

**BESCHREIBUNG NEUER HEFEARTEN AUS DEM
TERMITENDARM UND CHARAKTERISIERUNG EINER
XYLANASE VON EINER SYMBIOTISCHEN HEFE**

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)

IM FACHBEREICH BIOLOGIE
DER JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT
MAINZ

VORGELEGT VON
STEFFEN HANDEL
GEBOREN AM 13. OKTOBER 1986 IN MAINZ

MAINZ, IM NOVEMBER 2016

Die Untersuchungen zur vorliegenden Dissertation wurden von Oktober 2013 bis November 2016 am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung (IMW) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (JGU) durchgeführt.

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2017

Teile dieser Arbeit wurden auf Tagungen oder in Fachzeitschriften publiziert. Weitere Publikationen sind eingereicht oder in Vorbereitung.

Posterpräsentationen oder Vorträge:

Handel S, Schwentke J, König H (2014) Cellulolytic and hemicellulolytic symbionts from selected termites for the degradation of renewable plant material. Poster (BTP051). In: *Biospektrum - Tagungsband zur 4. Gemeinsamen Konferenz von DGHM und VAAM. Dresden, 05.–08. Oktober 2014*, S. 185. Kempf VAJ, Barth G (Hrsg.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Handel S, Wang T, Yurkov AM, König H (2016) Two novel yeast species from the gut of two different termite species. Vortrag (YEV-FG01). In: *Biospektrum - Tagungsband zur VAAM Jahrestagung 2016. Jena, 13.–16. März 2016*, S. 125. Brakhage A (Hrsg.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Artikel:

Handel S, Wang T, Yurkov AM, König H (2016) *Sugiyamaella mastotermitis* sp. nov. and *Papiliotrema odontotermitis* f.a., sp. nov. from the gut of the termites *Mastotermes darwiniensis* and *Odontotermes obesus*. *Int J Syst Evol Microbiol*, DOI: 10.1099/ijsem.0.001397. Im Druck.

% (v/v)	Volumenprozent (engl. „volume per volume“)
% (w/v)	Gewichtsprozent (engl. „weight per volume“)
4-HB	4-Hydroxybenzaldehyd
4-MUB	4-Methylumbelliferon
4-MUF	4-Methylumbelliferyl
5-HMF	5-Hydroxymethylfurfural
Å	Angström (1 Å = 0,1 nm)
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
API	analytischer Profilindex
BLAST	engl. „Basic local alignment search tool“
Bp	Basenpaare
CBS	Zentralbüro für Schimmelkulturen (Niederlande, „Centraal bureau voor Schimmelcultures“)
CMC	Carboxymethylcellulose
COX2	Cytochrom c Oxidase 2-Gen
DNSS	3,5-Dinitrosalicylsäure
DOPE	diskret-optimierte Proteinenergie
DSMZ	Leibniz Institut – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
eH ₂ O	entionisiertes Wasser
FPLC	schnelle Protein-Flüssigchromatographie (engl. „fast protein liquid chromatography“)
GH	Glycosid-Hydrolase
GHF	Glycosid-Hydrolase Familie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (engl. „high performance liquid chromatography“)
IC ₅₀	Inhibitorische Substanzkonzentration, die zu 50 % Aktivitätsverlust führt.
IEF	isoelektrische Fokussierung
IMW	Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der JGU
ITS	5,8S rRNA-Gen und flankierende interne, transkribierte Trenn-DNA-Sequenzen 1 & 2 (engl. „spacer 1 & 2“)

JGU	Johannes Gutenberg-Universität Mainz
LSU	D1/D2-Region des 26/28S rRNA-Gens
M1-4	Mitteldarmbereiche 1-4 der Feuerwanze <i>Pyrrhocoris apterus</i>
ML	maximale Wahrscheinlichkeit
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
MtSSU	Gen für die mitochondrielle kleine rRNA-Untereinheit
MU-Puffer	modifizierter 2x Universalpuffer
MW	Molekulargewicht
NCBI	Nationales Zentrum für biotechnologische Informationen, engl. „National Center for Biotechnology Information“
NP	2-/4-Nitrophenol
O _{2x}	O ₂ -Atom der Xylose
OD _λ	scheinbare optische Dichte bei einer Wellenlänge von λ
P1-P5	Proktodeale Segmente des Hinterdarms von Termiten
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Proteindatenbank (rcsb.org)
PFI	Prüf- und Forschungsinstitut Pirmasens
pI	isoelektrischer Punkt
Q ₁₀	Temperaturkoeffizient
RBB	Remazol-Brilliantblau R
<i>RPB1/2</i>	RNA-Polymerase II Gene 1 & 2
RU	spezifische Aktivität (RBB-Xylantest)
SSU	18S rRNA-Gen
TDH	Thermodruckhydrolyse
<i>TEF1</i>	Transkriptionselongationsfaktor 1α-Gen
U	spezifische Aktivität (DNSS-Test)
UPLC	Ultra HPLC (engl. „ultra performance liquid chromatography“)
λ	Wellenlänge [nm]

Inhaltsverzeichnis

1. – Zusammenfassung.....	1
2. – Einleitung	3
2.1 – Weite Verbreitung und Vielseitigkeit der Termitenfamilien	3
2.2 – Das Verdauungssystem von Termiten.....	4
2.3 – Wichtige StoffwechsellLeistungen von Termiten mit Symbiontenbeteiligung	5
2.3.1 – Wiederverwertung von Stickstoff	5
2.3.2 – Konversion von Lignocellulose zu Acetat und flüchtigen Fettsäuren	6
2.3.3 – Generierung von anaeroben Zonen im Hinterdarm.....	9
2.4 – Hefen: Pilze mit großem biotechnologischen Potential.....	10
2.5 – Lignocellulose und Xylanasen: Vielseitigkeit, Funktion und Nutzen	11
2.5.1 – Aufbau von Lignocellulose und Funktion in Pflanzenzellwänden.....	11
2.5.2 – Lignocelluloseabbau	12
2.5.3 – Xylanasen.....	14
2.5.4 – Lignocellulose im Kontext der Bioethanolproduktion	15
2.6 – Zielsetzung der Arbeit	18
3. – Material und Methoden	19
3.1 – Verwendete Hefestämme aus Stammsammlungen.....	19
3.2 – Medien, Lösungen und Puffer	20
3.2.1 – Medien zur Kultivierung von Hefen	20
3.2.2 – Lösungen und Puffer	21
3.2.3 – Herstellung von Strohpulversubstrat.....	22
3.3 – Insektenpräparation	22
3.4 – Mikrobiologische Methoden.....	22
3.4.1 – Isolierung von Hefestämmen	22
3.4.2 – Kultivierung von Hefestämmen und <i>in vivo</i> Charakterisierung	23
3.4.3 – Morphologie von Mikroorganismen und Mikroskopie	26
3.5 – Molekularbiologische Methoden	26
3.5.1 – Isolierung genomischer DNA.....	26
3.5.2 – Primer für die Polymerase-Kettenreaktion.....	27
3.5.3 – Polymerase-Kettenreaktion	27
3.5.4 – Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese	28
3.5.5 – Sequenzierungen	29
3.5.6 – Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).....	29
3.6 – Proteinbiochemische Methoden	30
3.6.1 – Proteinaufreinigung.....	30
3.6.2 – Proteinkonzentrationsbestimmung nach Smith und Warburg-Christian	32
3.6.3 – Darstellung von Proteinlösungen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE	32
3.6.4 – Proteinsequenzierung mittels Illumina und MS/MS	34
3.6.5 – Quantifizierung von Xylanabbau	34
3.6.6 – Methylumbelliferyl- und Nitrophenoltest zum Enzymaktivitätsnachweis	36
3.6.7 – Enzymatische Nachweise von Ethanol und Formiat	37
3.7 – Bioinformatische Methoden	38
3.7.1 – Sequenzvergleiche und phylogenetische Analysen.....	38
3.7.2 – Erstellung und Analyse von 3D-Homologiemodellen.....	38
3.7.3 – Berechnung von Enzymeigenschaften: isoelektrischer Punkt, Molekulargewicht, Signalpeptide und Enzymkinetik	39

