiteren Oligosacchariden frei (Abbildung

3.3). Xyn11A zeigte die höchste spezifische Aktivität (1030 U/mg), 1,7-fach und 7,7-fach höher als die spezifischen Aktivitäten die für Xyn10B (597 U/mg) und Xyn10C (134 U/mg) bestimmt wurden. Die Xylanasen Xyn10D, Xyn10E, und Xyn105F hydrolysierten ebenfalls Xylan, jedoch wurde keine Aktivität für β -Glucan nachgewiesen.

Die Mannanase Man26A hydrolysierte das β -(1,4)-verknüpfte Rückgrat von Mannan, Galactomannan und Glucomannan. Drei Enzyme, Arf51B, Arf43C und Axl43A, lösten Arabinose aus Arabinan. Arf51B und Axl43A setzten außerdem Arabinose aus löslichem Arabinoxylan frei und Arf43C setzte Arabinose aus Galactan aus Lupinen und pektischem Galactan frei. Während die höchste spezifische Aktivität von Arf51B mit Arabinan gemessen wurde, zeigte Axl43A die höchste Aktivität für Arabinoxylan und nur eine geringe Aktivität für Arabinan. Arf43C war am aktivsten mit pektischem Galactan aus Kartoffel. Auch die Arabinanase Abn43A setzte Arabinose aus Galactan und pektischem Galactan frei, zeigte die höchste Aktivität jedoch bei der Hydrolyse des α -(1,5)-verknüpften Arabinanrückgrats. Zusammengefasst waren die bestimmten Aktivitäten für die exo-wirkenden Enzyme Axl43A, Arf43A, Arf51B, Arf43C, Bxl3B, Bga35A und Bga2B signifikant niedriger als die spezifischen Aktivitäten der endo-wirkenden Enzyme.

Tabelle 3.4 Enzymaktivität von 17 Glycosidhydrolasen auf Polysacchariden. (Teil 1)

Enzyme	Spezifische Aktivität (U/mg)								
	Arabinan	AX (Weizen, löslich)	AX (Weizen, unlöslich)	4-O-Methyl-Glucuronoxylan	Xylan (Birke)	Xylan (Haferspelzen)	Xyloglucan	β-Glucan (Gerste)	Lichenin
Bga2B	(+)	-	-	-	-	-	3,11 ± 0,04	-	-
Bxl3B	-	0,25 ± 0,01	+	0,21 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,35 ± 0,02	-	-	-
Cel9Z	-	-	-	(+)	-	(+)	-	159 ± 1	136 ± 9
Xyn10E	-	0,17 ± 0,01	-	+	(+)	(+)	-	-	-
Xyn10C	-	134 ± 5	14,1 ± 0,8	91,3 ± 3,8	56,3 ± 2,0	86,6 ± 1,2	-	19,1 ± 0,1	7,85 ± 0,45
Xyn10B	-	597 ± 46	40,4 ± 3,7	483 ± 45	185 ± 20	679 ± 41	-	18,8 ± 1,6	9,65 ± 0,65
Xyn10D	-	6,55 ± 0,09	-	+	1,24 ± 0,04	6,17 ± 0,08	-	(+)	-
Xyn11A	-	1030 ± 50	226 ± 47	936 ± 19	619 ± 7	937 ± 6	-	-	-
Man26A	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Bga35A	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-
Axh43A	+	41,5 ± 0,8	(+)	(+)	-	+	-	-	-
Arf43A	-	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-
Arf43C	0,82 ± 0,06	-	-	-	-	-	-	-	-
Abn43A	79,5 ± 0,9	-	-	-	-	-	-	-	-
Arf51B	2,01 ± 0,03	0,32 ± 0,01	-	-	-	(+)	-	-	-
Gal53A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Xyn105F	-	0,22 ± 0,01	-	+	+	+	-	-	-

Die Hydrolysen wurden in Triplicaten in 0,1 M MOPS-Reaktionspuffer mit 0,05 bis 24 µg/ml Enzym bei pH 6,0 (pH 6,5 für Abn43A) und den Temperaturoptima der Enzyme in 30–120 min durchgeführt. Die spezifische Enzymaktivität wurde mit dem DNSA-Assay bestimmt. Getestete Polysaccharide für die keine Aktivität festgestellt werden konnte: Arabinogalactan (Lärche), Curdlan, Gummi arabicum (Akazie), Inulin (Dahlienknollen), Laminarin, Mannan (Steinnuss), Pachyman, Polygalacturonsäure, Pullulan, Rhamnogalacturonan I, Sinistrin, Chitosan und Avicel. -: keine Aktivität, (+): nachweisbar, aber sehr geringe Aktivität, +: Aktivität nach Inkubation über Nacht nachgewiesen. AX: Arabinoxylan, pek. Galactan: pektisches Galactan, HP1: Hemicellulosepräparation HP1.

Tabelle 3.5 Fortsetzung: Enzymaktivität von 17 Glycosidhydrolasen auf Polysacchariden. (Teil 2)

Enzyme	Spezifische Aktivität (U/mg)									
	Galactan (Kartoffel)	Galactan (Lupine)	pek. Galactan (Kartoffel)	pek. Galactan (Lupine)	Mannan	Galactomannan (Guarbohne)	Glucomannan (Konjakwurzel)	HP1		
Bga2B	+	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-
Bxl3B	-	-	-	-	-	-	-	0,55 ± 0,01	-	-
Cel9Z	-	-	-	-	-	-	32,9 ± 1,0	(+)	-	-
Xyn10E	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-
Xyn10C	-	-	-	(+)	-	-	+	109 ± 2	-	-
Xyn10B	-	-	-	(+)	-	-	(+)	749 ± 36	-	-
Xyn10D	-	-	-	(+)	-	-	-	9,47 ± 0,22	-	-
Xyn11A	-	-	-	-	-	-	-	1149 ± 8	-	-
Man26A	-	-	-	-	39,9 ± 2,0	216 ± 5	144 ± 3	-	-	-
Bga35A	2,17 ± 0,03	1,24 ± 0,08	1,08 ± 0,01	1,14 ± 0,02	-	-	-	-	-	-
Axh43A	-	-	-	(+)	-	-	-	3,06 ± 0,14	-	-
Arf43A	-	-	-	(+)	-	-	-	(+)	-	-
Arf43C	-	1,99 ± 0,20	6,50 ± 0,13	4,46 ± 0,09	-	-	-	-	-	-
Abn43A	-	10,1 ± 0,3	21,3 ± 0,2	12,0 ± 2,1	-	-	-	-	-	-
Arf51B	-	-	(+)	-	-	-	-	0,28 ± 0,01	-	-
Gal53A	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Xyn105F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Die Hydrolysen wurden in Triplikaten in 0,1 M MOPS-Reaktionspuffer mit 0,05 bis 24 µg/ml Enzym bei pH 6,0 (pH 6,5 für Abn43A) und den Temperaturoptima der Enzyme in 30–120 min durchgeführt. Die spezifische Enzymaktivität wurde mit dem DNSA-Assay bestimmt. Getestete Polysaccharide für die keine Aktivität festgestellt werden konnte: Arabinogalactan (Lärche), Curdlan, Gummi arabicum (Akazie), Inulin (Dahlienknollen), Laminarin, Mannan (Steinnuss), Pachyman, Polygalacturonsäure, Pullulan, Rhamnogalacturonan I, Sinistrin, Chitosan und Avicel. -: keine Aktivität, (+): nachweisbar, aber sehr geringe Aktivität, +: Aktivität nach Inkubation über Nacht nachgewiesen. AX: Arabinoxylyan, pek. Galactan: pektisches Galactan, HP1: Hemicellulosepräparation HP1.

3.3.2 Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von pH-Wert und Temperatur

Die pH- und Temperaturoptima unter den in Tabelle 3.6 genannten Bedingungen wurden für 13 *C. stercorarium* Glycosidhydrolasen mit hydrolytischer Enzymaktivität für hemicellulose Polysaccharide bestimmt. Alle charakterisierten Enzyme bevorzugten einen leicht sauren pH und die höchste Aktivität wurde jeweils zwischen pH 5,0 und pH 6,5 gemessen. Während die pH-Optima nahezu identisch waren, unterschieden sich die Temperaturoptima signifikant und lagen zwischen 49 °C und 81 °C (Tabelle 3.6). Unter den in Tabelle 3.6 genannten Bedingungen (siehe auch Kapitel 3.3.4) lagen die Temperaturoptima bei optimalem pH von elf Glycosidhydrolasen zwischen 57 °C und 76 °C. Das höchste Temperaturoptimum von 81 °C zeigte Cel9Z, während das niedrigste Temperaturoptimum für Arf43C mit 49 °C bestimmt wurde. Alle vier Xylanasen waren oberhalb von 65 °C am aktivsten, wobei Xyn10B das höchste Temperaturoptimum (76 °C) zeigte. Die Temperaturspanne, in der die Aktivität über 60 % lag, variierte je nach Enzym (Abbildung 3.5). Die Aktivitäten von Bga2B und Arf51B lagen innerhalb des gesamten Temperaturbereiches mit einer Temperaturspanne von 30 °C über 60 % der maximalen Aktivität. Die pH-Toleranzen der Enzyme lagen in einem Bereich zwischen pH 4,0 und pH 7,5. Die breitesten pH-Toleranzen wurden für die Xylanasen Xyn10B (pH 4,0–7,0) und Xyn10C (pH 4,5–7,5) bestimmt (Abbildung 3.4).

Tabelle 3.6 Optimale Reaktionsbedingungen von dreizehn ausgewählten hemicellulolytischen Glycosidhydrolasen

Enzyme	pH _{opt}	pH-Toleranz	T _{opt} (°C)	Temperatur-Spanne (°C)	Substrate
Bga2B	6,0	5,0–6,5	56,8	40–70	Xyloglucan
Bxl3B	5,5	5,0–6,5	65,6	48–72	Glucuronoxylan
Cel9Z	5,5	4,0–6,5	80,6	66–87	β-Glucan (Gerste)
Xyn10C	6,0	4,5–7,5	70,6	56–77	Arabinoxylan (löslich)
Xyn10B	5,5	4,0–7,0	75,6	61–79	Arabinoxylan (löslich)
Xyn10D	6,0	5,0–7,0	65,6	58–66	Arabinoxylan (löslich)
Xyn11A	5,5	4,5–7,0	66,8	56–74	Arabinoxylan (löslich)
Man26A	5,5	5,0–6,0	61,8	48–66	Galactomannan
Bga35A	5,5	5,0–6,0	60,6	40–67	Galactan (Lupine)
Axh43A	6,0	5,5–6,5	60,6	49–64	Arabinoxylan (löslich)
Arf43C	6,0	5,5–7,0	49,4	43–64	pek. Galactan (Kartoffel)
Abn43A	6,5	6,0–7,0	65,6	51–72	Arabinan
Arf51B	5,0	4,5–5,5	61,8	45–75	Arabinan

Die Enzyme wurden mit 0,5 % (w/v) des angegebenen Polysaccharids in 0,1 M Citrat-Phosphat-Reaktionspuffer bei pH 4,0 bis pH 8,0 (bei 60 °C) und zwischen 40 °C und 90 °C (beim pH-Optimum der Enzyme) für 30 min, 60 min (Bga2B, Bga35A, und Arf512B) oder 120 min (Bxl3B) inkubiert. Die Enzymaktivität wurde mit dem DNSA-Assay in Triplikaten bestimmt. Die Grenzen der pH- und Temperaturtoleranz wurden auf 60 % Aktivität festgesetzt, wobei jeweils die Spanne zwischen den Messwerten angegeben ist, bei denen eine relative Aktivität $\geq 60\%$ gemessen wurde. pH_{opt}: pH-Optimum, T_{opt}: Temperaturoptimum.

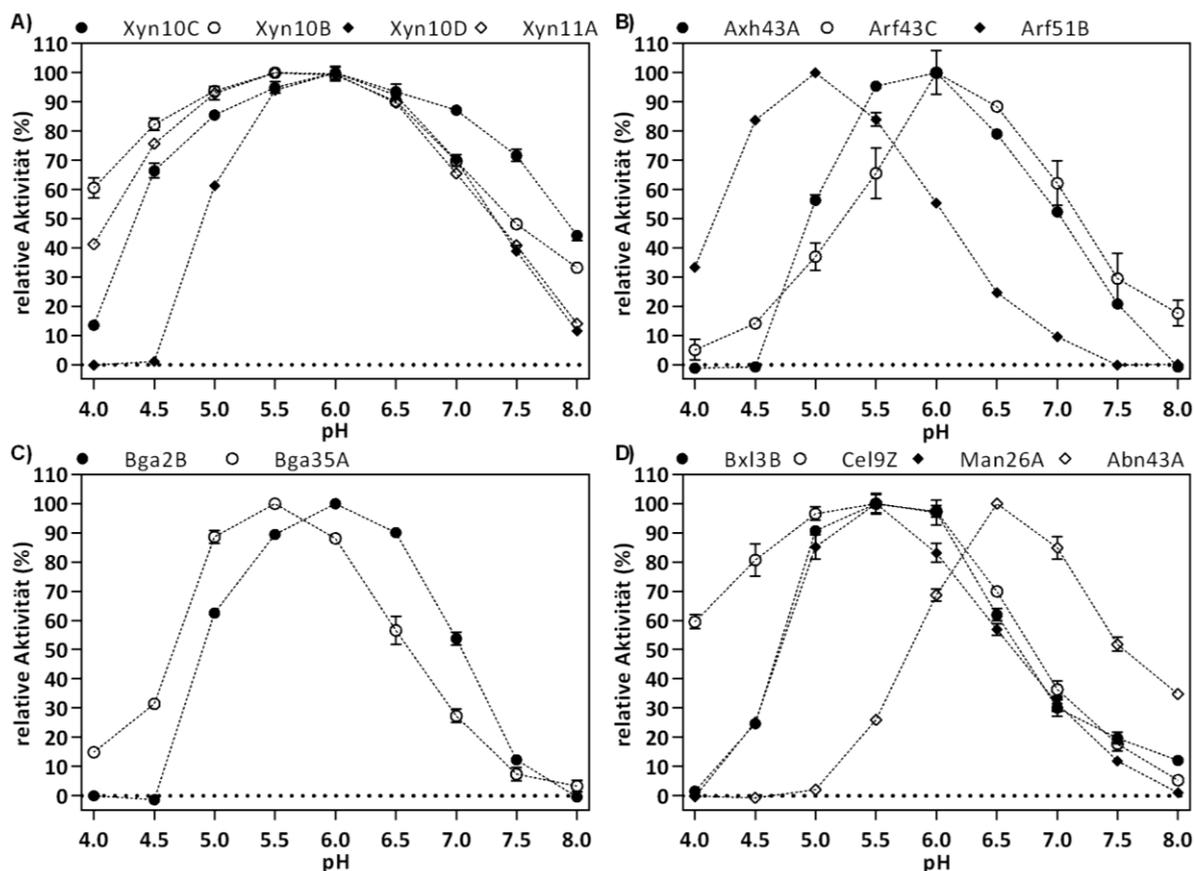


Abbildung 3.4 Relative Aktivität der charakterisierten Glycosidhydrolasen bei verschiedenen pH. pH-Aktivitätsprofile der (A) Xylanasen Xyn11A, Xyn10B, Xyn10C und Xyn10D, (B) Arabinose freisetzenden Enzyme Axh43A, Arf51B und Arf43C, (C) β-Galactosidasen Bga2B und Bga35A und (D) der Enzyme Bxl3B, Cel9Z, Man26A und Abn43A. Die Hydrolysen wurden mit 0,5 % (w/v) Polysaccharid in 0,1 M Citrat-Phosphat-Reaktionspuffer bei 60 °C in 30–120 min mit verschiedenen Enzymkonzentrationen durchgeführt: 0,05 µg/ml Xyn11A, 0,1 µg/ml Xyn10B, 0,5 µg/ml Xyn10C & Cel9Z, 0,6 µg/ml Man26A, 1,0 µg/ml Abn43A, 1,5 µg/ml Axh43A, 5,0 µg/ml Xyn10D & Arf43C, 8,0 µg/ml Bga2B, 10,0 µg/ml Arf51B & Bga35A und 24,0 µg/ml Bxl3B.

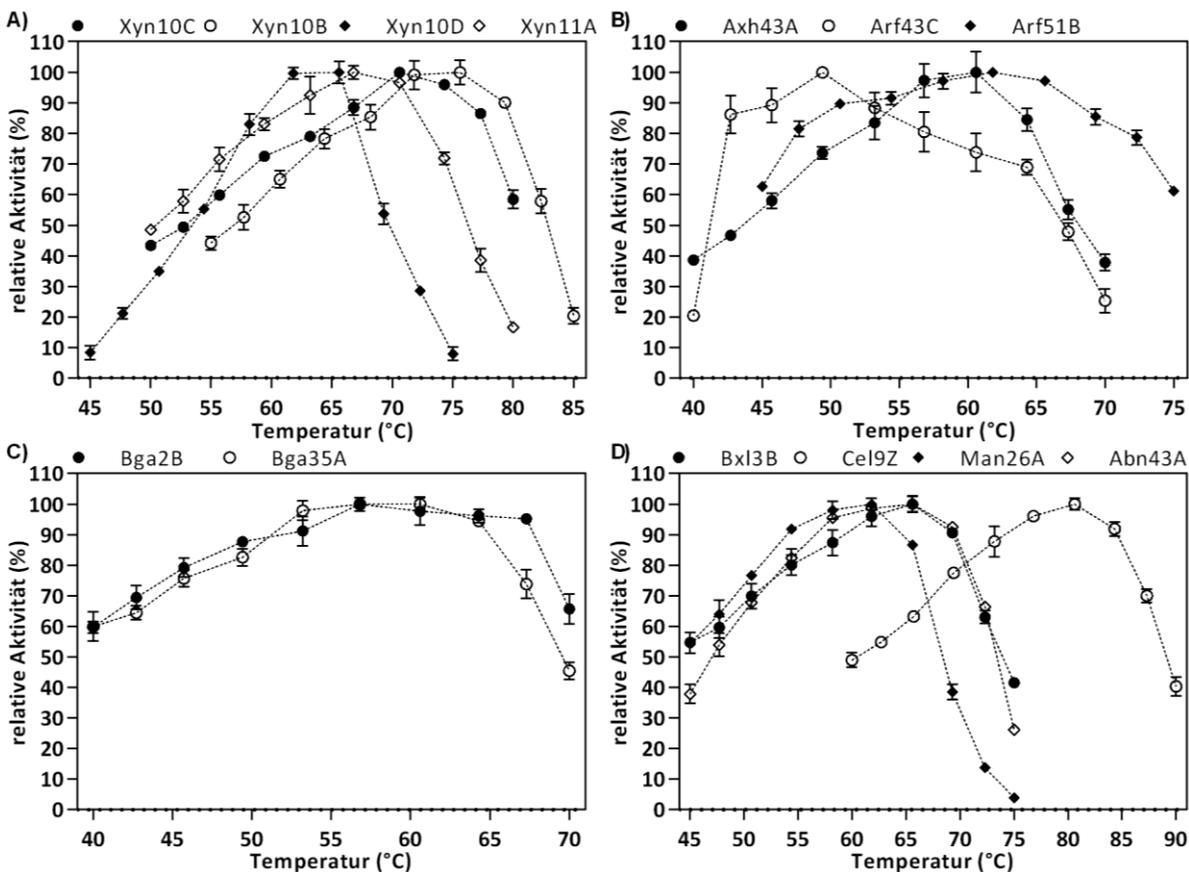


Abbildung 3.5 Relative Aktivität der charakterisierten Glycosidhydrolasen bei verschiedenen Temperaturen. Temperatur-Aktivitätsprofile der (A) Xylanasen Xyn11A, Xyn10B, Xyn10C und Xyn10D, (B) Arabinose freisetzenden Enzyme Axh43A, Arf51B und Arf43C, (C) β-Galactosidasen Bga2B und Bga35A und (D) der Enzyme Bxl3B, Cel9Z, Man26A und Abn43A. Die Hydrolysen wurden mit 0,5 % (w/v) Polysaccharid in 0,1 M Citrat-Phosphat-Reaktionspuffer beim pH-Optimum der Enzyme in 30–120 min mit verschiedenen Enzymkonzentrationen durchgeführt: 0,05 µg/ml Xyn11A, 0,1 µg/ml Xyn10B, 0,5 µg/ml Xyn10C & Cel9Z, 0,6 µg/ml Man26A, 1,0 µg/ml Abn43A, 1,5 µg/ml Axh43A, 5,0 µg/ml Xyn10D & Arf43C, 8,0 µg/ml Bga2B, 10,0 µg/ml Arf51B & Bga35A und 24,0 µg/ml Bxl3B.

3.3.3 Produktspezifität Xylan-hydrolysierender Glycosidhydrolasen

Die sekretierten und die rekombinanten *C. stercorarium* Enzyme zeigten die höchsten Aktivitäten für lösliches Arabinoxylan aus Weizen und weitere Xylane. Um die Produktspezifität Arabinoxylan-hydrolysierender Glycosidhydrolasen, den Xylanasen und Arabinose freisetzenden Enzymen, zu untersuchen, wurde Arabinoxylan mit Xyn11A, Xyn10B, Axh43A und Arf51B hydrolysiert und das Hydrolysat mit HPAEC-PAD analysiert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der DC (Abbildung 3.3) sind die Abbauprodukte von Arabinoxylan, hydrolysiert mit Xyn11A und Xyn10B, Xylooligosaccharide (XOS) und Arabinoxylooligosaccharide (AXOS) (Abbildung 3.6). Xyn11A setzte Xylose, Xylobiose und Xylotriose frei, während Xyn10B Xylose und Xylobiose als Endprodukte produzierte. Die Menge an freigesetzten XOS nahm für Xyn11A mit steigendem Polymerisierungsgrad ab, wohingegen Xyn10B Xylose und Xylobiose in vergleichbaren Mengen freisetzte. Neben der Freisetzung von XOS hydrolysierte Xyn10B Arabinoxylan in drei bekannte AXOS: A³X, XA²⁺³XX und

$A^{2+3}XX$. Dabei produzierte Xyn10B etwa doppelt so viel A^3X wie $XA^{2+3}XX$ und $A^{2+3}XX$. Xyn11A setzte XA^3XX , $XA^{2+3}XX$, $A^{2+3}XX$ und ein unbekanntes Oligosaccharid mit einer Retentionszeit von 43,1 min frei. Während Xyn10B mehr $A^{2+3}XX$ als $XA^{2+3}XX$ produzierte, produzierte Xyn11A mehr $XA^{2+3}XX$. Insgesamt setzte Xyn10B größere Mengen an XOS und AXOS frei, obwohl die spezifische Aktivität von Xyn11A für lösliches Arabinoxylan höher war (Tabelle 3.4).

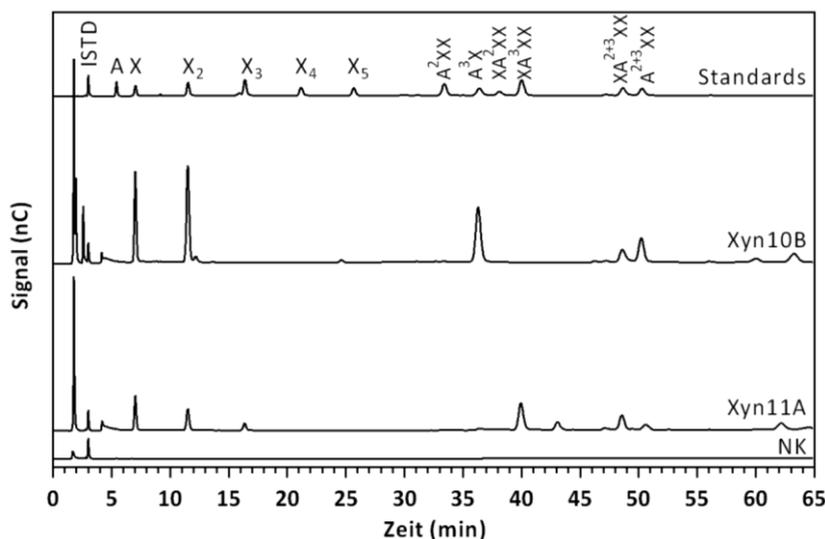


Abbildung 3.6 Hydrolyse von Arabinoxylan mit Xyn10B und Xyn11A analysiert mit HPAEC-PAD. Die Hydrolysen wurden mit 0,5 % (w/v) löslichem Arabinoxylan aus Weizen in ddH₂O über Nacht (20 h) bei 60 °C mit 5 µg/ml Xyn10B oder Xyn11A durchgeführt. Standards: A: Arabinose, X–X₅: Xylose bis Xylopentaose, A²XX, A³X, XA²XX, XA³XX, XA²⁺³XX, A²⁺³XX, ISTD: Interner Standard, NK: Negativkontrolle (1:10 Verdünnung).

Die α -Arabinofuranosidase Arf51B und die Arabinoxylan-Arabinofuranohydrolase Axh43A hydrolysierten die Arabinosesubstitutionen des Arabinoxylan und setzten Arabinose frei (Abbildung 3.7). Während Arf51B nur Arabinose produzierte, zeigte Axh43A darüber hinaus eine geringe Xylanase-Aktivität und setzte, bei der Verwendung höherer Enzymkonzentrationen, Xylose und XOS in geringen Mengen frei (Abbildung 6.14). Es wurden XOS mit einem Polymerisierungsgrad zwischen zwei und sechs nachgewiesen. Axh43A spaltete das Xylanrückgrat als Endo-Xylanase, war aber, im Gegensatz zu den Xylanasen Xyn11A und Xyn10B, nicht in der Lage, die entstandenen XOS weiter zu hydrolysieren. Die spezifische Enzymaktivität von Axh43A (41,5 U/mg) für Arabinoxylan war 130-mal höher als die spezifische Aktivität von Arf51B (0,32 U/mg) und Axh43A löste in etwa 3-mal mehr Arabinose aus Arabinoxylan als Arf51B (1,84 g vs. 0,61 g). Nach der Hydrolyse von Arabinoxylan mit Axh43A, lagen 94 % der in Arabinoxylan gebundenen Arabinose als Monosaccharid im Hydrolysat vor. Somit wurde das lösliche Arabinoxylan aus Weizen nahezu vollständig von Axh43A dearabinosyliert und Axh43A hydrolysierte die α -(1,2) und α -(1,3)-glycosidischen Bindungen von einfach und doppelt mit L-Arabinose substituierten Xyloseeinheiten.

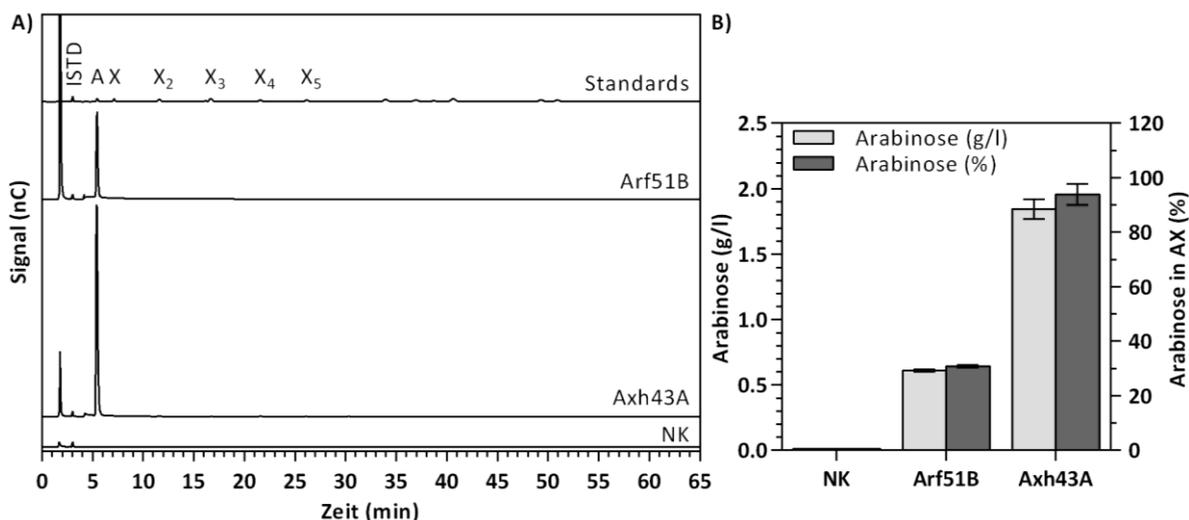


Abbildung 3.7 Hydrolyse von Arabinoxylan mit Arf51B und Axf43A analysiert mit (A) HPAEC-PAD und (B) Quantifizierung der freigesetzten Arabinose mit dem Arabinose Assay Kit (Megazyme). Die Hydrolysen wurden mit (A) 0,5 % oder (B) 1,0 % (w/v) löslichem Arabinoxylan aus Weizen in ddH₂O über Nacht (24 h) bei 60 °C mit 15 µg/ml Arf51B oder 1,5 µg/ml Axf43A durchgeführt. Standards: A: Arabinose, X-X₅: Xylose bis Xylopentaose, ISTD: Interner Standard, NK: Negativkontrolle (1:5 Verdünnung).

3.3.4 Thermische Inaktivierung Xylan-hydrolysierender Glycosidhydrolasen

Die Hydrolyseleistung einer Glycosidhydrolase wird bei konstanten physikalischen Bedingungen und gleichbleibender Substrat- sowie Enzymkonzentration durch die Enzymaktivität und die Dauer der Hydrolyse (Reaktionszeit) beeinflusst. In Kapitel 3.3.2 wurde mit dem „Temperaturoptimum“ die Temperatur bestimmt, bei der die Glycosidhydrolasen unter den verwendeten Bedingungen die maximale Enzymaktivität zeigten. Für eine effektive Hydrolyse ist neben der maximalen Aktivität aber auch die temperaturabhängige Enzymstabilität über die Zeit entscheidend. Ist die Glycosidhydrolase bei der verwendeten Temperatur nicht stabil, sinkt die Enzymaktivität mit zunehmender Reaktionszeit (thermische Inaktivierung) und die zeitlich gemittelte Aktivität liegt deutlich unter der gemessenen Enzymaktivität. Um eine optimale Reaktionsdauer für die Hydrolyse von Arabinoxylan und Hemicellulose zu finden, wurde der Effekt einer thermischen Inaktivierung bei 60 °C für die Xylanasen Xyn10B und Xyn11A, die Arabinoxylan-Arabinofuranohydrolase Axf43A und die β-Xylosidase Bxl3B bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Glycosidhydrolasen 48 h bei 60 °C inkubiert und die Aktivität der inkubierten Enzyme wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Während die Enzymaktivität von Xyn10B, Xyn11A und Axf43A mit löslichem Arabinoxylan bestimmt wurde, wurde die Aktivität von Bxl3B durch die Hydrolyse von XOS bestimmt.

Die Endo-Xylanasen und Axf43B erwiesen sich als sehr temperaturstabil und hatten nach 48 h bei 60 °C weniger als 50 % ihrer Aktivität verloren, wohingegen Bxl3B schon nach 12 h nur noch 7 %

seiner anfänglichen Aktivität besaß und nach 24 h keine Aktivität mehr zeigte (Abbildung 3.8). Der Aktivitätsverlust von Bxl3B zeigte einen exponentiellen Verlauf, wodurch das Enzym nach 2 h schon 43 % seiner Aktivität eingebüßt hatte. Die Xylanase Xyn10B erwies sich als das stabilste Enzym bei 60 °C mit 90 % Enzymaktivität nach 48 h Inkubation. Die Aktivitäten von Xyn11A und Axh43A betrugen nach 48 h nur noch 54 % bzw. 56 %. Nach 12 h lagen die Enzymaktivitäten beider Xylanasen noch über 96 %, anschließend nahm die Aktivität von Xyn11A aber deutlich schneller ab. Axh43A zeigte einen kontinuierlichen Aktivitätsverlust mit 81 % Enzymaktivität nach 12 h.

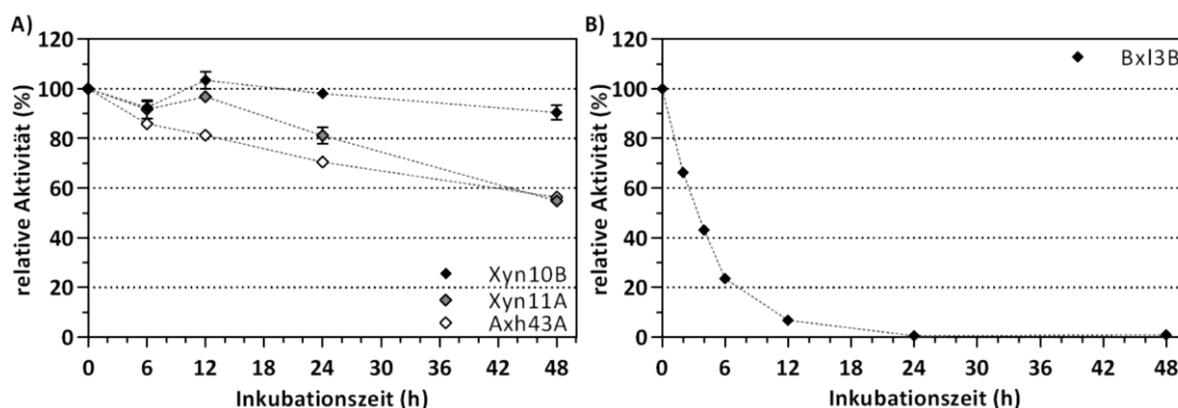


Abbildung 3.8 Thermische Inaktivierung der Glycosidhydrolasen (A) Xyn10B, Xyn11A, Axh43A und (B) Bxl3B für 48 h bei 60 °C. Die Enzyme wurden bis zu 48 h in (A) ddH₂O oder (B) 10 mM MOPS-Reaktionspuffer bei 60 °C inkubiert. Nach 0, 6, 12, 24 und 48 h wurde Enzym entnommen. Die Enzyme wurden mit (A) 0,5 % (w/v) löslichem Arabinoxylan aus Weizen oder (B) 1,0 % (w/v) XOS95P Xylooligosacchariden in 10 mM MOPS-Reaktionspuffer 30 min bei 60 °C inkubiert und die verbliebene Enzymaktivität wurde mit dem (A) DNSA-Assay oder (B) Xylose Assay Kit (Megazyme) bestimmt. Eingesetzte Enzymkonzentrationen: Xyn10B: 0,1 µg/ml, Xyn11A: 0,05 µg/ml, Axh43A: 1,5 µg/ml, Bxl3B: 5,0 µg/ml.

3.3.5 Produktinhibition Xylan-hydrolysierender Glycosidhydrolasen

Neben der Reduzierung der Aktivität durch thermische Inaktivierung (Kapitel 3.3.4) ist während der vollständigen Hydrolyse von Arabinoxylan auch eine Inhibition der Enzymaktivität einzelner Glycosidhydrolasen durch die Hydrolyseprodukte möglich. Bei einer vollständigen Hydrolyse von Arabinoxylan sind die Hauptprodukte D-Xylose und L-Arabinose. Daher wurde die Produktinhibition der Exo-Glycosidhydrolasen Arf51B, Axh43A und Bxl3B durch D-Xylose und L-Arabinose untersucht. Die Aktivität aller drei Enzyme wurde durch Arabinose inhibiert, während Xylose nur die Aktivität von Bxl3B deutlich inhibierte (Abbildung 3.9). Die Enzymaktivität von Axh43A wurde durch Arabinose exponentiell inhibiert, bei 1 g/l (6,7 mM) Arabinose hatte das Enzym schon 20 % der Aktivität verloren und bei 50 g/l (333,0 mM) Arabinose betrug die Aktivität nur noch 1 %. Bxl3B und Arf51B wurden hingegen deutlich geringer durch Arabinose inhibiert und besaßen bei 50 g/l (Bxl3B) bzw. 80 g/l (532,9 mM) Arabinose noch über 50 % ihrer Aktivität. Die Enzymaktivität von

Bxl3B wurde durch Xylose exponentiell inhibiert, mit 76 % Aktivität bei 1 g/l (6,7 mM) und nur noch 7 % bei 50 g/l (333,0 mM) Xylose. Arf51B wurde auch durch Xylose am wenigsten inhibiert, mit 90 % Aktivität bei 50 g/l Xylose. Axh43A hatte bei 50 g/l Xylose noch 81 % Aktivität. Insgesamt zeigte sich, dass die Glycosidhydrolasen durch die Produkte ihrer eigenen Hauptaktivität deutlich stärker inhibiert werden.

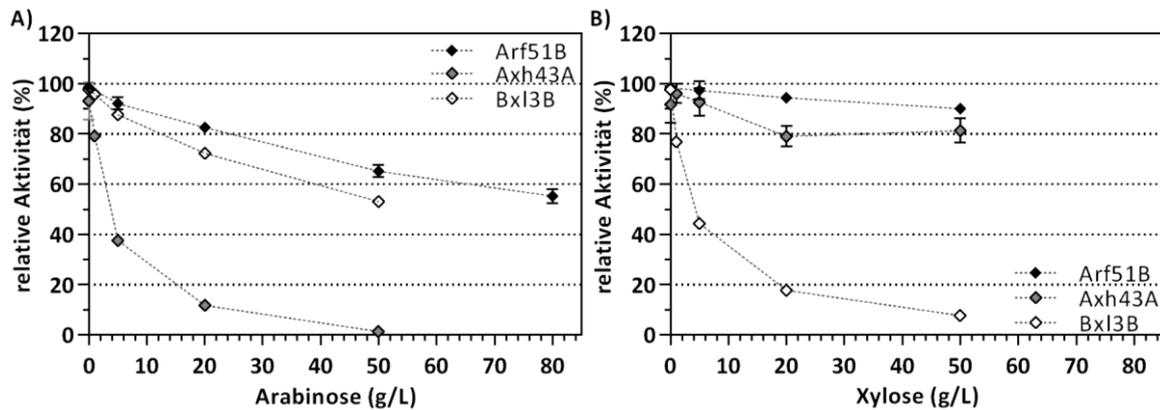


Abbildung 3.9 Produktinhibition der Glycosidhydrolasen Arf51B, Axh43A und Bxl3B durch (A) Arabinose und (B) Xylose. Die Enzyme wurden mit 4 mM *p*NP- α -L-Arabinofuranosid (Arf51B, Axh43A) oder *p*NP- β -D-Xylopyranosid (Bxl3B) und (A) Arabinose oder (B) Xylose in 10 mM MOPS-Reaktionspuffer 10 min bei 60 °C inkubiert. Die Enzymaktivität wurde durch die Quantifizierung von freigesetztem *p*NP bestimmt. Eingesetzte Enzymkonzentrationen: Arf51B: 0,2 μ g/ml, Axh43A: 6,0 μ g/ml, Bxl3B: 4,0 μ g/ml.

Die Produkte der Endo-Xylanasen Xyn10B und Xyn11A bei der Hydrolyse von Arabinoxylan sind Xylose, Xylobiose, Xylotriose und einige Arabinoxyloligosaccharide. Da das Ziel dieser Arbeit aber eine vollständige Hydrolyse von Arabinoxylan mit einer Kombination von Enzymen ist, wurde nur die Produktinhibition der Xylanasen durch Xylose bestimmt. XOS und AXOS werden von der β -Xylosidase Bxl3B und einer α -Arabinofuranosidase zu Xylose und Arabinose hydrolysiert und können sich so nicht im Hydrolysat akkumulieren. Weder Xyn10B noch Xyn11A wurden durch 50 g/l Xylose inhibiert (Abbildung 3.10).

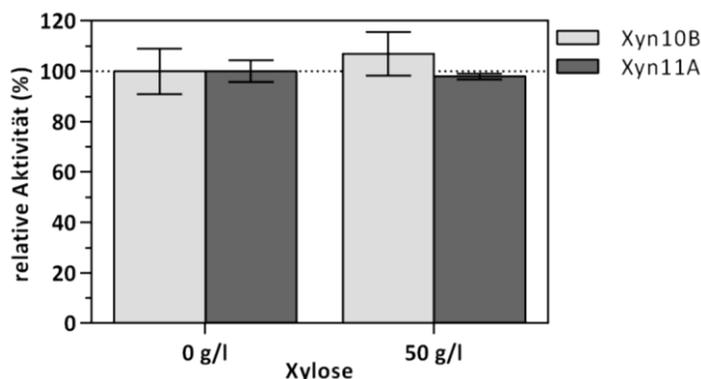


Abbildung 3.10 Produktinhibition der Xylanasen Xyn10B und Xyn11A durch 50 g/l Xylose. Die Enzymaktivität wurde mit dem Xylanase Assay Kit (Megazyme) bestimmt. 3 µg/ml Xylanase wurden in 10 mM MOPS-Reaktionspuffer mit 50 g/l Xylose 10 min bei 60 °C mit 1 % Azo-WAX inkubiert.

3.4 Charakterisierung der *C. stercoreum* Kohlenhydratesterasen

In den Aktivitätsassays wurde für zwei der acht ausgewählten *C. stercoreum* Kohlenhydratesterasen Acetylerase-Aktivität nachgewiesen. Eines der Enzyme hydrolysierte zusätzlich Ferulylester. Beide Enzyme wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal charakterisiert. Eine Aktivität für Carbonsäureester in Polysacchariden konnte nicht nachgewiesen werden.

Die enzymatische Aktivität der 8 ausgewählten Kohlenhydratesterasen wurde mit 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-*D*-xylopyranose (XTA), β -*D*-Glucose-pentaacetat (GPA) und feruloylierten *p*NP- α -*L*-Arabinofuranosiden bestimmt (Tabelle 2.18). Darüber hinaus wurden die Kohlenhydratesterasen mit unlöslichem Arabinoxylan aus Weizen und der Hemicellulosepräparation HP3 inkubiert, um eine Hydrolyse von Acetylestern oder Carbonsäureestern mit phenolischen Säuren nachzuweisen. Die Acetylerase-Aktivität wurde, soweit möglich, im linearen Bereich der Enzymkinetik quantitativ bestimmt, während die Aktivitäten für Ferulylester und Carbonsäureester in Polysacchariden qualitativ nachgewiesen wurden.

Die Kohlenhydratesterasen Axe4A und Axe7B hydrolysierten Acetyler von 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-*D*-xylopyranose (XTA) und β -*D*-Glucose-pentaacetat (GPA) und setzten Acetat frei. Beide Enzyme zeigten eine geringfügig höhere Aktivität mit XTA (Abbildung 3.11). Für Axe4A wurden mit 83,2 U/mg (XTA) und 80,4 U/mg (GPA) um etwa 20 % höhere Aktivitäten bestimmt als für Axe7B (66,0 U/mg & 61,7 U/mg). Während die spezifische Aktivität von Axe7B bei Substratsättigung und somit im linearen Bereich der Enzymkinetik gemessen wurde, wurde die Aktivität von Axe4A unter Substratlimitierung bestimmt (Abbildung 6.15). Aufgrund der geringen Löslichkeit der Substrate und der nicht ausreichenden Sensitivität des Acetat-Assays war es nicht möglich, die Aktivität von

Axe4A bei Substratsättigung zu bestimmen. Die tatsächliche Aktivität von Axe4A könnte daher etwas höher liegen.

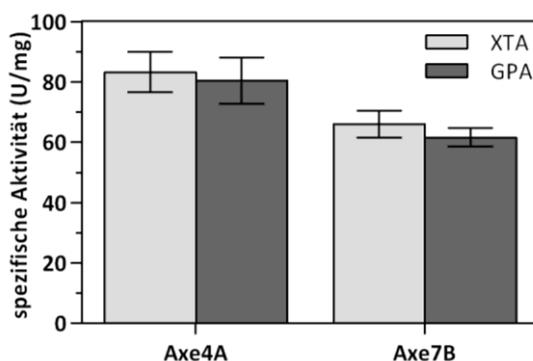


Abbildung 3.11 Enzymaktivität der Kohlenhydratesterasen Axe4A und Axe7B auf 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl- β -xylopyranose (XTA) und β -*D*-Glucose-pentaacetat (GPA). Die Hydrolysen wurden in Triplikaten mit 0,2 μ g/ml Enzym und 2,5 mM XTA oder GPA in 10 mM MOPS-Reaktionspuffer bei pH 6,5 und 60 °C in 30 min durchgeführt. Die Enzymaktivität wurde durch die Quantifizierung von freigesetztem Acetat mit dem Acetic Acid Assay Kit (Megazyme) bestimmt. XTA: 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl- β -xylopyranose, GPA: β -*D*-Glucose-pentaacetat.

Eine Aktivität der Kohlenhydratesterasen für die Hemicellulosepräparation HP3 konnte nicht nachgewiesen werden. Bei der Hydrolyse des unlöslichen Arabinoxylans aus Weizen mit den Esterasen wurden sehr geringe Mengen Acetat freigesetzt (Abbildung 6.16). Abgesehen von der freigesetzten Menge Acetat für Axe4A (16 mg/l) lagen die Acetatkonzentrationen unterhalb der Sensitivität des Acetat-Assays und auch für Axe4A wurde keine signifikante Aktivität gemessen.

Axe7B hydrolysierte als einzige Kohlenhydratesterase die Esterbindung zwischen Ferulasäure und *L*-Arabinose in *p*NP-2-*O*-*trans*-feruloyl- α -*L*-Arabinofuranosid und *p*NP-5-*O*-*trans*-feruloyl- α -*L*-Arabinofuranosid (Abbildung 6.17). Die Esterase zeigte für das 2-*O*-Isomer eine 4,5-fach höhere Aktivität als für das 5-*O*-Isomer des *p*NP-*O*-*trans*-feruloyl- α -*L*-Arabinofuranosids (Abbildung 3.12). In Kombination mit der Arabinofuranosidase Arf51B hydrolysierte Axe7B die feruloylierten *p*NP- α -*L*-Arabinofuranoside zu *p*NP, *L*-Arabinose und Ferulasäure. Arf51B alleine zeigte keine Aktivität und konnte die glycosidische Bindung zwischen *p*NP und der 2-*O*- oder 5-*O*-feruloylierten *L*-Arabinose nicht hydrolysieren (Abbildung 3.12). Der Ferulylester wurde zunächst von Axe7B hydrolysiert und erst anschließend wurde die glycosidische Bindung von Arf51B hydrolysiert. Da die zweite Hydrolyse aufgrund der hohen Aktivität von Arf51B für *p*NP- α -*L*-Arabinofuranosid (Tabelle 3.3) sehr schnell abläuft, konnte die Menge der hydrolysierten feruloylierten *p*NP- α -*L*-Arabinofuranoside anhand der freigesetzten Menge Arabinose bestimmt werden. Es wurde gezeigt, dass Axe7B das 2-*O*-Isomer gegenüber dem 5-*O*-Isomer bevorzugt.

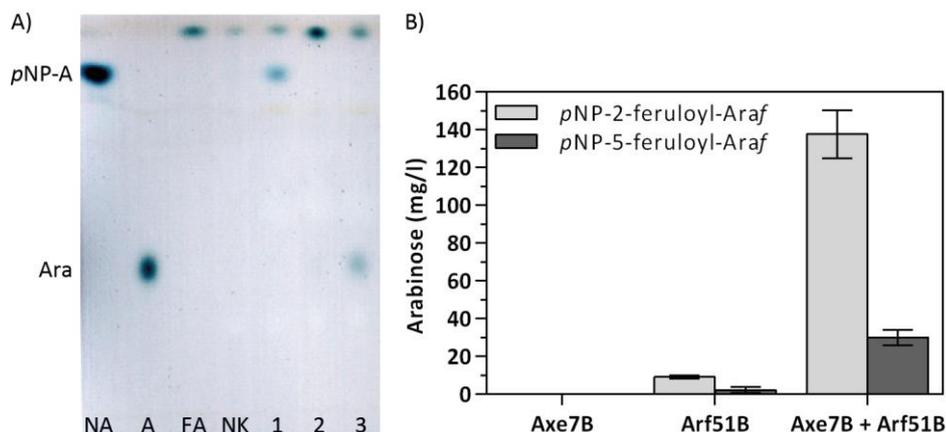


Abbildung 3.12 Hydrolyse von feruloylierten *pNP-α-L-Arabinofuranosiden* mit Axe7B und Arf51B (A) DC der Hydrolyse von *pNP-2-O-trans-feruloyl-α-L-Arabinofuranosid* mit Axe7B (1), Arf51B (2) und der Kombination beider Enzyme (3). Es wurden 3 µl aufgetragen. NK: Negativkontrolle. Standards: Ara/A: Arabinose, *pNP-A*, NA: *pNP-α-L-Arabinofuranosid*, FA: *pNP-2-O-trans-feruloyl-α-L-Arabinofuranosid*. (B) Quantifizierung der bei der Hydrolyse von *pNP-α-L-Arabinofuranosiden* freigesetzten Arabinose mittels HPAEC-PAD. Die Hydrolysen wurden jeweils in Duplikaten mit 100 µg/ml Axe7B und/oder 20 µg/ml Arf51B und 2,24 mM Substrat in 0,1 M MOPS-Reaktionspuffer bei 60 °C über Nacht durchgeführt.

3.5 Hydrolyse von ausgewählten Polysacchariden mit Enzymkombinationen

Arabinan und lösliches Arabinoxylan aus Weizen wurden mit Enzymkombinationen annähernd vollständig zu Monosacchariden hydrolysiert, während 4-*O*-Methyl-Glucuronoxylan und Xylan aus Birken aufgrund fehlender Enzymaktivitäten nur zu Oligosacchariden hydrolysiert wurden. Bei der Hydrolyse aller vier Polysaccharide wurde ein synergistischer Effekt der Enzyme nachgewiesen. Für das unlösliche Arabinoxylan aus Weizen zeigte die Enzymkombination aus Xylanase, β-Xylosidase und Arabinoxylan-Arabinofuranohydrolase nur eine sehr geringe Aktivität; durch die Zugabe von Kohlenhydraterasen wurde jedoch eine leichte Aktivitätssteigerung beobachtet. Die optimalen Reaktionsbedingungen für die Hydrolyse von löslichem Arabinoxylan mit der Enzymkombination aus Xyn10B, Axh43A und Bxl3B lagen bei pH 5,5 und 63 °C.

Arabinan, 4-*O*-Methyl-Glucuronoxylan, Xylan aus Birken und Arabinoxylan aus Weizen wurden ausgewählt, um die Effekte einer Hydrolyse mit Enzymkombinationen aus zwei bis vier Enzymen zu untersuchen. Die Polysaccharide wurden mit den Einzelenzymen und den Enzymkombinationen hydrolysiert und die Enzymaktivität sowie die hydrolytischen Produkte wurden mit dem DNSA-Assay, HPAEC-PAD, Xylose- und Arabinose-Assay bestimmt und quantifiziert. War die gemessene Aktivität der Enzymkombination höher als die Summe der Aktivitäten der Einzelenzyme, wirkten die Aktivitäten der eingesetzten Enzyme synergistisch zusammen um das Polysaccharid zu hydrolysieren. Für die Hydrolysen wurden die Enzymkonzentrationen eingesetzt, die bei der Charakterisierung der Enzyme verwendet wurden.

3.5.1 Hydrolyse von Arabinan

Arabinan wurde mit der Arabinanase Abn43A, den α -Arabinofuranosidasen Arf51B und Arf43C, der Arabinoxylan-Arabinofuranohydrolase Axx43A und Kombinationen aus Abn43A mit Arf51B, Arf43C oder Axx43A hydrolysiert. Wie schon bei der Charakterisierung der Enzyme gezeigt wurde (Kapitel 3.3.1), hydrolysierte Abn43A Arabinan zu Arabinoooligosacchariden, während Arf51B und Axx43A Arabinose aus dem Polysaccharid freisetzen (Abbildung 3.13). In Kombination mit Abn43A setzte auch Arf43C geringe Mengen Arabinose frei. Während die Kombination von Abn43A mit Axx43A Arabinan in Arabinoooligosaccharide und Arabinose hydrolysierte, wobei im Vergleich zur Hydrolyse mit Axx43A keine Zunahme der freigesetzten Arabinosemenge zu beobachten war, hydrolysierte die Kombination von Abn43A mit Arf51B Arabinan fast ausschließlich zu Arabinose. Die von Abn43A freigesetzten Arabinoooligosaccharide wurden von Arf51B zu Arabinose hydrolysiert. Axx43A war hingegen nicht in der Lage, die Arabinoooligosaccharide zu hydrolysieren.

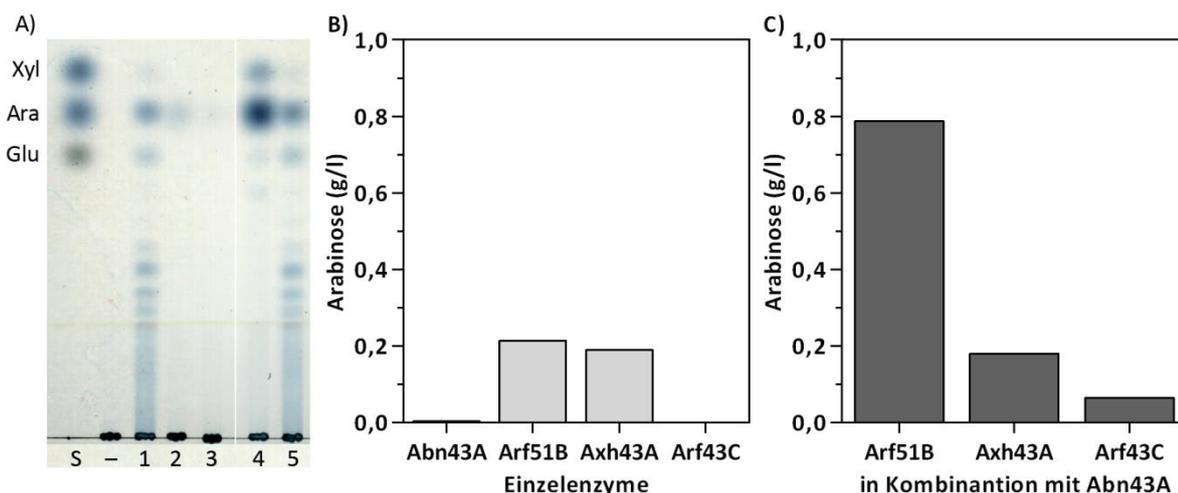


Abbildung 3.13 Hydrolyse von Arabinan mit Abn43A, Arf51B, Axx43A, Arf43C und Kombinationen aus der Arabinanase Abn43A mit Arf51B, Axx43A oder Arf43C. (A) DC der hydrolytischen Produkte. Es wurde 1 μ l aufgetragen. -: Negativkontrolle, 1: Abn43A, 2: Arf51B, 3: Axx43A, 4: Abn43A & Arf51B, Abn43A & Axx43A. S: Standard mit Xylose, Arabinose und Glucose. (B) Quantifizierung der freigesetzten Arabinose nach Hydrolyse mit Einzelenzymen und (C) in Kombination mit Abn43A. Die freigesetzte Arabinose wurde mit dem Arabinose Assay Kit (Megazyme) quantifiziert. Die Hydrolysen wurden jeweils mit 5 μ g/ml pro Enzym und 0,5 % (w/v) Arabinan in ddH₂O bei 60 °C in 5 h durchgeführt.

Abn43A und Arf51B wirkten bei der Hydrolyse synergistisch zusammen und hydrolysierten 77 % des Arabinan zu Arabinose (Abbildung 3.14). Bei der Hydrolyse mit der Enzymkombination wurde ein synergistischer Effekt von plus 137 % im Vergleich zur Summe der Aktivitäten der Einzelenzyme gemessen. Auch bei einer Reduzierung der Enzymkonzentration von Arf51B auf die Hälfte bzw. ein Viertel wurde, aufgrund der Hydrolyse der Oligosaccharide, noch eine deutlich höhere Aktivität

der Enzymkombination beobachtet. Eine Kinetik der Hydrolyse von Arabinan zeigte, dass die Arabinose über 4 h nahezu linear freigesetzt wurde.

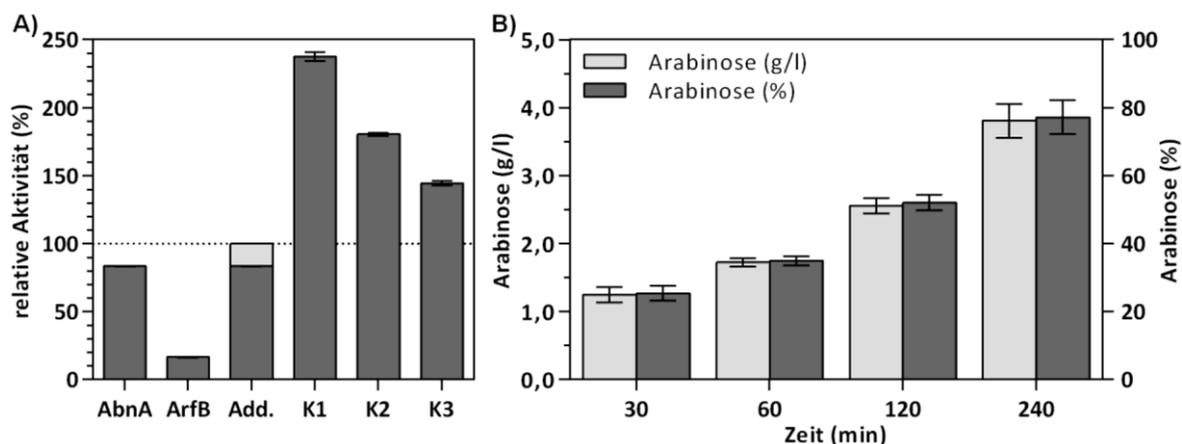


Abbildung 3.14 Synergistischer Effekt bei der Hydrolyse von Arabinan mit Abn43A und Arf51B. (A) Hydrolyse von Arabinan mit Abn43A, Arf51B und Kombinationen mit beiden Enzymen. Die Enzymaktivität (U) wurde mit dem DNSA-Assay bestimmt. AbnA: Abn43A, ArfB: Arf51B, Add.: Addition der Aktivität von Abn43A und Arf51B, K: Hydrolyse mit Enzymkombinationen mit 1,0 µg/ml Abn43A und (K1) 20 µg/ml, (K2) 10 µg/ml oder (K3) 5 µg/ml Arf51B. (B) Kinetik der Hydrolyse von Arabinan mit Abn43A und Arf51B. Die freigesetzte Arabinose wurde mit dem Arabinose Assay Kit (Megazyme) quantifiziert. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Hydrolysen jeweils mit 1 µg/ml Abn43A und 20 µg/ml Arf51B und 0,5 % (w/v) Arabinan in 10 mM MOPS-Reaktionspuffer bei 60 °C und pH 6,0 in 20 min durchgeführt.

3.5.2 Hydrolyse von 4-O-Methyl-Glucuronoxylan und Xylan aus Birken

4-O-Methyl-Glucuronoxylan und Xylan aus Birken wurden mit der Xylanase Xyn11A und der β -Xylosidase Bxl3B hydrolysiert. Die Kombination der Enzyme führte zu einem synergistischen Effekt bei der Hydrolyse beider Polysaccharide (Abbildung 3.15). Während bei der Hydrolyse von 4-O-Methyl-Glucuronoxylan die Aktivität der Enzymkombination nur 9 % höher war als die Summe der Aktivitäten der Einzelenzyme, wurde bei der Hydrolyse des mit weniger substituierten Xylan aus Birken ein deutlich höherer synergistischer Effekt von plus 72 % gemessen. Xyn11A hydrolysierte beide Xylane zu Xylobiose, Xylotriase, Xyloetraose, geringen Mengen Xylopentaose und einer Reihe unbekannter Oligosaccharide mit Retentionszeiten zwischen 47 min und 60 min. Die Xylanase zeigte eine höhere Aktivität für Glucuronoxylan und produzierte sowohl mehr XOS als auch mehr unbekannte Oligosaccharide mit diesem Xylan.

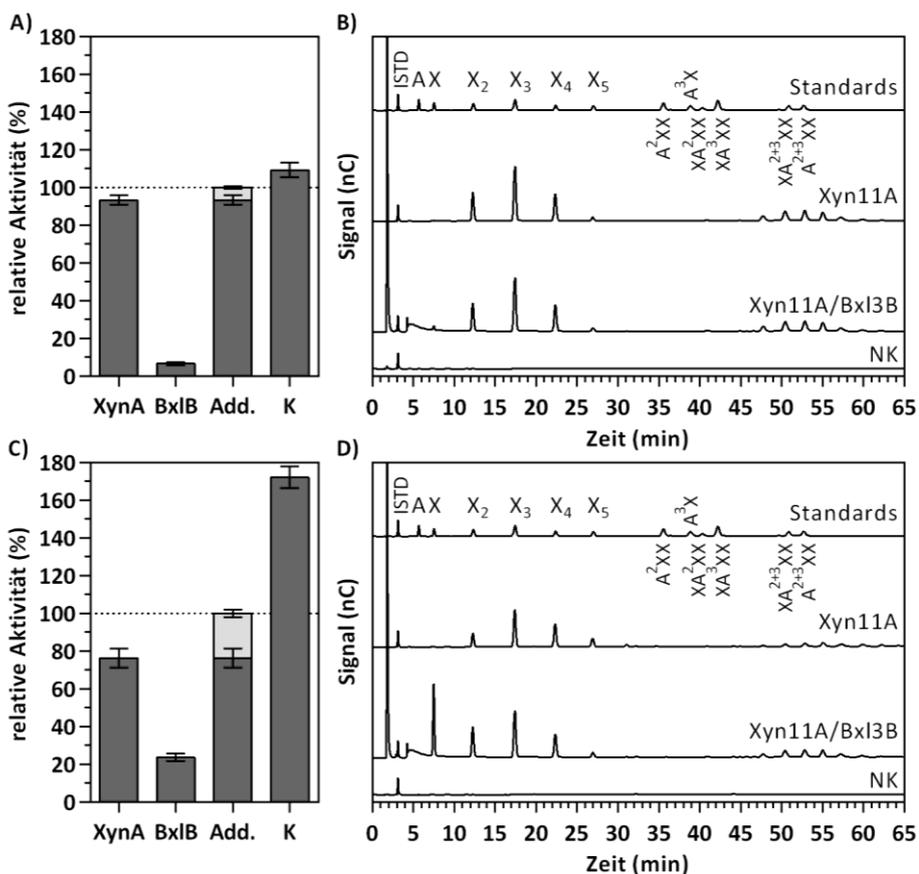


Abbildung 3.15 Synergistischer Effekt bei der Hydrolyse von 4-O-Methyl-Glucuronoxylan und Xylan aus Birken mit Xyn11A und Bxl3B. (A) Hydrolyse von 4-O-Methyl-Glucuronoxylan oder (C) Xylan aus Birken mit Xyn11A, Bxl3B und Kombination beider Enzyme. Die Enzymaktivität (U) wurde mit dem DNSA-Assay bestimmt. XynA: Xyn11A, Bxl3B: Bxl3B, Add.: Addition der Aktivität von Xyn11A und Bxl3B, K: Hydrolyse mit Kombination aus Xyn11A und Bxl3B. (B) Hydrolytische Produkte der Hydrolyse von 4-O-Methyl-Glucuronoxylan oder (D) Xylan aus Birken analysiert mit HPAEC-PAD. Standards: A: Arabinose, X-X₅: Xylose bis Xylopentaose, A²XX, A³X, XA²XX, XA³XX, XA²⁺³XX, A²⁺³XX, ISTD: Interner Standard, NK: Negativkontrolle (1:10 Verdünnung). Die Hydrolysen wurden jeweils mit 0,05 µg/ml Xyn11A und 24 µg/ml Bxl3B und 0,5 % (w/v) Polysaccharid in 10 mM MOPS-Reaktionspuffer bei 60 °C und (A,C) pH 6,0 in 20 min oder bei (B,D) pH 6,5 in 240 min durchgeführt.

In Kombination mit Xyn11A setzte Bxl3B aus Glucuronoxylan geringe Mengen Xylose frei, an der Quantität der Oligosaccharide änderte sich jedoch nichts. Bei der Hydrolyse von Xylan aus Birken erhöhte sich durch die Enzymkombination hingegen die Menge der freigesetzten Oligosaccharide und es wurde zusätzlich Xylose freigesetzt. Beide Xylane besitzen Substitutionen die durch die Kombination von Xylanase und β-Xylosidase nicht hydrolysiert wurden. Der Vergleich zeigte, dass 4-O-Methyl-Glucuronoxylan mehr Substitutionen enthielt und die Zugabe von Bxl3B daher einen geringeren Effekt hatte.

3.5.3 Hydrolyse von Arabinoxylan aus Weizen

Lösliches Arabinoxylan aus Weizen wurde mit den Xylanasen Xyn10B und Xyn11A, der Arabinoxylan-Arabinofuranohydrolase Axh43A, der β -Xylosidase Bxl3B und Kombinationen aus zwei oder drei dieser Enzyme hydrolysiert. Zur Hydrolyse von unlöslichem Arabinoxylan wurde der Enzymkombination zusätzlich eine Acetylerase, Axe4A oder Axe7B, hinzugefügt. Wie in den Experimenten zur Produktspezifität (Kapitel 3.3.3) schon gezeigt wurde, setzten Axh43A und auch Arf51B bei der Hydrolyse von löslichem Arabinoxylan ausschließlich Arabinose frei. Im Hydrolysat wurde darüber hinaus aber die Bildung eines weißen Niederschlags beobachtet (Abbildung 6.19). Lösliches Arabinoxylan aus Weizen ist ein lineares β -(1,4)-verknüpftes Xylose-Polysaccharid mit Arabinosylierungen an einzelnen Xyloseeinheiten. Werden genügend der Arabinosylierungen abgespalten, bilden die Xylosepolymere untereinander Wasserstoffbrückenbindungen und fallen als unlösliches, aggregiertes Xylan aus, vergleichbar mit kristalliner Cellulose (Gomes *et al.*, 2015). Nach der Hydrolyse von 0,5 % (w/v) löslichem Arabinoxylan mit Axh43A in einem Volumen von 1 ml wurden 3,4 mg unlösliches Xylan durch Zentrifugation des Niederschlags isoliert, dies entsprach 74 % des eingesetzten Arabinoxylans (Abbildung 3.16). Bei der Hydrolyse mit Arf51B wurden nur 1,5 mg unlösliches Xylan (33 %) isoliert. Zum Vergleich der hydrolytischen Produkte wurden das ausgefällte, unlösliche Xylan und lösliches Arabinoxylan mit den Xylanasen Xyn10B und Xyn11A hydrolysiert. Arabinoxylan wurde zu Xylose, Xylobiose, Xylotriose und AXOS hydrolysiert. Wie erwartet, wurde das unlösliche Xylan hingegen nur zu Xylose, Xylobiose und Xylotriose hydrolysiert, da es keine Arabinosylierungen mehr enthält (Abbildung 3.16). Xyn10B setzte bei der Hydrolyse des unlöslichen Xylans nur geringe Mengen Xylose und Xylobiose frei und für das unlösliche Xylan wurde, verglichen mit der Aktivität für Arabinoxylan, eine deutlich geringere Aktivität gemessen. Xyn11A auf der anderen Seite hydrolysierte das unlösliche Xylan zu Xylose, Xylobiose und Xylotriose und zeigte eine deutlich höhere Aktivität für das unlösliche Xylan.

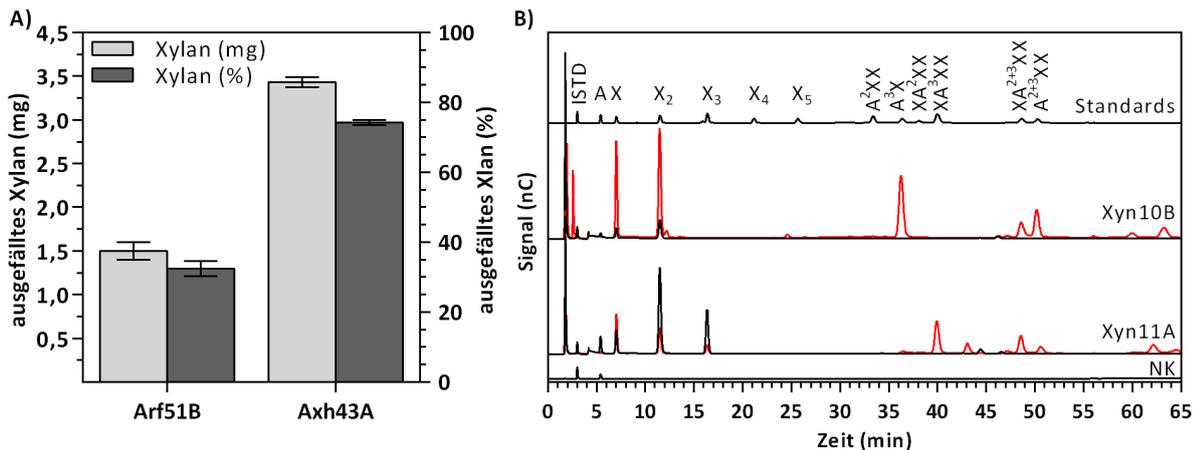


Abbildung 3.16 Hydrolyse von Arabinoxylan und ausgefälltem, unlöslichem Xylan. (A) Quantifizierung von unlöslichem Xylan nach der Hydrolyse von Arabinoxylan mit Arf51B oder Axh43A. Die Hydrolysen wurden mit 15 µg/ml Arf51B oder 1,5 µg/ml Axh43A und 0,5 % (w/v) löslichem Arabinoxylan aus Weizen in ddH₂O bei 60 °C in 24 h durchgeführt. Das unlösliche Xylan wurde getrocknet und eingewogen. (B) Hydrolyse von Arabinoxylan (rot) und unlöslichem Xylan (schwarz) mit Xyn10B und Xyn11A analysiert mit HPAEC-PAD. Unlösliches Xylan wurde durch die Hydrolyse von Arabinoxylan mit Axh43A produziert. Die Hydrolysen wurden mit 5 µg/ml Enzym und 1,0 % (w/v) löslichem Arabinoxylan oder unlöslichem Xylan in ddH₂O in 24 h bei 60 °C durchgeführt. Standards: A: Arabinose, X–X₅: Xylose bis Xylopentaose, A²XX, A³X, XA²XX, XA³XX, XA²⁺³XX, A²⁺³XX, ISTD: Interner Standard, NK: Negativkontrolle (1:5 Verdünnung).

Sowohl die Kombinationen einer Xylanase mit einer Arabinofuranohydrolase als auch die Kombinationen einer Xylanase mit einer β-Xylosidase führten zu einem synergistischen Effekt bei der Hydrolyse von löslichem Arabinoxylan. Die Kombination der zwei Xylanasen Xyn10B und Xyn11A zeigte hingegen kein synergistisches Zusammenwirken der Enzyme (Abbildung 3.17). Die Aktivität der Enzymkombination lag unter den addierten Aktivitäten der Xylanasen Xyn10B und Xyn11A. In Kombination mit Axh43A wurde für Xyn10B und Xyn11A ein synergistischer Effekt von jeweils plus 20 % bei der Hydrolyse von Arabinoxylan gemessen. In Kombination mit Bxl3B fiel der synergistische Effekt mit plus 30 % für Xyn10B und plus 34 % für Xyn11A noch deutlicher aus. Während Axh43A die Arabinosylierungen abspaltete, hydrolysierte Bxl3B die freigesetzten XOS und hatte in Kombination mit beiden Xylanasen einen stärkeren Effekt auf die Steigerung der gemessenen Aktivität. Der synergistische Effekt der Kombination mit Axh43A oder Bxl3B war bei Xyn11A etwas ausgeprägter als bei Xyn10B.

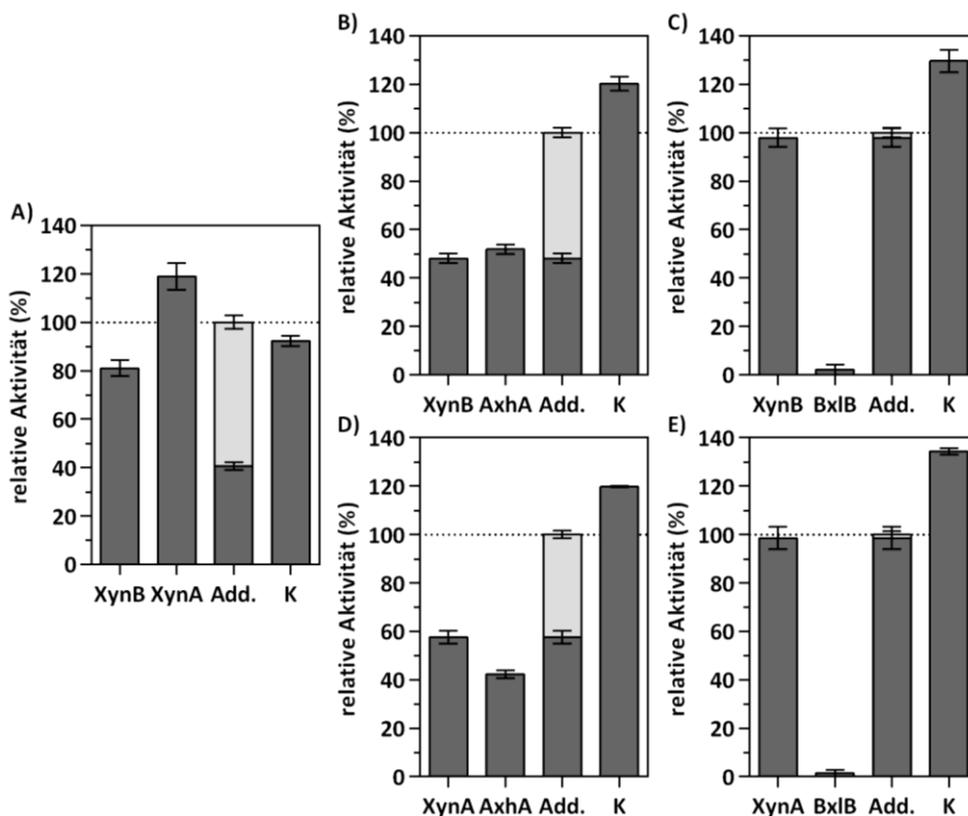


Abbildung 3.17 Synergistischer Effekt bei der Hydrolyse von Arabinoxylan mit Kombinationen aus zwei der Enzyme Xyn10B, Xyn11A, Axh43A und Bxl3B. (A) Hydrolyse von Arabinoxylan mit Xyn10B und Xyn11A (B) Hydrolyse von Arabinoxylan mit Xyn10B und Axh43A. (C) Hydrolyse von Arabinoxylan mit Xyn10B und Bxl3B. (D) Hydrolyse von Arabinoxylan mit Xyn11A und Axh43A. (E) Hydrolyse von Arabinoxylan mit Xyn11A und Bxl3B. Die Enzymaktivität (U) wurde mit dem DNSA-Assay bestimmt. XynB: Xyn10B, XynA: Xyn11A, AxhA: Axh43A, BxlB: Bxl3B, Add.: Addition der Aktivität der zwei Enzyme, K: Hydrolyse mit einer Kombination aus Xyn10B oder Xyn11A und Axh43A oder Bxl3B. Die Hydrolysen wurden mit 0,1 µg/ml Xyn10B, 0,05 µg/ml Xyn11A, 1,5 µg/ml Axh43A, 24 µg/ml Bxl3B mit 0,5 % (w/v) löslichem Arabinoxylan aus Weizen in 10 mM MOPS-Reaktionspuffer bei 60 °C und pH 6,0 in 20 min durchgeführt.