4. – Ergebnisse	40
4.1 – Identifizierung lignocellulolytischer Hefearten	40
4.1.1 – Identifizierung von Hefearten aus dem Darm von Termiten, einer holzfressenden Schabe und einer Feuerwanze	40
4.1.2 – Hefearten mit lignocellulolytischen Enzymaktivitäten	43
4.2 – Erstbeschreibung von <i>Sugiyamaella mastotermitis</i> sp. nov. und <i>Papiliotrema odontotermitis</i> f.a., sp. nov.	44
4.2.1 – Phylogenie.....	45
4.2.2 – Physiologie.....	47
4.2.3 – Morphologie und Reproduktion.....	50
4.3 – Ethanolproduktion im Darm von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	51
4.3.1 – Niedermolekulare Substanzen im Darm von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	51
4.3.2 – Ethanolproduktion und -toleranz von Hefen aus <i>Mastotermes darwiniensis</i>	52
4.4 – Analyse der endo-1,4- β -Xylanase „Xyl1“ der Hefe <i>Saitozyma flava</i> OO2	53
4.4.1 – Xyl1-Aufreinigung sowie Bestimmung des Molekulargewichtes und des pI.....	54
4.4.2 – Zuordnung der Xylanase zu einer GH-Familie und Strukturanalyse	56
4.4.3 – Substratspezifität, TDH-Strohabbau und Endprodukte.....	59
4.4.4 – Bestimmung des Temperatur-, pH- und Pufferoptimums	61
4.4.5 – Enzymkinetik	65
4.4.6 – Hemmung und Aktivierung der Xylanaseaktivität durch Substanzen.....	66
5. – Diskussion	71
5.1 – Hefen in ligninreichen Habitaten: Kontinuität und Polysaccharidabbau.....	71
5.1.1 – Die Darmhefen von <i>Mastotermes darwiniensis</i>	71
5.1.2 – Verbreitung von Hefen im Darm von Termiten und einer holzfressenden Schabe	72
5.1.3 – Transient-assoziierte Darmhefen in der Feuerwanze <i>Pyrrhocoris apterus</i>	73
5.1.4 – Lignocelluloseabbau durch <i>Saccharomyces arboricola</i> -Stämme	74
5.2 – <i>Sugiyamaella mastotermitis</i> sp. nov. und <i>Papiliotrema odontotermitis</i> sp. nov.....	75
5.2.1 – Die Gattung <i>Sugiyamaella</i> : unerschlossene Quelle neuartiger Xylanasen.....	75
5.2.2 – <i>Papiliotrema odontotermitis</i> : gemeinsamer Ursprung mit <i>P. rajasthanensis</i>	76
5.2.3 – Symbioseleistungen der neuen Hefearten	76
5.2.4 – Temperaturtoleranz der neuen Hefearten.....	77
5.3 – Ethanol und niedermolekulare Substanzen im Darm von <i>M. darwiniensis</i>	78
5.3.1 – Dominanz von Acetat und Ethanol	78
5.3.2 – Alkoholische Gärung: Grundlage für die Ethanol- und Glycerinpräsenz.....	79
5.3.3 – Ethanol als Edukt für die Acetatproduktion	80
5.3.4 – Wirtsintoxikation durch Ethanol	81
5.4 – Die endo-1,4- β -Xylanase Xyl1 des Hefestammes <i>Saitozyma flava</i> OO2.....	82
5.4.1 – Substratspektrum, Strohabbau und Endprodukte	83
5.4.2 – Konventionelles Temperatur- und pH-Optimum	84
5.4.3 – Partiiell unkonventionelles Signalpeptid.....	84
5.4.4 – Molekulargewicht, pI, Tertiärstruktur und Katalysemechanismus.....	85
5.4.5 – Xyl1 und CfXYN1: Homologe Xylanasen mit abweichendem pH-Optimum	87
5.4.6 – Überdurchschnittlich hohe Umsatzrate und Substrataffinität.....	88
5.4.7 – Hemmung und Aktivierung der Xylanase.....	90
5.4.8 – Aktivierung durch Xylobiose.....	92
5.5 – Ausblick.....	93
6. – Literatur.....	95

7. – Anhang	107
7.1 – Thermodruckhydrolysestroh.....	107
7.2 – Größe von ITS-RFLP-Fragmenten	108
7.3 – Stammsammlungshinterlegungen und GenBank-Einträge	109
7.4 – Erweitertes lignocelluloytisches Abbauspektrum ausgewählter Hefestämme.....	109
7.5 – Phylogenetische Analyse von <i>Sugiyamaella mastotermitis</i> und <i>Papiliotrema odontotermitis</i>	110
7.6 – 3D-Homologiemodell der Xylanase Xyl1	114
7.7 – Laborutensilien, Chemikalien und bioinformatische Programme	116
Lebenslauf	120
Erklärung	122

1. – Zusammenfassung

Die mikrobiellen Darmsymbionten von Termiten produzieren auch Cellulasen und Hemicellulasen. Diese unterstützen den Wirt beim Abbau von Lignocellulose. Die Hemicellulasen der Termitensymbionten sind, wie auch die Hefesymbionten, weitestgehend unerforscht. Neuartige robuste Xylanasen sind für die Produktion von Bioethanol aus Weizenstroh von Interesse.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden sieben lignocellulolytische Hefearten aus dem Darm von Termiten und einer Schabe isoliert und identifiziert. Die Persistenz der Hefen *Apiotrichum mycotoxinivorans*, *Candida tropicalis* und *Sugiyamaella mastotermitis* sp. nov. im Darm der Termiten *Mastotermes darwiniensis* wurde bestätigt. Alle drei Hefearten zeigten Ethanoltoleranz. *Candida tropicalis* betrieb eine alkoholische Gärung und *Sugiyamaella mastotermitis* produzierte Ethanol. Der Darm von *Mastotermes darwiniensis* enthielt neben 11 mM Acetat bis zu 11 mM Ethanol. Dies ist der erste Ethanolnachweis im Termitendarm.

Die Hypothese einer weiten Verbreitung von Hefen im Darm von Termiten konnte durch die vorliegende Arbeit unterstützt werden. 13 Hefearten aus Termitendärmen verschiedener Spezies wurden in Reinkultur isoliert. Mindestens vier davon waren konstant mit dem Termitendarm assoziiert. Sechs Arten hatten eine lignocellulolytische Aktivität. Von den zwei neuen Arten *Sugiyamaella mastotermitis* und *Papiliotrema odontotermitis* wurden Erstbeschreibungen angefertigt. Beide wuchsen bei ungewöhnlich hohen Temperaturen (40 °C, 35 °C). Eine Rolle für den Wirt bei der Xylanspaltung und der Vitaminsynthese wird vermutet.