Um den synergistischen Effekt einer Enzymkombination mit Xylanase, Arabinofuranohydrolase und β -Xylosidase zu bestimmen, wurden die zuvor getesteten Enzymkombinationen aus Xylanase und Arabinofuranohydrolase oder Xylanase und β -Xylosidase jeweils um die dritte Enzymaktivität ergänzt. Die Aktivität der Enzymkombination aus drei Enzymen wurde mit der Summe der Aktivität der Enzymkombination aus zwei Enzymen und der Aktivität des fehlenden Einzelenzym verglichen. In Kombination mit Axh43A und Bxl3B wurde für Xyn10B ein synergistischer Effekt von plus 18 % und für Xyn11A nur ein insignifikant niedrigerer Effekt von plus 16 % bestimmt (Abbildung 3.18). Für die Bestimmung des synergistischen Effekts war es dabei irrelevant, mit welcher Kombination aus zwei Enzymen die gemessene Aktivität verglichen wurde. Xylanase, Arabinoxylan-Arabinofuranohydrolase und β -Xylosidase wirken bei der Hydrolyse von Arabinoxylan synergistisch zusammen. Während die Kombination der Xylanasen mit einer der akzessorischen Aktivitäten schon eine deutliche Aktivitätssteigerung bewirkte, wurde die synergistische Wirkung durch die Kombination aller drei Enzymaktivitäten nochmals verstärkt.

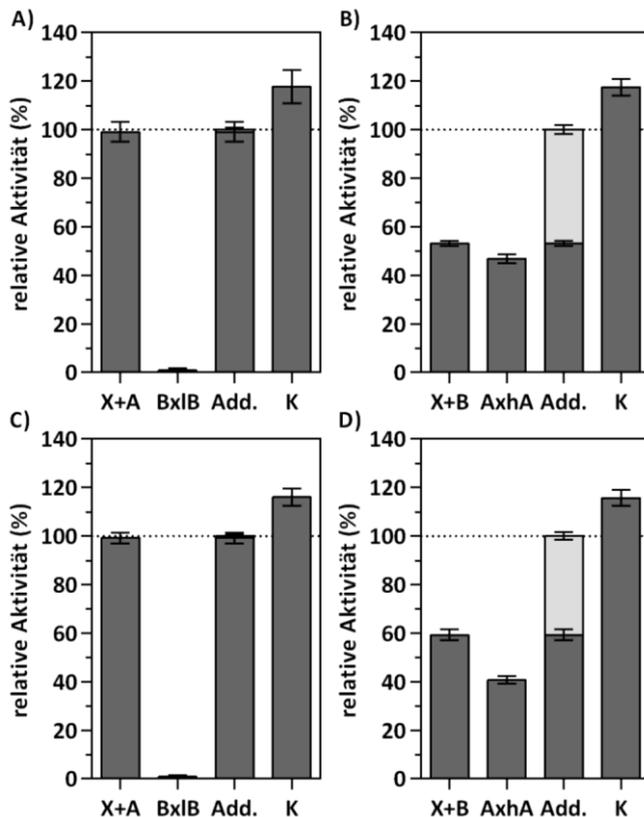


Abbildung 3.18 Synergistischer Effekt bei der Hydrolyse von Arabinoxylan mit Xylanase, β -Xylosidase und Arabinoxylan-Arabinofuranohydrolase. (A,B) Hydrolyse von Arabinoxylan mit Xyn10B, Axh43A und Bxl3B (C,D) Hydrolyse von Arabinoxylan mit Xyn11A, Axh43A und Bxl3B. Der synergistische Effekt wurde mit der Aktivität einer Enzymkombination aus zwei Enzymen verglichen. Die Enzymaktivität (U) wurde mit dem DNSA-Assay bestimmt. X+A: Xyn10B/Xyn11A und Axh43A, X+B: Xyn10B/Xyn11A und Bxl3B, BxlB: Bxl3B, AxhA: Axh43A, Add.: Addition der Aktivität der drei Enzyme, K: Hydrolyse mit Kombinationen aus Xyn10B oder Xyn11A mit Axh43A und Bxl3B. Die Hydrolysen wurden jeweils mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Xyn10B, 0,05 $\mu\text{g/ml}$ Xyn11A, 1,5 $\mu\text{g/ml}$ Axh43A, 24 $\mu\text{g/ml}$ Bxl3B und 0,5 % (w/v) löslichem Arabinoxylan aus Weizen in 10 mM MOPS-Reaktionspuffer bei 60 °C und pH 6,0 in 20 min durchgeführt.

Der Synergismus der Glycosidhydrolasen Xyn11A, Axh43A und Bxl3B bei der Hydrolyse von löslichem Arabinoxylan konnte auch anhand der hydrolytischen Produkte gezeigt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Kinetik der Hydrolyse von Arabinoxylan mit Xyn11A und den Enzymkombinationen aufgenommen und die hydrolytischen Produkte wurden nach 30, 60 und 240 min analysiert (Abbildung 6.20). Lösliches Arabinoxylan wurde von Xyn11A über Nacht zu Xylose, XOS und AXOS (Abbildung 3.6) hydrolysiert, nach nur 4 h Reaktionszeit und mit sehr viel weniger Enzym (0,05 $\mu\text{g/ml}$ statt 5 $\mu\text{g/ml}$) wurden allerdings nur geringe Mengen AXOS und sehr geringe Mengen XOS freigesetzt (Abbildung 3.19). In Kombination mit Bxl3B setzte Xyn11A die gleiche Menge AXOS frei und die XOS wurden größtenteils zu Xylose hydrolysiert. In Kombination mit Axh43A wurden hingegen nur sehr geringe Mengen AXOS freigesetzt, dafür aber deutlich höhere Mengen XOS, insbesondere X₂ bis X₅. Zusätzlich wurden große Mengen Arabinose aber keine Xylose freigesetzt. Die Kombination aller drei Glycosidhydrolasen führte zu einer weiteren Steigerung der XOS Freisetzung, obwohl zugleich eine große Menge Xylose freigesetzt wurde. Auch die Menge

freigesetzter Arabinose stieg leicht an. Die Analyse der hydrolytischen Produkte zeigte, dass die Hydrolyse von Arabinoxyylan hauptsächlich durch die von Axh43A katalysierte Abspaltung der Arabinosylierungen begünstigt wurde. Bxl3B hydrolysierte in Kombination mit Xyn11A nur die schon freigesetzten XOS und erhöhte so zwar die gemessene Aktivität der Enzymkombination, begünstigte aber nicht die Hydrolyse des Arabinoxyylan. Die Hydrolyse aller drei Enzyme führte hingegen zu einer schnelleren Hydrolyse des Arabinoxyylan. Obwohl Bxl3B XOS hydrolysierte, nahm die Konzentration der XOS bei der Hydrolyse mit allen drei Enzymen im Vergleich zu der Kombination aus Xyn11A und Axh43A zu statt ab.

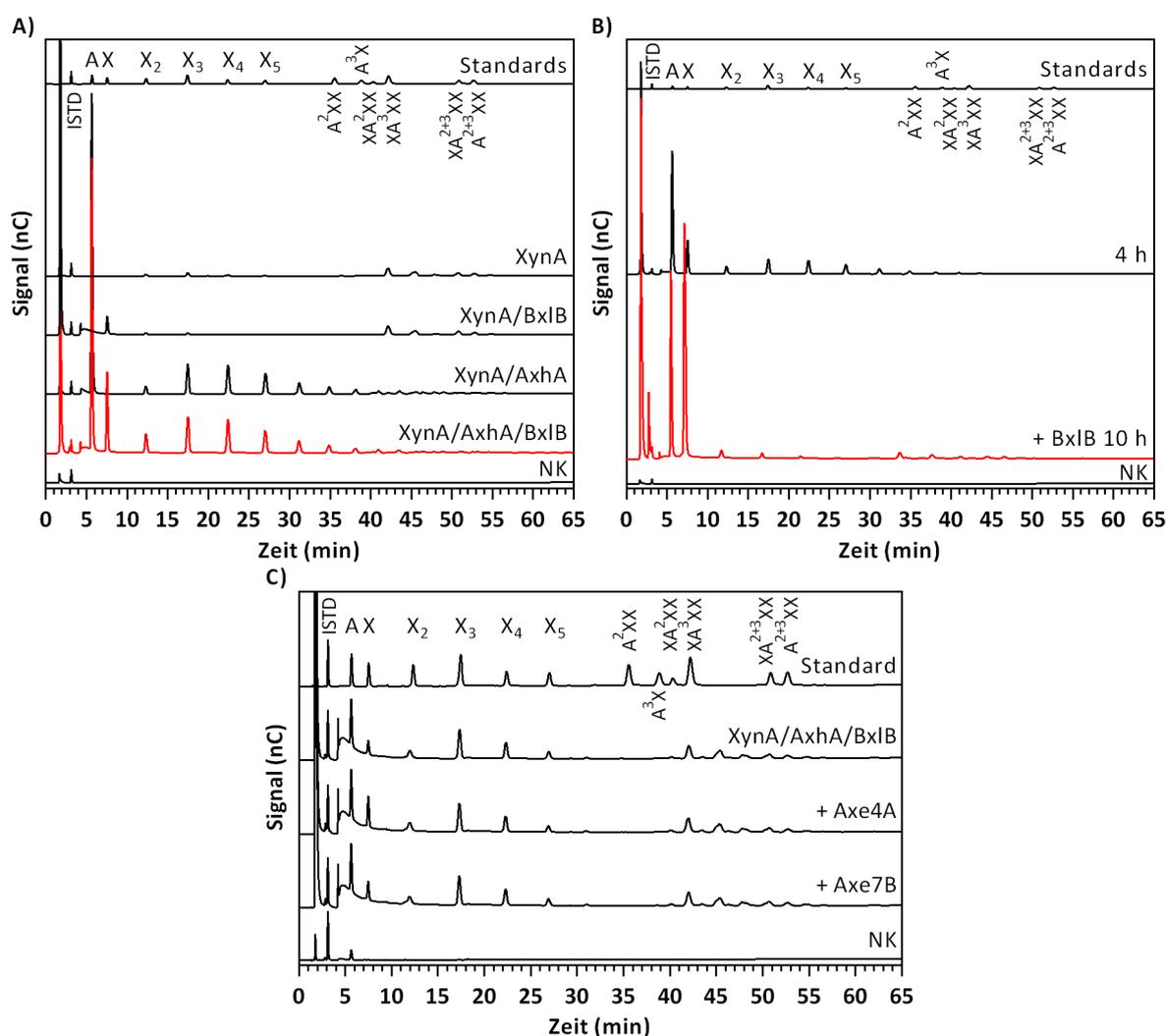


Abbildung 3.19 Hydrolytische Produkte der Hydrolyse von löslichem und unlöslichem Arabinoxyylan analysiert mit HPAEC-PAD. (A) Hydrolyse von löslichem Arabinoxyylan mit Xyn11A, Axh43A und Bxl3B. (B) Zusätzliche Hydrolyse (6 h) der hydrolytischen Produkte aus (A) mit 20 µg/ml Bxl3B. (C) Hydrolyse von unlöslichem Arabinoxyylan mit Xyn11A, Axh43A und Bxl3B und den Esterasen Axe4A oder Axe7B. Die Hydrolysen wurden mit 0,05 µg/ml Xyn11A, 1,5 µg/ml Axh43A, 24 µg/ml Bxl3B, 20 µg/ml Axe4A/Axe7B und 0,5 % (w/v) Polysaccharid in 10 mM MOPS-Reaktionspuffer bei 60 °C und pH 6,5 in 4 h oder (B) 10 h durchgeführt. XynA: Xyn11A, AxhA: Axh43A, BxlB: Bxl3B Standards: A: Arabinose, X–X₅: Xylose bis Xylopentaose, A²XX, A³X, XA²XX, XA³XX, XA²⁺³XX, A²⁺³XX, ISTD: Interner Standard, NK: Negativkontrolle (1:10 Verdünnung).

Erst eine erneute Zugabe von 20 µg/ml Bxl3B führte zu einer nahezu vollständigen Hydrolyse der XOS nach 6 h und zu einem deutlichen Anstieg der freigesetzten Mengen Arabinose und Xylose (Abbildung 3.19). Während nach 4 h erst 15 % der im Arabinoxylan vorhandenen Xylose als Monosaccharid vorlagen, waren es nach der erneuten Zugabe von Bxl3B und 10 h Reaktionszeit 72 %. Die freigesetzte Menge an Arabinose stieg im selben Zeitraum von 71 % auf 80 % (Abbildung 6.21). Somit wurden durch Kombination der Xylanase Xyn11A, der Arabinoxylan-Arabinofuranohydrolase Axx43B und der β -Xylosidase Bxl3B innerhalb von 10 h Reaktionszeit 75 % des löslichen Arabinoxylan aus Weizen zu Monosacchariden hydrolysiert. Während eine Verdopplung der Axx43A Konzentration in der Enzymkombination zu einer leicht erhöhten Arabinose, Xylose und XOS Freisetzung führte, wurde durch eine Verdopplung der anfänglichen Bxl3B Konzentration nach 4 h eine deutliche Steigerung der freigesetzten Menge Xylose und eine entsprechende, geringe Reduzierung der XOS Konzentration erreicht (Abbildung 6.20).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit dem löslichen Xylan zeigte die Enzymkombination mit Xyn11A, Axx43A und Bxl3B für das unlösliche Arabinoxylan aus Weizen nur eine geringe Aktivität. Die Enzymkombination setzte bei der Hydrolyse hauptsächlich Arabinose, geringe Mengen Xylose, Xylobiose und Xylopentaose, sowie Xylotriase, Xyloetraose, XA³XX und ein unbekanntes Oligosaccharid mit einer Retentionszeit von 45,4 min frei (Abbildung 3.19). Zusätzlich wurden weitere AXOS und unbekannte Oligosaccharide freigesetzt. Bei der Hydrolyse des unlöslichen Arabinoxylan wurde in etwa nur ein Viertel der Menge des abundantesten XOS Xylotriase freigesetzt, die bei der Hydrolyse des löslichen Arabinoxylans freigesetzt wurde.

Durch zusätzliche Kombination mit der Acetylerase Axe4A oder Axe7B wurde die Xylose Freisetzung erhöht, dabei zeigte Axe4A einen größeren Effekt als Axe7B. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde bei der Charakterisierung der Esterasen (Kapitel 3.4) gezeigt, dass Axe4A und Axe7B Acetat von Xylose abspalten, wobei ebenfalls eine höhere Aktivität für Axe4A als für Axe7B nachgewiesen wurde.

Die optimalen Reaktionsbedingungen der einzelnen Enzyme innerhalb einer Enzymkombination können variieren und beeinflussen gemeinsam die optimalen Reaktionsbedingungen für eine Hydrolyse mit der Enzymkombination. Die Temperatur- und pH-Optima der Glycosidhydrolyasen Xyn10B, Axx43A und Bxl3B lagen alle in einem relativ engen Bereich zwischen 61 °C und 76 °C sowie pH 5,5 und pH 6,0 (Tabelle 3.6). Um die optimalen Reaktionsbedingungen der Enzymkombination zu bestimmen, wurde ein kombiniertes pH- und Temperatur-Aktivitätsprofil (pH-vs-Temperatur-Aktivitätsprofil) für die Hydrolyse von löslichem Arabinoxylan mit den Enzymen

Xyn10B, Axh43A und Bxl3B erstellt. Die Aktivität der Enzymkombination wurde bei acht pH-Werten zwischen pH 4,0 und pH 7,5 und gleichzeitig bei zehn verschiedenen Temperaturen zwischen 50 °C und 80 °C bestimmt (Abbildung 3.20). Die maximale Aktivität der Enzymkombination wurde bei pH 5,5 und 63 °C gemessen. Im Bereich von pH 5,5–6,0 und 59–67 °C lag die relative Aktivität der Enzymkombination über 90 % der maximalen Aktivität, während die kombinierte pH- und Temperatur-Toleranz der Enzymkombination, in der die relative Aktivität über 60 % lag, im Bereich von pH 5,0–6,5 und 50–80 °C lag.

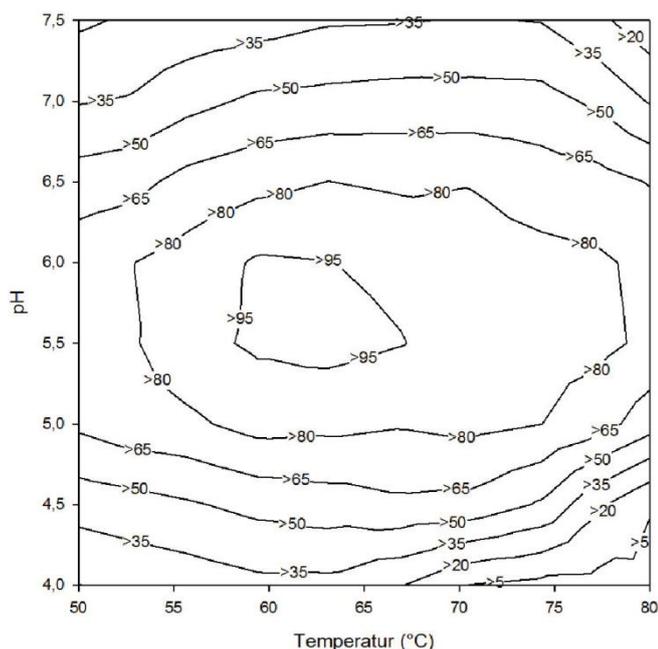


Abbildung 3.20 pH-vs-Temperatur-Aktivitätsprofil der Enzymkombination mit Xyn10B, Axh43A und Bxl3B bei der Hydrolyse von Arabinoxylan. Die Hydrolyse wurde in drei unabhängigen Assays mit 0,1 µg/ml Xyn10B, 1,5 µg/ml Axh43A, 24 µg/ml Bxl3B und 0,5 % (w/v) löslichem Arabinoxylan aus Weizen in 0,1 M Citrat-Phosphat-Reaktionspuffer mit pH 4,0–7,5 bei 50–80 °C in 20 min durchgeführt. Die Enzymaktivität wurde mit dem DNSA-Assay bestimmt.

3.6 Hydrolyse von Hemicellulosepräparationen

Die ausgewählten *C. stercorarium* Glycosidhydrolasen und Kohlenhydratesterasen sind mit reinen Polysacchariden und künstlichen Substraten charakterisiert worden. Ziel dieser Arbeit war jedoch auch die Hydrolyse von natürlich vorkommender Hemicellulose aus Biomasse. Zu diesem Zweck wurde Hemicellulose erfolgreich aus Weizenstroh isoliert, analysiert und mit einer Enzymkombination aus den Xylanasen Xyn10B und Xyn11A, den Arabinose abspaltenden Enzymen Axh43A und Arf51B und der β -Xylosidase Bxl3B hydrolysiert. Im 40 ml und 5 l Maßstab wurden mit der für Arabinoxylan spezialisierten, oben beschriebenen Enzymkombination bis zu 71 % der gebundenen Xylose und 56 % der gebundenen Arabinose als Monosaccharide freigesetzt.

3.6.1 Präparation von Hemicellulose aus Weizenstroh

Die Zusammensetzung des Hemicelluloseanteils in pflanzlicher Biomasse sowie die Größe des Anteils selbst sind abhängig von der Pflanzenart (Van Dyk und Pletschke, 2012). *C. stercorarium* ist auf die Hydrolyse von Hemicellulose und im Besonderen auf die Hydrolyse von Xylan spezialisiert (Tabelle 3.4). Aus diesem Grund wurde Weizenstroh mit einem Hemicelluloseanteil von 23–25 % (Arabinoxylan 19–21 %), als Rohstoff für die Isolierung von Hemicellulose ausgewählt (Alvarez *et al.*, 2016; Otieno und Ahring, 2012).

Insgesamt wurden vier Hemicellulosepräparationen aus Weizenstroh isoliert. Für die Präparationen HP1, HP2 und HP3 wurde Weizenstroh mit 1 % (w/v) NaOH oder H₂O autoklaviert und die Hemicellulose wurde anschließend durch eine Ethanol-fällung präzipitiert (Kapitel 2.7.1). Während HP1 und HP2 mit NaOH aus Weizenstroh isoliert wurden, wurde HP3 mit H₂O isoliert, um den Effekt von NaOH bei der Präparation zu untersuchen. Die Präparationen HP1 und HP2 wurden aus zwei verschiedenen Chargen Weizenstroh isoliert; für die Isolierung von HP3 und der vierten Präparation HP4 wurde die gleiche Charge wie für HP2 verwendet. Die Hemicellulosepräparation HP4 wurde mit 6 % (w/v) NaOH durch Extrusion, Hitzebehandlung und anschließende Ethanol-fällung isoliert. Um die vier Präparationen zu vergleichen, wurden die Hemicelluloseausbeute und der Kohlenhydratgehalt bestimmt (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7 Hemicelluloseausbeute bei der Präparation von Hemicellulose aus Weizenstroh.

Hemicellulosepräparation	isoliert mit	Ausbeute (g)	Anteil am Stroh (%)	Ausbeute Hemicellulose (%)	Kohlenhydrat-gehalt (%)
HP1	1 % NaOH	5,89	6,2	24,3	69,1
HP2	1 % NaOH	7,33	8,7	34,0	65,7
HP3	H ₂ O	1,33	1,5	6,1	38,6
HP4	6 % NaOH	301,04	32,1	125,8	50,0

Die prozentuale Hemicelluloseausbeute wurde mit der Formel 2.8 berechnet. Die Berechnung wurde mit dem Mittelwert des in (Tabelle 1.1) angegebenen Hemicelluloseanteils für Weizenstroh (25,5 %) durchgeführt. Der Kohlenhydratgehalt wurde mit Formel 2.9 aus dem Kohlenhydrat-Fingerabdruck (Tabelle 3.8) der Präparationen berechnet.

Allein mit H₂O wurden nur 1,33 g Hemicellulosepräparation aus 90 g Weizenstroh isoliert, dies entsprach nur 6,1 % der Hemicellulose in Weizenstroh. Mit 1 % (w/v) NaOH wurden hingegen 5,89 g bzw. 7,33 g Hemicellulosepräparation isoliert. Während die Ausbeute bei der Präparation HP2 34,0 % des Hemicelluloseanteils entsprach, waren es bei der Präparation HP1 24,3 %. Allerdings wurde HP2 mit einer im Hinblick auf die Verluste optimierten Methode isoliert und HP1 wurde zusätzlich zweimal gewaschen, weshalb eine geringere Ausbeute zu erwarten war. Durch den Einsatz von 1 % (w/v) NaOH wurde 5,5-mal mehr Material aus dem Weizenstroh gelöst als bei

der Isolierung mit H₂O. Im Extruder mit anschließender Hitzebehandlung wurden mit 6 % (w/v) NaOH 32,1 % des Weizenstrohs mit Ethanol aus der Lösung gefällt, dies entspricht 125,8 % der im Stroh enthaltenen Hemicellulose. Dieses Ergebnis zeigt, dass neben der Hemicellulose noch andere Bestandteile aus dem Stroh isoliert wurden. Um die tatsächliche Hemicelluloseausbeute zu bestimmen, wurde der Kohlenhydratgehalt der Präparationen ermittelt und mit der Ausbeute an Hemicellulose multipliziert. Der Kohlenhydratgehalt der Präparationen HP1 und HP2 war mit 69,1 % und 65,7 % deutlich höher als der Gehalt von Pentosen und Hexosen in HP3 und HP4 (Tabelle 3.7). Im Ergebnis enthielt HP3 nur 2,4 % der im Weizenstroh vorhandenen Hemicellulose, während HP4 62,9 % des Hemicelluloseanteils aus dem Stroh enthielt. HP1 und HP2 enthielten mit 16,8 % bzw. 22,3 % in etwa ein Fünftel der Hemicellulose aus dem Weizenstroh.

Um die Zusammensetzung der Hemicellulosepräparationen zu untersuchen, wurden die vier Präparationen, lösliches und unlösliches Arabinoxylan aus Weizen sowie gemahlene Weizenstroh chemisch hydrolysiert und der Kohlenhydrat-Fingerabdruck der Polysaccharide bestimmt (Tabelle 3.8). Von den vier Hemicellulosepräparationen enthielt HP1 mit 787 mg/g den höchsten Kohlenhydratanteil, gefolgt von HP2 (756 mg/g). Die Zusammensetzungen der Präparationen unterschieden sich allerdings deutlich voneinander. Während das Hydrolysat von HP1 27 % mehr Xylose enthielt, war der Arabinoseanteil in HP2 39 % höher. Die Präparation HP3 enthielt nur 452 mg/g Kohlenhydrate, auffällig war jedoch der hohe Glucose- und Mannoseanteil von 215 % bzw. 207 % im Vergleich zu HP2. HP4 enthielt mit 573 mg/g Kohlenhydraten nur einen um ca. 12 % höheren Zuckeranteil als HP3. Das lösliche Arabinoxylan bestand zu 100 % aus den Monosacchariden Xylose und Arabinose mit einem Verhältnis von 66:38, dieses entsprach ziemlich genau dem vom Hersteller angegebenen Verhältnis von 62:38. In den Hydrolysaten variierte das Verhältnis von Xylose zu Arabinose von 1,5:1 bis 4,1:1. Während das lösliche und unlösliche Arabinoxylan (1,7:1 und 1,6:1) und die Präparationen HP2 (2,3:1) und HP3 (1,5:1) ein Verhältnis von ungefähr 2:1 zeigten, enthielten die Präparationen HP1 (4,1:1) und HP4 (3,2:1) sowie das Weizenstroh-Hydrolysat (3,9:1) eher 4-mal so viel Xylose wie Arabinose. Das Weizenstroh-Hydrolysat enthielt erwartungsgemäß den größten Glucoseanteil (333 mg/g), da es als unbehandeltes Substrat die Hemicellulose- und die Cellulosefraktion umfasste.

Ergebnisse

Tabelle 3.8 Kohlenhydrat-Fingerabdruck von Arabinoxylan, Hemicellulosepräparationen und Weizenstroh.

Polysaccharide	Kohlenhydratanteil (mg/g)									Summe
	Pentosen		Hexosen			Desoxyhexosen		Uronsäuren		
	Xyl	Ara	Glu	Gal	Man	Rha	Fuc	GlcA	GalA	
HP1	513	128	90	27	24	1	1	2	1	787
HP2	403	178	40	65	57	5	2	3	3	756
HP3	109	71	86	49	118	9	4	3	3	452
HP4	359	112	46	27	22	3	1	2	1	573
AX (Weizen, löslich)	656	382	0	3	0	0	0	0	0	1.041
AX (Weizen, unlöslich)	359	225	105	17	136	1	1	1	1	846
Weizenstroh	231	59	333	16	16	1	0	1	1	658

Der Kohlenhydrat-Fingerabdruck wurde am Lehrstuhl für Chemie Biogener Rohstoffe der TU München bestimmt (Kapitel 2.6.4). Die Polysaccharide wurden hydrolysiert und die Monosaccharide mittels Massenspektrometrie quantifiziert (Ruhmann *et al.*, 2014; Schwarz *et al.*, 2016). Xyl: Xylose, Ara: Arabinose, Glu: Glucose, Gal: Galactose, Man: Mannose, Rha: Rhamnose, Fuc: Fucose, GlcA: Glucuronsäure, GalA: Galacturonsäure.

Die Hemicellulosepräparationen HP1, HP2 und HP4 wurden mit der Xylanase Xyn10B hydrolysiert und die hydrolytischen Produkte wurden miteinander und mit den hydrolytischen Produkten von löslichem Arabinoxylan verglichen (Abbildung 6.22). Alle drei Präparationen wurden hauptsächlich zu Xylose, Xylobiose und A³X hydrolysiert. Bei der Hydrolyse von HP1 wurden die größten Mengen Xylose und Xylobiose freigesetzt. Im Gegensatz zum Hydrolysat von Arabinoxylan wurden in keinem Hydrolysat der drei Präparationen die zweifach substituierten AXOS XA²⁺³XX und A²⁺³XX nachgewiesen. Bei der Hydrolyse des löslichen Arabinoxylans wurden am wenigsten Xylose und Xylobiose freigesetzt. Die Hydrolysen mit Xyn10B zeigten, dass alle drei Präparationen HP1, HP2 und HP3 in ihrer Hydrolysierbarkeit und den freigesetzten Produkte vergleichbar sind. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis des Kohlenhydrat-Fingerabdrucks wurde gezeigt, dass HP1 den größten Xyloseanteil enthielt.

3.6.2 Prototyp Hydrolyse der isolierten Hemicellulosepräparation

Die Experimente zur Charakterisierung der Glycosidhydrolasen und Kohlenhydratesterasen sowie die Hydrolysen ausgewählter Polysaccharide wurden in Reaktionsvolumen von 50 bis 1.000 µl und mit maximal 1 % (w/v) Substrat durchgeführt. Um die Möglichkeit einer Maßstabsvergrößerung der in dieser Arbeit durchgeführten Hydrolysen und somit eine Annäherung an industrielle Bedingungen zu untersuchen, wurden 5 % (w/v) der Hemicellulosepräparation HP4 mit der für Arabinoxylan getesteten Enzymkombination im 40 ml und 5 l Maßstab hydrolysiert. Da in dieser Arbeit die benötigten Enzyme nicht in ausreichender Menge für eine Hydrolyse im 5 l Maßstab produziert wurden, wurde die Enzymproduktion bei der Firma ASA Spezialenzyme in Auftrag gegeben. Fünf Glycosidhydrolasen wurden von der Firma ASA Spezialenzyme mit den in dieser

Arbeit erstellten *E. coli* BL21 Star Expressionsstämmen produziert: Xyn10B, Xyn11A, Axh43A, Arf51B und Bxl3B. Die Aktivitäten der bestellten Enzympräparate waren um das 9–130-Fache niedriger als die Aktivitäten der Glycosidhydrolasen, die in dieser Arbeit produziert und charakterisiert wurden (Tabelle 3.9).

Tabelle 3.9 Aktivität der Enzyme die in dieser Arbeit und von der Firma ASA Spezialenzyme produziert wurden.

Glycosidhydrolase	diese Arbeit	ASA Spezialenzyme	Bedingungen	Substrat
Xyn10B	440 U/mg	6,06 U/mg	pH 6,0; 60 °C	Arabinoxylan (löslich)
Xyn11A	1.000 U/mg	7,54 U/mg	pH 6,0; 60 °C	Arabinoxylan (löslich)
Axh43A	40,0 U/mg	4,24 U/mg	pH 6,0; 60 °C	Arabinoxylan (löslich)
Arf51B	2,01 U/mg	0,04 U/mg	pH 6,0; 60 °C	Arabinan
Bxl3B	0,21 U/mg	0,02 U/mg	pH 6,0; 60 °C	Glucuronoxylan

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Enzymaktivitäten bei identischen Reaktionsbedingungen in 0,1 M MOPS-Reaktionspuffer mit 0,5 % (w/v) Polysaccharid bei 60 °C und pH 6,0 bestimmt.

Im 40 ml Maßstab wurden zunächst unterschiedliche Konzentrationen der Einzelenzyme bei der Hydrolyse mit Enzymkombinationen untersucht (Tabelle 3.10). HP4 wurde von allen fünf Kombinationen zu Xylose, Arabinose, Xylobiose, Xylotriose und einigen unbekanntem Oligosacchariden hydrolysiert (Abbildung 3.21). Dabei nahm die Konzentration der XOS mit zunehmender Enzymkonzentration ab. Nach 24 h Reaktionszeit enthielt das Hydrolysat aller fünf Kombinationen jedoch noch große Mengen Xylobiose, einige Hydrolysate enthielten auch noch Xylotriose. Um die verbliebene Xylobiose im Hydrolysat der Kombination 5 zu hydrolysieren, wurden nach 24 h 10 mU/ml oder 20 mU/ml Bxl3B zu 5 ml Hydrolysat gegeben und die Hydrolyse wurde für weitere 4 h inkubiert. Nach 28 h Reaktionszeit war die Xylobiose hydrolysiert und, abgesehen von einem unbekanntem Oligosaccharid auf Höhe der Xylopentaose, wurden nur Xylose und Arabinose als Produkte identifiziert (Abbildung 3.21). Durch die Hydrolyse mit der Enzymkombination wurden 12,87 g/l Xylose und 3,13 g/l Arabinose freigesetzt (Abbildung 6.23, Tabelle 6.3). Anhand der Quantifizierung der Monosaccharide in der Präparation HP4 (Tabelle 3.8) wurde die prozentuale Ausbeute errechnet: 71 % der enthaltenen Xylose und 56 % der enthaltenen Arabinose in der Hemicellulosepräparation wurden als Monosaccharide freigesetzt.

Ergebnisse

Tabelle 3.10 Enzymkombinationen für die Hydrolyse der Hemicellulosepräparation HP4 im 40 ml Maßstab.

Glycosidhydrolase	Kombination 1	Kombination 2	Kombination 3	Kombination 4	Kombination 5
Xyn10B	550 U/l	550 U/l	550 U/l	550 U/l	1.100 U/l
Xyn11A	500 U/l	500 U/l	500 U/l	500 U/l	1.000 U/l
Axh43A	150 U/l	150 U/l	150 U/l	300 U/l	300 U/l
Arf51B	5,0 U/l	5,0 U/l	5,0 U/l	10 U/l	10 U/l
Bxl3B	2,5 U/l	5,0 U/l	10 U/l	10 U/l	10 U/l

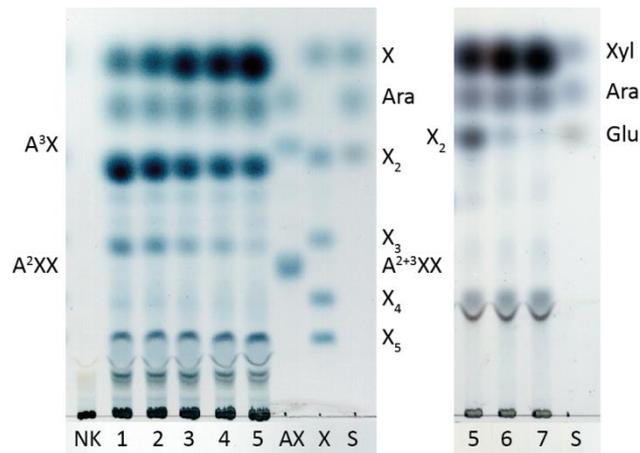


Abbildung 3.21 Hydrolytische Produkte der Hydrolyse der Hemicellulosepräparation HP4 im 40 ml Maßstab mit Enzymkombinationen aus Xyn10B, Xyn11A, Axh43A, Arf51B und Bxl3B. Für die Hydrolyse wurden die Enzyme verwendet, die von der Firma ASA Spezialenzyme produziert wurden. Die Hydrolyse wurden mit den in Tabelle 3.10 aufgelisteten Kombinationen sowie 5 % HP4 in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (5 mM NaCl; pH 6,0) bei 62 °C und 120 rpm in 24 h oder 28 h durchgeführt. Es wurde jeweils 1 µl aufgetragen. 1-5: Kombination 1 bis 5 (24 h), 6: Kombination 5 (28 h) mit Zugabe von 10 mU/ml Bxl3B nach 24 h, 7: Kombination 5 (28 h) mit Zugabe von 20 mU/ml Bxl3B nach 24 h, Standards: S: Xylose, Arabinose und Glucose, X: Xylose bis Xylopentaose, AX: Arabinose, A³X, A²XX, A²⁺³XX.

Zur Bestimmung der benötigten Enzymmengen für die 5 l Hydrolyse im Bioreaktor wurden die Ergebnisse der 40 ml Hydrolyse zugrunde gelegt. 5 % (w/v) Präparation HP4 wurde mit 1.100 U/l Xyn10B, 1.000 U/l Xyn11A, 300 U/l Axh43A, 10 U/l Arf51B und 20 U/l Bxl3B hydrolysiert. Die Bxl3B Konzentration wurde gegenüber der 40 ml Hydrolyse verdoppelt, da 10 U/l Bxl3B nicht ausgereicht hatten, um die XOS zu hydrolysieren und um der Produktinhibition durch hohe Xylosekonzentrationen zu begegnen. Bei einer Konzentration von 10 g/l Xylose im Hydrolysat wurden für Bxl3B nur 30 % relative Aktivität gemessen (Abbildung 3.9). Um die geringe Halbwertszeit von ca. 3,5 h auszugleichen (Abbildung 3.8), wurden nach 24 h Reaktionszeit weitere 15 U/l Bxl3B zugegeben. Insgesamt wurden 2,25 g/l (2.445 U/l) der Enzympräparationen der Firma ASA Spezialenzyme eingesetzt, während die eingesetzten Aktivitäten 183 mg/l der in dieser Arbeit produzierten Enzyme entsprachen. Die Temperatur des Bioreaktors wurde konstant bei 62 °C gehalten, Änderungen des pH wurden aufgezeichnet und die Hydrolyse wurde mit 750 rpm durchmischt. Während der 30-stündigen Hydrolyse änderte sich der pH von pH 6,0 zu pH 5,7. Die Freisetzung der hydrolytischen Produkte wurde mittels HPAEC-PAD analysiert (Abbildung 3.22).

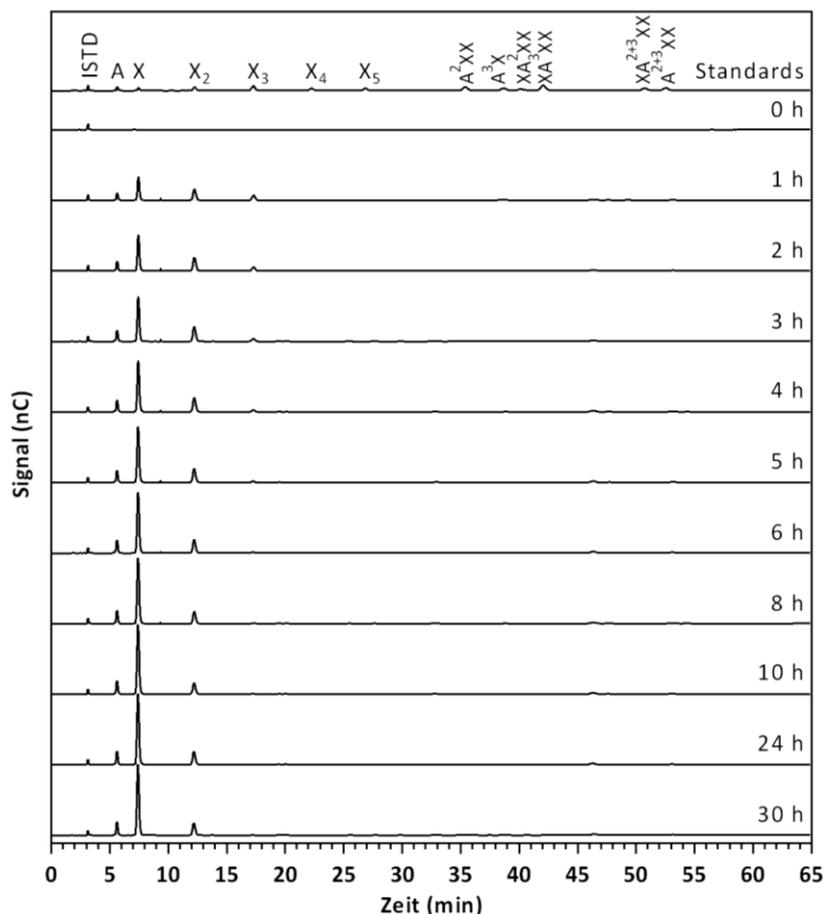


Abbildung 3.22 Kinetik der Prototyp Hydrolyse der Hemicellulosepräparation HP4 im 5 l Maßstab mit der Enzymkombination aus Xyn10B, Xyn11A, Axl43A, Arf51B und Bxl3B. Die freigesetzten hydrolytischen Produkte wurden mit HPAEC-PAD analysiert. Für die Hydrolyse wurden die von der Firma ASA Spezialenzyme produzierten Enzyme verwendet. Die Hydrolyse wurde mit 1.100 U/l Xyn10B, 1.000 U/l Xyn11A, 300 U/l Axl43A, 10 U/l Arf51B und 20 U/l Bxl3B sowie 5 % HP4 in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,0; 5 mM NaCl) bei 62 °C und 750 rpm in 30 h im 5 l Bioreaktor durchgeführt. Nach 24 h wurden zusätzlich 15 U/l Bxl3B zugegeben. Standards: A: Arabinose, X–X₅: Xylose bis Xylopentaose, A²XX, A³X, XA²XX, XA³XX, XA²⁺³XX, A²⁺³XX, ISTD: Interner Standard (1:200 Verdünnung).

Die Hemicellulosepräparation wurde wie erwartet zu Arabinose, Xylose, Xylobiose und Xylotriose hydrolysiert. Zunächst nahmen die freigesetzten Mengen Arabinose, Xylose und Xylobiose stetig zu, während die Konzentration der freigesetzten Xylotriose nach einer Stunde am höchsten war und anschließend wieder abnahm. Xylobiose und Arabinose erreichte nach etwa 4 h bzw. 6 h Reaktionszeit ihre maximale Konzentration. Die Xylosekonzentration stieg zunächst schnell und näherte sich nach 10 h Reaktionszeit einer maximalen Konzentration an (Abbildung 3.23). Die erneute Zugabe von Bxl3B nach 24 h Reaktionszeit führte entgegen der Erwartung nicht zur Hydrolyse der noch verbliebenen Xylobiose und nur zu einem sehr geringen Anstieg der freigesetzten Xylosemenge (Abbildung 6.23, Tabelle 6.3). Nach 29 h Hydrolyse wurden mit 9,69 g/l Xylose und 2,71 g/l Arabinose 54 % der Xylose und 48 % der Arabinose freigesetzt. Während die freigesetzte Arabinosekonzentration mit dem Ergebnis der 40 ml Hydrolyse (3,13 g/l) vergleichbar

ist, wurden bei der 5 l Hydrolyse 3,18 g/l weniger Xylose freigesetzt. Werden hingegen, aufgrund der ausgebliebenen Hydrolyse nach erneuter Bxl3B Zugabe, die Xylosekonzentrationen vor der Bxl3B Zugabe verglichen, ist die Differenz zwischen den Xylosekonzentrationen deutlich geringer. Verglichen mit den 8,92 g/l (24 h) der 40 ml Hydrolyse, wurde bei der 5 l Hydrolyse mit 9,31 g/l (10 h) eine etwas höhere Xylosekonzentration freigesetzt.

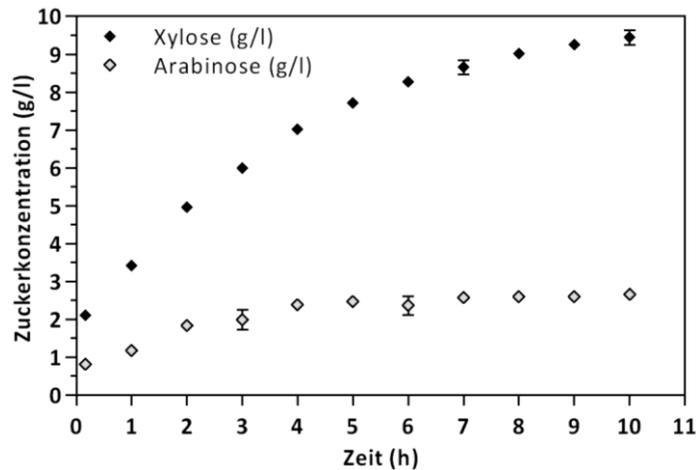


Abbildung 3.23 Xylose- und Arabinosekonzentrationen die bei der Prototyp Hydrolyse von HP4 im 5 l Maßstab mit der Enzymkombination aus Xyn10B, Xyn11A, Axh43A, Arf51B und Bxl3B freigesetzt wurden. Die Zuckerkonzentrationen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Kinetik mit HPLC quantifiziert. Die Hydrolyse wurde mit 1.100 U/l Xyn10B, 1.000 U/l Xyn11A, 300 U/l Axh43A, 10 U/l Arf51B und insgesamt 35 U/l Bxl3B sowie 5 % HP4 in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,0; 5 mM NaCl) bei 62 °C und 750 rpm in 30 h im 5 l Bioreaktor durchgeführt.

4 Diskussion

4.1 Hemicellulolytisches Potential von *C. stercorarium*

Die Nutzung erneuerbarer Biomasse zur Erzeugung von Kraftstoffen, Elektrizität und Wärme ist eine klimafreundliche Ergänzung der Energieproduktion aus fossilen Energieträgern. Im Jahr 2014 reduzierte allein die Energieerzeugung aus Biogas die Emission des klimaschädlichen, fossil basierten Kohlenstoffdioxids (CO₂) in Deutschland um rund 16,8 Millionen Tonnen (Maus *et al.*, 2016). Um jedoch einen energetisch und ökonomisch effizienten Prozess zur Verwertung von lignocelluloseischer Biomasse zu realisieren, müssen sowohl Cellulose als auch Hemicellulosen so vollständig wie möglich hydrolysiert werden. *C. stercorarium*, *C. thermocellum* und verwandte Spezies wurden als hervorragende Biomasse-abbauende Bakterien identifiziert (Zverlov *et al.*, 2010). Eine synthetische Kultur aus *C. stercorarium* und *C. thermocellum* depolymerisierte beim Wachstum auf Maissilage 76 % der Maissilage und zeigte eine nur geringfügig niedrigere Effektivität als die beste, aus einer thermophilen Biogasanlage isolierte, Bakterienmischkultur (Zverlov *et al.*, 2010). Während *C. thermocellum* eines der erfolgreichsten cellulolytischen Mikroorganismen ist und ausschließlich Cellooligosaccharide verwertet, scheint *C. stercorarium* an die Hydrolyse von Hemicellulosen angepasst zu sein. *C. stercorarium* hydrolysiert eine Vielzahl hemicelluloseischer Polysaccharide und verwertet deren Abbauprodukte, Hexosen ebenso wie Pentosen. Erwartungsgemäß enthält das Genom von *C. stercorarium* eine große Anzahl von Genen für die Hydrolyse von Hemicellulosen (Zverlov *et al.*, 2010; Zverlov und Schwarz, 2008). Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der kodierten, Glycosidhydrolasen und Kohlenhydratesterasen sowie der gezielte, synergistische Einsatz dieser Enzyme zur Hydrolyse von Hemicellulosen.

Eine effiziente, enzymatische Hydrolyse von hemicelluloseischen Polysacchariden ist abhängig von der gleichzeitigen Anwesenheit verschiedener, synergistisch wirkender Enzymaktivitäten (Zverlov und Schwarz, 2008). So sind für die Hydrolyse substituierter Heteropolysaccharide, wie z.B. Xylan, mindestens drei glycosidspaltende Enzymaktivitäten nötig (die Abspaltung von Estersubstituenten nicht berücksichtigend): eine Endo-Glycosidhydrolase zur Hydrolyse des Polysaccharid-Rückgrats, eine akzessorische Glycosidhydrolase zur Abspaltung von Substitutionen und eine α/β -Glycosidase zur Hydrolyse freigesetzter Oligosaccharide (Abbildung 4.1) (de Vries und Visser, 2001). Die Anzahl der benötigten Enzymaktivitäten ist dabei abhängig von der Komplexität des Polysaccharids und den enthaltenen Monosacchariden (Tabelle 4.1). In dieser Arbeit wurden die Aktivitäten von

α/β -Glycosidasen mit *p*NP-Glycosiden und die Aktivitäten von endo-wirkenden und akzessorischen Glycosidhydrolasen mit gereinigten Polysacchariden ermittelt.

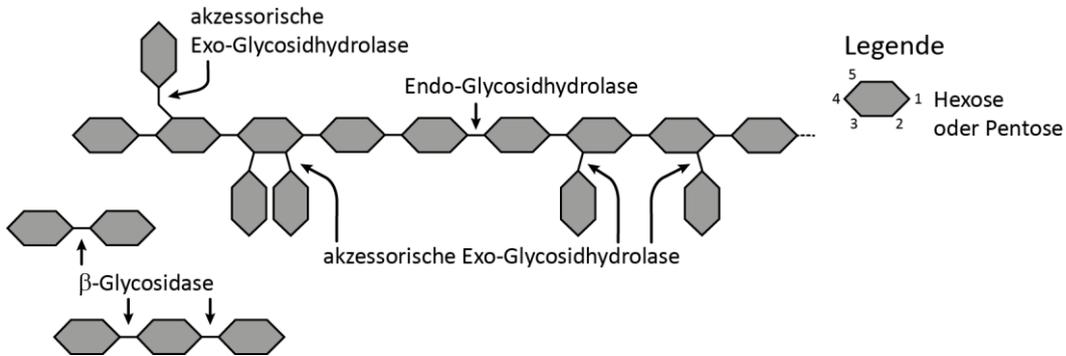


Abbildung 4.1 Allgemeine schematische Struktur hemicellulöser Heteropolysaccharide mit Enzymaktivitäten für die Hydrolyse. Strukturinformationen und Enzymaktivitäten wurden abgeleitet aus: Ebringerová *et al.* (2005), Scheller und Ulvskov (2010), Moreira und Filho (2008) und de Vries und Visser (2001).

Tabelle 4.1 Enzymaktivitäten für die Hydrolyse hemicellulöser und Hemicellulose-assoziiierter Polysaccharide

Polysaccharid	Endo-Glycosidhydrolasen	akzessorische Glycosidhydrolasen	α/β -Glycosidasen
		Arabinoxylan	
Xylan	Endo- β -Xylanase	Arabinofuranohydrolase α -Arabinofuranosidase α -Glucuronidase	β -Xylosidase
β -Glucan	Endo- β -Glucanase	-	β -Glucosidase
Mannan	Endo- β -Mannanase	α -Galactosidase	β -Mannosidase β -Glucosidase
Xyloglucan	Endo- β -Glucanase (Xyloglucanase)	verschiedene α/β -Glycosidasen	β -Glucosidase
Arabinan	Endo-Arabinanase	α -Arabinofuranosidase Exo-Galactanase,	α -Arabinofuranosidase
Galactan	Endo-Galactanase	β -Galactosidase α -Arabinofuranosidase	β -Galactosidase

Literatur: de Vries und Visser (2001), Biely *et al.* (2016), Edashige und Ishii (1998) und Moreira und Filho (2008).

In Biogasanlagen und verrottender Biomasse wird Lignocellulose von synergistischen, mikrobiellen Konsortien depolymerisiert. Vergleichbar mit der synthetischen Kultur aus *C. stercorarium* und *C. thermocellum*, unterstützen sich die Mitglieder dieser Konsortien und sekretieren ein gemeinsames Enzymsystem zur Hydrolyse der Polysaccharide (Maus *et al.*, 2016; Zuroff und Curtis, 2012). Fehlende Enzymaktivitäten einzelner Spezies können durch das Konsortium bereitgestellt werden.

Die sekretierten *C. stercorarium* Enzyme, die aus Kulturüberständen mit Xylan oder Cellulose als Kohlenstoffquelle präzipitiert wurden, hydrolysierten jeweils 15 der 26 getesteten Polysaccharide (Abbildung 3.1), vorzugsweise lösliche Xylane und β -Glucan aus Gerste. Neben Xylanen und β -Glucanen wurden auch Glucomannan, Galactan und Xyloglucan hydrolysiert. Die bestimmten

Aktivitäten gehen über die Ergebnisse von Adelsberger *et al.* (2004) hinaus, in denen hohe hemicellulolytische Aktivitäten des Kulturüberstandes von *C. stercorarium*, kultiviert auf Cellobiose, für Arabinoxylan und β -(1,3; 1,4)-Glucan beschrieben wurden. Die signifikant höhere Aktivität der Xylan-Proteinpräparation für β -Glucane, sowie die höhere Aktivität der Cellulose-Proteinpräparation für Xylane sind vermutlich präparationsbedingt und auf eine CBM-vermittelte Bindung an Xylane bzw. β -Glucane zurückzuführen. Xyn11A und Xyn10C enthalten CBMs, die spezifisch an Xylane binden, während die CBMs von Cel9Z Glucan-spezifisch sind. Durch die Bindung an die Polysaccharide reduziert sich die Konzentration der freien Enzyme im Kulturüberstand, wodurch geringere Mengen der Enzyme mit Substrat-spezifischen CBMs präzipitiert werden können (Riedel *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2005). *C. stercorarium* wuchs schneller mit Xylan (Haferspелzen) als Kohlenstoffquelle und sekretierte, im Vergleich zum Wachstum auf Cellulose, die dreifache Menge an Proteinen. Dies deutet darauf hin, dass *C. stercorarium* Xylan als Kohlenstoffquelle gegenüber kristalliner Cellulose bevorzugt. Adelsberger *et al.* (2004) beschrieben eine um 9,5-fach höhere β -Xylosidase- und Xylanase-Aktivität, wenn *C. stercorarium* mit Xylose oder Arabinose anstatt mit Glucose kultiviert wurde, wobei eine Induktion durch die Pentosen und/oder eine Katabolitrepression durch Glucose eine Rolle spielen könnten. Im Vergleich zum Wachstum auf Glucose wurde die Transkription der Gene *xynA*, *bxIA* und *bxIB* durch Xylan als Kohlenstoffquelle um 60–90 % erhöht (Adelsberger *et al.*, 2004).

Zweiunddreißig Glycosidhydrolasen sowie zwei Kohlenhydratesterasen der heterolog in *E. coli* produzierten, hemicellulolytischen Enzyme zeigten hydrolytische Aktivität (siehe Kapitel 3.3.1), während für 24 der rekombinanten Proteine keine Aktivität bestimmt werden konnte. Mögliche Gründe für die nicht identifizierten Aktivitäten könnten, neben einer fehlerhaften Proteinfaltung in *E. coli*, fehlende Substrate oder Cofaktoren, sowie pH- und Temperaturoptima sein, die sich signifikant von den verwendeten Reaktionsbedingungen (pH 6,0; 60 °C) unterscheiden. So wurde gezeigt, dass RamB bei 50 °C eine signifikant höhere Aktivität besaß als bei 60 °C. Das pH-Optimum der von Suryani *et al.* (2004) charakterisierten β -Xylosidase Xyl43B, die in dieser Arbeit keine Aktivität zeigte, liegt bei pH 3,5, während die Aktivität der von Bronnenmeier *et al.* (1995) charakterisierten α -D-Glucuronidase Agu67A in dieser Arbeit nicht nachgewiesen wurde, da die benötigten Substrate (z.B.: 4-O-Methyl- β -D-Xylotriöse) nicht erhältlich waren. So ist es möglich, dass die Aktivitäten weiterer untersuchter Proteine infolge der limitierten Reaktionsbedingungen oder fehlender Substrate unentdeckt geblieben sind.

Elf Glycosidhydrolasen und vier Kohlenhydratesterasen der untersuchten, hemicellulolytischen Proteine scheinen von *C. stercorarium* sekretiert zu werden, da für diese Proteine *N*-terminale Proteinsequenzen mit Signalpeptid-typischen Domänen vorhergesagt wurden (Tabelle 3.2). Das Proteom von *C. stercorarium*, kultiviert mit Cellobiose als Kohlenstoffquelle, wurden von Broeker *et al.* (2018) mittels Massenspektrometrie analysiert. Sechsendvierzig der in dieser Arbeit untersuchten Glycosidhydrolasen wurden im Sekretom und/oder im intrazellulären Proteom detektiert; nur die Proteine Axh43A, Xyn105F, BglA und AGC67892.1 konnten nicht nachgewiesen werden. Die Xylanasen Xyn11A und Xyn10B wurden vollständig sekretiert, während Bxl31A, Arf43C, AGC67127.1 und AGC68046.1 nur intrazellulär vorlagen. Neben Xyn11A und Xyn10B zählten Cel9Z und Xyn10C zu den 35 % der häufigsten Proteine im Sekretom und zu den 5 % (Cel9Z) bzw. 40 % (Xyn10C) der seltensten Proteine des intrazellulären Proteoms. Man26A und Gal53A gehörten ebenso zu den seltensten Proteinen (10 %) im intrazellulären Proteom. Alle sechs Enzyme hydrolysieren das Rückgrat von Polysacchariden und können, infolge der mit dem jeweiligen Gen assoziierten Signalpeptide, als extrazelluläre Enzyme angesehen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass *C. stercorarium* ein effektives System zur Sekretion von endo-wirkenden Glycosidhydrolasen besitzt, speziell für die wichtigsten Endo- β -Xylanasen (Broeker *et al.*, 2018).

4.2 Hydrolyse von Arylglycosiden

Vierzehn der untersuchten *C. stercorarium* Glycosidhydrolasen hydrolysierten ausschließlich die glycosidische Bindung von *p*NP-Glycosiden. Neben den in der Literatur beschriebenen Enzymen Bxl39A, Xyl43A, Xyl43B und Ram78A, wurden neun Enzyme mit bisher unbekanntem Aktivitäten identifiziert: die drei β -D-Galactosidasen Bga2C, Bga2D und Bga2E, die zwei β -D-Xylosidasen Bxl43C und Bxl31D, die β -D-Glucosidase BglA, die α -L-Arabinofuranosidase ArfD, die α -L-Rhamnosidase RamB, die β -D-Glucuronidase Uid2A sowie die *N*-Acetyl- β -D-Glucosaminidase Nag2A (Tabelle 3.3) (Adelsberger *et al.*, 2004; Sakka *et al.*, 1993b; Suryani *et al.*, 2004; Zverlov *et al.*, 2000). Mit Ausnahme von Bxl31D entsprachen die ermittelten Enzymaktivitäten den bekannten Aktivitäten der jeweiligen GH-Familien. Während jedoch Glycosidhydrolasen der Familie GH31 überwiegend α -glycosidische Bindungen hydrolysieren, spaltete Bxl31D ausschließlich *p*NP- β -D-Xylopyranosid, eine bisher unbekannte und somit neue Aktivität für die GH-Familie 31 (Lombard *et al.*, 2014). Die Enzyme BglA, ArfD und RamB enthalten GH-Module (GHnc), die keiner GH-Familie der in dieser Arbeit verwendeten Annotation zugeordnet werden konnten (Lombard *et al.*, 2014). In der aktuellen Annotation der GH-Familien werden ArfD und RamB jedoch der GH-Familie 106 zugeordnet (<http://www.cazy.org/b2475.html>; am 11.06.2019). Die sechs charakterisierten

Enzyme dieser Familie spalten α -L-Rhamnose von α -L-Rhamnosiden oder Rhamnogalacturonan-oligosacchariden ab. Während die α -L-Rhamnosidase-Aktivität von RamB den beschriebenen Aktivitäten der Familie entspricht, zeigte die α -L-Arabinofuranosidase ArfD eine bisher unbekannte Aktivität für die GH-Familie 106. Die Glycosidhydrolase BglA könnte das erste charakterisierte Enzym sein, welches eine neue GH-Familie definiert.

Keine der vierzehn identifizierten Arylhydrolasen schien eine Funktion bei der Hydrolyse der getesteten Polysaccharide zu haben. Einige Glycosidhydrolasen, wie α -Glucuronidasen der Familie GH67, besitzen nur Aktivität für Oligosaccharide (Biely *et al.*, 2016). Die beschriebenen Enzyme könnten daher, neben den ermittelten Aktivitäten, Oligosaccharide oder auch Polysaccharide hydrolysieren, die in dieser Arbeit nicht getestet wurden. So wurde von Adelsberger *et al.* (2004) beschrieben, dass Bxl39A Xylobiose hydrolysiert und Suryani *et al.* (2004) zeigten, dass Xyl43B Xylan aus Haferspelzen und Birke hydrolysiert. Beide Enzyme besaßen jedoch deutlich höhere Aktivitäten für *p*NP-Glycoside (Adelsberger *et al.*, 2004; Suryani *et al.*, 2004). Ram78A spaltet hingegen die pflanzlichen Flavonoidglycoside Naringin und Hesperidin, die in den Schalen von Zitrusfrüchten vorkommen (Zverlov *et al.*, 2000). Die Funktion spezifischer Arylhydrolasen könnte in der Entgiftung von Arylglycosiden liegen (Zverlov und Schwarz, 2008).

4.3 Hydrolyse von verschiedenen Polysacchariden

Die rekombinanten Glycosidhydrolasen hydrolysierten summiert betrachtet, mit Ausnahme von Pullulan, Pachyman und Polygalacturonsäure, die gleichen Polysaccharide wie das Sekretom, zeigten jedoch zusätzlich hydrolytische Aktivität für Arabinan, Mannan und Galactomannan. Die Arabinanase Abn43A und die Mannanase Man26A zählten zu den selteneren Proteinen im Sekretom, weshalb weder Arabinanase- noch Mannanase-Aktivität im Sekretom nachgewiesen werden konnten (Broeker *et al.*, 2018). Fünf mögliche Pullulanasen mit einem GH13-Modul wurden im Genom identifiziert, aber aufgrund fehlender hemicellulolytischer Aktivitäten der GH-Familie in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Diese Enzyme könnten die Aktivität des Sekretoms für Pullulan und Pachyman erklären (Stam *et al.*, 2006). Die glycosidischen Bindungen zwischen den D-Galacturonsäureeinheiten in Polygalacturonsäure werden häufig von Polysaccharidlyasen (PL) gespalten (Lombard *et al.*, 2010). Im Genom von *C. stercorarium* sind sieben Proteine mit einem PL-Modul kodiert, deren Charakterisierung war jedoch ebenso nicht das Ziel dieser Arbeit (Lombard *et al.*, 2014).

Siebzehn Glycosidhydrolasen hydrolysierten das Rückgrat von Polysacchariden oder spalteten Substitutionen ab und wurden biochemisch charakterisiert (Tabelle 3.4 und Tabelle 3.5). Zehn der Enzyme werden in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben, darunter die Mannanase Man26A, die Arabinanase Abn43A, die Galactanase Gal53A, die Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase Axb43A, die α -L-Arabinofuranosidase Arf43C und die zwei β -D-Galactosidasen Bga2B und Bga35A. Während Arabinoxylan und Arabinan durch Kombination rekombinanter Enzyme zu Monosacchariden hydrolysiert werden konnten, wurden β -Glucane, Mannane, Galactane und Xyloglucan in dieser Arbeit nur mit Einzelenzymen hydrolysiert. Für eine vollständige Hydrolyse von Mannan oder Xyloglucan wurden zudem entscheidende Enzymaktivitäten nicht identifiziert. Die Hydrolyse von Mannan erfordert β -Mannosidasen und für eine Hydrolyse von Xyloglucan wird mindestens eine Xyloglucanase benötigt (Alvarez *et al.*, 2016). Nur für drei der in *C. stercorarium* identifizierten GH-Familien sind β -Mannosidasen oder Xyloglucanasen beschrieben worden. So wurden bestimmte Enzyme der GH-Familien 9 und 26 als Xyloglucanasen und Proteine der GH-Familie 2 als β -Mannosidasen charakterisiert (Lombard *et al.*, 2014). Jedoch konnte weder für Cel9Z oder Man26A noch für eines der fünf GH2-Enzyme Mannosidase- bzw. Xyloglucanase-Aktivität nachgewiesen werden. Während die Temperaturoptima von elf der dreizehn charakterisierten Enzyme (57–76 °C) bei den verwendeten Bedingungen in etwa der optimalen Wachstumstemperatur (65 °C) von *C. stercorarium* entsprechen, bevorzugen die Enzyme, unabhängig ob intra- oder extrazellulär, mit pH 5,0–6,5 einen etwas niedrigeren pH als das Bakterium (pH 7,3) (Madden, 1983).

4.3.1 Partielle und vollständige Hydrolyse von Xylanen

Die enzymatische Hydrolyse von Heteroxylanan erfordert den synergistischen Einsatz von Endo- β -1,4-Xylanase, β -Xylosidase und akzessorischen Enzymen, wie α -L-Arabinofuranosidasen und α -D-Glucuronidasen (Biely *et al.*, 2016). Zehn rekombinante Glycosidhydrolasen zeigten Aktivität für Xylane, sechs Xylanasen, drei α -L-Arabinofuranosidasen und eine β -Xylosidase (Tabelle 3.4). Die Relevanz der Xylane als Kohlenstoffquelle für *C. stercorarium* spiegelt sich in der Anzahl von Xylanasen wieder, die das Bakterium produziert. Neben den gut charakterisierten, extrazellulären Xylanasen Xyn11A, Xyn10B und Xyn10C, wurden drei weitere Endo- β -1,4-Xylanasen identifiziert: Xyn10D, Xyn10E und Xyn105F. Die höchste Aktivität der Xylanasen wurde jeweils bei der Hydrolyse von löslichem Arabinoxylan aus Weizen gemessen. Xyn10B und Xyn10C hydrolysierten zusätzlich β -(1,3;1,4)-Glucane, eine bekannte Nebenaktivität von GH10 Xylanasen (Chakdar *et al.*, 2016). Die ermittelten Aktivitäten der Xylanasen Xyn11A, Xyn10B und Xyn10C, sowie die Nebenaktivität der

GH10 Xylanasen entsprechen den Aktivitäten, die von Adelsberger *et al.* (2004) beschrieben wurden. Obwohl Xyn10C eine niedrigere Aktivität für Xylane hat, zeigte das Enzym, im Vergleich mit Xyn10B, eine höhere Aktivität für Gersten- β -Glucan. Diese erklärt sich durch die bevorzugte Bindung des CBM9 und der CBM22-Module von Xyn10C an β -(1,3;1,4)-Glucane (Zhao *et al.*, 2005). Xyn11A zeigte, im Gegensatz zu den GH10 Xylanasen, eine vergleichsweise hohe Aktivität für unlösliches Arabinoxylan, die durch die hohe Spezifität der drei CBM6-Module für unlösliche Xylane bedingt ist (Sun *et al.*, 1998). Die pH- und Temperaturoptima der Xylanasen Xyn11A, Xyn10B, Xyn10C und Xyn10D liegen zwischen pH 5,5–6,0 und 65–76 °C und entsprechen somit den Ergebnissen früherer Arbeiten (Adelsberger *et al.*, 2004).

Xyn105F ist die erste Glycosidhydrolase mit einem GH105-Modul, für die eine Endo-Xylanase-Aktivität beschrieben wurde. Xyn105F hydrolysierte lösliches Arabinoxylan und weitere Xylane mit einer niedrigen, aber signifikanten Aktivität. In Übereinstimmung zeigten Broeker *et al.* (2018), dass Xyn105F Xylopentaose zu Xylobiose und Xylose hydrolysiert. Die Familie GH105 enthielt bislang ausschließlich ungesättigte Rhamnogalacturonyl- und β -Glucuronyl-Hydrolasen sowie α -Galacturonidasen (Itoh *et al.*, 2006; Lombard *et al.*, 2014). Xyn105F zeigte keine Aktivität für Rhamnogalacturonan I, jedoch ist es möglich, dass die Hauptaktivität des Enzyms in dieser Arbeit nicht identifiziert wurde. Xyn105F gehörte zu den vier Proteinen, die von *C. stercorarium*, kultiviert auf Cellobiose, nicht produziert wurden (Broeker *et al.*, 2018).

Die ermittelten Produktspezifitäten von Xyn11A und Xyn10B entsprachen den in der Literatur beschriebenen Spezifitäten für GH11 und GH10 Xylanasen (Abbildung 3.6). Xyn11A produzierte überwiegend Xylose, X_2 , X_3 , XA^3XX und $XA^{2+3}XX$, während Xyn10B Xylose, X_2 , A^3X und $A^{2+3}XX$ freisetzte. GH11 Xylanasen benötigen drei unsubstituierte Xylosen zwischen substituierten Xyloseeinheiten um Xylan zu hydrolysieren und setzen AXOS mit mindestens vier Xyloseeinheiten und einer unsubstituierten Xylose am nicht reduzierenden Ende frei. GH10 Xylanasen benötigen hingegen nur zwei unsubstituierte Xyloseeinheiten um das Xylanrückgrat zu spalten und hydrolysieren Arabinoxylan, abhängig von der Position der Arabinosylierung, eine (O-3) oder zwei (O-2) Xyloseeinheiten nach einer Substitution. Zusätzlich können GH10 Xylanasen die glycosidische Bindung vor einer substituierten Xylose hydrolysieren und setzen daher AXOS mit mindestens zwei Xyloseeinheiten und einer substituierten Xylose am nicht reduzierenden Ende frei. GH11 Xylanasen produzieren X_2 und X_3 , während GH10 Xylanasen X_3 zu X_2 und Xylose hydrolysieren können und üblicherweise mehr Xylose produzieren als GH11 Xylanasen (Biely *et al.*, 2016). Während Xyn10B insgesamt mehr Produkte aus löslichem Arabinoxylan freisetzte, hydrolysierte

Xyn11A größere Mengen XOS aus unlöslichem Homoxylan. GH10 Xylanasen, wie Xyn10B, können wegen ihrer geringeren Substratspezifität hoch substituierte Heteroxylane besser spalten als GH11 Xylanasen, die bevorzugt unsubstituierte Xylanregionen hydrolysieren (Pollet *et al.*, 2010). Die Aktivität von Xyn11A für unlösliches Homoxylan wird durch drei xylanspezifischen CBM6-Module begünstigt (Sun *et al.*, 1998).

Die Substratspezifität der Xylanasen Xyn11A, Xyn10B, Xyn10C, Xyn10D und Xyn105F wurde von Broeker *et al.* (2018) durch eine enzymatische Hydrolyse von Xylopentaose und einzelnen AXOS bestimmt. Alle fünf Xylanasen hydrolysierten Xylopentaose zu Xylotriose und Xylobiose oder zwei Xylobiosen und Xylose. Jedoch spalteten nur die GH10 Xylanasen Xyn10B, Xyn10C und Xyn10D Xylose von verschiedenen AXOS ab. Xyn10B und Xyn10C hydrolysierten die glycosidische Bindung zwischen einer unsubstituierten Xyloseeinheit und einer substituierten Xylose am nicht reduzierenden Ende von AXOS. Im Gegensatz zu Xyn10B konnte Xyn10C jedoch nicht die terminale Xylose neben *O*-2 arabinosylierten Xyloseeinheiten (XA²XX, XA²⁺³XX) abspalten. Xyn10D unterschied sich signifikant von den anderen beiden GH10 Xylanasen und hydrolysierte die zweite β -(1,4)-Bindung nach Arabinosylierungen am reduzierenden Ende von AXOS (Broeker *et al.*, 2018). Ein vergleichbarer hydrolytischer Mechanismus wurde für die Xylanase Xyn10B von *Herbinix hemicellulolytica* beschrieben (Mechelke *et al.*, 2017b). Die Unterschiede in den Produkt- und Substratspezifitäten der Xylanasen deuten darauf hin, dass für die vollständige Hydrolyse von Heteroxylanen verschiedene Xylanase-Aktivitäten erforderlich sind.

Xyn11A und Xyn10B sind wegen ihrer hohen Aktivitäten und der effektiven Sekretion in die extrazelluläre Umgebung wichtigste Endo- β -Xylanasen für den Xylanabbau durch *C. stercorarium*. Die Temperaturoptima von Xyn11A und Xyn10B liegen mit 67 °C bzw. 76 °C im Bereich des Temperaturoptimums der *C. thermocellum* Xylanase Xyn10X (T_{opt} : 70 °C) und damit über der optimalen Wachstumstemperatur von *C. stercorarium* von 65 °C (Kim *et al.*, 2000; Madden, 1983). Beide Xylanasen zeigten eine hohe Thermostabilität bei 60 °C und besaßen nach 48 h Inkubation ohne Substrat noch 55 % (Xyn11A) bzw. 90 % (Xyn10B) ihrer Aktivität (Abbildung 3.8). Unter der Annahme eines linearen Aktivitätsverlustes hat Xyn11A eine thermische Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von 52 h, während für Xyn10B eine Halbwertszeit von 161 h berechnet wurde. Xyn10X von *C. thermocellum* zeigte nach thermischer Inaktivierung bei 70 °C eine Halbwertszeit von nur 60 min (Kim *et al.*, 2000). Die *C. stercorarium* Xylanasen Xyn11A und Xyn10B sind bei 60 °C deutlich thermostabiler als Xylanasen von *Bacillus stearothermophilus* No. 236 ($t_{1/2}$: 147 min), *Geobacillus thermodenitrificans* C5 ($t_{1/2}$: 18 min) und *Aspergillus sydowii* MG49 ($t_{1/2}$: 165 min) (Ghosh und

Nanda, 1994). Obwohl die Thermostabilität der Xylanasen XynA (GH11) von *B. stearrowophilus* und GthC5Xyl (GH10) von *G. thermodenitrificans* durch den gezielten Austausch von Aminosäuren verbessert werden konnten (Irfan *et al.*, 2018; Jeong *et al.*, 2007), sind die Mutanten mit Halbwertszeiten von 386 min bzw. 240 min thermolabiler als Xyn11A und Xyn10B. Hingegen besaß die GH11 Xylanase von *Actinomadura sp.* Cpt20, mit einem Temperaturoptimum von 70 °C, nach 5 Tagen Inkubation bei 60 °C noch 100 % Aktivität (Taibi *et al.*, 2012). Die GH10 Xylanasen XynA1 und XynA2 von *G. thermodenitrificans* NG80-2 hatten nach 24 h Inkubation bei 55 °C oder 65 °C noch 80 % bzw. über 50 % ihrer Aktivität und zeigen somit eine ähnliche Thermostabilität wie Xyn11A (Huang *et al.*, 2017).

Weder Xyn11A noch Xyn10B wurden bei der Hydrolyse von Arabinoxylan durch 333 mM (50 g/l) D-Xylose im Reaktionsansatz inhibiert (Abbildung 3.10), was auf eine hohe Resistenz gegen Endproduktinhibition schließen lässt. Bachmann und McCarthy (1991) charakterisierten das Xylanhydrolysierende Enzymsystem von *Thermomonospora fusca* und zeigten, dass diese Endo-Xylanasen durch 20 mM D-Xylose nicht inhibiert wurden. Eine Konzentration von 0,9 µM Xylobiose im Reaktionsansatz führte hingegen zu einer spezifischen Produktinhibition und einer Reduzierung der Xylanase-Aktivität von *T. fusca* um 20 % (Bachmann und McCarthy, 1991). Eine Produktinhibition mit Xylobiose wurde in dieser Arbeit nicht untersucht und ist auch bei Xyn11A und Xyn10B möglich.

Arf43A, Arf51B und Bxl3B zeigten jeweils geringe Aktivität bei der Hydrolyse von Xylanen sowie α -L-Arabinofuranosidase- und β -Xylosidase-Aktivität gegenüber *pNP*-Glycosiden (Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4). Dies entspricht den Ergebnissen früherer Charakterisierungen der Enzyme (Adelsberger *et al.*, 2004; Schwarz *et al.*, 1990). Arf43A wurde von Adelsberger *et al.* (2004) als α -L-Arabinofuranosidase beschrieben, besaß in dieser Arbeit jedoch eine höhere Aktivität für *pNP*- β -D-Xylopyranosid. In Übereinstimmung zeigten Broeker *et al.* (2018), dass Arf43A, vergleichbar mit Bxl3B, ausschließlich Xylose von XOS und AXOS abspaltet und somit eher als β -Xylosidase charakterisiert werden kann. Wie bereits von Schwarz *et al.* (1995a) beschrieben wurde, dearabinsylierte Arf51B lösliches Arabinoxylan, zeigte aber eine höhere Aktivität bei der Hydrolyse von Arabinan.