Der Hefestamm *Saitozyma flava* OO2 wurde als guter Xylanaseproduzent identifiziert. Desse Endoxylanase „Xyl1“ der Glycosid-Hydrolasefamilie 11 (GHF 11) konnte aufgereinigt und biochemisch charakterisiert werden. Das Enzym bestand aus einer einzigen Domäne. Das Molekulargewicht von Xyl1 war typisch für GHF11-Xylanasen (20,4 kDa), ebenso wie der isoelektrische Punkt (pH 8,61), die Tertiärstruktur (β -Biskuitrolle) und die Abwesenheit von Nebenaktivitäten. Die Endprodukte waren Xylobiose und Xylotriose. Ein 3D-Homologiemodell auf der strukturellen Basis der *Aspergillus niger*-Xylanase XYNA wurde angefertigt und deutete auf eine hohe Konservierung des aktiven Zentrums hin. Ein Vergleich mit der homologen Xylanase CfXYN1 aus dem Isolat *Saitozyma flava* I-11 wurde angefertigt.

Die Xylanase Xyl1 zeigte eine hohe Aktivität und eine leicht überdurchschnittliche Substrataffinität. Xyl1 hatte eine Toleranz gegen Furfural, 5-Hydroxymethylfurfural und Ethanol. Die Hemmung durch Glucose und Cellobiose war schwach. Xylose und L-Arabinose hatten keine Hemmwirkung. Xylobiose aktivierte die Xylanspaltung (Optimum: 17,7 mM).

Die Xylanase Xyl1 eignet sich zum Einsatz in der Bioethanolproduktion und die gewonnenen Erkenntnisse sind ein wichtiger Beitrag zur mikrobiellen Ökologie des Termitendarmes.

1. – Summary

The microbial symbionts of termites produce cellulases and hemicellulases in addition to other enzymes. Cellulases and hemicellulases support the lignocellulose degradation in the host's gut. The hemicellulases of the termites' symbionts, and also the yeast symbiosis, need further emphasis. New and robust xylanases are important for the production of second generation biofuels, e.g. from wheat straw.

As part of this work, seven lignocellulolytic yeast species from the gut of termites and of a cockroach were isolated and identified. The persistence of the yeasts *Apiotrichum mycotoxinivorans*, *Candida tropicalis* and *Sugiyamaella mastotermitis* sp. nov. in the gut of the lower termite *Mastotermes darwiniensis* was verified. All three yeast species showed an unusual tolerance against ethanol. *Candida tropicalis* conducted an alcoholic fermentation and *Sugiyamaella mastotermitis* sp. nov. produced ethanol. The gut of *Mastotermes darwiniensis* contained about 11 mM ethanol, next to 11 mM acetate. Ethanol was not found in the gut of a termite until now.

The hypothesis of a wide distribution of yeasts in the gut of termites is being supported by this work. 13 yeast species from the guts of different termites were identified. At least four yeast species were persistent in the termites' gut. Six yeast species were lignocellulolytic. The two novel yeast species *Sugiyamaella mastotermitis* and *Papiliotrema odontotermitis* were characterized. Both grew at uncommonly high temperatures (40 °C, 35 °C). A possible role for the host regarding the utilization of xylan or the production of vitamins is hypothesized.

The yeast strain *Saitozyma flava* OO2 has been identified as a good xylanase producer. Its endoxylanase “Xyl1” of the glycoside hydrolase family 11 (GHF 11) was purified and biochemically characterized. The enzyme consisted of a single domain. The molecular weight of Xyl1 was typical for GHF 11 xylanases (20.4 kDa), as well as the isoelectric point (pH 8.61), the tertiary structure (β -jellyroll fold) and the absence of side activities. The end products were xylobiose and xylotriose. A 3D homology model was created on the structural basis of the *Aspergillus niger* xylanase XYNA. The model pointed to a high conservation of the active site. The xylanase was compared to a homologue xylanase of the isolate *Saitozyma flava* I-11. The xylanase Xyl1 showed a high activity and a substrate affinity which was slightly above average. The xylanase had a tolerance against furfural, 5-hydroxymethylfurfural and ethanol. The inhibition by glucose and cellobiose was weak. Xylose and L-arabinose showed no inhibitory effect. Xylobiose activated the cleavage of xylan (optimum: 17.7 mM).

The xylanase is suitable for use in bioethanol production and the gained knowledge is an important contribution about the microbial ecology of the termites' gut.

2. – Einleitung

Die fossilen Energieressourcen der Erde schwinden. Ein Engpass der globalen Ölproduktion wird für 2020-2030 vorhergesagt. Dies wird die Energiewirtschaft in einem drastischen Maß beeinflussen. Anpassungen müssen mindestens zehn Jahre vor dem globalen Fördermaximum getroffen werden, um den Effekt abzuschwächen (Hirsch *et al.* 2005, Miller und Sorrell 2014). Die Suche nach regenerativen Energiequellen ist eine unausweichliche Aufgabe, wenn die Menschheit ihren steigenden Energieverbrauch decken will. Vielversprechende Forschungsbereiche sind Biotreibstoffe der zweiten Generation. Diese Treibstoffe werden aus lignocellulosehaltigen Materialien hergestellt, welche durch Agrarabfälle in großer Zahl verfügbar sind (z. B. als Weizenstroh). Die CO₂-Freisetzung während der Verbrennung von Bioethanol ist in der Summe nahe Null (aufgrund der initialen CO₂-Fixierung durch die Photosynthese) (Kim und Dale 2004, Olsson 2007, Rhodes und Keith 2008). Bei der Gewinnung von Zuckermonomeren aus diesen Rohstoffen ist die Lignininkrustierung eine große Barriere. Diese kann mittels energieaufwändiger thermochemischer Prozesse überwunden werden, gefolgt von einer enzymatischen Saccharifikation der Zuckerpolymere (Ballmann *et al.* 2013). Im Intestinalsystem von Termiten werden die Zuckerpolymere der ligninreichen Nahrung innerhalb von 24 h effizient durch enzymatische Prozesse hydrolysiert. Termiten und ihre mikrobiellen Darmsymbionten sind geeignete Organismen zur Erschließung neuartiger Enzyme für die enzymatische Saccharifikation (König *et al.* 2013).

2.1 – Weite Verbreitung und Vielseitigkeit der Termitenfamilien

Termiten sind auf allen Kontinenten, außer der Antarktis, verbreitet. Sie können in der Regel zwischen dem 47. nördlichen und südlichen Breitengrad angetroffen werden. Dies macht etwa 68 % der Landmasse der Erde aus. Der bevorzugte Lebensraum von Termiten sind die Tropen und Subtropen (König *et al.* 2006, Brune 2014).