Neben Arf51B dearabinsylierte auch Axh43A lösliches Arabinoxylan, wobei die Aktivität von Axh43A 130-mal höher war als die Aktivität von Arf51B. Im Gegensatz zu Arf51B zeigt Axh43A jedoch eine sehr geringe Aktivität für Arabinan und eine 146-fach niedrigere Aktivität für *pNP*- α -L-Arabinofuranosid. Axh43A und Arf51B hydrolysierten 94 % bzw. 31 % der Arabinsylierungen

im löslichen Arabinoxylan aus Weizen (Abbildung 3.7). Infolge der Dearabinosylierung präzipitierten 74 % (Axx43A) bzw. 33 % (Arf51B) des Arabinoxylans als unlösliches Polysaccharid (Abbildung 3.16). Indem Arabinosylierungen eine intermolekulare Aggregation der Xylanpolymere durch nicht-kovalente Bindungen verhindern, erhöhen sie die Löslichkeit von Xylanen. Aus diesem Grund sind über 15 % der Xyloseeinheiten im Rückgrat wasserlöslicher Xylane substituiert, wohingegen unsubstituierte Xylanpolymere als unlösliches Xylan präzipitieren (Andrewartha *et al.*, 1979; Ebringerová *et al.*, 2005). Chimphango *et al.* (2012) produzierten mit der α -L-Arabinofuranosidase Abf54B von *Aspergillus niger* Xylanhydrogele aus Arabinoxylan. Im Gegensatz zu Axx43A und Arf51B hydrolysierte Abf54B jedoch nur 20 % der Arabinosylierungen in Arabinoxylan aus Weizen und Haferspelzen (Chimphango *et al.*, 2012). Die Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase Xyn43D von *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ATCC 6061 spaltet spezifisch α -L-Arabinofuranosyleinheiten von, an Position O-2 oder O-3, monosubstituierten Xyloseeinheiten ab und hydrolysiert im Durchschnitt 80 % der Monosubstitutionen in Arabinoxylan. Aus Arabinoxylan mit einem Arabinose zu Xylose Verhältnis von 0,68, welches in etwa dem A/X Verhältnis des, in dieser Arbeit verwendeten, löslichen Arabinoxylans aus Weizen (0,58) entspricht, setzte Xyn43D 66 % der Monosubstitutionen frei. Dies entsprach jedoch nur 9 % der gesamten Arabinosylierungen, da hohe A/X Verhältnisse primär die Folge eines Anstiegs der disubstituierten Xyloseeinheiten sind (Bourgeois *et al.*, 2007).

Sorensen *et al.* (2007) zeigten durch $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Analyse des löslichen Arabinoxylans aus Weizen, dass ungefähr 1/3 der Arabinofuranosyleinheiten am O-3 einfach substituierter Xyloseeinheiten gebunden sind, während 2/3 der Arabinosesubstitutionen disubstituierten Xyloseeinheiten zugeordnet werden können. Die Hydrolyse von 94 % der Arabinosylierungen deutet darauf hin, dass zumindest Axx43A Mono- und Diarabinosylierungen hydrolysiert. Durch die Bestimmung der Substratspezifität mit Oligosacchariden zeigten Broeker *et al.* (2018), dass Axx43A und Arf51B sowohl mono- und als auch disubstituierte AXOS vollständig dearabinosylieren. Somit gehören beide Enzyme zur AXHB-md 2,3 Unterklasse der Arabinoxylan α -L-Arabinofuranohydrolasen (Numan und Bhosle, 2006). Interne Disubstitutionen des Xylanrückgrats mit L-Arabinose wurden als nicht oder nur schlecht hydrolysierbare Substrate beschrieben und inhibieren die vollständige Hydrolyse von Arabinoxylan. Die Fähigkeit Diarabinosylierungen zu spalten, wurde bislang ausschließlich für einige GH51 α -L-Arabinofuranosidasen beschrieben. So hydrolysiert die GH51 α -L-Arabinofuranosidase Abf51 von *Xanthomonas citri* die Arabinosylierungen in XA²⁺³XX (Dos Santos *et al.*, 2018). Axx43A ist die erste charakterisierte Arabinoxylan Arabinofuranohydrolase der Familie GH43, die L-Arabinose von mono- und diarabinosylierten Xyloseeinheiten freisetzt.

Neben zwei GH43-Modulen enthält Axx43A ein xylanspezifisches CBM der Familie 6, welches die akzessorische Aktivität durch räumliche Nähe zum Xylanrückgrat erhöht (Mewis *et al.*, 2016). Auch die Arabinoxylan Arabinofuranohydrolasen Xyn43D von *B. subtilis* subsp. *subtilis* ATCC 6061, Axx43A von *B. licheniformis* SVD1 und Abf43A von *Bacillus* sp. BP-7 enthalten neben einem GH43-Modul jeweils ein CBM6. Im Kontrast zu Axx43A spalten die drei *Bacillus* Enzyme L-Arabinose spezifisch nur von einfach arabinosylierten Xyloseeinheiten ab und wurden als AXH-m 2,3 Arabinofuranohydrolasen klassifiziert (Bourgois *et al.*, 2007; Sakka *et al.*, 2012; Valls *et al.*, 2016). Die Fähigkeit, Diarabinosylierungen zu hydrolysieren, könnte mit dem zweiten GH43-Modul von Axx43A zusammenhängen. Bei der Kultivierung auf Cellobiose wurde Axx43A weder im *C. stercorarium* Sekretom noch im Proteom nachgewiesen (Broeker *et al.*, 2018).

Axx43A zeigte mit 56 % Aktivität nach 48 h Inkubation bei 60 °C und einer Halbwertszeit von 56 h eine vergleichbare Thermostabilität wie Xyn11A. Die β -Xylosidase Bxl3B besaß hingegen bereits nach 24 h bei 60 °C keine Aktivität mehr und hat eine Halbwertszeit von nur 3,5 h (Abbildung 3.8). Obwohl das Temperaturoptimum von Bxl3B 5 °C über dem Temperaturoptimum von Axx43A (61 °C) liegt, ist Axx43A das deutlich thermostabilere Enzym. Die α -L-Arabinofuranosidase von *B. stearothermophilus* T-6 zeigte mit einer Halbwertszeit von 53 h bei 60 °C eine ähnliche Thermostabilität wie Axx43A, während die α -L-Arabinofuranosidase Abf von *Ruminococcus albus* 7 mit 31 % Aktivität nach 3 h Inkubation bei 60 °C deutlich thermolabiler ist (Gilead und Shoham, 1995; Yang *et al.*, 2016). Die GH43 α -Arabinofuranosidase Axb8 von *C. thermocellum* hat nach 2 h Inkubation bei 60 °C noch 60 % ihrer Aktivität (de Camargo *et al.*, 2018). Die β -Xylosidase von *Caldocellum saccharolyticum* hat bei 65 °C eine Halbwertszeit von 4,85 h, während die β -Xylosidasen XynB1, XynB2 und XynB3 von *G. thermodenitrificans* NG80-2 nach Inkubation bei 75 °C für 5, 3 bzw. 6 Tage über 40 % Restaktivität besaßen und somit deutlich thermostabiler sind als Bxl3B und auch Axx43A von *C. stercorarium* (Huang *et al.*, 2017; Hudson *et al.*, 1991).

Bxl3B, Axx43A und Arf51B wurden bei der Hydrolyse von pNP-Glycosiden durch die Reaktionsendprodukte L-Arabinose und D-Xylose inhibiert (Abbildung 3.9). Dabei wurde die β -Xylosidase ebenso wie die α -L-Arabinofuranosidasen deutlich stärker durch das eigene Spaltprodukt als durch das zweite Monosaccharid inhibiert. Bxl3B besaß bei 333 mM (50 g/l) D-Xylose im Reaktionsansatz noch 8 % Restaktivität. Die β -Xylosidase von *C. saccharolyticum* wird durch D-Xylose geringer inhibiert und zeigt bei 250 mM D-Xylose noch 54 % Aktivität. Mit Restaktivitäten von 88 % bei 33 mM bzw. 85 % bei 50 mM L-Arabinose werden Bxl3B und die *C. saccharolyticum* β -Xylosidase vergleichbar durch L-Arabinose inhibiert (Hudson *et al.*, 1991). Auch die β -Xylosidasen XynB1,

XynB2 und XynB3 von *G. thermodenitrificans* NG80-2 sind deutlich insensitiver gegenüber D-Xylose als Bxl3B. Während XynB3 bei 300 mM D-Xylose nur 50 % Restaktivität besitzt, zeigt XynB2 bei 400 mM 70 % und bei 800 mM D-Xylose immer noch 30 % Aktivität (Huang *et al.*, 2017).

Axh43A und Arf51B wurden durch D-Xylose kaum inhibiert und besaßen bei 333 mM D-Xylose über 80 % ihrer Aktivität, verloren durch Inhibition mit 333 mM L-Arabinose jedoch 99 % bzw. 35 % ihrer Aktivität. Bei einer Konzentration von 133 mM L-Arabinose zeigten Axh43A und Arf51B 12 % bzw. 83 % Restaktivität (Abbildung 3.9). Die α -L-Arabinofuranosidasen Abf51A und Abf51B von *Corynebacterium alkanolyticum* besaßen bei 100 mM L-Arabinose noch 73 % bzw. 92 % Aktivität und zeigten eine vergleichbare Sensitivität gegenüber L-Arabinose wie Arf51B. Bei einer Konzentration von 100 mM D-Xylose wurde die Aktivität von Abf51A um 17 % reduziert, wohingegen Abf51B kaum inhibiert wurde (Kuge *et al.*, 2017). Im Gegensatz zu den *C. stercorarium* Xylanasen Xyn10B und Xyn10A, zeigten die akzessorischen Enzyme Bxl3B und Axh43A eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber einer Produktinhibition durch ihre Reaktionsendprodukte als vergleichbare Enzyme.

Endo- β -1,4-Xylanasen, α -L-Arabinofuranosidasen und β -Xylosidasen wirken bei der Hydrolyse von Weizen-Arabinoxylan synergistisch zusammen (Sorensen *et al.*, 2007). Adelsberger *et al.* (2004) rekonstituierten das Enzymsystem von *C. stercorarium* für die Hydrolyse von Arabinoxylan mit rekombinanten Enzymen und zeigten, dass Xyn11A oder Xyn10C in Kombination mit Arf51B und Bxl3B deesterifiziertes Arabinoxylan vollständig zu Xylose und Arabinose hydrolysieren. In dieser Arbeit wurden, neben den von Adelsberger *et al.* (2004) beschriebenen Enzymen Xyn11A, Xyn10B, Xyn10C, Arf51B und Bxl3B, vier weitere Glycosidhydrolasen identifiziert, die an der Hydrolyse von Arabinoxylan beteiligt sind: Xyn10D, Xyn10E, Xyn105F und Axh43A (Tabelle 3.4). Die Ergebnisse der Charakterisierung zeigen, dass Xyn10B, mit einer 4,5-fach höheren spezifischen Aktivität als Xyn10C und einer breiteren Produktspezifität im Vergleich zu Xyn11A, besser für die Hydrolyse von löslichem Weizen-Arabinoxylan geeignet ist als die von Adelsberger *et al.* (2004) eingesetzten Xylanasen Xyn10C und Xyn11A. GH10 Xylanasen hydrolysieren Heteroxylane in kürzere Produkte und sind daher die bessere Wahl für eine extensive Hydrolyse von Arabinoxylan in fermentierbare Monosaccharide (Pollet *et al.*, 2010). Entsprechend setzte Xyn10B bei der Hydrolyse von löslichem Weizen-Arabinoxylan über Nacht deutlich höhere Produktkonzentrationen frei als Xyn11A. Axh43A ist wiederum deutlich besser für die Dearabinosylierung von Arabinoxylan geeignet als die von Adelsberger *et al.* (2004) eingesetzte α -L-Arabinofuranosidase Arf51B. Durch die Substitution von Xyn11A bzw. Xyn10C mit Xyn10B und Arf51B mit Axh43A wird die Dearabinosylierung des Xylan-

rückgrats beschleunigt und die Hydrolyse stark arabinosylierter Xylanregionen verbessert, was in der Folge zu einer Optimierung des rekonstituierten *C. stercorarium* Enzymsystems führen könnte.

Sowohl in dieser Arbeit als auch in der Publikation von Adelsberger *et al.* (2004) wurde lösliches Arabinoxylan mit einer Kombination aus drei Enzymaktivitäten hydrolysiert. Biely *et al.* (2016) beschrieben, dass für die Hydrolyse von deesterifiziertem Arabinoxylan mit einer GH10 oder GH11 Endo-Xylanase in Kombination mit einer β -Xylosidase zwei α -L-Arabinofuranosidasen erforderlich sind: eine d3 α -L-Arabinofuranosidase, die spezifisch O-3 verknüpfte Arabinosylierungen an disubstituierten Xyloseeinheiten spaltet, und eine m2,3 α -L-Arabinofuranosidase, die Mono-substitutionen hydrolysiert. Da die AXHB-md 2,3 α -L-Arabinofuranosidasen Axh43A und Arf51B jedoch Mono- und Disubstitutionen hydrolysieren, wird für die Hydrolyse von Arabinoxylan nur eines der dearabinosylierenden Enzyme benötigt. α -L-Arabinofuranosidasen, die Arabinose von mono- und diarabinosylierten Xyloseeinheiten hydrolysieren sind attraktive Enzyme für industrielle Anwendungen, insbesondere für Technologien zur Herstellung von fermentierbaren Zuckern unter Verwendung von Arabinoxylan-reicher Biomasse wie Gräsern, Zuckerrohr oder Maisstroh, da durch ihre seltene Wirkungsweise die Anzahl der nötigen Enzymaktivitäten reduziert werden kann (Dos Santos *et al.*, 2018).

Bei der Hydrolyse von löslichem Weizen-Arabinoxylan mit Kombinationen der Xylanasen Xyn10B und Xyn11A mit Axh43A und Bxl3B wurden Synergismen zwischen den Endo-Xylanasen und den akzessorischen Enzymen festgestellt, nicht jedoch zwischen den Xylanasen (Abbildung 3.17). Die Kombination von Xyn10B oder Xyn11A mit Axh43A führte zu einem 1,2-fachen Anstieg der Menge an freigesetzten reduzierenden Zuckern gegenüber der addierten Aktivität der Einzelenzyme, unabhängig davon welche der beiden Xylanasen eingesetzt wurde. Auch die Kombination der Xylanasen mit Bxl3B zeigte einen synergistischen Effekt mit einer 1,30- und 1,34-fachen Aktivitätssteigerung für Xyn10B bzw. Xyn11A mit Bxl3B. Die Addition von Axh43A zu den Kombinationen aus Xyn10B oder Xyn11A mit Bxl3B erhöhte die Menge freigesetzter reduzierender Zucker um das 1,18- bzw. 1,16-fache (Abbildung 3.18). Die synergistische Wirkung der Kombination von Endo-Xylanasen, β -Xylosidasen und α -L-Arabinofuranosidasen wurde bereits mehrfach beschrieben, unter anderem für Enzyme von *Streptomyces* sp. PC22 (Raweesri *et al.*, 2008), *G. thermodenitrificans* NG80-2 (Huang *et al.*, 2017) und *B. subtilis* 168 (Rhee *et al.*, 2016). Vergleichbar mit dem Synergismusgrad zwischen Xyn10B oder Xyn11A und Axh43A beschrieben Lei *et al.* (2016) eine um das 1,14-fach erhöhte Freisetzung reduzierender Zucker bei der Hydrolyse von löslichem Weizen-Arabinoxylan mit einer Endo-Xylanase von *Neocallimastix patriciarum* und

einer α -L-Arabinofuranosidase von *Bacillus pumilus*. Auch Xyn11A und Axx43 von *B. subtilis* 168 zeigten bei der Hydrolyse von Glucuronoarabinoxylan aus Sorghumhirse einen vergleichbaren Synergismusgrad von 1,13 (Rhee *et al.*, 2016). Die Kombination der Xylanase XII und der β -Xylosidase Xyl von *Streptomyces* sp. PC22 bzw. sp. CH7 führte bei der Hydrolyse von Xylan aus Haferspelzen zu einem 1,1-fachen Anstieg der freigesetzten Zuckermenge, während XII und Xyl in Kombination mit der α -L-Arabinofuranosidase von *Streptomyces* sp. PC22 die Menge freigesetzter Zucker um das 1,17-fache erhöhte (Raweesri *et al.*, 2008). Ein deutlich höherer Synergismusgrad wurde mit den Enzymen von *G. thermodenitrificans* NG80-2 erreicht. So zeigte XynA2 in Kombination mit XynB2 oder AbfA bei der Hydrolyse von Xylan aus Haferspelzen einen synergistischen Effekt mit einer 1,99- bzw. 1,58-fachen Aktivitätssteigerung (Huang *et al.*, 2017).

Das pH- und das Temperaturoptimum der synergistischen Enzymkombination aus Xyn10B, Axx43A und Bxl3B für die Hydrolyse von löslichem Arabinoxylan aus Weizen liegen bei pH 5,5 und 63 °C (Abbildung 3.20). Ungeachtet einer Differenz von 13 °C zum Temperaturoptimum von Xyn10B (76 °C), liegt das Temperaturoptimum der Enzymkombination innerhalb der Temperatur-Toleranz (>60 % Aktivität) aller drei Glycosidhydrolasen.

Die synergistische Kombination aus Xyn11A, Axx43A und Bxl3B hydrolysierte in 10 h 75 % des löslichen Weizen-Arabinoxylans zu Monosacchariden und setzte 458,3 mg Xylose und 313,8 mg Arabinose pro g Arabinoxylan frei (Abbildung 3.19). Sorensen *et al.* (2007) erreichten eine höhere Ausbeute von 548,7 mg Xylose und 343,7 mg Arabinose pro g Arabinoxylan mit einer optimierten Enzymkombination aus der GH10 Endo- β -1,4-Xylanase Xyl III und der GH43 α -L-Arabinofuranosidase Abf II von *Humicola insolens*, der GH51 α -L-Arabinofuranosidase Abf III von *Meripilus giganteus* und der GH3 β -Xylosidase β -xyl von *Trichoderma reesei*. Abweichend von der Hydrolyse in dieser Arbeit wählten Sorensen *et al.* (2007) eine Substratkonzentration von 0,1 % statt 0,5 % (w/v) löslichem Arabinoxylan und eine Inkubationszeit von 24 h. Während bei einer Substratkonzentration von nur 0,1 % (w/v) eine mögliche Produktinhibition durch die niedrigeren Konzentrationen einen kleineren Effekt hat, ist die benötigte Inkubationszeit abhängig von der Enzymmenge. Jedoch wurden in dieser Arbeit nach 10 h Inkubation mit der Enzymkombination nur 80 % der Arabinose freigesetzt, wohingegen die gleiche Konzentration Axx43A allein in 24 h 94 % der Arabinose aus löslichem Arabinoxylan freisetzte. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Hydrolyse nach 10 h Inkubation noch nicht vollständig abgeschlossen war, allerdings stieg die Arabinosekonzentration in den letzten 6 h der Hydrolyse um nur 9 %.

Die höchste Menge freigesetzter Monosaccharide erreichten Sorensen *et al.* (2007) mit einer 20:20:20:40 (%) Kombination der Enzyme Abf II, Abf III, Xyl III und β -xyl und die optimale Enzymmenge wurde mit 0,4 g pro kg Substrat bestimmt. Höhere Enzymkonzentrationen führten zu keiner weiteren Produktzunahme (Sorensen *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurden Xyn11A, Axh43A und Bxl3B hingegen in einem Verhältnis von 0,1:3,3:96,6 eingesetzt und mit 9,11 g/kg Substrat wurde die 23-fache Enzymmenge verwendet. Obwohl die eingesetzte Menge Bxl3B mit 8,8 g/kg Weizen-Arabinoxylan 97 % der eingesetzten Enzymmenge entsprach, war die Hydrolyse der XOS zu Xylose die limitierende Reaktion. Aufgrund der geringen Halbwertszeit und der Inhibition durch bereits geringe Konzentrationen D-Xylose ist Bxl3B nicht geeignet für eine mehrstündige Hydrolyse mit hohen Substratkonzentrationen. Die Substitution von Bxl3B mit einer thermostabileren und gegenüber D-Xylose insensitiveren β -Xylosidase, wie z.B. XynB2 von *C. saccharolyticum*, würde die benötigte β -Xylosidase Menge deutlich reduzieren und somit die Effektivität der Enzymkombination erhöhen.

Mit unlöslichem Arabinoxylan aus Weizen als Substrat, setzte die Enzymkombination aus Xyn11A, Axh43A und Bxl3B deutlich weniger XOS und AXOS frei als aus löslichem Arabinoxylan (Abbildung 3.19). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis zeigten Lei *et al.* (2016), dass die *N. patriciarum* Xylanase in Kombination mit der α -L-Arabinofuranosidase von *B. pumilus* bei der Hydrolyse von unlöslichem Weizen-Arabinoxylan in Summe 21 % weniger Xylose, Xylobiose, -triose und -tetraose freisetzt als bei der Hydrolyse von löslichem Weizen-Arabinoxylan. Die zusätzliche Zugabe einer Feruloyl-esterase von *C. thermocellum* führte hingegen zu einer 1,33- und 1,13-fach höheren Freisetzung reduzierender Zucker im Vergleich zur Hydrolyse mit der Xylanase alleine bzw. Xylanase und α -L-Arabinofuranosidase (Lei *et al.*, 2016). Raweesri *et al.* (2008) beschrieben wiederum, dass die Addition der Acetyl-esterase von *Streptomyces* sp. PC22 zu der Kombination aus Xylanase, β -Xylosidase und α -L-Arabinofuranosidase die Freisetzung reduzierender Zucker aus Haferspelzen-Xylan um den Faktor 1,08 erhöht. In dieser Arbeit zeigte die Zugabe der Acetyl-esterasen Axe4A und Axe7B ebenfalls nur einen geringen Effekt durch die leicht erhöhte Freisetzung von Xylose (Abbildung 3.19).

Die Kombination der Xylanasen Xyn11A mit Bxl3B zeigte auch bei der Hydrolyse von 4-O-Methyl-Glucuronoxylan und Birken-Xylan einen synergistischen Effekt mit einem 1,09- bzw. 1,72-fachen Anstieg der Menge an freigesetzten reduzierenden Zuckern (Abbildung 3.15). Huang *et al.* (2017) beschrieben bei der Hydrolyse von Birken-Xylan mit Kombinationen der Xylanasen XynA1 und XynA2 mit einer der β -Xylosidasen XynB1, XynB2 oder XynB3 Aktivitätssteigerung zwischen 1 %

und 98 %. Die Kombination von Xyn11A und Bxl3B führte jedoch weder bei 4-O-Methyl-Glucuronoxylan noch bei Birken-Xylan zu einer vollständigen Hydrolyse in Monosaccharide sondern setzte nur eine Reihe von XOS und unbekanntem Oligosacchariden frei. Während die XOS durch höhere β -Xylosidasekonzentrationen zu D-Xylose hydrolysiert werden können, werden für die Hydrolyse der restlichen Oligosaccharide weitere Enzymaktivitäten wie α -Glucuronidasen, Acetylxylan Esterasen, und Ferulylesterasen benötigt (Biely *et al.*, 2016). Jedoch zeigten weder die von Bronnenmeier *et al.* (1995) charakterisierte α -D-Glucuronidase Agu67A noch die in dieser Arbeit charakterisierten Acetylesterasen Axe4A und Axe7B eine Aktivität für die polymeren Glucuronoxylane. Da GH67 Glucuronidasen spezifisch MeGlcA von Xylooligosacchariden mit Uronsäuren am nicht reduzierenden Ende freisetzen, ist Agu67A vielleicht in der Lage, die unbekanntem, oligomeren Spaltprodukte der Glucuronoxylan-Hydrolyse mit Xyn11A und Bxl3B in kleinere Produkte zu hydrolysieren. Diese Aktivität wurde in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht. Im Gegensatz zu GH67 Glucuronidasen spalten GH115 Glucuronidasen auch MeGlcA, die an interne Xyloseeinheiten in Oligo- und Polysacchariden gebunden sind (Biely *et al.*, 2016).

4.3.2 Hydrolyse von β -Glucanen

Die enzymatische Hydrolyse von β -(1,3;1,4)-Glucanen erfordert den synergistischen Einsatz von Endo- β -1,4-Glucanasen und β -Glucosidasen (Edashige und Ishii, 1998). In Übereinstimmung mit der Charakterisierung von Bronnenmeier und Staudenbauer (1990) zeigte die Endo- β -Glucanase Cel9Z eine hohe Aktivität für lösliches β -Glucan aus Gerste und hydrolysierte Gersten- β -Glucan, Lichenin und Glucomannan zu Oligosacchariden (Abbildung 3.3). Bronnenmeier und Staudenbauer (1990) beschrieben zusätzlich eine niedrige Aktivität für kristalline Cellulose. In dieser Arbeit wurde aufgrund abweichender Reaktionsbedingungen jedoch nur eine insignifikante Aktivität für mikrokristalline Cellulose (Avicel) gemessen. Das hohe Temperaturoptimum von 81 °C entspricht den Ergebnissen früherer Charakterisierungen und wird durch die Anwesenheit eines thermostabilisierenden CBM der Familie 3 erklärt, während ein zweites, cellulosespezifisches CBM3 die Bindung an kristalline Cellulose ermöglicht (Bronnenmeier und Staudenbauer, 1990; Riedel *et al.*, 1998). Cel9Z wird von *C. stercorarium* sekretiert und gehört zu den häufigsten Glycosidhydrolasen im Sekretom (Broeker *et al.*, 2018). Adelsberger *et al.* (2004) beschrieben eine sehr niedrige Aktivität (0,002 U/mg) der β -Glucosidase Bgl3Z für β -Glucan aus Gerste. Cel9Z und Bgl3Z in Kombination hydrolysieren β -Glucane möglicherweise zu kurzen Glucoligosacchariden und/oder D-Glucose.

4.3.3 Hydrolyse von Mannan, Glucomannan und Galactomannan

Die enzymatische Hydrolyse von Mannanen erfordert den synergistischen Einsatz von β -Mannanasen, β -Mannosidasen und gegebenenfalls α -Galactosidasen. Für die Hydrolyse von Glucomannanen werden zusätzlich β -Glucosidasen benötigt (Moreira und Filho, 2008). Neben der Endo- β -Glucanase Cel9Z, die das Glucomannanrückgrat spaltete, hydrolysierte die Endo- β -Mannanase Man26A drei der vier getesteten Mannane zu Oligosacchariden (Abbildung 3.3). Die Endo- β -Mannanase-Aktivität entspricht den bekannten Aktivitäten bereits charakterisierter Glycosidhydrolasen der GH-Familie 26 (Henrissat, 1991). Neben dem GH26-Modul enthält Man26A ein CBM der Familie 35. Module dieser Familie binden häufig an das Zielsubstrat des katalytischen Moduls im Enzym. So bindet das CBM35 der Mannanase Man5C von *Cellvibrio japonicus* an lösliches und unlösliches Mannan und Mannooligosaccharide und verstärkt die Mannanase-Aktivität des Enzyms gegenüber unlöslichem Mannan (Bolam *et al.*, 2004). Die Mannanase Man26A von *C. thermocellum* besitzt neben ihrem katalytischen GH26-Modul ebenfalls ein CBM der Familie 35 und hydrolysiert Galactomannan, Glucomannan und Mannan zu Mannooligosacchariden. Mit 216 ± 5 U/mg bzw. $97,0 \pm 5,0$ U/mg zeigen die Mannanasen von *C. stercorarium* und *C. thermocellum* ihre höchste Aktivität jeweils bei der Hydrolyse von Galactomannan. Im Gegensatz zu Man26A von *C. stercorarium* hydrolysierte die Mannanase von *C. thermocellum* jedoch auch unlösliches Mannan der Steinnuss und zeigte niedrige Aktivitäten bei der Hydrolyse von β -Glucanen und Cellulose (Tabelle 3.5) (Ghosh *et al.*, 2013).

4.3.4 Freisetzung von D-Galactose aus Xyloglucan

Die Hydrolyse von Xyloglucan erfordert den synergistischen Einsatz von Endo- β -1,4-Glucanasen und β -Glucosidasen zur Hydrolyse des Glucopyranose-Rückgrats und akzessorischen α/β -Glycosidasen zur Hydrolyse der verschiedenen Substitutionen (de Vries und Visser, 2001). Ausschließlich die β -Galactosidase Bga2B zeigte Aktivität bei der Hydrolyse von Xyloglucan aus den Samen des Tamarindenbaums und setzte, im Gegensatz zu den ebenfalls neu beschriebenen β -Galactosidasen Bga2C, Bga2D und Bga2E, D-Galactose aus Xyloglucan frei (Tabelle 3.4).

Das Xyloglucan der Tamarindensamen dient als Speicherpolysaccharid und wird dem Xyloglucan Typ XXXG zugeordnet. Die zweite und/oder dritte β -(1,6)-verknüpfte D-Xylopyranosesubstitution (X) kann jeweils mit einer β -(1,2)-D-Galactopyranosyleinheit (L) substituiert sein. Bei der Hydrolyse mit einer Endo-Glucanase entstehen in der Regel vier Oligosaccharide aus sieben bis neun Monosacchariden: XXXG, XLXG, XXLXG und XLLG (Herlet *et al.*, 2018). Bga2B hydrolysiert somit die

β -(1,2)-glycosidische Bindung zwischen der terminalen D-Galactopyranosesubstitution (L) und einer D-Xylopyranosesubstitution. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis zeigten Herlet *et al.* (2018), dass Bga2B die terminalen D-Galactopyranosesubstitutionen, unabhängig von der Position, nahezu vollständig abspaltet und in Kombination mit der Endo-Glucanase Cel9D von *C. thermocellum* Xyloglucan aus Tamarindensamen zu nur zwei Produkten hydrolysiert: dem Heptasaccharid XXXG und D-Galactose. Cel9D hydrolysiert Tamarinden-Xyloglucan in die vier Oligosaccharide XXXG, XLXG, XXLG und XLLG, wobei XLLG deutlich langsamer freigesetzt wird. Die Kombination von Cel9D mit Bga2B zeigte bei der Hydrolyse einen synergistischen Effekt mit einer 22-fachen Steigerung der Produktausbeute, reduzierte die nötige Enzymmenge um 80 % und hydrolysierte 93 ± 3 % des Xyloglucans zu XXXG und D-Galactose (Herlet *et al.*, 2018). Cel9Z von *C. stercorearium* zeigte hingegen keine Aktivität für Xyloglucan und in dieser Arbeit konnte keine *C. stercorearium* Glycosidhydrolase für die Hydrolyse des Xyloglucanrückgrats identifiziert werden.

4.3.5 Hydrolyse von pektischem Arabinan und Galactan

Die enzymatische Hydrolyse des Hemicellulose-assoziierten Polysaccharides Arabinan erfordert den synergistischen Einsatz von Endo- α -Arabinanasen und α -L-Arabinofuranosidasen. Für die Hydrolyse von Galactanen werden Endo- β -Galactanasen, Exo- β -Galactanasen, β -Galactosidasen und gegebenenfalls, für die Hydrolyse von Arabinogalactan, α -L-Arabinofuranosidasen benötigt (de Vries und Visser, 2001). Insgesamt sieben *C. stercorearium* Glycosidhydrolasen zeigten Aktivität für Arabinan, Galactan oder beide Polysaccharide, sechs dieser Enzyme werden in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben (Tabelle 3.4 und Tabelle 3.5). Neben Arf51B setzen Arf43C und mit sehr geringer Aktivität Axx43A L-Arabinose aus Arabinan frei, während die Endo-Arabinanase Abn43A das Arabinanrückgrat hydrolysiert. Arf51B und Axx43A setzen L-Arabinose vermutlich durch die Hydrolyse von α -(1,2)- und α -(1,3)-verknüpften Arabinosesubstitutionen frei (Numan und Bhosle, 2006). Arf43C setzt Arabinose aus Arabinan und Galactanen frei, mit einer höheren Aktivität für Galactan, insbesondere pektischem Galactan. Die gemessenen Aktivitäten deuten darauf hin, dass Arf43C ausschließlich oder zumindest bevorzugt α -(1,3)-Arabinosylierungen hydrolysiert. Abn43A zeigte Endo- α -(1,5)-Arabinanase-Aktivität bei der Hydrolyse von Arabinan und α -(1,3)-Arabinofuranosidase Aktivität bei der Dearabinosylierung von Galactanen. Die Aktivitäten von Arf43C und Abn43A entsprechen den beschriebenen Aktivitäten charakterisierter Glycosidhydrolasen der GH-Familie 43 (Mewis *et al.*, 2016). Im Gegensatz zu Arf43C und Abn43A, die Aktivität für Arabinan und Galactan zeigten, hydrolysierten die β -Galactosidase Bga35A und die verkürzte Version der Endo- β -Galactanase Gal53A ausschließlich Galactan und pektisches

Galactan. Bga35A setzt D-Galactose aus Galactan frei, womit die Aktivität den bekannten Aktivitäten für Enzyme der GH-Familie 35 entspricht (Henrissat, 1991).

Ebenfalls in Übereinstimmung mit den beschriebenen Aktivitäten für Glycosidhydrolasen der Familie GH53, zeigte Gal53A Endo- β -Galactanase Aktivität gegenüber Galactanen (Tabelle 3.5) (Lombard *et al.*, 2014). Das native Protein wird von *C. stercorearium* sekretiert und enthält neben dem GH53-Modul ein Signalpeptid, vier CBM61-Module und drei *S-layer-homology* (SLH) Module (Broeker *et al.*, 2018). CBMs der Familie 61 sind am häufigsten mit Endo- β -(1,4)-Galactanasen assoziiert und erkennen die helikale Struktur von β -(1,4)-Galactan, dies deutet auf eine Aktivität des nativen Proteins hin, die mit der Aktivität der verkürzten Gal53A Variante vergleichbar ist (Cid *et al.*, 2010). Die SLH-Module des nativen Gal53A Proteins binden an die bakterielle Zellwand und vermitteln so eine räumliche Nähe zwischen Zelle und galactanhaltigen Polymeren (Mesnage *et al.*, 2000).

Die Kombination der Endo-Arabinanase Abn43A mit der α -L-Arabinofuranosidase Arf51B zeigte bei der Hydrolyse von Zuckerrüben-Arabinan einen synergistischen Effekt mit einer 1,37-fachen Aktivitätssteigerung. Nach 2 h Reaktionszeit wurden 2,56 g/l und nach 4 h 3,80 g/l L-Arabinose aus 5,0 g/l Arabinan freigesetzt (Abbildung 3.14). Bei einem L-Arabinose Anteil von 88 % entspricht dies Ausbeuten von 52 % und 77 %. Im Vergleich zu diesem Ergebnis setzten Lim *et al.* (2011) mit einer synergistischen Kombination der thermostabilen Endo- α -(1,5)-Arabinanase und α -L-Arabinofuranosidase von *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* unter optimalen Reaktionsbedingungen in 2 h 16 g/l L-Arabinose aus 20 g/l Zuckerrüben-Arabinan frei, eine Ausbeute von 91 % der enthaltenen L-Arabinose. Die höchste Menge an freigesetzter L-Arabinose erreichten Lim *et al.* (2011) mit 4 U/ml Endo- α -(1,5)-Arabinanase und 32 U/ml α -L-Arabinofuranosidase im Verhältnis 1:8. Im Gegensatz wurden in dieser Arbeit, bei einem Viertel der Substratkonzentration, mit 79,5 mU/ml Abn43A und 40 mU Arf51B eine 50-fach niedrigere Endo-Arabinanasekonzentration und eine 800-fach niedrigere α -L-Arabinofuranosidasekonzentration im Verhältnis 2:1 eingesetzt. Mit einem höheren Enzymeinsatz könnte eventuell auch mit Abn43A und Arf51B eine höhere Arabinoseausbeute erreicht werden.

4.4 Hydrolyse von Carbonsäureestern

Kohlenhydratesterasen sind von entscheidender Bedeutung für eine vollständige Hydrolyse von pflanzlichen Zellwandpolysacchariden, da viele Hemicellulosen, z.B. Xylane, Mannane und Xyloglucane, und pektische Polysaccharide wie Arabinan oder Galactan acetyliert und mit Ferulasäure

oder anderen phenolischen Säuren substituiert sind (de Vries und Visser, 2001; Ebringerová *et al.*, 2005). So wurde gezeigt, dass Acetylgruppen in Xylanen und Mannanen sterische Hindernisse darstellen und die enzymatische Hydrolyse durch eine Reduzierung der Enzym-Substrat-Bindungen limitieren (Alvarez *et al.*, 2016; Biely *et al.*, 2016). Ebenso inhibieren Feruloyl-ester und Ferulasäure-Dimere die Hydrolyse von Arabinoxylan (de Vries und Visser, 2001). Agger *et al.* (2010) zeigten in einer Publikation zur Hydrolyse von stark verzweigtem und acetyliertem Arabinoglucuronoxylan mit einer Enzymkombination aus Endo-Xylanase, β -Xylosidase und α -L-Arabinofuranosidase die Bedeutung von Acetylxylan Esterasen und Feruloyl-esterasen für die Freisetzung von Xylose und Arabinose. Während die Addition der Acetylxylan Esterase (CE1) oder der Feruloyl-esterase (CE1) die Menge freigesetzter D-Xylose um 44 % bzw. 27 % erhöhte, führte die Addition beider Enzyme zu einer Steigerung von 55 % (Agger *et al.*, 2010).

Acetylxylan Esterasen setzen Acetat von an Positionen O-2 und O-3 mono- oder diacetylierten Xylopyranoseeinheiten frei und machen so das Xylanrückgrat für Xylanasen und β -Xylosidasen zugänglich. Esterasen die Xylan deacetylieren werden in die CE-Familien 1 bis 7, sowie 12 und 15 klassifiziert. Feruloyl-esterasen setzen *trans*-Ferulat von 5-O-feruloylierten Arabinofuranosyleinheiten frei und werden, entsprechend ihrer Substratspezifität, in vier Gruppen unterteilt. Einige Feruloyl-esterasen werden der CE-Familie 1 zugeordnet (Biely *et al.*, 2016; Lombard *et al.*, 2014).

Im Genom von *C. stercorarium* sind zehn Kohlenhydrat-esterasen der CE-Familien 1, 4, 7, 8, 9 und 12 kodiert, von denen acht, mit Ausnahme von zwei Proteinen der Familie CE8, in dieser Arbeit untersucht wurden. Zwei der Kohlenhydrat-esterasen, Axe4A und Axe7B, zeigten Aktivität bei der Hydrolyse von Carbonsäureestern; bei der Hydrolyse von Arabinoxylan bewirkte ihre Addition jedoch nur eine nicht signifikante Aktivitätssteigerung (Abbildung 3.11 und Abbildung 6.16). Nach der aktuellen Annotation der *C. stercorarium* CE-Familien wird Axe4A nicht mehr den Kohlenhydrat-esterasen zugeordnet (<http://www.cazy.org/b2475.html>; am 11.06.2019). Die verwendeten Arabinoxylane werden durch eine alkalische Extraktion gewonnen, wodurch ein Großteil der Acetylierungen hydrolysiert wird und nur wenige Acetatester für eine enzymatische Hydrolyse erhalten bleiben (Sun *et al.*, 2005). Axe4A und Axe7B spalten Acetat von den acetylierten Monosacchariden 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-D-xylopyranose (XTA) und β -D-Glucose-pentaacetat (GPA), wobei Axe4A mit z.B. 80,4 U/mg für GPA eine höhere Aktivität zeigte als Axe7B (61,7 U/mg). Zusätzlich zu der Acetyl-esterase Aktivität setzte Axe7B *trans*-Ferulasäure aus 2-O- und 5-O-feruloylierten pNP- α -L-Arabinofuranosid frei (Abbildung 3.12).

Axe7B ist die erste beschriebene Esterase der CE-Familie 7 die Acetat- und Ferulatester hydrolysiert (Lombard *et al.*, 2014). Die hyperthermostabile Acetylxylyl Esterase Axe7A von *Thermotoga maritima* setzt Acetat aus *p*NP-Acetat, GPA und nativem Buchen-Xylan frei und zeigte mit 366,8 U/mg eine deutlich höhere Aktivität für GPA als Axe4A und Axe7B. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit, setzte Axe7A kein Acetat aus alkalisch präpariertem Birken- und Buchen-Xylan frei, deacetylierte jedoch natives, mit DMSO extrahiertes Buchen-Xylan mit einer spezifischen Aktivität von 5,2 U/mg (Drzewiecki *et al.*, 2010).

Donaghy *et al.* (2000) charakterisierten eine extrazelluläre Feruloyl-esterase, die *C. stercorarium* beim Wachstum auf Birken-Xylan produziert. Die Feruloyl-esterase setzte Ferulasäure, *p*-Cumarinsäure, Kaffeesäure und Sinapinsäure aus den jeweiligen Methylestern frei und hydrolysierte 16 % der Feruloyl-ester in einer Weizenkleie Präparation. Mit 88 U/mg zeigte die Feruloyl-esterase ihre höchste Aktivität bei der Hydrolyse von Ethylferulat (Donaghy *et al.*, 2000). Aufgrund fehlender Übereinstimmung der molekularen Masse von 33 kDa mit den molekularen Massen der untersuchten Kohlenhydrat-esterasen (Abbildung 3.2 und Abbildung 6.5) und mangels angegebener AS- oder DNA-Sequenzen konnte die Charakterisierung keiner der Esterasen zugeordnet werden.

4.5 Hydrolyse von deesterifizierter Hemicellulose aus Weizenstroh

Die Hemicellulosefraktion lignocellulosischer Biomassen setzt sich aus variablen Anteilen der verschiedenen, hemicellulosischen Polysaccharide zusammen. Dabei sind sowohl die Höhe des Hemicelluloseanteils als auch die Zusammensetzung abhängig von Pflanzenart und Gewebetyp (Alvarez *et al.*, 2016; Van Dyk und Pletschke, 2012). Die einzelnen Polysaccharide sind durch kovalente Bindungen untereinander und mit Lignin quervernetzt und bilden zusammen mit den kristallinen Cellulosefibrillen die komplexe und widerstandsfähige Struktur der Lignocellulose (Himmel *et al.*, 2010). Daher erfordert die Isolierung der Hemicellulosefraktion eine mechanische, thermo-mechanische oder chemische Vorbehandlung (siehe Kapitel 1.2.6), durch welche die komplexe Struktur delignifiziert und geschwächt wird. Erst anschließend lässt sich die Hemicellulosefraktion extrahieren. Während durch eine alkalische Extraktion die Hemicellulosen deesterifiziert werden, werden bei einer Extraktion mit DMSO native Polysaccharide isoliert (Sun *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit wurden zwei Verfahren zur alkalischen Extraktion von deesterifizierter Hemicellulose aus Weizenstroh und eine Heißwasserextraktion verglichen. Mit einer jährlichen Produktion von 132,1 Mio. t gehört Weizenstroh zu den am häufigsten vorkommenden landwirtschaftlichen Reststoffen in Europa (Sarkar *et al.*, 2012). Aufgrund des hohen Arabinoxylananteils von 19–21 %

(Tabelle 1.2) ist aus Weizenstroh extrahierte Hemicellulose ideal für eine enzymatische Hydrolyse mit den xylanspezifischen *C. stercorarium* Glycosidhydrolasen geeignet. Mit einem Glucoseanteil von 33,3 % und einem Hemicelluloseanteil von 32,2 % entspricht die Zusammensetzung des verwendeten Weizenstrohs in etwa den in der Literatur angegebenen Mittelwerten von 34,4 % und 25,5 % (Tabelle 1.1). Xylose- und Arabinosekonzentration liegen mit 23,1 % bzw. 5,9 % ein wenig höher, als die von Alvarez *et al.* (2016) sowie Otieno und Ahring (2012) beschriebenen Konzentrationen (Tabelle 3.8). Mit der Heißwasserextraktion wurde nur 2,4 % der Hemicellulose aus dem Weizenstroh extrahiert, während mit 1 % (w/v) NaOH im Autoklaven 22,3 % der Hemicellulose isoliert wurde. Im Extruder mit 6 % (w/v) NaOH und anschließender Hitzebehandlung wurde, mit einer Hemicelluloseausbeute von 62,9 %, die 26,2- bzw. 2,8-fache Menge Hemicellulose extrahiert und eine Arabinoxylanausbeute von 41,4 % erzielt. Mit einem Kohlenhydratgehalt von nur 50 % enthielt die Hemicellulosepräparation aus dem Extruder deutlich mehr Verunreinigungen als die Präparationen aus dem Autoklaven mit Kohlenhydratgehalten von 69 % und 66 %. Aufgrund unterschiedlicher Substratkonzentrationen in den zwei alkalischen Extraktionsverfahren entsprachen 6 % NaOH (w/v) im Extruder einer Konzentration von 0,24 g/g Substrattrockenmasse, während 1 % (w/v) NaOH im Autoklaven 0,11 g NaOH pro g Weizenstroh entsprachen. Somit wurde im Extruder in etwa die doppelte NaOH-Konzentration eingesetzt. Liu *et al.* (2013) solubilisierten in einem vergleichbaren Extruderverfahren mit einer NaOH-Konzentration von 0,1 g/g Maisstroh und einer Hitzebehandlung von 1 h bei 99 °C 39,3 % des Xylans. Kabel *et al.* (2007) solubilisierten in einer chemischen Vorbehandlung mit 1 % (w/w) H₂SO₄ bei 180 °C aus Weizenstroh ebenfalls einen vergleichbaren Xylananteil von etwa 45 %. Von diesen Ergebnissen abweichend erzielten Sun *et al.* (2005) in einem Organosolv-Verfahren mit einer sauren Dioxan/Wasser-Lösung und einer DMSO-Extraktion nur eine Hemicelluloseausbeute von 16,9 %, während Hongzhang und Liying (2007) durch Dampfexplosion eine Extraktion von 80 % der hemicellulosischen Zucker, mit einem Xyloseanteil von 86 %, aus Weizenstroh erreichten. Jedoch wurden bei Hongzhang und Liying (2007) 10 % der Polymere zu Monosacchariden hydrolysiert.

Mit Xylose zu Arabinose Verhältnissen von 4,1:1 bzw. 3,2:1 entsprach das Verhältnis der Monosaccharide in den mit 1 % bzw. 6 % (w/v) NaOH extrahierten Präparationen HP1 und HP4 in etwa dem 3,9:1 Verhältnis von Xylose zu Arabinose im unbehandelten Weizenstroh. In der Heißwasserextraktion wurde deutlich weniger Xylose extrahiert, im Vergleich mit 1 % NaOH nur 21 % der Xylose aber 55 % Arabinose, und in Folge ergab sich ein Xylose/Arabinose Verhältnis von 1,5:1. Die unterschiedliche Monosaccharidzusammensetzung zeigte sich deutlich bei der Hydrolyse der Substrate mit der Xylanase Xyn10B. Während die mit 1 % oder 6 % NaOH extrahierten

Hemicellulosepräparationen mehrheitlich zu Xylose, Xylobiose und einfach arabinosylierten AXOS hydrolysiert wurden, wurden bei der Hydrolyse des löslichen Arabinoxylans mit einem Xylose/Arabinose Verhältnis von 1,7:1 diarabinosylierte AXOS freigesetzt (Tabelle 3.8).

Die Hemicellulosepräparation HP4 aus dem Extruderverfahren wurde mit den Enzymen Xyn10B, Xyn11A, Axh43A, Arf51B und Bxl3B im 40 ml und 5 l Maßstab hydrolysiert. Im 40 ml Maßstab wurden 71 % der in der Präparation enthaltenen Xylose und 56 % der Arabinose freigesetzt, somit wurden 68 % der Hemicellulosen in Monosaccharide hydrolysiert. Entgegen der Erwartung einer vergleichbaren Ausbeute, wurden im 50 l Maßstab weniger Arabinose (49 %) und deutlich weniger Xylose (54 %) freigesetzt (Tabelle 6.3). Die um 17 % niedrigere Xylosetzsetzung erklärt sich überwiegend durch die fehlende Aktivität der nach 24 h zugegebenen 15 U/l Bxl3B. Auch unterschiedliche Reaktionsbedingungen im 50 ml Reaktionsgefäß und 5 l Bioreaktor haben die Ausbeute sehr wahrscheinlich beeinflusst und sind für die abweichenden Konzentrationen verantwortlich. Wie bei der Hydrolyse des löslichen Arabinoxylans (siehe Kapitel 4.3.1) war in beiden Hydrolysen die Spaltung der XOS zu Xylose und damit die β -Xylosidaseaktivität die limitierende Reaktion. Eine Substitution von Bxl3B würde auch bei der Hydrolyse von deesterifizierten Hemicellulosen die benötigte Enzymmenge reduzieren und die Xyloseausbeute erhöhen. Bei der Hydrolyse von HP4 wurde die gleiche Axh43A-Konzentration (6,0 U/g Substrat) eingesetzt wie bei der Hydrolyse des löslichen Arabinoxylans mit Axh43A, jedoch wurden 38 % weniger Arabinose freigesetzt. Mögliche Erklärungen sind eine Inhibition der Enzymaktivität durch Verunreinigungen der Präparation, substituierte Arabinosylierungen des Xylanpolymers, die eine Freisetzung der Arabinose verhindern und Arabinose die in Arabinan oder Seitenketten von Galactan gebunden ist und durch Axh43A oder Arf51B nicht freigesetzt wurde. Weizenstroh enthält in etwa 2,5 % Arabinan und durch Zugabe einer Endo-Arabinanase, z.B. Abn43A, in Kombination mit Arf51B könnte das Arabinan hydrolysiert und die Arabinoseausbeute erhöht werden (Otieno und Ahring, 2012).

Liu *et al.* (2013) beschrieben eine Xylanhydrolyse von 83 % mit 20 FPU (*filter paper unit*)/g Celluclast 1.5 L und 5 IU (*international unit*)/g β -Glucosidase aus im Extruder mit 0,06 g/g NaOH vorbehandeltem Maisstroh (2 % w/v). Deutlich niedrigere Ausbeuten erreichten Nghiem *et al.* (2011) bei der Hydrolyse von Hemicellulose, die mit NH_4OH und Ethanolpräzipitation aus Maisfaser extrahiert wurde. Mit einer Xylanase, einer Pektinase und einer Feruloylsterase wurden nur 44,5 % der Xylose und 52,5 % der Arabinose freigesetzt (Nghiem *et al.*, 2011). Van Dyk und Pletschke (2012) haben die Ergebnisse mehrerer Publikationen zur Hydrolyse unterschiedlich

vorbehandelter, lignocellulose Substrate mit Zuckerausbeuten zwischen 13,6 % und 100 % zusammengefasst, dabei liegen die meisten angegebenen Ausbeuten zwischen 73 % und 91 %.

In dieser Arbeit wurde für die Hydrolyse deesterifizierter Hemicellulose eine Substratkonzentration von 50 g/l und eine Enzymkonzentration von 49,1 U/g Hemicellulose eingesetzt. Für eine ökonomisch effiziente Ethanolfermentation sind eine Ethanolkonzentration von 4 % (w/w) und eine initiale Zuckerkonzentration von 8 % (w/w) erforderlich. Um dies zu erreichen, sollte die Substratkonzentration über 200 g/l liegen. Bei der Hydrolyse von lignocellulose Substraten werden im Allgemeinen Enzymkonzentrationen von 7–60 FPU/g eingesetzt (Van Dyk und Pletschke, 2012).

4.6 Ausblick

Die Komplexität hemicellulose Polysaccharide und lignocellulose Biomasse im Allgemeinen erfordert zahlreiche Enzyme, die in Synergie die Polysaccharide hydrolysieren. Die Variation in der Struktur und Zusammensetzung der Lignocellulose aus verschiedenen Quellen erhöht die Komplexität noch weiter (Van Dyk und Pletschke, 2012). Die in dieser Arbeit erstmals charakterisierten Glycosidhydrolasen sind an der Hydrolyse von Xylanen, Xyloglucan, Mannan, Galacto- und Glucmannan sowie Arabinan und Galactan beteiligt. Die neu bestimmten Enzymaktivitäten führen zu einem besseren Verständnis des Hemicelluloseabbaus durch *C. stercorarium* sowie der beteiligten Enzyme und Enzymsysteme. Entsprechend der Verbesserung des von Adelsberger *et al.* (2004) rekonstituierten Enzymsystems für die Hydrolyse von Arabinoxylan durch Substitution der Endo-Xylanase und der α -L-Arabinofuranosidase und der Kombination von Abn43A und Arf51B zur Hydrolyse von Arabinan, können durch die Kombination neu charakterisierter Glycosidhydrolasen, insbesondere durch die Kombination von Endo- und Exo-Aktivitäten, mit hoher Wahrscheinlichkeit weitere Hemicellulosen wie β -(1,3;1,4)-Glucane oder Galactane zu Monosacchariden hydrolysiert werden. Hierfür sind jedoch weitere Experimente mit den Enzymen notwendig, um optimierte Enzymsysteme zu rekonstituieren. Aus den daraus resultierenden Daten könnten die Abbauwege rekonstruiert werden, mit denen *C. stercorarium* die verschiedenen Hemicellulosen hydrolysiert. Ebenso wäre es interessant in weiteren Experimenten zu überprüfen, ob *C. stercorarium* über in dieser Arbeit nicht identifizierte Enzymaktivitäten, wie Xyloglucanase und β -Mannosidase, verfügt oder zur Hydrolyse von Xyloglucan und Mannooligosacchariden auf die Unterstützung anderer Mikroorganismen angewiesen ist.

In Kombination mit Aktivitätsassays könnten Sekretomanalysen des auf verschiedenen Polysacchariden kultivierten *C. stercorarium*, wie sie von Broeker *et al.* (2018) mit Cellobiose durchgeführt

wurden, die Enzyme identifizieren, die *C. stercorarium* für die vollständige Hydrolyse einzelner Polysaccharide verwendet. Zudem erhöhen detaillierte Produkt- und Substratspezifitäten, wie sie bereits für Xylanasen, α -L-Arabinofuranosidasen und die β -Xylosidase Bxl3B bestimmt wurden, das Verständnis der spezifischen Enzymaktivitäten und liefern interessante Daten für biotechnologische Anwendungen (Broeker *et al.*, 2018). Speziell die α -L-Arabinofuranosidasen Arf51B und Axl43A mit ihrer Fähigkeit, mono- und disubstituierte Xyloseeinheiten zu dearabinosylieren, sind von großem Interesse, da Arabinosylierungen die vollständige Hydrolyse von Arabinoxylan und Pektinen inhibieren oder sogar verhindern (Numan und Bhosle, 2006).

Das rekonstituierte Enzymsystem aus Xyn10B, Xyn11A, Axl43A, Arf51B und Bxl3B zur Hydrolyse von Arabinoxylan hydrolysierte effektiv lösliches Weizen-Arabinoxylan und deesterifizierte Hemicellulose zu Monosacchariden. Durch eine Optimierung der eingesetzten Enzymmenge und dem Verhältnis der eingesetzten Enzyme zueinander, vergleichbar mit der Optimierung von Sorensen *et al.* (2007), kann die Enzymkombination jedoch noch verbessert werden. Auch die Addition zusätzlicher Enzymaktivitäten, wie Glucuronidase, Acetyl- und Feruloyl-esterase für die Hydrolyse von Xylanen oder Arabinanase, Endo-Glucanase und β -Glucosidase für die Hydrolyse von deesterifizierter Hemicellulose würde die Menge freigesetzter Monosaccharide erhöhen.

Saccharolytische, thermophile Mikroorganismen, wie *C. stercorarium*, sind ein genetisches Reservoir für neue Enzymaktivitäten und Enzyme, die unter den Prozessbedingungen der industriellen Biotechnologie arbeiten (Blumer-Schuette *et al.*, 2014). Durch die systematische Charakterisierung von Enzymen mit bisher unbekannter Funktion, können neue Enzymaktivitäten und, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, sogar neue Enzymfamilien nachgewiesen werden.

5 Literaturverzeichnis

- Adelsberger, H., Hertel, C., Glawischnig, E., Zverlov, V. V., Schwarz, W. H. (2004).** Enzyme system of *Clostridium stercorarium* for hydrolysis of arabinoxylan: reconstitution of the in vivo system from recombinant enzymes. *Microbiology*, 150(Pt 7), 2257-2266.
- Agger, J., Vikso-Nielsen, A., Meyer, A. S. (2010).** Enzymatic xylose release from pretreated corn bran arabinoxylan: differential effects of deacetylation and deferuloylation on insoluble and soluble substrate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6141-6148.
- Ali, M. K., Fukumura, M., Sakano, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., et al. (1999).** Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding the *Clostridium stercorarium* xylanase C in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63(9), 1596-1604.
- Alonso, D. M., Bond, J. Q., Dumesic, J. A. (2010).** Catalytic conversion of biomass to biofuels. *Green Chemistry*, 12(9), 1493-1513.
- Alvarez, C., Reyes-Sosa, F. M., Diez, B. (2016).** Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. *Microbial biotechnology*, 9(2), 149-156.
- Andrewartha, K. A., Phillips, D. R., Stone, B. A. (1979).** Solution Properties of Wheat-Flour Arabinoxylans and Enzymically Modified Arabinoxylans. *Carbohydrate research*, 77(Dec), 191-204.
- Antoni, D., Zverlov, V. V., Schwarz, W. H. (2007).** Biofuels from microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(1), 23-35.
- Bachmann, S. L., McCarthy, A. J. (1991).** Purification and Cooperative Activity of Enzymes Constituting the Xylan-Degrading System of *Thermomonospora fusca*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(8), 2121-2130.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2007).** *Stryer Biochemie* (6. Auflage). Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München.
- Bertani, G. (1951).** Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293-300.
- Biely, P., Singh, S., Puchart, V. (2016).** Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1260-1274.
- Blumer-Schuette, S. E., Brown, S. D., Sander, K. B., Bayer, E. A., Kataeva, I., Zurawski, J. V., et al. (2014).** Thermophilic lignocellulose deconstruction. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(3), 393-448.
- Bolam, D. N., Xie, H., Pell, G., Hogg, D., Galbraith, G., Henrissat, B., et al. (2004).** X4 modules represent a new family of carbohydrate-binding modules that display novel properties. *Journal of Biological Chemistry*, 279(22), 22953-22963.
- Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., Davies, G. J. (2004).** Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal*, 382, 769-781.

- Bourgois, T. M., Van Craeyveld, V., Van Campenhout, S., Courtin, C. M., Delcour, J. A., Robben, J., et al. (2007).** Recombinant expression and characterization of XynD from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ATCC 6051: a GH 43 arabinoxylan arabinofuranohydrolase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(6), 1309-1317.
- Brandt, A., Gräsvik, J., Hallett, J. P., Welton, T. (2013).** Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chemistry*, 15(3), 550-583.
- Broeker, J., Mechelke, M., Baudrexl, M., Mennerich, D., Hornburg, D., Mann, M., et al. (2018).** The hemicellulose-degrading enzyme system of the thermophilic bacterium *Clostridium stercorarium*: comparative characterisation and addition of new hemicellulolytic glycoside hydrolases. *Biotechnology for biofuels*, 11, 229.
- Bronnenmeier, K., Kundt, K., Riedel, K., Schwarz, W. H., Staudenbauer, W. L. (1997).** Structure of the *Clostridium stercorarium* gene celY encoding the exo-1,4-beta-glucanase Avicelase II. *Microbiology*, 143 (Pt 3), 891-898.
- Bronnenmeier, K., Meissner, H., Stocker, S., Staudenbauer, W. L. (1995).** alpha-D-glucuronidases from the xylanolytic thermophiles *Clostridium stercorarium* and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Microbiology*, 141 (Pt 9), 2033-2040.
- Bronnenmeier, K., Rucknagel, K. P., Staudenbauer, W. L. (1991).** Purification and properties of a novel type of exo-1,4-beta-glucanase (avicelase II) from the cellulolytic thermophile *Clostridium stercorarium*. *European Journal of Biochemistry*, 200(2), 379-385.
- Bronnenmeier, K., Staudenbauer, W. L. (1990).** Cellulose hydrolysis by a highly thermostable endo-1,4-beta-glucanase (avicelase I) from *Clostridium stercorarium*. *Enzyme and Microbial Technology*, 12(6), 431-436.
- Brown, R. M. (2004).** Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42(3), 487-495.
- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P. L., et al. (2016).** Bacterial xylanases: biology to biotechnology. *3 Biotech*, 6(2), 150.
- Chakravorty, U., Hubert, M.-H., Nøstbakken, L. (2009).** Fuel Versus Food. *Annual Review of Resource Economics*, 1(1), 645-663.
- Chimphango, A. F., Rose, S. H., van Zyl, W. H., Gorgens, J. F. (2012).** Production and characterisation of recombinant alpha-L-arabinofuranosidase for production of xylan hydrogels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(1), 101-112.
- Chinga-Carrasco, G. (2011).** Cellulose fibres, nanofibrils and microfibrils: The morphological sequence of MFC components from a plant physiology and fibre technology point of view. *Nanoscale Res Lett*, 6(1), 417.
- Cid, M., Pedersen, H. L., Kaneko, S., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Willats, W. G., et al. (2010).** Recognition of the helical structure of beta-1,4-galactan by a new family of carbohydrate-binding modules. *Journal of Biological Chemistry*, 285(46), 35999-36009.

Claassen, P. A. M., van Lier, J. B., Lopez Contreras, A. M., van Niel, E. W. J., Sijtsma, L., Stams, A. J. M., et al. (1999). Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(6), 741-755.

de Camargo, B. R., Claassens, N. J., Quirino, B. F., Noronha, E. F., Kengen, S. W. M. (2018). Heterologous expression and characterization of a putative glycoside hydrolase family 43 arabinofuranosidase from *Clostridium thermocellum* B8. *Enzyme and Microbial Technology*, 109, 74-83.

de Vries, R. P., Visser, J. (2001). Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4), 497-522, table of contents.

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

Dos Santos, C. R., de Giuseppe, P. O., de Souza, F. H. M., Zanphorlin, L. M., Domingues, M. N., Pirolla, R. A. S., et al. (2018). The mechanism by which a distinguishing arabinofuranosidase can cope with internal di-substitutions in arabinoxylans. *Biotechnology for biofuels*, 11, 223.

Drzewiecki, K., Angelov, A., Ballschmiter, M., Tiefenbach, K. J., Sterner, R., Liebl, W. (2010). Hyperthermostable acetyl xylan esterase. *Microbial biotechnology*, 3(1), 84-92.

Ebringerová, A., Hromádková, Z., Heinze, T. (2005). Hemicellulose. In Heinze, T. (Ed.), *Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use* (pp. 1-67). Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Edashige, Y., Ishii, T. (1998). Hemicellulosic polysaccharides from bamboo shoot cell-walls. *Phytochemistry*, 49(6), 1675-1682.

FAO. (2015). *FAO Statistical Pocketbook 2015 - World food and agriculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rom.

Fauré, R., Courtin, C. M., Delcour, J. A., Dumon, C., Faulds, C. B., Fincher, G. B., et al. (2009). A Brief and Informationally Rich Naming System for Oligosaccharide Motifs of Heteroxylans Found in Plant Cell Walls*. *Australian Journal of Chemistry*, 62(6), 533-537.

Finn, R. D., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., et al. (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D279-285.

Fukumura, M., Sakka, K., Shimada, K., Ohmiya, K. (1995). Nucleotide sequence of the *Clostridium stercorarium* xynB gene encoding an extremely thermostable xylanase, and characterization of the translated product. *Biosci Biotechnol Biochem*, 59(1), 40-46.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., et al. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server. In Walker, J. M. (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571-607). Totowa, New Yoork City.

Ghosh, A., Luis, A. S., Bras, J. L., Fontes, C. M., Goyal, A. (2013). Thermostable recombinant beta-(1->4)-mannanase from *C. thermocellum*: biochemical characterization and manno-oligosaccharides production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(50), 12333-12344.

- Ghosh, M., Nanda, G. (1994).** Purification and some properties of a xylanase from *Aspergillus sydowii* MG49. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4620-4623.
- Gibson, D. G. (2009).** Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, 37(20), 6984-6990.
- Gilead, S., Shoham, Y. (1995).** Purification and characterization of alpha-L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), 170-174.
- Girio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R. (2010).** Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4775-4800.
- Gomes, K. R., Chiphango, A. F., Gorgens, J. F. (2015).** Modifying solubility of polymeric xylan extracted from *Eucalyptus grandis* and sugarcane bagasse by suitable side chain removing enzymes. *Carbohydr Polym*, 131, 177-185.
- Haimer, E., Wendland, M., Potthast, A., Henniges, U., Rosenau, T., Liebner, F. (2010).** Controlled precipitation and purification of hemicellulose from DMSO and DMSO/water mixtures by carbon dioxide as anti-solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, 53(1), 121-130.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557-580.
- Henrissat, B. (1991).** A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280 (Pt 2), 309-316.
- Henrissat, B., Davies, G. (1997).** Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7(5), 637-644.
- Herlet, J., Kornberger, P., Roessler, B., Glanz, J., Schwarz, W. H., Liebl, W., et al. (2017).** A new method to evaluate temperature vs. pH activity profiles for biotechnological relevant enzymes. *Biotechnology for biofuels*, 10, 234.
- Herlet, J., Schwarz, W. H., Zverlov, V. V., Liebl, W., Kornberger, P. (2018).** Addition of beta-galactosidase boosts the xyloglucan degradation capability of endoglucanase Cel9D from *Clostridium thermocellum*. *Biotechnology for biofuels*, 11, 238.
- Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., et al. (2007).** Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315(5813), 804-807.
- Himmel, M. E., Xu, Q., Luo, Y., Ding, S.-Y., Lamed, R., Bayer, E. A. (2010).** Microbial enzyme systems for biomass conversion: emerging paradigms. *Biofuels*, 1(2), 323-341.
- Hongzhang, C., Liying, L. (2007).** Unpolluted fractionation of wheat straw by steam explosion and ethanol extraction. *Bioresource Technology*, 98(3), 666-676.
- Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Eijsink, V. G. (2012).** Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for biofuels*, 5(1), 45.

Huang, D., Liu, J., Qi, Y., Yang, K., Xu, Y., Feng, L. (2017). Synergistic hydrolysis of xylan using novel xylanases, beta-xylosidases, and an alpha-L-arabinofuranosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(15), 6023-6037.

Hudson, R. C., Schofield, L. R., Coolbear, T., Daniel, R. M., Morgan, H. W. (1991). Purification and properties of an aryl beta-xylosidase from a cellulolytic extreme thermophile expressed in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 273 (Pt 3), 645-650.

IEA. (2015). *World Energy Outlook 2015*. International Energy Agency (IEA)/OECD, Paris.

Irfan, M., Gonzalez, C. F., Raza, S., Rafiq, M., Hasan, F., Khan, S., et al. (2018). Improvement in thermostability of xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* C5 by site directed mutagenesis. *Enzyme and Microbial Technology*, 111, 38-47.

Itoh, T., Ochiai, A., Mikami, B., Hashimoto, W., Murata, K. (2006). A novel glycoside hydrolase family 105: the structure of family 105 unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase complexed with a disaccharide in comparison with family 88 enzyme complexed with the disaccharide. *Journal of Molecular Biology*, 360(3), 573-585.

Jauris, S., Rucknagel, K. P., Schwarz, W. H., Kratzsch, P., Bronnenmeier, K., Staudenbauer, W. L. (1990). Sequence analysis of the *Clostridium stercorarium* celZ gene encoding a thermoactive cellulase (Avicelase I): identification of catalytic and cellulose-binding domains. *Molecular and General Genetics*, 223(2), 258-267.

Jeong, M. Y., Kim, S., Yun, C. W., Choi, Y. J., Cho, S. G. (2007). Engineering a de novo internal disulfide bridge to improve the thermal stability of xylanase from *Bacillus stearothermophilus* No. 236. *Journal of Biotechnology*, 127(2), 300-309.

Johnson, E. A., Madia, A., Demain, A. L. (1981). Chemically Defined Minimal Medium for Growth of the Anaerobic Cellulolytic Thermophile *Clostridium thermocellum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(4), 1060-1062.

Kabel, M. A., Bos, G., Zeevalking, J., Voragen, A. G., Schols, H. A. (2007). Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Bioresource Technology*, 98(10), 2034-2042.

Kaur, A., Singh, S., Singh, R. S., Schwarz, W. H., Puri, M. (2010). Hydrolysis of citrus peel naringin by recombinant alpha-L-rhamnosidase from *Clostridium stercorarium*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(10), 1419-1422.

Kazamia, E., Smith, A. G. (2014). Assessing the environmental sustainability of biofuels. *Trends in Plant Science*, 19(10), 615-618.

Kim, H., Jung, K. H., Pack, M. Y. (2000). Molecular characterization of xynX, a gene encoding a multidomain xylanase with a thermostabilizing domain from *Clostridium thermocellum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(4), 521-527.

Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., Bohn, A. (2005). Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44(22), 3358-3393.

Koeck, D. E., Pechtl, A., Zverlov, V. V., Schwarz, W. H. (2014). Genomics of cellulolytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 29, 171-183.

- Kuge, T., Watanabe, A., Hasegawa, S., Teramoto, H., Inui, M. (2017).** Functional analysis of arabinofuranosidases and a xylanase of *Corynebacterium alkanolyticum* for arabinoxylan utilization in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(12), 5019-5032.
- Lei, Z., Shao, Y., Yin, X., Yin, D., Guo, Y., Yuan, J. (2016).** Combination of Xylanase and Debranching Enzymes Specific to Wheat Arabinoxylan Improve the Growth Performance and Gut Health of Broilers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(24), 4932-4942.
- Li, M., Pu, Y., Ragauskas, A. J. (2016).** Current Understanding of the Correlation of Lignin Structure with Biomass Recalcitrance. *Front Chem*, 4, 45.
- Lim, Y. R., Yeom, S. J., Kim, Y. S., Oh, D. K. (2011).** Synergistic production of L-arabinose from arabinan by the combined use of thermostable endo- and exo-arabinanases from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Bioresource Technology*, 102(5), 4277-4280.
- Liu, C., van der Heide, E., Wang, H., Li, B., Yu, G., Mu, X. (2013).** Alkaline twin-screw extrusion pretreatment for fermentable sugar production. *Biotechnology for biofuels*, 6, 97.
- Lombard, V., Bernard, T., Rancurel, C., Brumer, H., Coutinho, P. M., Henrissat, B. (2010).** A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics. *Biochemical Journal*, 432(3), 437-444.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., Henrissat, B. (2014).** The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D490-495.
- Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W. B. (2009).** Revised road map to the phylum Firmicutes. In De Vos, P., Garrity, G. M., et al. (Eds.), *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Three The Firmicutes* (pp. 1-13). Springer New York, New York, NY.
- Madden, R. H. (1983).** Isolation and Characterization of *Clostridium stercorarium* sp. nov., Cellulolytic Thermophile. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33(4), 837-840.
- Maus, I., Koeck, D. E., Cibis, K. G., Hahnke, S., Kim, Y. S., Langer, T., et al. (2016).** Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates. *Biotechnology for biofuels*, 9, 171.
- Mechelke, M., Herlet, J., Benz, J. P., Schwarz, W. H., Zverlov, V. V., Liebl, W., et al. (2017a).** HPAEC-PAD for oligosaccharide analysis-novel insights into analyte sensitivity and response stability. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(30), 7169-7181.
- Mechelke, M., Koeck, D. E., Broeker, J., Roessler, B., Krabichler, F., Schwarz, W. H., et al. (2017b).** Characterization of the arabinoxylan-degrading machinery of the thermophilic bacterium *Herbinix hemicellulosilytica*-Six new xylanases, three arabinofuranosidases and one xylosidase. *Journal of Biotechnology*, 257, 122-130.
- Mesnager, S., Fontaine, T., Mignot, T., Delepierre, M., Mock, M., Fouet, A. (2000).** Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *EMBO Journal*, 19(17), 4473-4484.

Mewis, K., Lenfant, N., Lombard, V., Henrissat, B. (2016). Dividing the Large Glycoside Hydrolase Family 43 into Subfamilies: a Motivation for Detailed Enzyme Characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(6), 1686-1692.

Moreira, L. R., Filho, E. X. (2008). An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(2), 165-178.

Nghiem, N. P., Montanti, J., Johnston, D. B., Drapcho, C. (2011). Fractionation of corn fiber treated by soaking in aqueous ammonia (SAA) for isolation of hemicellulose B and production of C5 sugars by enzyme hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(8), 1390-1404.

Numan, M. T., Bhosle, N. B. (2006). Alpha-L-arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 33(4), 247-260.

Otieno, D. O., Ahring, B. K. (2012). The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannoooligosaccharides (MOS). *Carbohydrate research*, 360, 84-92.

Pandey, M. P., Kim, C. S. (2010). Lignin Depolymerization and Conversion: A Review of Thermochemical Methods. *Chemical Engineering & Technology*, 34(1), 29-41.

Pauly, M., Keegstra, K. (2008). Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *Plant Journal*, 54(4), 559-568.

Perez, J., Munoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martinez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5(2), 53-63.

Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785-786.

Pihlajaniemi, V., Sipponen, M. H., Pastinen, O., Nyysola, A., Laakso, S. (2016). The effect of direct and counter-current flow-through delignification on enzymatic hydrolysis of wheat straw, and flow limits due to compressibility. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(12), 2605-2613.

Poehlein, A., Zverlov, V. V., Daniel, R., Schwarz, W. H., Liebl, W. (2013). Complete Genome Sequence of *Clostridium stercorarium* subsp. *stercorarium* Strain DSM 8532, a Thermophilic Degradator of Plant Cell Wall Fibers. *Genome announcements*, 1(2), e0007313.

Pollet, A., Delcour, J. A., Courtin, C. M. (2010). Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(3), 176-191.

Ratanakhanokchai, K., Waeonukul, R., Pason, P., Tachaapaikoon, C., Kyu, K. L., Sakka, K., et al. (2013). *Paenibacillus curdlanolyticus* Strain B-6 Multienzyme Complex: A Novel System for Biomass Utilization. In Matovic, M. D. (Ed.), *Biomass Now - Cultivation and Utilization* (pp. 369-394). IntechOpen.

Raweesri, P., Riangrunrojana, P., Pinphanichakarn, P. (2008). alpha-L-Arabinofuranosidase from *Streptomyces* sp. PC22: purification, characterization and its synergistic action with xylanolytic

enzymes in the degradation of xylan and agricultural residues. *Bioresource Technology*, 99(18), 8981-8986.

Reichenbecher, M., Lottspeich, F., Bronnenmeier, K. (1997). Purification and properties of a cellobiose phosphorylase (CepA) and a cellodextrin phosphorylase (CepB) from the cellulolytic thermophile *Clostridium stercorarium*. *European Journal of Biochemistry*, 247(1), 262-267.