Termiten sind eusoziale und koloniebildende Insekten, deren Arten in Kasten unterteilt sind. Die Kaste der Nymphen kann sich in Arbeiter, Soldaten oder Geflügelte (Alate) entwickeln. Alate sind reproduktive Termiten. Nach dem Ausschwärmen und der Paarung der Alaten bilden sich feste Königspaare, die sich ihrer Flügel entledigen. Das Königspaar baut ein kleines Nest und die Königin legt Eier. Eine erste Arbeitergeneration übernimmt den Ausbau und die Pflege des Nests. Die Arbeiter fressen Holz und füttern andere Kasten. Soldaten haben eine defensive Rolle. Die Unterordnung der Termiten, Isoptera, enthält 2.600-3.600 Arten in neun bekannten Familien. Alle Termitenfamilien ernähren sich von Lignocellulose. Niedere Termiten fressen hauptsächlich Holz (Kalotermitidae, Mastotermitidae, Rhinotermitidae,

Stolotermitidae, Stylotermitidae, Termopsidae), pflanzliche Zerfallsprodukte (Serritermitidae) oder Gras (Hodotermitidae). Die artenreichen höheren Termiten (Termitidae, mindestens 2.000 Spezies) ernähren sich auch von Erde oder Dung. Macrotermitinae, eine Termitidae-Unterfamilie, kultiviert einen lignocellulolytischen Pilz (*Termitomyces* spp.). Der Pilz versorgt Macrotermitinae mit vorprozessierter Lignocellulose, lignocellulolytischen Enzymen und Biomasse (Emerson und Krishna 1975, Thompson *et al.* 2000, Kumari *et al.* 2006, Krishna *et al.* 2013, Ni und Tokuda 2013, Brune 2014).

Die Unterordnung Isoptera befindet sich in der Ordnung Blattodea (Schaben). *Mastotermes darwiniensis* ist die primitivste lebende Termitenart. Die Art kann als Außengruppe der Schaben betrachtet werden. Die direkteste Verwandtschaft besteht hierbei zu der holzfressenden Schabe *Cryptocercus punctulatus*. Die Schabe lebt in den Appalachen (Pennsylvania, Virginia, West Virginia) (Gay und Calaby 1970, Lo *et al.* 2003, Kambhampati und Peterson 2007). *Mastotermes darwiniensis* lebt heutzutage in Australien und wurde am Ende des zweiten Weltkrieges nach Neuguinea verschleppt. Fossilien aus der Karibik, Europa und Zentralamerika datieren die Gattung bis zum Eozän, Miozän und die Kreidezeit vor bis zu 145 Millionen Jahren zurück. Neben Holz kann *Mastotermes darwiniensis* z. B. auch Heu fressen (Gay und Calaby 1970, Schlüter 1989, König *et al.* 2013).

2.2 – Das Verdauungssystem von Termiten

Das Verdauungssystem von Termiten ist ein Bioreaktor im Kleinstmaßstab. Konsumiertes Holz wird von den Mandibeln und dem Kaumagen der Arbeitertermiten zerkleinert (Abb. 2.1a) (Brune 2014).

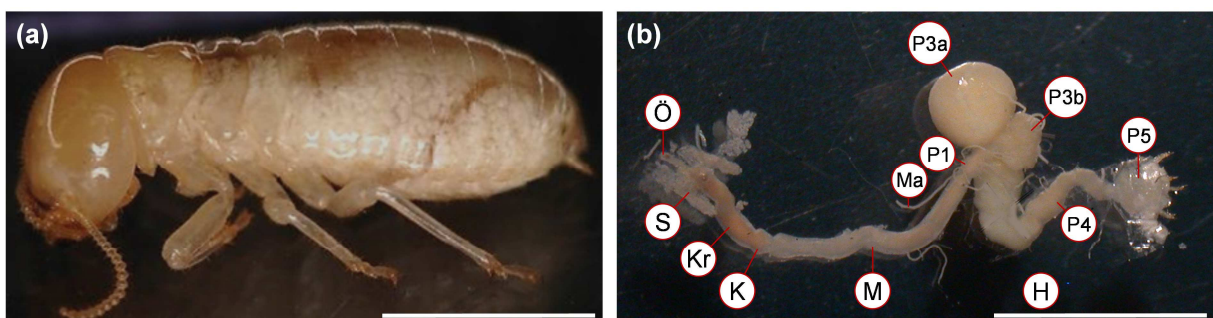


Abbildung 2.1: *Mastotermes darwiniensis*-Arbeiter und Darm. Balken: 5 mm. (a) Arbeitertermiten. (b) Darmpräparat eines Arbeiters. Ö: Ösophagus. S: linke Speicheldrüse. Kr: Kropf. K: Kaumagen. M: Mitteldarm. Ma: Malpighisches Gefäß. H: Hinterdarm, bestehend aus den proktodealen Segmenten P1-5. P1: Erstes proktodeales Segment (Ileum), gefolgt vom enterischen Ventil (P2, nicht markiert). P3a: Dünnwandiger Teil der Gärkammer. P3b: Dickwandiger Teil der Gärkammer. P4: Kolon. P5: Rektum. Verändert nach König *et al.* 2007.

Vor der Passage in den Kaumagen wird der Nahrungsbrei mit termiteneigenen Cellulasen und β -Glucosidasen aus den Speicheldrüsen versetzt und sammelt sich im Kropf (Abb. 2.1b). Der Kaumagen ist mit 48 longitudinalen sklerotisierten Cuticulafalten ausgestattet, die zahnähnli-

che Strukturen ausbilden. Die Holzpartikel sind, je nach Termitenspezies, 10-30 μm oder 100-300 μm klein (Li *et al.* 2006, König *et al.* 2007, Watanabe und Tokuda 2010, Ni und Tokuda 2013, Brune 2014). Im Mitteldarm wird freigesetzte Glucose resorbiert und bei höheren Termiten werden Cellulasen sekretiert (Ni und Tokuda 2013). Der Hinterdarm besteht aus den proktodealen Segmenten P1-5. Die Funktion des kleinen ersten proktodealen Segments (Ileum, P1) ist für *Mastotermes darwiniensis* nicht genau bekannt. Im Ileum existieren dornartige Strukturen in unterschiedlicher Anordnung (Ornamente). Die Dornen höherer Termiten sind wahrscheinlich mit einem bakteriellen Film besetzt. Die Ornamente könnten zur Aufrauung und Inokulation des Holzbreies dienen. Durch den hohen pH-Wert des elongierten Ileums höherer Termiten wird kristalline Cellulose für den enzymatischen Verdau zugänglich gemacht (siehe Kapitel 2.5.3) (Noirot 1995, Brune 2014, Rocha und Constantini 2015, Bali *et al.* 2015). Das enterische Ventil (P2) verschließt den Hinterdarm und verhindert einen Rückfluss des Nahrungsbreis in den Mitteldarm (Brune 2014). Die Gärkammer ist bei *Mastotermes darwiniensis* in einen ausgeweiteten dünnwandigen und einen eher tubulären dickwandigen Teil untergliedert (P3a, b). Am Darmepithel der Gärkammer beginnt ein Sauerstoffgradient bis zum anaeroben Zentrum. Die anaerobe Zone der Gärkammer beginnt allgemein etwa im 50-200 μm -Abstand zum Epithel und für *Mastotermes darwiniensis* ab 100 μm . Das Kolon (P4) ist eher mikroaerob bis aerob (P_{O_2} : bis zu 0,09-0,15 bar), was wahrscheinlich am kleineren Durchmesser liegt (Brune 1998, Berchtold *et al.* 1999, König *et al.* 2007, Brune 2014). Der Hinterdarm und hauptsächlich dessen Gärkammer beherbergt ein breites Spektrum von Mikroorganismen. Die Darmgemeinschaft besteht aus Archaea, Bakterien und Hefen. Niedere Termiten besitzen im Gegensatz zu höheren Termiten Flagellaten. Die mikrobiellen Symbionten sind bei der Wiederverwertung von Stickstoff, dem Abbau von Lignocellulose und dem Aufbau des Sauerstoffgradienten wichtig (siehe Kapitel 2.3) (Prillinger *et al.* 1996, König *et al.* 2013, Brune 2014). Das Rektum (P5) ist mit Rektaldrüsen ausgestattet, die dem Ionen-transport und der Wasserresorption dienen (Collins 1969, Nation 2015). Die Darmpassage des Holzes dauert 24 h (König *et al.* 2013).