Rhee, M. S., Wei, L., Sawhney, N., Kim, Y. S., Rice, J. D., Preston, J. F. (2016). Metabolic potential of *Bacillus subtilis* 168 for the direct conversion of xylans to fermentation products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1501-1510.

Ridley, B. L., O'Neill, M. A., Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), 929-967.

Riedel, K., Ritter, J., Bauer, S., Bronnenmeier, K. (1998). The modular cellulase CelZ of the thermophilic bacterium *Clostridium stercorarium* contains a thermostabilizing domain. *FEMS Microbiology Letters*, 164(2), 261-267.

Riedel, K., Ritter, J., Bronnenmeier, K. (1997). Synergistic interaction of the *Clostridium stercorarium* cellulases Avicelase I (CelZ) and Avicelase II (CelY) in the degradation of microcrystalline cellulose. *FEMS Microbiology Letters*, 147(2), 239-243.

Ruhmann, B., Schmid, J., Sieber, V. (2014). Fast carbohydrate analysis via liquid chromatography coupled with ultra violet and electrospray ionization ion trap detection in 96-well format. *J Chromatogr A*, 1350, 44-50.

Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30(5), 279-291.

Sakka, K., Kojima, Y., Kondo, T., Karita, S., Ohmiya, K., Shimada, K. (1993a). Nucleotide sequence of the *Clostridium stercorarium* xynA gene encoding xylanase A: identification of catalytic and cellulose binding domains. *Biosci Biotechnol Biochem*, 57(2), 273-277.

Sakka, K., Yoshikawa, K., Kojima, Y., Karita, S., Ohmiya, K., Shimada, K. (1993b). Nucleotide Sequence of the *Clostridium stercorarium* xylA Gene Encoding a Bifunctional Protein with beta-D-Xylosidase and alpha-L-Arabinofuranosidase Activities, and Properties of the Translated Product. *Biosci Biotechnol Biochem*, 57(2), 268-272.

Sakka, M., Tachino, S., Katsuzaki, H., van Dyk, J. S., Pletschke, B. I., Kimura, T., et al. (2012). Characterization of Xyn30A and Axl43A of *Bacillus licheniformis* SVD1 identified by its genomic analysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 51(4), 193-199.

Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37(1), 19-27.

Scheller, H. V., Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 263-289.

Schwarz, D., Dorrstein, J., Kugler, S., Schieder, D., Zollfrank, C., Sieber, V. (2016). Integrated biorefinery concept for grass silage using a combination of adapted pulping methods for advanced saccharification and extraction of lignin. *Bioresource Technology*, 216, 462-470.

Schwarz, W. H. (2001). The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(5-6), 634-649.

Schwarz, W. H., Adelsberger, H., Jauris, S., Hertel, C., Funk, B., Staudenbauer, W. L. (1990). Xylan degradation by the thermophile *Clostridium stercorarium*: cloning and expression of xylanase, beta-D-xylosidase, and alpha-L-arabinofuranosidase genes in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 170(1), 368-374.

Schwarz, W. H., Bronnenmeier, K., Krause, B., Lottspeich, F., Staudenbauer, W. L. (1995a). Debranching of arabinoxylan: properties of the thermoactive recombinant alpha-L-arabinofuranosidase from *Clostridium stercorarium* (ArfB). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(5), 856-860.

Schwarz, W. H., Bronnenmeier, K., Landmann, B., Wanner, G., Staudenbauer, W. L., Kurose, N., et al. (1995b). Molecular Characterization of Four Strains of the Cellulolytic Thermophile *Clostridium stercorarium*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(9), 1661-1665.

Schwarz, W. H., Brunecky, R., Broeker, J., Liebl, W., Zverlov, V. V. (2018). Handling gene and protein names in the age of bioinformatics: the special challenge of secreted multimodular bacterial enzymes such as the cbhA/cbh9A gene of *Clostridium thermocellum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 34(3), 42.

Searle, S. Y., Malins, C. J. (2016). Waste and residue availability for advanced biofuel production in EU Member States. *Biomass and Bioenergy*, 89, 2-10.

Shallom, D., Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 219-228.

Si Si, H., Kurokawa, J., Suryani, Kimura, T., Ohmiya, K., Sakka, K. (2005). A novel thermophilic pectate lyase containing two catalytic modules of *Clostridium stercorarium*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 69(11), 2138-2145.

Sorensen, H. R., Pedersen, S., Jorgensen, C. T., Meyer, A. S. (2007). Enzymatic hydrolysis of wheat arabinoxylan by a recombinant "minimal" enzyme cocktail containing beta-xylosidase and novel endo-1,4-beta-xylanase and alpha-L-arabinofuranosidase activities. *Biotechnology Progress*, 23(1), 100-107.

Stam, M. R., Danchin, E. G., Rancurel, C., Coutinho, P. M., Henrissat, B. (2006). Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of alpha-amylase-related proteins. *Protein Engineering Design and Selection*, 19(12), 555-562.

Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif*, 41(1), 207-234.

Sun, J. L., Sakka, K., Karita, S., Kimura, T., Ohmiya, K. (1998). Adsorption of *Clostridium stercorarium* xylanase A to insoluble xylan and the importance of the CBDs to xylan hydrolysis. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(1), 63-68.

Sun, X. F., Sun, R., Fowler, P., Baird, M. S. (2005). Extraction and characterization of original lignin and hemicelluloses from wheat straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 860-870.

- Suryani, Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K. (2003).** Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding the *Clostridium stercorarium* alpha-galactosidase Aga36A in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67(10), 2160-2166.
- Suryani, Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K. (2004).** Sequencing and expression of the gene encoding the *Clostridium stercorarium* beta-xylosidase Xyl43B in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 68(3), 609-614.
- Taibi, Z., Saoudi, B., Boudelaa, M., Trigui, H., Belghith, H., Gargouri, A., et al. (2012).** Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. strain Cpt20 isolated from poultry compost. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(3), 663-679.
- Tuck, C. O., Perez, E., Horvath, I. T., Sheldon, R. A., Poliakoff, M. (2012).** Valorization of biomass: deriving more value from waste. *Science*, 337(6095), 695-699.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itävaara, M. (2000).** Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, 72(2), 169-183.
- Valls, A., Diaz, P., Pastor, F. I., Valenzuela, S. V. (2016).** A newly discovered arabinoxylan-specific arabinofuranohydrolase. Synergistic action with xylanases from different glycosyl hydrolase families. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(4), 1743-1751.
- Van Dyk, J. S., Pletschke, B. I. (2012).** A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes--factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1458-1480.
- Verherbruggen, Y., Marcus, S. E., Haeger, A., Verhoef, R., Schols, H. A., McCleary, B. V., et al. (2009).** Developmental complexity of arabinan polysaccharides and their processing in plant cell walls. *Plant Journal*, 59(3), 413-425.
- Verhoef, R., Lu, Y., Knox, J. P., Voragen, A. G., Schols, H. A. (2009).** Fingerprinting complex pectins by chromatographic separation combined with ELISA detection. *Carbohydr Res*, 344(14), 1808-1817.
- Wood, T. M., Bhat, K. M. (1988).** Methods for Measuring Cellulase Activities. *Methods in Enzymology*, 160, 87-112.
- Yang, Y., Sun, J., Wu, J., Zhang, L., Du, L., Matsukawa, S., et al. (2016).** Characterization of a Novel alpha-L-Arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 7 and Rational Design for Its Thermostability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(40), 7546-7554.
- Yutin, N., Galperin, M. Y. (2013).** A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environmental Microbiology*, 15(10), 2631-2641.
- Zhang, X., Tu, B., Dai, L. R., Lawson, P. A., Zheng, Z. Z., Liu, L. Y., et al. (2018).** *Petroclostridium xylanilyticum* gen. nov., sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from an oilfield, and reclassification of clostridial cluster III members into four novel genera in a new Hungateiclostridiaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*

Zhao, G., Ali, E., Araki, R., Sakka, M., Kimura, T., Sakka, K. (2005). Function of the family-9 and family-22 carbohydrate-binding modules in a modular beta-1,3-1,4-glucanase/xylanase derived from *Clostridium stercorarium* Xyn10B. *Biosci Biotechnol Biochem*, 69(8), 1562-1567.

Zuroff, T. R., Curtis, W. R. (2012). Developing symbiotic consortia for lignocellulosic biofuel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(4), 1423-1435.

Zverlov, V. V., Hertel, C., Bronnenmeier, K., Hroch, A., Kellermann, J., Schwarz, W. H. (2000). The thermostable alpha-L-rhamnosidase RamA of *Clostridium stercorarium*: biochemical characterization and primary structure of a bacterial alpha-L-rhamnoside hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase. *Molecular Microbiology*, 35(1), 173-179.

Zverlov, V. V., Hiegl, W., Kock, D. E., Kellermann, J., Kollmeier, T., Schwarz, W. H. (2010). Hydrolytic bacteria in mesophilic and thermophilic degradation of plant biomass. *Engineering in Life Sciences*, 10(6), 528-536.

Zverlov, V. V., Liebl, W., Bachleitner, M., Schwarz, W. H. (1998). Nucleotide sequence of arfB of *Clostridium stercorarium*, and prediction of catalytic residues of alpha-L-arabinofuranosidases based on local similarity with several families of glycosyl hydrolases. *FEMS Microbiology Letters*, 164(2), 337-343.

Zverlov, V. V., Schwarz, W. H. (2008). Bacterial cellulose hydrolysis in anaerobic environmental subsystems-*Clostridium thermocellum* and *Clostridium stercorarium*, thermophilic plant-fiber degraders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125, 298-307.

6 Anhang

6.1 Klonierung, Produktion und Reinigung rekombinanter *C. stercorarium* Enzyme

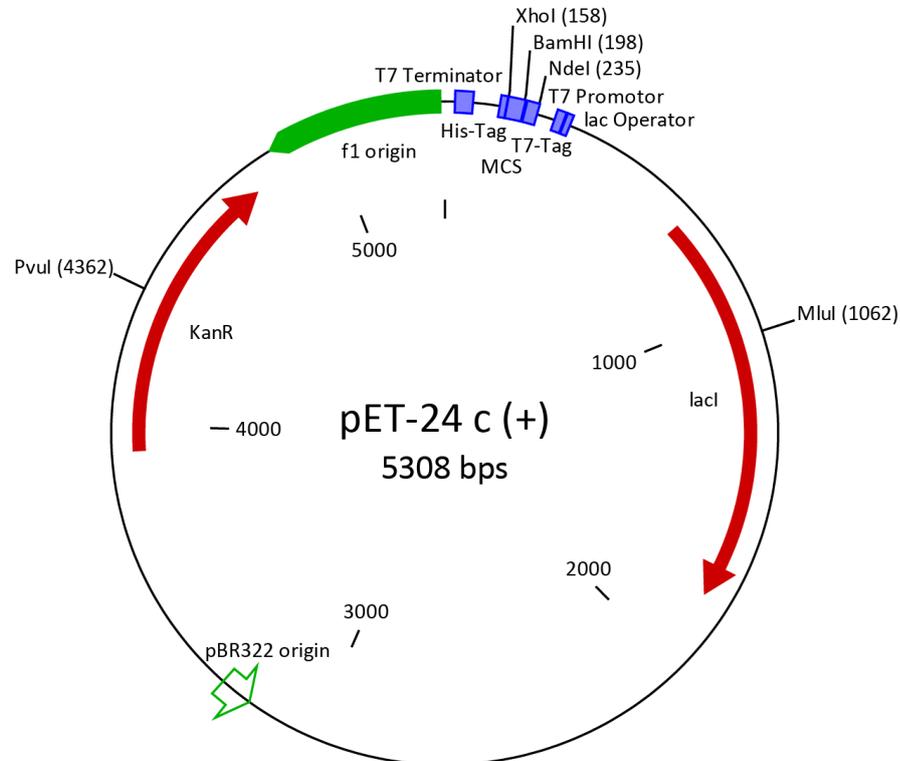


Abbildung 6.1 Vektorkarte des pET-24c(+) Leervektors mit den Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme. Kanamycin Resistenzgen (KanR), Multiple cloning site (MCS).

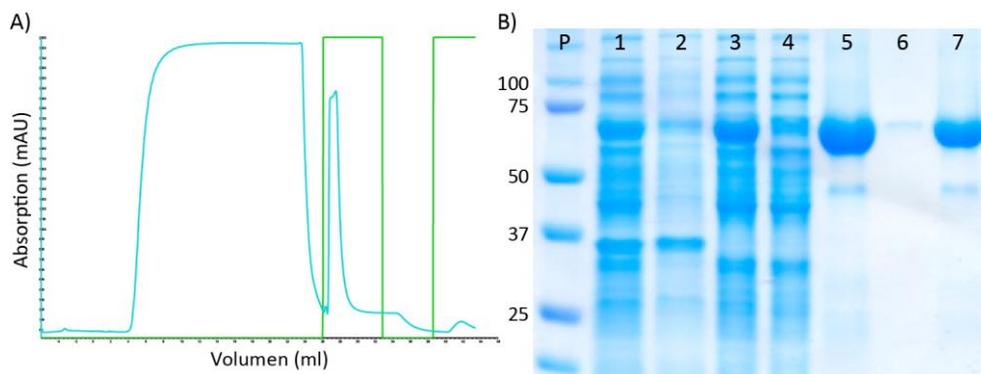


Abbildung 6.2 Beispiele für ein Chromatogramm und eine SDS-PAGE Analyse aus der Proteinreinigung. (A) Chromatogramm der nativen His₆-Affinitätsreinigung von Xyn11A. (B) SDS-Page der Proteinfraktionen aus der nativen His₆-Affinitätsreinigung von Xyn11A. Die Proteinmassen sind in kDa angegeben. P: Protein-Größenstandard Precision Plus Protein™ Dual Color Standard, 1: Zellextrakt, 2: Pellet, 3: Überstand, 4: Durchlauf, 5: Eluat, 6: Niederschlag, 7: Proteinlösung.

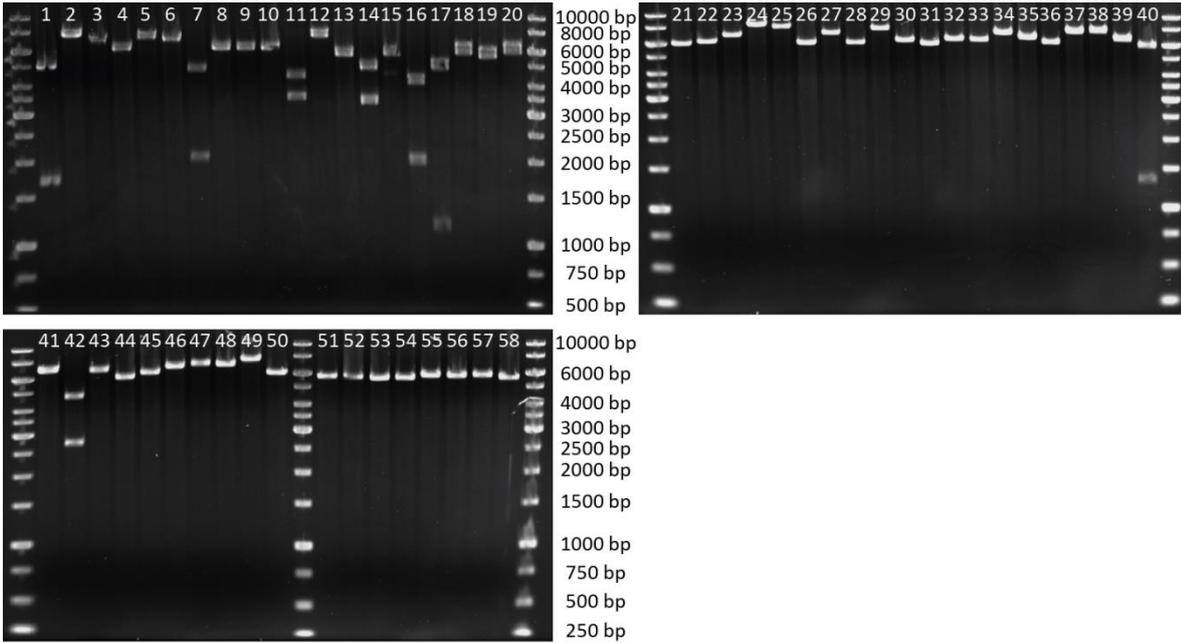


Abbildung 6.3 Restriktionsverdau der 58 pET-24c(+) Expressionsvektoren mit den *C. stercorarium* Genen für die ausgewählten Glycosidhydrolasen (1–50) und Kohlenhydratesterasen (51–58). Die Vektoren wurden mit MluI gespalten. DNA-Längenstandard: GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Die Zahlen werden in Tabelle 6.1 den Proteinen zugeordnet.

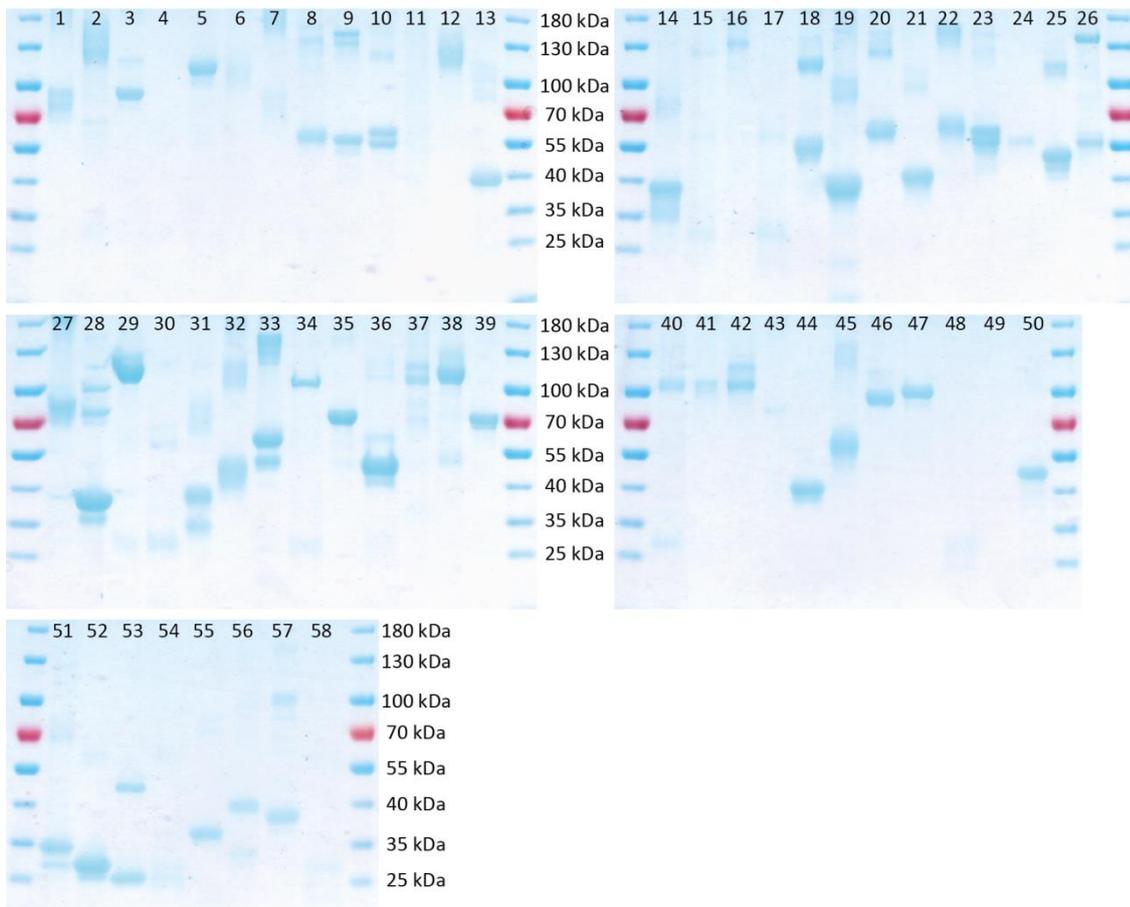


Abbildung 6.4 SDS-PAGE Analyse der heterolog produzierten Glycosidhydrolasen (1–50) und Kohlenhydratesterasen (51–58). Die Proteinkonzentration wurde in 8 M Harnstoff bestimmt und es wurden jeweils 2 µg des Proteins aufgetragen. Protein-Größenstandard: PageRuler Prestained Protein Ladder. Die Nummern werden in Tabelle 6.1 den Proteinen zugeordnet.

Tabelle 6.1 Nummerierung der *C. stercorarium* Proteine für den Restriktionsverdau der pET-24c(+) Expressionsvektoren (Abbildung 6.3) und die SDS-Page der rekombinanten Proteine (Abbildung 6.4).

Nummerierung	Protein	Nummerierung	Protein	Nummerierung	Protein
1	AGC67053.1	21	AGC67946.1	41	Bga35A
2	RamB	22	AGC67947.1	42	ArfD
3	AGC67127.1	23	AGC67967.1	43	Agu67A
4	AGC67128.1	24	Bga2B	44	AGC69452.1
5	Bga2E	25	AGC68033.1	45	Bxl43C
6	Bga2D	26	Xyn105F	46	Bxl3B
7	AGC67292.1	27	AGC68044.1	47	Bgl3Z
8	Xyn10E	28	AGC68046.1	48	AGC67350.1
9	Xyl43B	29	Ram78A	49	AGC68204.1
10	Arf51B	30	BglA	50	Nag3A
11	Bga2C	31	Arf43C	51	AGC67568.1
12	Xyn10C	32	Abn43A	52	Axe4A
13	Xyn10B	33	Man26A	53	AGC68045.1
14	Axh43A	34	Bxl31D	54	AGC68379.1
15	Xyn10D	35	Uid2A	55	Axe7B
16	AGC67830.1	36	AGC68671.1	56	AGC69318.1
17	Xyl43A	37	Gal53A	57	AGC69600.1
18	Bxl39A	38	Cel9Z	58	AGC69220.1
19	AGC67892.1	39	Xyn11A		
20	Arf43A	40	AGC69032.1		

Tabelle 6.2 Proteinkonzentrationen der rekombinanten *C. stercorarium* Proteine.

Proteine	Konzentration (mg/ml)	Proteine	Konzentration (mg/ml)	Proteine	Konzentration (mg/ml)
Bga2B	1,54	AGC67128.1	0,55	AGC67946.1	8,86
Bga2E	2,96	Bxl31D	0,35	AGC68044.1	2,56
Bga2D	1,80	Bga35A	3,27	AGC68046.1	3,39
Bga2C	2,75	AGC68033.1	0,37	AGC67967.1	0,47
Uid2A	2,81	Bxl39A	21,10	AGC67053.1	3,97
Bxl3B	4,08	Axh43A	2,92	AGC67292.1	3,62
Bgl3Z	0,58	Arf43A	1,58	RamB	1,09
AGC67350.1	0,31	Arf43C	8,44	BglA	0,25
AGC68204.1	2,43	Abn43A	9,72	AGC69032.1	1,06
Nag3A	14,32	Xyl43B	4,89	ArfD	0,82
Cel9Z	5,69	Xyl43A	6,71	AGC69220.1	0,42
Xyn10E	1,91	Bxl43C	13,59	AGC67568.1	7,46
Xyn10C	6,44	Arf51B	3,75	Axe4A	11,04
Xyn10B	14,30	Gal53A	2,99	AGC68379.1	0,41
Xyn10D	5,39	Agu67A	6,54	AGC69318.1	2,67
Xyn11A	7,86	Ram78A	0,92	Axe7B	4,23
Man26A	9,00	AGC69452.1	1,89	AGC69600.1	6,57
AGC68671.1	1,20	AGC67127.1	1,17	AGC68045.1	1,28
AGC67830.1	0,41	Xyn105F	1,82		
AGC67947.1	7,52	AGC67892.1	10,30		

Die Proteinkonzentrationen der reduzierten Proteine wurden nach der Zugabe von 20 % Glycerin und 0,02 % NaN₃ photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm in 8 M Harnstoff gemessen.

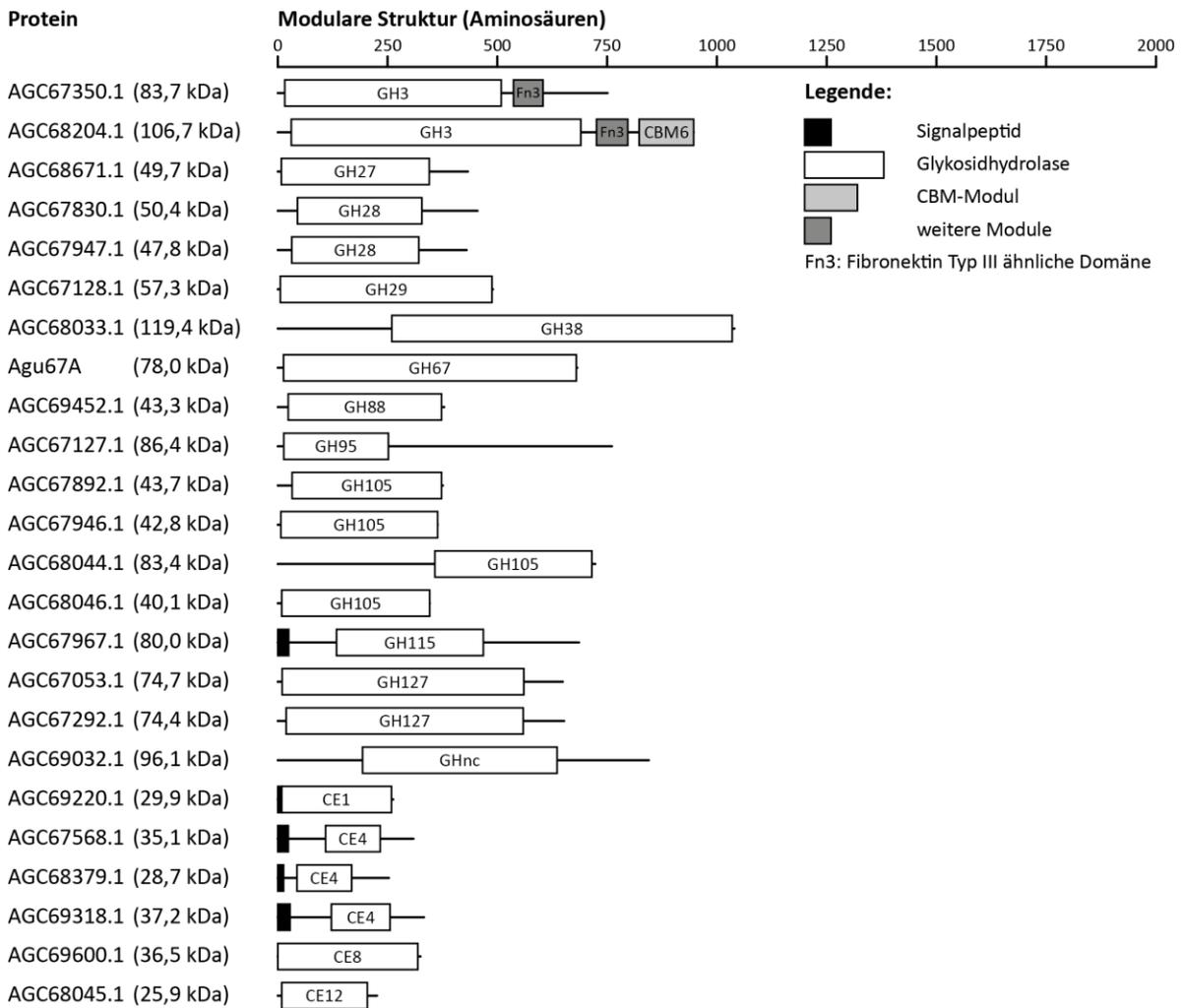


Abbildung 6.5 Schematische Struktur der *C. stercorarium* Glycosidhydrolasen (GH) und Kohlenhydratesterasen (CE) für die keine Aktivität nachgewiesen werden konnte. Die Molekulare Masse der nativen Proteine ist in Klammern angegeben. Die Größe der Enzyme und Module ist entsprechend der Anzahl an Aminosäuren skaliert. Die Klassifizierung von GH- und CBM-Modulen wurde mit der CAZy-Datenbank ermittelt (Lombard *et al.*, 2014). Die Modulstruktur wurde mit der Pfam-Datenbank ermittelt (Finn *et al.*, 2016).

6.2 Referenzgeraden

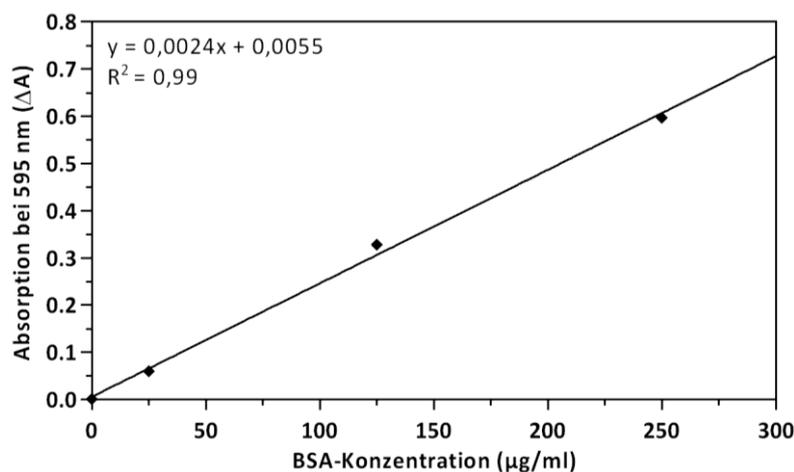


Abbildung 6.6 Bradford-Referenzgerade zur photometrischen Quantifizierung der Gesamtproteinkonzentration bei einer Wellenlänge von 595 nm. Für die Referenzgerade wurden neun Proteinkonzentrationen in Duplikaten gemessen: 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1.000, 1.500, 2.000 μg/ml. Linearer Bereich abgebildet: 0–250 μg/ml.

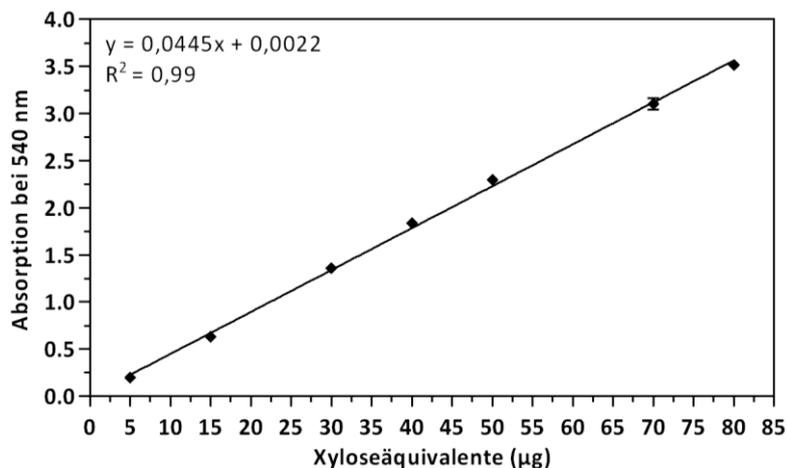


Abbildung 6.7 Lineare DNSA-Referenzgerade zur photometrischen Quantifizierung der Xyloseäquivalente bei einer Wellenlänge von 540 nm. Für die Referenzgerade wurden sieben Xylosekonzentrationen in Triplikaten gemessen: 5; 15; 30; 40; 50; 70; 80 μg/DNSA Ansatz.

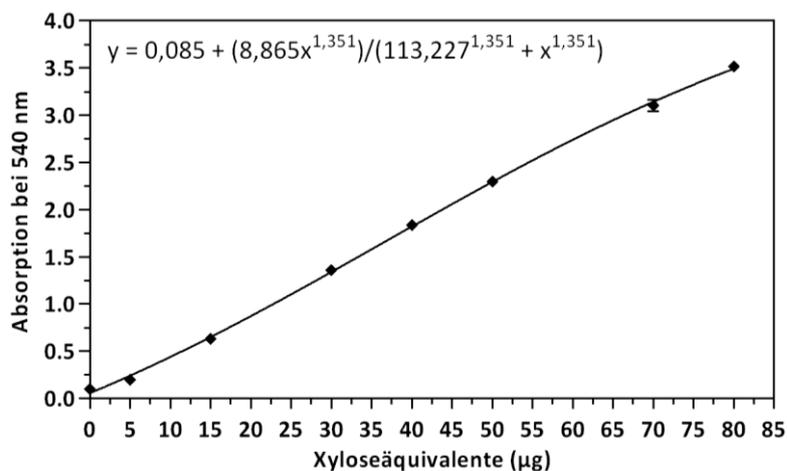


Abbildung 6.8 Sigmoidale DNSA-Referenzgerade zur photometrischen Quantifizierung der Xyloseäquivalente bei einer Wellenlänge von 540 nm. Für die Referenzgerade wurden acht Xylosekonzentrationen in Triplikaten gemessen: 0; 5; 15;

30; 40; 50; 70; 80 µg/DNSA Ansatz.

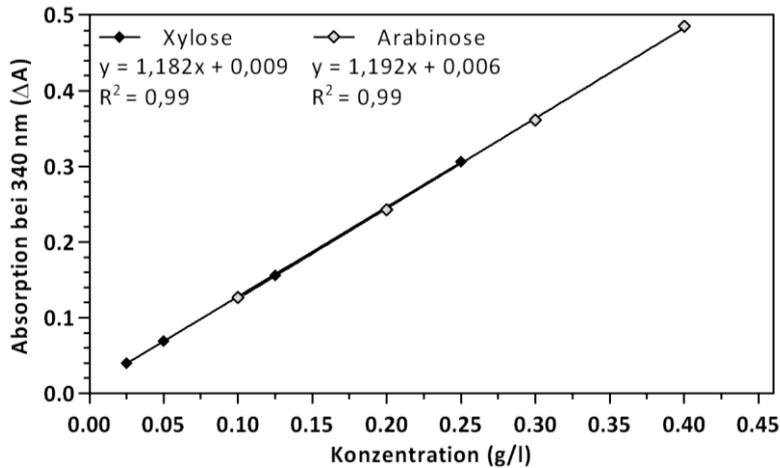


Abbildung 6.9 Referenzgerade zur photometrischen Quantifizierung der Xylose- und Arabinosekonzentration mit dem Xylose/Arabinose Assay Kit (Megazyme) bei einer Wellenlänge von 340 nm. Für die Referenzgerade wurden jeweils vier Konzentrationen in Duplikaten gemessen: Xylose: 0,025; 0,05; 0,125; 0,25 g/l; Arabinose: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 g/l.

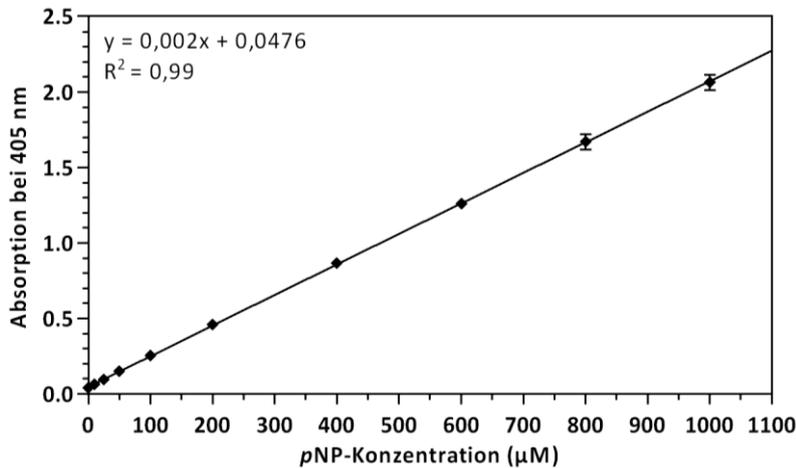


Abbildung 6.10 Lineare pNP-Referenzgerade zur photometrischen Quantifizierung der freigesetzten pNP-Konzentration bei einer Wellenlänge von 405 nm. Für die Referenzgerade wurden zehn pNP-Konzentrationen in 0,1 M MOPS-Reaktionspuffern in Triplikaten gemessen: 0, 10, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1.000 µM.

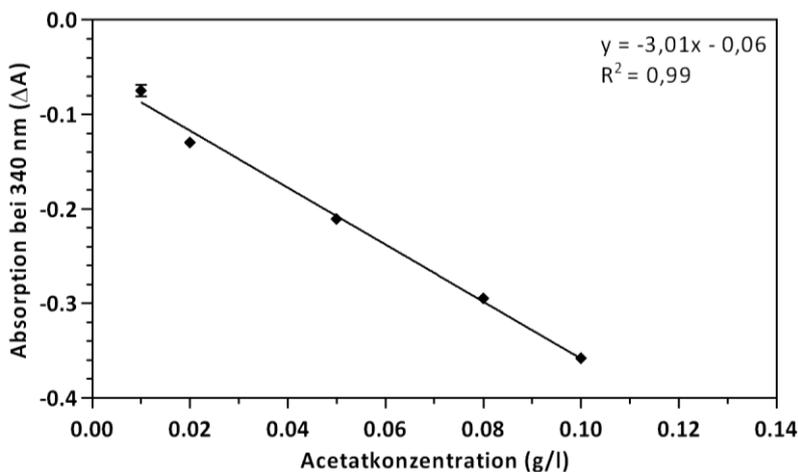


Abbildung 6.11 Referenzgerade zur photometrischen Quantifizierung der Acetatkonzentration mit dem Acetic Acid Assay Kit (Megazyme) bei einer Wellenlänge von 340 nm. Für die Referenzgerade wurden fünf Konzentrationen in Duplikaten gemessen; 0,01; 0,02; 0,05; 0,08; 0,1 g/l.