2.3 – Wichtige Stoffwechsellösungen von Termiten mit Symbiontenbeteiligung

2.3.1 – Wiederverwertung von Stickstoff

Die Malpighischen Gefäße leiten Harnsäure, die aus abgebauten Termitenproteinen synthetisiert wird, in das Ileum. Der Proteinabbau findet im Fettkörper statt, welcher den Darm umgibt. Im Hinterdarm sind Symbionten aktiv, die Harnsäure zu NH_3 umwandeln. Eine zu-

sätzliche Fixierung von atmosphärischem Stickstoff macht 30-60 % der Stickstoffversorgung aus. Zahlreiche diazotrophe Bakterien aus dem Termitendarm sind bekannt (Bacteroidetes, Clostridia, Fibrobacteres, Spirochaetes). In niederen Termiten leben die Diazotrophen hauptsächlich in Symbiose mit Flagellaten. Im Neutralen und Sauren wird Stickstoff als NH_4^+ von Transportproteinen der Symbionten aufgenommen. Aus NH_3 und Kohlenstoffverbindungen entsteht Biomasse, die als Darmflüssigkeit ausgeschieden und gefressen wird (proktodeale Trophallaxis). Proktodeale Trophallaxis ist nötig, da das enterische Ventil den Mittel- und Hinterdarm trennt. Die Proktodeale Trophallaxis dient auch dem vertikalen Transfer der Symbionten auf frischgeschlüpfte Nymphen. Im Mitteldarm wird die Biomasse verdaut und als Aminosäuren und Vitamine aufgenommen. Die Aminosäuren werden bei der Synthese von Termitenproteinen verwendet. Diese Wiederverwertung ist nötig, da der Nährstoff Holz sehr stickstoffarm ist. Das N:C-Verhältnis beträgt 1:500 bis 1:1000, was im Vergleich zu Proteinen (1:5) niedrig ist (Kirschbaum *et al.* 2001, Scharf *et al.* 2011, Costa-Leonardo *et al.* 2013, Brune 2014, Fuchs 2014).

2.3.2 – Konversion von Lignocellulose zu Acetat und flüchtigen Fettsäuren

Acetat ist, neben Butyrat und Propionat, der wichtigste Nährstoff für Termiten und wird primär in der Gärkammer gebildet. Die Acetatkonzentration des Hinterdarms von *Incisitermes schwarzi*, *Nasutitermes walkeri*, *Reticulitermes flavipes* und *Zootermopsis angusticollis* beläuft sich auf 31,9-80,6 mM. Der Anteil von Acetat an den kurzkettigen, flüchtigen Fettsäuren beträgt 94-98 mol% (Acetat, Propionat, Butyrat) (Odelson und Breznak 1983, Slaytor *et al.* 1997). Neben kurzkettigen, flüchtigen Fettsäuren befinden sich auch H_2 , CO_2 , Methan, Formiat und Lactat in Termitendärmen. Lactat wird für gewöhnlich schnell verstoffwechselt (Breznak und Switzer 1986, Brune 2014).

Der Lignocelluloseabbau der Termiten ist in eine hydrolytische Phase, eine fermentative Phase und eine acetogene/methanogene Phase unterteilt (König *et al.* 2013, Brune 2014):

Die Hydrolysephase umfasst die Spaltung von Cellulose und Hemicellulose (z. B. Xylan) in Monosaccharide. Sie ist auf zwei Darmbereiche unterteilt. Im Mitteldarm wird ein Teil der Cellulose durch termiteneigene Cellulasen und β -Glucosidasen gespalten. Die freigesetzte Glucose wird über das Darmepithel absorbiert. Die termiteneigenen Enzyme gelangen mit dem Nahrungsbrei in den Hinterdarm und können dort von Flagellaten aufgenommen werden. Diese stellen ein abgegrenztes Milieu für die enzymatische Cellulosespaltung bereit (z. B. *Koruga bonita*, *Mixotricha paradoxa*) (König *et al.* 2007, Ni und Tokuda 2013). Manche Darmsymbionten produzieren eigene lignocellulolytische Enzyme (Cellulasen und Xylanasen). Mindestens 20 verschiedene Cellulase und 7 Xylanase produzierende Bakteriengattun-

gen sind als Termitensymbionten bekannt. Ebenfalls existieren Flagellaten mit eigenen Cellulasen (*Koruga bonita*, *Trichomomitopsis termopsidis*, *Trichonympha sphaerica*) (König *et al.* 2007, König *et al.* 2013). Eine mögliche Rolle von Hefen bei der Cellulose- und Xylanspaltung wird diskutiert (Schäfer *et al.* 1996). Lignin wird nur in geringem Maß abgebaut (siehe Kapitel 2.5.2, König *et al.* 2013).

Die fermentative Phase umfasst die mikrobielle Konversion von Zuckermonomeren zu H_2 , CO_2 , Ameisensäure, Milchsäure und kurzkettigen, flüchtigen Fettsäuren (Abb. 2.2; Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure).

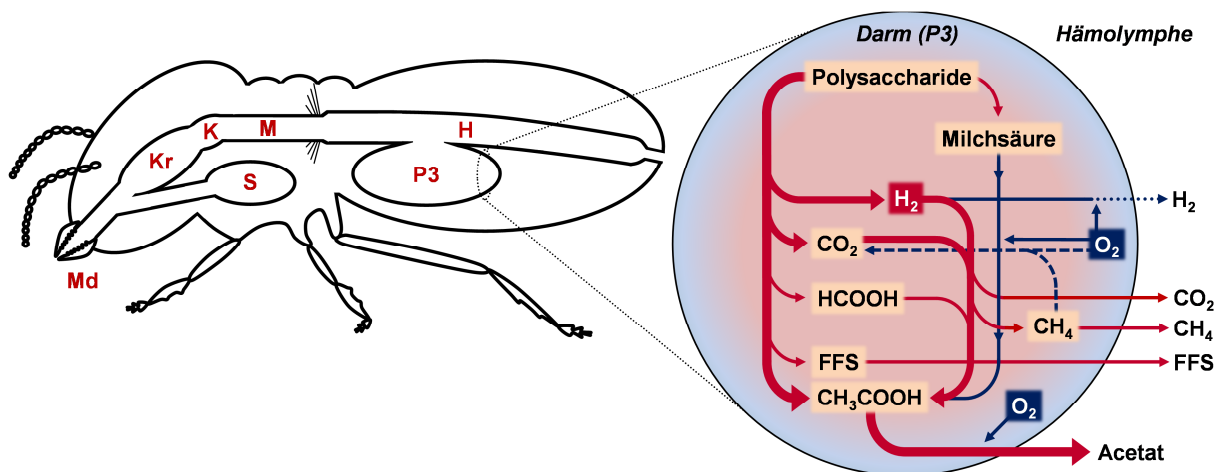


Abbildung 2.2: Schema des C-Stoffkreislaufs in der Gärkammer einer Arbeitertermiten. Md: Mandibeln. S: Speicheldrüsen. Kr: Kropf. K: Kaumagen. M: Mitteldarm. H: Hinterdarm. P3: Gärkammer. FFS: flüchtige Fettsäuren (Propionsäure, Buttersäure). Rot: fakultativ/obligat anaerob, Kapitel 2.3.2. Blau: mikrooxygen, Kapitel 2.3.3. Gepunktete Linie: signifikante Oxidation. Gestrichelte Linie: Signifikanz ungeklärt. HCOOH kann in die Acetogenese einfließen. Acetogenese und Methanogenese sind im Schema zusammengefasst. Zwischenschritte sind ausgeblendet. Acetat kann auch im Rahmen der Sulfatrespiration durch *Desulfovibrio* aus Lactat gebildet werden. Die globale H_2 -Emission übertrifft trotz starker H_2 -Oxidation die CH_4 -Emission (2 versus $1,5 \times 10^8$ t/a). Die globale CO_2 -Emission beträgt $4,6 \times 10^{10}$ t/a. Ni und Tokuda 2013, König *et al.* 2013, Brune 2014.

Wahrscheinlich spielen die Flagellaten niederer Termiten eine große Rolle bei der Bildung von Milchsäure und kurzkettigen, flüchtigen Fettsäuren. Ebenfalls wird den Klassen Clostridia und Spirochaetes eine zentrale Rolle bei der Fermentation zugesprochen. Die Darmmikroben der Termiten bilden eine komplexe Gemeinschaft und genaue Stoffwechselbilanzen sind nicht publiziert (Hussender *et al.* 2010, König *et al.* 2013, Brune 2014). Relevante Gärungen oder Respirationen, die sich aus der bakteriellen Mikrobengemeinschaft ableiten, sind möglicherweise die homoacetogene Milchsäuregärung, die Buttersäuregärung, Teile des Methylmalonyl-CoA-Weges, der Acrylyl-CoA-Weg, die gemischte Säuregärung, die Hydrogenasereaktion sowie die Sulfat- und Fumaratrespiration (Wertz und Breznak 2007, Blomquist 2010, Shaomei *et al.* 2013, König *et al.* 2013, Fuchs 2014).

Die reduktive Acetogenese ist eine Form der anaeroben Respiration und findet unter Sauerstoffausschluss statt (Brune 2014, Fuchs 2014):



Ameisensäure kann in der Acetogenese verwendet werden. Ameisensäure wird durch nicht acetogene Symbionten zu CO_2 oxidiert wobei auch H_2 entsteht. Die reduktive Acetogenese wird durch die Präsenz von Ameisensäure demnach direkt oder indirekt stimuliert (Breznak 1994, Brune 2014, Fuchs 2014). Wichtige acetogene Mikroorganismen im Termitendarm sind Spirochaetes (speziell *Treponema*) (König *et al.* 2013, Brune 2014).

Die Methanogenese ist eine von Archaea betriebene Form der anaeroben Atmung. Die Gesamtreaktion lautet wie folgt (Fuchs 2014):



In niederen Termiten wird Methanogenese nach dem aktuellen Kenntnisstand ausschließlich durch *Methanobrevibacter* betrieben. Höhere Termiten besitzen ein breiteres Spektrum methanogener Archaea, das auch die Ordnungen Methanomicrobiales, Methanosarcinales und Methanoplasmatales einschließt. Die Erde und Dung fressenden Termitidae verfügen möglicherweise über ein breiteres Angebot verschiedener Substrate für die Methanogenese, wie Methanol oder Ameisensäure. Es wird spekuliert, dass acetatverwertende Methanosarcinales eine Rolle bei der CO_2 -Regulation in Pilzgärten von Macrotermitidae spielen. Möglicherweise inhibieren hohe CO_2 -Niveaus in Synergie mit termiteneigenen Antimycotica das Wachstum der cellulolytischen Bodenpilze *Xylaria*. Diese Gattung wächst unter Normalbedingungen schneller als *Termitomyces* und konkurriert um Cellulose (Batra und Batra 1979, Shinzanto *et al.* 2005, Gomathi *et al.* 2009, König *et al.* 2013, Brune 2014).

Die Methanogenese ist gegenüber der Acetogenese energetisch begünstigt (32,75 kJ/mol H_2 versus 27,75 kJ/mol H_2). Der Wettbewerbsvorteil der Methanogenen wird vor allem durch räumliche Lokalisierung der Acetogenen ausgeglichen. Die Acetogenen kolonisieren die gesamte H_2 -reiche anaerobe Zone des Darmes (P_{H_2} : bis zu 0,06 bar). Sie sind hochmotil (Spirochaetes). *Methanobrevibacter* ist auf die H_2 -ärmere mikroaerobe Darmwand beschränkt (P_{O_2} : etwa 0,03 bar) oder ist mit Flagellaten assoziiert (Brune 1998, Fröhlich und König 1999, Madigan *et al.* 2013, Brune 2014).

Acetat, Butyrat, Propionat, Methan und geringe H_2 -Mengen werden von der Termiten über das Darmepithel aufgenommen. Flüchtige Fettsäuren dienen als Nährstoff. Die globale Methanausscheidung durch Termiten beträgt 150 Millionen Tonnen pro Jahr (Madigan *et al.* 2013).

2.3.3 – Generierung von anaeroben Zonen im Hinterdarm

Der Termitendarm hat ein sehr großes Oberflächen-Volumenverhältnis, was zu einer schnellen Sauerstoffdiffusion führt. Die Methanogenese und reduktive Acetogenese benötigen anaerobe Verhältnisse (Kapitel 2.3.2). In der Regel öffnen und schließen Insekten ihre Tracheen phasenweise (diskontinuierlich). Lange Öffnungszeiten werden vermieden, was zum Schutz vor schädlich hohen Sauerstoffkonzentrationen für die Gewebe dient und zur Minimierung von Wasserverlust führt. Eine CO₂-Akkumulation wird durch intensives Spülen mit normoxischer Luft nach längerer Tracheenverschießung verhindert. Normoxische Sauerstoffniveaus könnten in Termiten Schaden an sauerstoffsensitiven Darmsymbionten verursachen, die auch an der Hinterdarmwand vorkommen. Für die Termiten *Zootermopsis nevadensis* ist bekannt, dass sie die Sauerstoffversorgung auf ein kontinuierlich hypoxisches Niveau reguliert. Dies wird durch kontinuierliches Öffnen und Schließen der Spirakeln erreicht (Lighton und Ottesen 2005, Brune 2014).