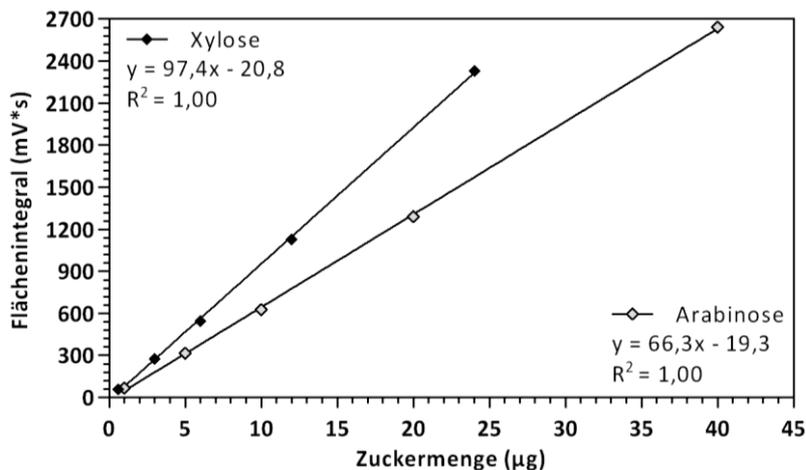


Abbildung 6.12 Referenzgerade zur Quantifizierung der Xylose- und Arabinosemenge mit HPLC. Für die Referenzgerade wurden jeweils fünf Injektionsvolumen mit 0,3 µg/µl Xylose oder 0,5 µg/µl Arabinose gemessen: Injektionsvolumen: 2, 10, 20, 40, 80 µl. Konzentrationen: Xylose: 0,6; 3,0; 6,0; 12,0; 24,0 µg; Arabinose: 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 µg.

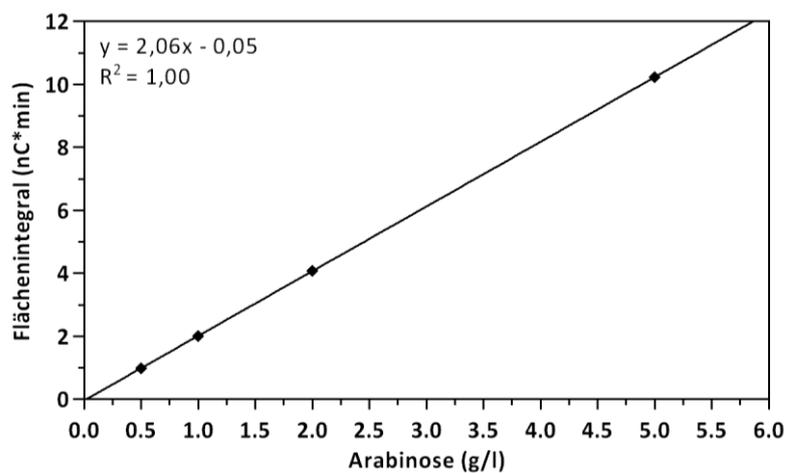


Abbildung 6.13 Referenzgerade zur Quantifizierung der Arabinosekonzentration mit HPAEC-PAD. Für die Referenzgerade wurden vier Arabinosekonzentrationen in 0,1 M MOPS-Reaktionspuffer gemessen: 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 mg/l.

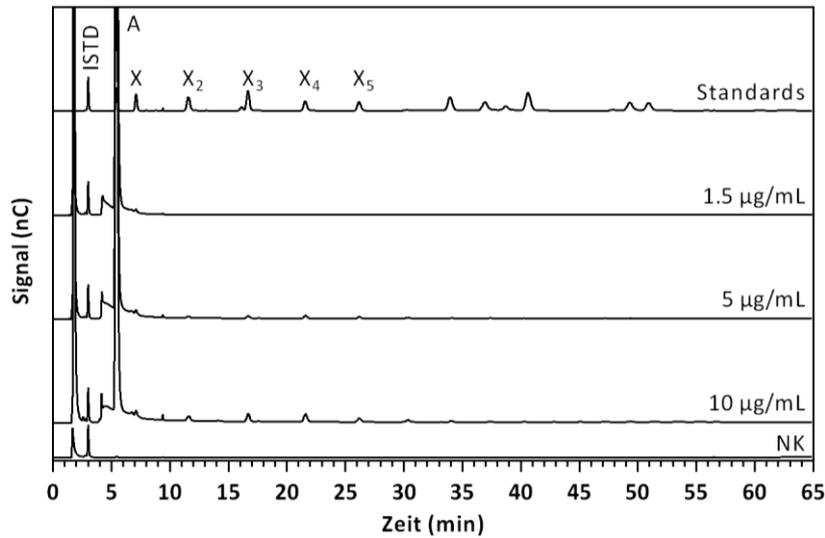
6.3 Charakterisierung rekombinanter *C. stercorarium* Enzyme

Abbildung 6.14 Hydrolyse von Arabinoxylan mit verschiedenen Konzentrationen von Axh43A analysiert mit HPAEC-PAD. Die Hydrolysen wurden mit 0,5 % (w/v) löslichem Arabinoxylan aus Weizen in ddH₂O über Nacht (24 h) bei 60 °C mit 1,5 µg/ml, 5,0 µg/ml und 10,0 µg/ml Axh43A durchgeführt. Standards: A: Arabinose, X–X₅: Xylose bis Xylopentaose, ISTD: Interner Standard, NK: Negativkontrolle (1:5 Verdünnung).

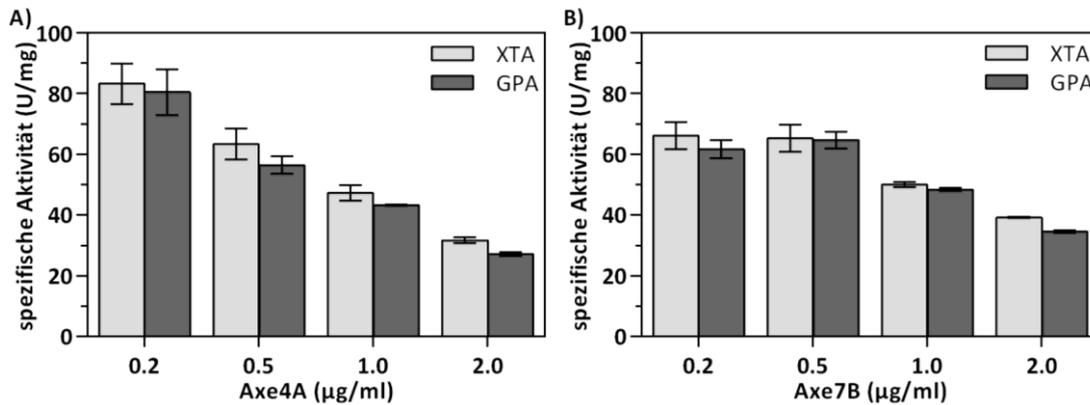


Abbildung 6.15 Enzymaktivität der Kohlenhydratesterasen Axh4A und Axh7B auf 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-D-xylopyranose (XTA) und β -D-Glucose-pentaacetat (GPA). Die Hydrolysen wurden in Triplikaten mit 0,2–2,0 µg/ml Enzym und 2,5 mM XTA oder GPA in 10 mM MOPS-Reaktionspuffer bei pH 6,5 und 60 °C in 30 min durchgeführt. Die Enzymaktivität wurde durch die Quantifizierung von freigesetztem Acetat mit dem Acetic Acid Assay Kit (Megazyme) bestimmt.

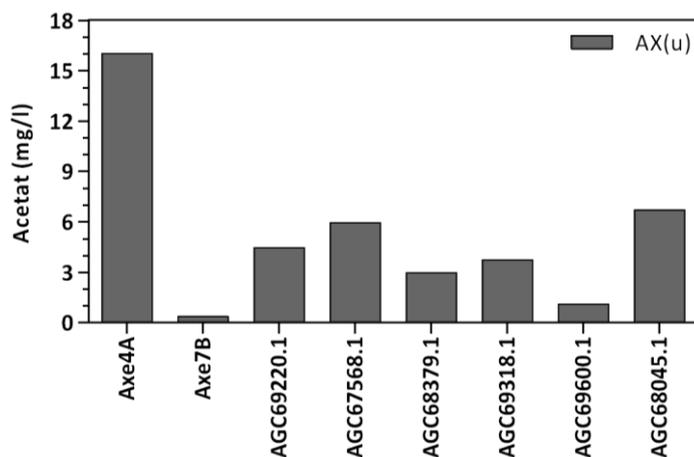


Abbildung 6.16 Acetatkonzentration die bei der Hydrolyse von unlöslichem Arabinoxylan (AX(u)) mit den Kohlenhydrat-esterasen freigesetzt wurde. Die Hydrolysen wurden in Einzelreaktionen mit 20 µg/ml Enzym und 2 % (w/v) unlöslichem Arabinoxylan aus Weizen in 0,1 M MOPS-Reaktionspuffer bei pH 6,5 und 60 °C über Nacht durchgeführt. Die Acetat-konzentration wurde mit dem Acetic Acid Assay Kit (Megazyme) quantifiziert.

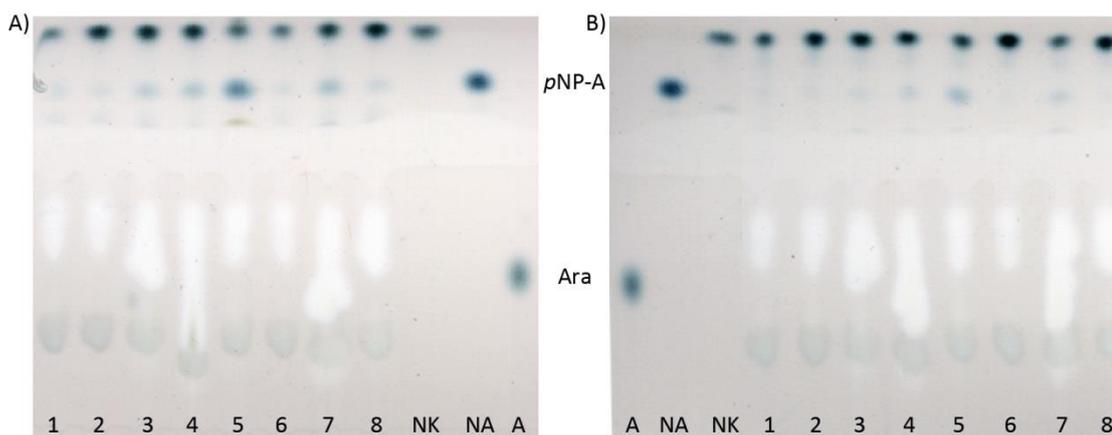


Abbildung 6.17 DC der Hydrolyse von (A) *pNP-2-O-trans-feruloyl-α-L-Arabinofuranosid* und (B) *pNP-5-O-trans-feruloyl-α-L-Arabinofuranosid* mit den Kohlenhydrat-esterasen. Es wurden jeweils 4 µl aufgetragen. Die Hydrolysen wurden mit 100 µg/ml Enzym und 2,24 mM Substrat in 0,1 M MOPS-Reaktionspuffer bei 60 °C über Nacht durchgeführt. NK: Negativkontrolle, 1: AGC67568.1, 2: Axe4A, 3: AGC68045.1, 4: AGC68379.1, 5: Axe7B, 6: AGC69600.1, 7: AGC69220.1, 8: AGC69318.1. Standards: Ara/A: Arabinose, *pNP-A*, NA: *pNP-α-L-Arabinofuranosid*.

6.4 Hydrolyse von ausgewählten Polysacchariden mit Enzymkombinationen

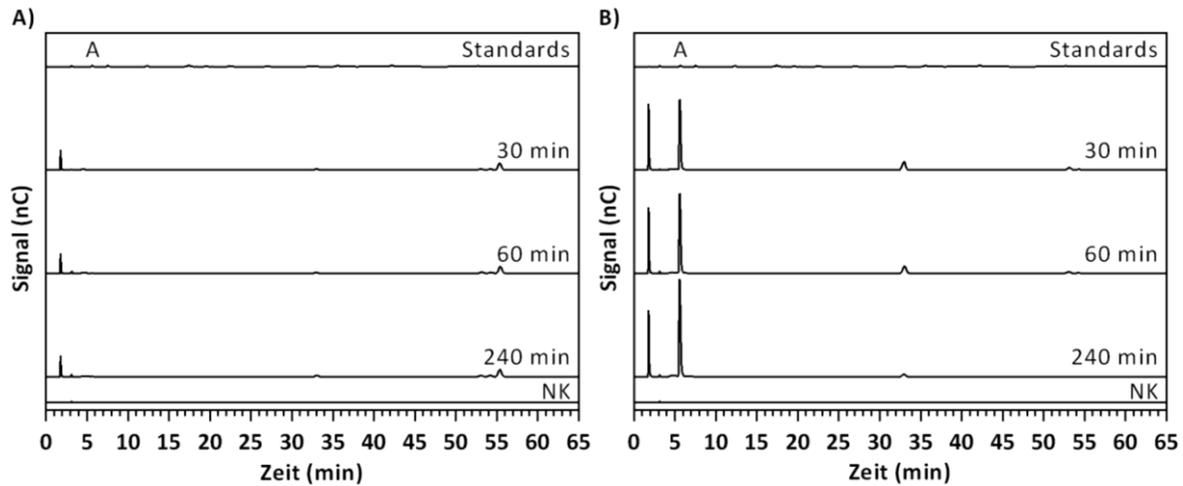


Abbildung 6.18 Hydrolytische Produkte der Hydrolyse von Arabinan mit ABn43A und Arf51B analysiert mit HPAEC-PAD. (A) Hydrolyse mit Abn43A. (B) Hydrolyse mit Abn43A und Arf51B. Die Hydrolysen wurden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Abn43A, 20 $\mu\text{g/ml}$ Arf51B und 0,5 % (w/v) Arabinan in 10 mM MOPS-Reaktionspuffer bei 60 °C und pH 6,5 in 30, 60 oder 240 min durchgeführt. Standards: A: Arabinose, X–X₅: Xylose bis Xylopentaose, A²XX, A³X, XA²XX, XA³XX, XA²⁺³XX, A²⁺³XX, NK: Negativkontrolle (1:10 Verdünnung).

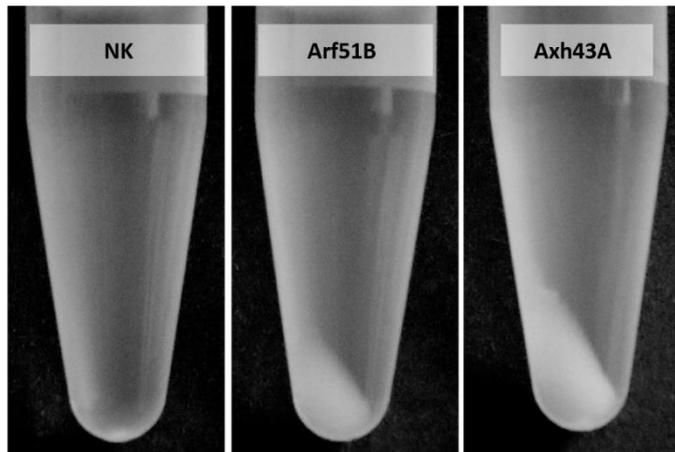
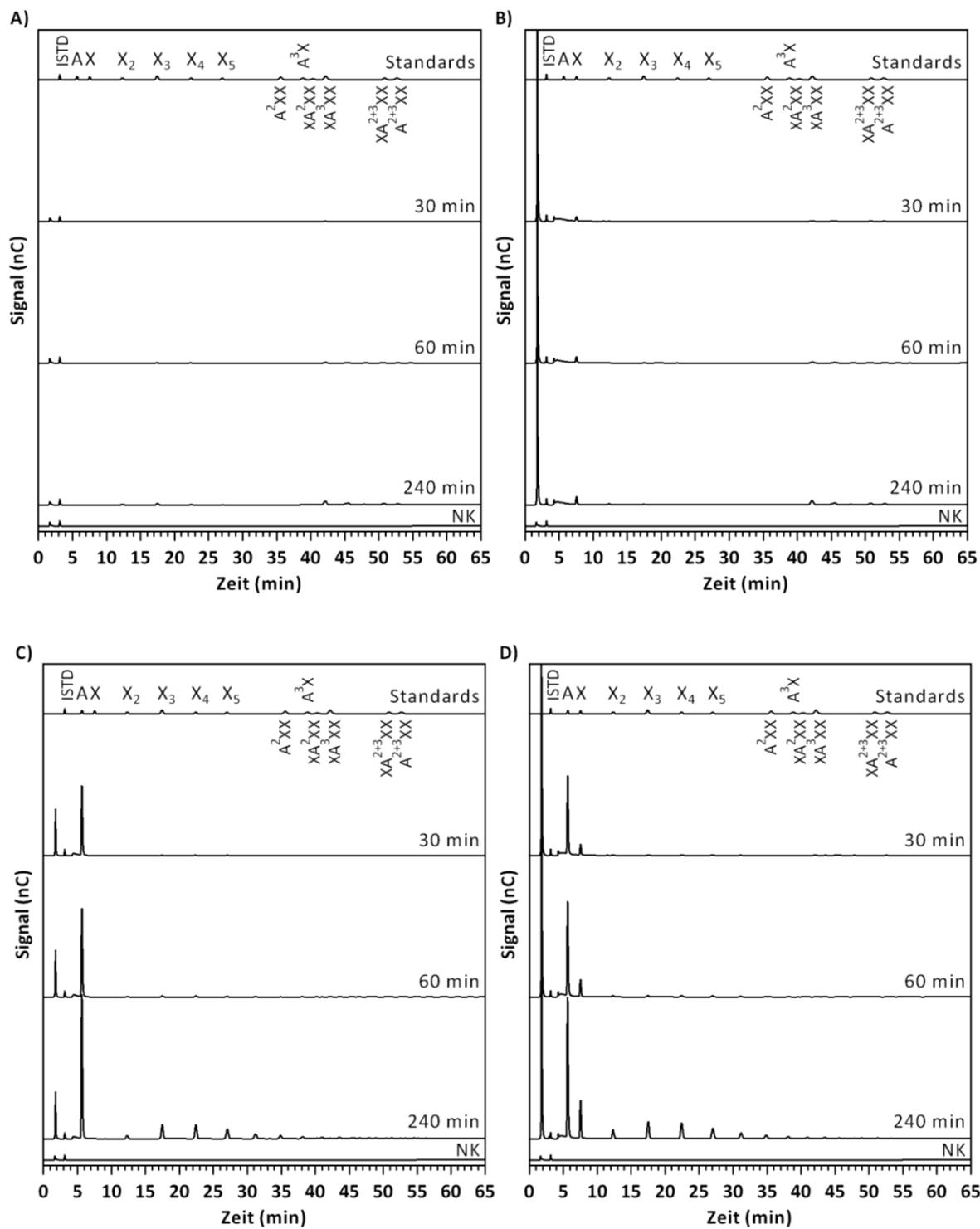


Abbildung 6.19 Ausgefälltes unlösliches Xylan nach der Hydrolyse von Arabinoxylan mit Arf51B und Axx43A. Die Hydrolysen wurden mit 15 $\mu\text{g/ml}$ Arf51B oder 1,5 $\mu\text{g/ml}$ Axx43A und 0,5 % (w/v) löslichem Arabinoxylan aus Weizen in ddH₂O bei 60 °C in 24 h durchgeführt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß zentrifugiert. NK: Negativkontrolle.



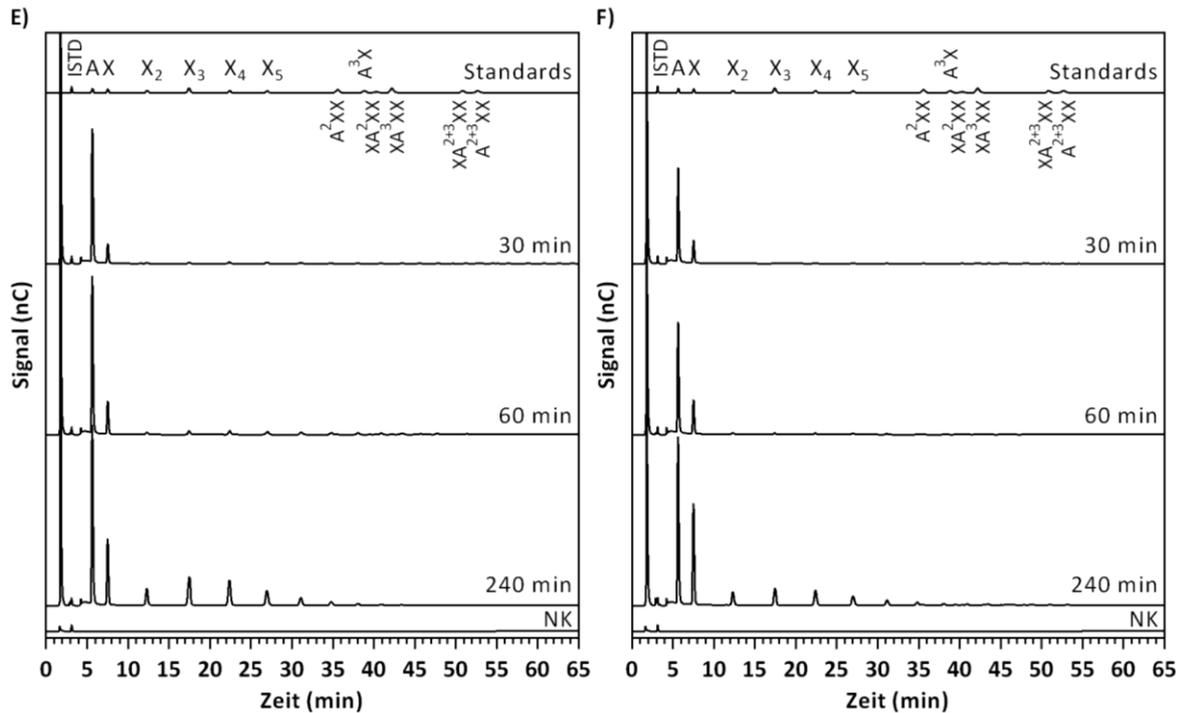


Abbildung 6.20 Hydrolytische Produkte der Hydrolyse von Arabinoxylan mit Xyn11A, Bxl3B und Axh43A analysiert mit HPAEC-PAD. (A) Hydrolyse mit Xyn11A. (B) Hydrolyse mit Xyn11A und Bxl3B. (C) Hydrolyse mit Xyn11A und Axh43A. (D) Hydrolyse mit Xyn11A, Bxl3B und Axh43A. (E) Hydrolyse mit Xyn11A, Bxl3B und der doppelten Konzentration Axh43A. (F) Hydrolyse mit Xyn11A, Axh43A und der doppelten Konzentration Bxl3B. Die Hydrolysen wurden mit 0,05 µg/ml Xyn11A, 1,5 µg/ml oder (E) 3,0 µg/ml Axh43A und 24 µg/ml oder (F) 48 µg/ml Bxl3B und 0,5 % (w/v) löslichem Arabinoxylan aus Weizen in 10 mM MOPS-Reaktionspuffer bei 60 °C und pH 6,5 in 30, 60 oder 240 min durchgeführt. Standards: A: Arabinose, X-X₅: Xylose bis Xylopentaose, A²XX, A³X, XA²XX, XA³XX, XA²⁺³XX, A²⁺³XX, ISTD: Interner Standard, NK: Negativkontrolle (1:10 Verdünnung).

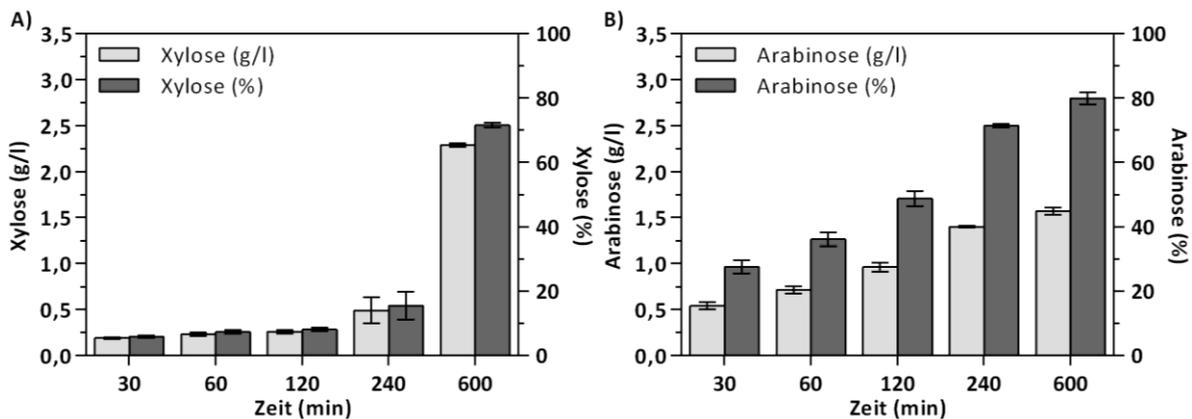


Abbildung 6.21 Quantifizierung der freigesetzten (A) Xylose und (B) Arabinose nach Hydrolyse von Arabinoxylan mit Xyn11A, Bxl3B und Axh43A. Die Hydrolysen wurden mit 0,05 µg/ml Xyn11A, 1,5 µg/ml Axh43A und 48 µg/ml Bxl3B und 0,5 % (w/v) löslichem Arabinoxylan aus Weizen in 10 mM MOPS-Reaktionspuffer bei 60 °C und pH 6,5 in 30, 60, 120, 240 oder 600 min durchgeführt. Die Xylose und Arabinose wurden mit dem Xylose und Arabinose Assay Kit (Megazyme) quantifiziert.

6.5 Präparation und Hydrolyse von Hemicellulosepräparationen

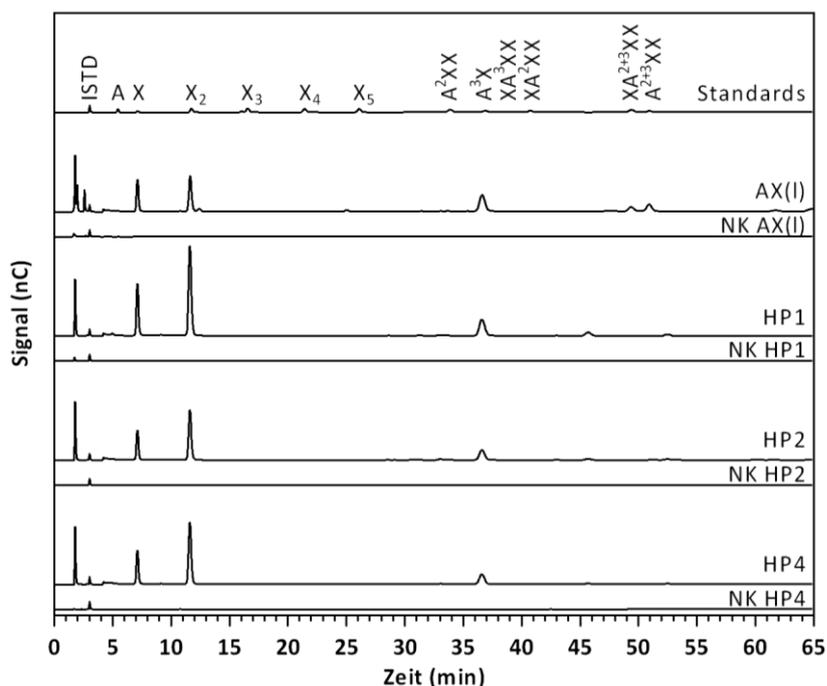


Abbildung 6.22 Hydrolytische Produkte der Hydrolyse von löslichem Arabinoxyylan (AX(I)) und der Hemicellulosepräparationen HP1, HP2 und HP4 analysiert mit HPAEC-PAD. Die Hydrolysen wurden mit 5,0 µg/ml Xyn10B und 0,5 % (w/v) Polysaccharid in 0,1 M MOPS-Reaktionspuffer bei 60 °C und pH 6,5 in 17 h durchgeführt. Standards: A: Arabinose, X–X₅: Xylose bis Xylopentaose, A²XX, A³X, XA²XX, XA³XX, XA²⁺³XX, A²⁺³XX, ISTD: Interner Standard, NK: Negativkontrolle (1:10 Verdünnung).

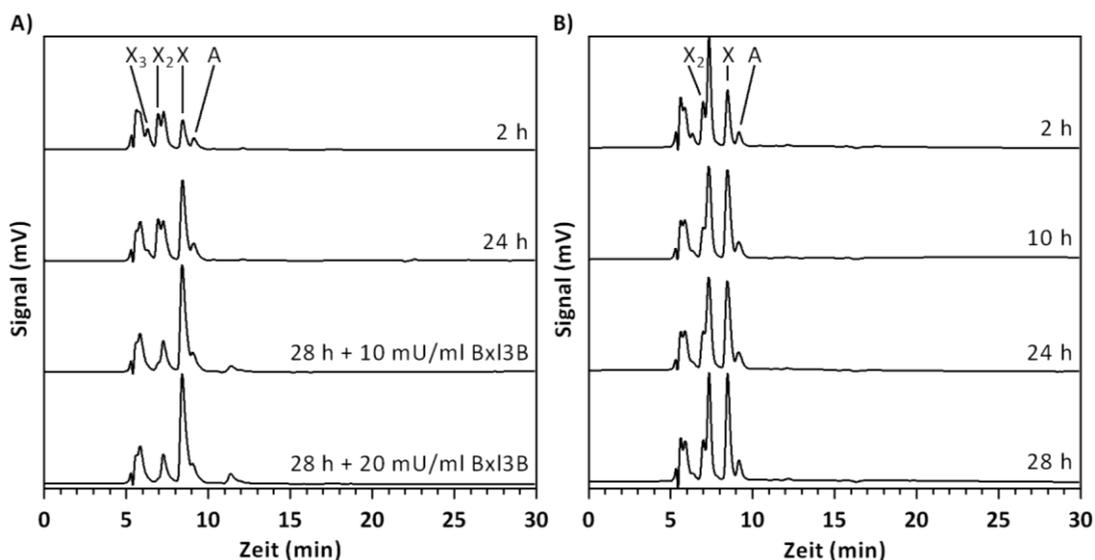


Abbildung 6.23 Hydrolytische Produkte der Hydrolyse der Hemicellulosepräparation HP4 mit der Enzymkombination aus Xyn10B, Xyn11A, Axh43A, Arf51B und Bxl3B im (A) 40 ml oder (B) 5 l Maßstab analysiert mit HPLC. Für die Hydrolyse wurden die Enzyme verwendet, die von der Firma ASA Spezialenzyme produziert wurden. Die Hydrolyse wurde mit 1.100 mU/ml Xyn10B, 1.000 mU/ml Xyn11A, 300 mU/ml Axh43A, 10 mU/ml Arf51B und (A) 10 mU/ml oder (B) 20 mU/ml Bxl3B sowie 5 % HP4 in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,0, 5 mM NaCl) bei 62 °C und (A) 120 rpm in 28 h oder (B) bei 750 rpm in 30 h durchgeführt. Nach 24 h wurden zusätzlich (A) 10 mU/ml, 20 mU/ml oder (B) 15 mU/ml Bxl3B zugegeben. X: Xylose, X₂: Xylobiose, X₃: Xylotriose, A: Arabinose.

Tabelle 6.3 Quantifizierung der Xylose und Arabinose Freisetzung bei der Hydrolyse von HP4 im 40 ml und 5 l Maßstab.

Reaktionszeit (h)	40 ml Hydrolyse		5 l Hydrolyse	
	Xylose (g/l)	Arabinose (g/l)	Xylose (g/l)	Arabinose (g/l)
0,167	-	-	2,10	0,81
1	-	-	3,43	1,18
2	2,95	1,73	4,96	1,83
3	-	-	6,00	1,99
4	-	-	7,02	2,38
5	-	-	7,71	2,47
6	-	-	8,27	2,36
7	-	-	8,66	2,57
8	-	-	9,01	2,60
9	-	-	9,25	2,60
10	-	-	9,44	2,67
24	8,92	3,08	9,49	2,78
25	-	-	9,74	2,74
26	-	-	9,46	2,67
27	-	-	9,86	2,78
28	12,87	3,13	9,78	2,76
29	-	-	9,69	2,71

Die Zuckerkonzentrationen wurden mittels HPLC quantifiziert (siehe Abbildung 6.23). Die Konzentrationen wurden bei der 40 ml Hydrolyse (30 mU/ml Bxl3B) in Einzelmessungen und bei der 5 l Hydrolyse in Duplikaten bestimmt.

VIII Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig erstellt habe und nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 der Promotionsordnung angebotenen Hilfsmittel benutzt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel verwendet. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift

IX Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl für die Möglichkeit, meine Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München durchführen zu dürfen und für die hilfreichen Ratschläge während der Zeit am Lehrstuhl.

Ganz besonders möchte ich Dr. Wolfgang Schwarz und Dr. Vladimir Zverlov danken, die mir die Möglichkeit gegeben haben in ihrer großartigen Arbeitsgruppe an einem interessanten und aktuellen Forschungsthema zu arbeiten. Ich habe mich in der Arbeitsgruppe sehr wohl gefühlt und wenn nötig stets Unterstützung gefunden. Vielen Dank für die engagierte Betreuung und die geduldige Beantwortung aller meiner Fragen.

Sehr herzlich möchte ich mich bei meinen Kollegen Dr. Claudia Held, Dr. Daniela Köck, Alexander Pechtl, Dr. Björn Andreeßen, Dr. Matthias Mechelke, Patricia Krähe, Simon Heinze, Jonathan Herlet, Dr. Petra Kornberger, Dr. Benedikt Leis, Sabrina Sigl, Dr. Waldemar Hauf, Dr. Georg Schmid, Dr. Sigrid Graubner, Regina Rettenmaier und Melanie Baudrexel für die sehr gute Zusammenarbeit, das tolle Arbeitsklima und anregende Diskussionen bei dem einen oder anderen Feierabendbier bedanken. Mein Dank gilt insbesondere Matthias für die gemeinsame und erfolgreiche Arbeit am ValorPlus Projekt, Simon für anregende Diskussionen und Experimente, Jona für Unterstützung bei HPLC und HPAEC-PAD Messungen und Björn, Daniela und Claudia für zahlreiche Ratschläge sowie Björn für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Natürlich gilt mein Dank auch allen weiteren Mitarbeitern des Lehrstuhls, hervorheben möchte ich Johannes Müller, der mich bei der HPLC Analytik unterstützt hat sowie Dr. Angel Angelov, Maria Übelacker und Kornelia Garus.

Danken möchte ich auch den Studenten Marie von Wrisberg, Denise Mennerich, Jana Gagsteiger, Sandra Kolbeck, Ursula Rambold und Tobias Wörl für ihre Beiträge zu meinen Ergebnissen im Rahmen von Master-, Bachelor und Praktikumsarbeiten.

Den Mitgliedern des ValorPlus Projektteams danke ich für die interessante Zusammenarbeit.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern und Claudia danken, die mich durch die Höhen und Tiefen meiner Promotion begleitet und mir wenn nötig den Rücken freigehalten haben.

X Lebenslauf

Berufserfahrung und Praktika

07/2014 – 11/2017

Wissenschaftlicher Mitarbeiter

Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München

Promotion zum Thema „Charakterisierung der Enzymausstattung von *Clostridium stercorarium* für den vollständigen Abbau von Hemicellulosen“ als Teil des EU FP7 Projekts ValorPlus (FP7-KBBE-2013-7-613802)

- Identifizierung, Klonierung und heterologe Produktion von Enzymen zur Hydrolyse von Hemicellulosen
- Biochemische Charakterisierung von Glycosidhydrolasen und Kohlenhydratesterasen
- Entwicklung von spektrometrischen Assays und chromatographischen Methoden zum Nachweis und Quantifizieren von Mono- und Oligosacchariden
- Koordination, Durchführung und Präsentation des Arbeitspaketes Hemicellulosewertschöpfung im internationalen Projektteam

07/2016

Auslandsaufenthalt

Brunel University London

- Entwicklung und Optimierung eines Extruderprozesses zur Präparation von Hemicellulose
- Isolierung von Hemicellulosefraktionen aus Weizenstroh

03/2013 – 05/2013

Forschungspraktikum

Genome Analysis Center, Helmholtz Zentrum München

Praktikum zum Thema „Einfluss von Hexosen auf Metformin behandelte Hep-G2 Zellen“

08/2012 – 01/2013

Wissenschaftliche Hilfskraft

Lehrstuhl für Botanik, TU München

- Anzucht und Analyse von *Arabidopsis thaliana* Mutanten

02/2012 – 04/2012

Forschungspraktikum

Lehrstuhl für Mikrobiologie, TU München

Praktikum zum Thema „Heterologe Expression verkürzter Malatsynthase aus *Bacillus licheniformis* in *E. coli* und Deletion eines hypothetischen ORFs in *Bacillus licheniformis*“

Ausbildung

- 09/2011 – 07/2014 **Master of Science in Molekularer Biotechnologie**
TU München

Masterarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie zum Thema
„Klonierung und Charakterisierung von Hemicellulasen aus dem
Cellulosom von *Clostridium thermocellum*, sowie Optimierung der
Expression in *Escherichia coli*“
- 09/2008 – 07/2011 **Bachelor of Science in Molekulare Biotechnologie**
TU München

Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Botanik zum Thema
„Charakterisierung des Homöodomain-Transkriptionsfaktors
AtHB16 in der Hormonantwort der Pflanze auf Abscisinsäure“
- 08/1998 – 06/2007 **Allgemeine Hochschulreife (Abitur)**
Anne-Frank-Gymnasium, Aachen