Der steile Sauerstoffgradient in der ausgeweiteten Gärkammer kann sich ohne mikrobielle Beteiligung nicht bilden. Sauerstoff wird durch mikroaerobe, fakultativ anaerobe und anaerobe Bakterien effizient verwertet. Als Elektronendonoren dienen Essigsäure, H₂, Milchsäure und möglicherweise Methan (Abb. 2.2) (Kuhnigk *et al.* 1996, Brune 2014, Reuß *et al.* 2015). Mikroaerophile Acetatoxidierer aus *Reticulitermes flavipes* sind *Stenoxybacter acetivorans* und *Diplosphaera colotermitum*. Deren Effizienz im Mikroaerophilen besteht aufgrund von einer hochaffinen cbb₃ Cytochrom-Oxidase. Ihre Michaeliskonstante (K_m) für Sauerstoff beträgt etwa 7 nM O₂, während gewöhnliche aa₃ Cytochrom-Oxidasen einen höheren K_m-Wert von 0,1-1 µM O₂ besitzen (Wertz und Breznak 2007, Wertz *et al.* 2012, Brune 2014).

Sauerstoffabhängige H₂-Oxidation („Knallgasreaktion“) wird in hohen Raten durchgeführt, sodass nur wenig H₂ aus dem Darm entweicht. Sauerstoffempfindliche homoacetogene und methanogene Mikroorganismen sind zur H₂-abhängigen Sauerstoffreduktion fähig. Neben der Sauerstoffreduktion schützen sich manche Symbionten durch Superoxiddismutasen und Katalasen. Arten der Gattungen *Acetonema*, *Desulfovibrio*, *Sporomusa* und *Sporotalea* betreiben sauerstoffabhängige H₂-Reduktion. Ebenfalls werden Flagellaten als H₂-reduzierend beschrieben (Kuhnigk *et al.* 1996, Boga und Brune 2003, Boga *et al.* 2003, Boga *et al.* 2007, König *et al.* 2013, Brune 2014).

Sauerstoffabhängige Oxidation von Lactat zu Acetat ist durch Bakterien an der Darmwand von *Reticulitermes flavipes* und *Thoracotermes macrothorax* bekannt (*Enterococcus*, *Sporotalea*) (Tholen *et al.* 1997, Tholen und Brune 2000, Boga *et al.* 2007).

Methanoxidierende Bakterien sind auf Sauerstoff angewiesen und könnten an der Generierung des Sauerstoffgradienten im Termitendarm teilnehmen. Die Gattung *Methylocystis* ist im Darm von *Incisitermes marginipennis*, *Neotermes castaneus* und *Mastotermes darwiniensis* vorhanden. Noch ist es unklar, ob Methanotrophie ein weit verbreiteter Stoffwechselweg in Termiten ist (Reuß *et al.* 2015).

2.4 – Hefen: Pilze mit großem biotechnologischen Potential

Etwa 1.630 Hefespezies sind zum heutigen Zeitpunkt beschrieben. Nach Schätzungen entspricht dies etwa 1 % der extanten Hefearten der Erde (Kurtzman und Fell 2006, Kurtzman *et al.* 2015). Artenreiche Habitats von Hefen sind Bäume der tropischen Regenwälder oder Därme von Insekten (Morais *et al.* 2006, Blackwell 2011). Ligninreiche Isolierungsquellen sind z. B. Baumrinden, baumansässige Pilze, Blätter, Waldböden, Därme und Gallerien holzfressender Insekten sowie das Nager- und Pferdecaecum (van Uden *et al.* 1958, Callahan und Shifrine 1960, Spencer und Spencer 1997, Sláviková und Vadkertiová 2000, Vega und Blackwell 2005, Sláviková *et al.* 2009, Naumov *et al.* 2013).

In Symbiose mit holzfressenden Insekten unterstützen Hefen den Wirt bei der Spaltung von Zuckerpolymeren (Cellulose, Xylan) und bei der Synthese von essentiellen Aminosäuren oder Vitaminen (Spencer und Spencer 1997, Vega und Blackwell 2005, Ganter 2006). Der Darm von Termiten enthält Hefen, deren physiologische Rolle weitestgehend nicht erfasst ist. Es wird diskutiert, ob manche der Darmhefen die Termiten bei der Cellulose- und Xylanspaltung unterstützen (Prillinger *et al.* 1996, Schäfer *et al.* 1996, Molnar *et al.* 2004, Yoro *et al.* 2014). Ascomycota (Schlauchpilze) ist eine Abteilung der Pilze, deren Mitglieder meist schlauchförmige sporenbeinhaltende Fruchtkörper (Asci) bilden. Hefen der Ascomycota sind in einigen Fällen für die industrielle Applikation erschlossen. Ein Einsatz erfolgt oft in der Lebensmittelherstellung, da die Produktion von toxischen Sekundärmetaboliten selten ist. Eine traditionelle Anwendung ist die alkoholische Gärung durch *Saccharomyces cerevisiae* (Olempska-Beer *et al.* 2006, Johnson 2013a). Ascomycota-Hefen werden zur heterologen Proteinexpression genutzt. Ein Beispiel ist die Produktion von Biopharmazeutika, wie monoklonalen Antikörpern (*Pichia pastoris*, *S. cerevisiae*) (Zha 2012, Johnson 2013a). Bei der Herstellung von Chemikalien wird die Biokatalyse gegenüber der chemischen Katalyse tendenziell bevorzugt. Enzyme sind oft stereoselektiv, können gentechnisch modifiziert werden und bedürfen meist einer geringeren Reaktionstemperatur, neutraleren pH-Werten, atmosphärischen Bedingungen sowie Normaldruck. Gentechnisch modifizierte *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme werden zur Produktion von Bioethanol aus Glucose und Xylose verwendet.

Natürliche, effiziente Xylosefermentierer sind *Candida tropicalis*, *Debaryomyces hansenii* und *Scheffersomyces stipitis*. Die Gattung *Debaryomyces* wird auch zur Biodieselproduktion verwendet, da sie 20-70 % des Zellrockengewichts als Lipide akkumulieren kann (Granström *et al.* 2002, Sánchez *et al.* 2008, Demeke *et al.* 2013, Johnson 2013a).

Die Mitglieder der Abteilung Basidiomycota (Ständerpilze) bilden sporenpräsentierende Fruchtkörper (Basidien) (Banno *et al.* 1967). Charakteristisch für manche Hefen der Basidiomycota sind der starke oxidative Katabolismus und die Produktion von Pigmenten oder reaktiven Sauerstoffspezies. Dies ermöglicht das typische Vorkommen auf Blattoberflächen. Manche Basidiomyceten sind in der Lage, widerstandsfähige Substrate wie Lignocellulose zu spalten. Die Industrie nutzt Basidiomyceten z. B. zur Toxinentgiftung (*Trichosporon*) oder zur Produktion von Carotinoiden (*Cryptococcus*, *Xantophyllomyces*), von Xylanasen (*Cryptococcus*) und von Lipiden als Biodieselvorstufe (*Sporobolomyces*, *Trichosporon*). Das biotechnologische Potential ist noch nicht ausgeschöpft (Johnson 2013b).

2.5 – Lignocellulose und Xylanasen: Vielseitigkeit, Funktion und Nutzen

2.5.1 – Aufbau von Lignocellulose und Funktion in Pflanzenzellwänden

Lignocellulose setzt sich aus etwa 40-50 % Cellulose, 20-40 % Hemicellulosen und 20-30 % Lignin zusammen. Der relative Anteil variiert je nach Pflanze. Weitere Bestandteile sind 3-5 % Pektin und sehr wenig Proteine, Lipide, lösliche Zucker sowie Mineralien (Horn *et al.* 2012).

Cellulose ist das häufigste in der Natur produzierte Biopolymer (180 Milliarden Tonnen pro Jahr) (Korish 2003). Es besteht aus β -1-4 verknüpfter Glucose. Jedes Disaccharid (Cellobiose) ist zum Nächsten um 180° verdreht. Cellulose bildet Mikrofibrillen über Wasserstoffbrücken. Eine Mikrofibrille besteht aus 24-36 parallelen Elementarfibrillen. Mikrofibrillen sind von Hemicellulose- und Ligninfasern umbettet und haben einen Durchmesser von 10-20 nm. Die kompakte Bündelung von Cellulose zu rigiden Mikrofibrillen und weiter zu Makrofibrillen verleiht der Pflanze statische Festigkeit (Rubin 2008, Horn *et al.* 2012, Thomas *et al.* 2013).

Lignin ist ein hydrophobes und aromatisches Heteropolymer. Drei Monolignole, die in verschiedenen Graden methoxyliert sind, bilden das Grundgerüst des Lignins: p-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol. Die Anteile der Monolignole variieren je nach Pflanze. In Gymnosperma (Weichholz) dominiert Coniferylalkohol, in Angiosperma (Hartholz) kommen Coniferyl- und Sinapylalkohol vor und in Poaceae (Gräser) alle drei Monolignole. Lignin

dient als wasserabweisende Schicht und zur kovalenten Quervernetzung mit Cellulose oder Hemicellulose über Ester und Ether (Gerüstbildung) (Monties 1989, Kamm und Kamm 2007, Horn *et al.* 2012, Du *et al.* 2014).

Pektin ist ein Polysaccharid, das in der Mittellamelle konzentriert ist und davon ausgehend graduell in der Zellwand verteilt ist. Es dient der Zelladhäsion und besteht aus linear verknüpfter β -1-4 Galacturonsäure, die in den sogenannten „glatten Regionen“ acetyliert und methyliert vorliegen kann. Eine Calciumbindung an den negativ geladenen Säuregruppen zweier Pektinpolymere verursacht eine Quervernetzung in der Mittellamelle. Der neutrale Zucker Rhamnose ist als seltener Bestandteil in „haarigen Regionen“ der Pektinkette eingeschoben und kann mit oligomerer Arabinose, Galactose oder Xylose verknüpft sein. Die verbundenen Neutralzucker reichen in die primäre Zellwand hinein und dienen als Zellanker: Cellulose-Mikrofibrillen binden an die Neutralzucker des Pektins und eine kovalente Verbindung mit Xyloglucan, einer Hemicellulose, wird diskutiert (Sriamornsak 2003, Zykwinska *et al.* 2005, Caffall und Mohnen 2009, de Souza 2013, Gu und Catchmark 2013, Daher und Braybook 2015).

Hemicellulose ist ein Sammelbegriff für Heteropolymere mit variablen Verzweigungsgraden. Monomere Grundbausteine der Hemicellulosen sind Xylose, Mannose oder Glucose. Gemein ist allen Hemicellulosen, dass die Zuckermonomere äquatorial in β -1-4-Verknüpfung vorliegen. Die häufigsten Hemicellulositypen sind Mannan (Mannosepolymer; Gymnosperma), Xylan (Xylosepolymer; Angiosperma, Poaceae) und Xyloglucan (Glucosepolymer mit repetitiver β -1-6-Xylose; Angiosperma, Embryophyta). Hemicellulosen sind mit Zuckern oder weiteren Substanzen verknüpft. Im Falle von Hartholzxyylan treten oft Acetyler, einige α -1,2 substituierte Glucuronsäuren und 4-O-Methyl-Glucuronsäuren auf. Grasxyylan ist komplexer als Hartholzxyylan und enthält viele α -L-Arabinosesubstituenten, Acetyler, Hydroxymizsäureester sowie p-Cumarsäureester. Veresterungen sind oft am C3-Atom lokalisiert und seltener an C2. Ferulasäure ist oft über C5 verestert. Die Phenolsäuren sind über eine Etherverbindung mit Lignin verbunden. Cellulose wird über Wasserstoffbrückenbindungen gebunden. Die Quervernetzungen mit Lignin und Cellulose verursachen eine Stabilitätserhöhung (Scheller und Ulskov 2010, Horn *et al.* 2012, Gu und Catchmark 2013, Fuchs 2014).

2.5.2 – Lignocelluloseabbau

Die Spaltung von Lignin wird vor allem durch Weißfäulepilze wie *Phanerochaete chrysosporium* durchgeführt. Der Vorteil von Pilzen ist, dass sie als Hyphengeflecht gut in das Holz eindringen können. Ligninspaltende Exoenzyme enthalten oft ein eisenhaltiges Häm als Coenzym, z. B. die Mangan-Peroxidase oder die Lignin-Peroxidase. Laccasen enthalten Kupfer

fer zum Elektronentransfer. Die Enzyme starten Radikalkettenreaktionen durch Ligninoxidation. Mangan-Peroxidasen oxidieren Mn^{2+} zu Mn^{3+} , wobei $0,5 \text{ H}_2\text{O}_2$ und H^+ in die Reaktion eingehen und H_2O entsteht. Mn^{3+} diffundiert in das Holz hinein und entzieht dem Lignin ein Elektron. Lignin-Peroxidasen reduzieren $0,5 \text{ H}_2\text{O}_2$ und nutzen Veratrylalkohol oder Lignin als Substrat. Laccasen nutzen molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor zur Oxidation von Polyphenolen (Timofeevski *et al.* 2000, Claus und Strong 2010, Fuchs 2014). Lignin wird im Termitendarm nur leicht oxidiert, vermutlich aufgrund der starken physikalischen Zerkleinerung des Holzes durch die Mandibeln und den Kaumagen. Termiteneigene Laccasen werden in den Speicheldrüsen von *Reticulitermes flavipes* produziert und oxidieren Lignin-Seitenketten. Carboxylesterasen des Mitteldarmepithels von *R. flavipes* spalten die kovalenten Verknüpfungen zur Hemicellulose. Anorganische Prozesse, wie die Fenton-Reaktion, könnten im leicht sauren und eisenreichen Vorderdarm stattfinden, wobei Lignin partiell abgebaut werden könnte ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$). Das Hydroxylradikal ist das stärkste bekannte Oxidationsmittel in biologischen Systemen ($E^0 = +2,18 \text{ V}$) (Brune 2014, Fuchs 2014).

Pektin wird durch endo- und exo-agierende Pektinasen hydrolysiert. Acetyl- und Methylester werden durch Esterasen hydrolysiert und als Acetat oder Methanol freigesetzt. Polysaccharid-Lyasen spalten Pektinketten durch β -Eliminierung (Voragen *et al.* 2003, Fuchs 2014).

Die Hydrolyse des Xylans ähnelt der Cellulosespaltung. Die Xylanspaltung ist der Cellulosespaltung in Abb. 2.3 gegenübergestellt. Die Xylanspaltung findet extrazellulär statt. Eine Endoxylanase hydrolysiert innerhalb des amorphen Xylans. Exoxylanasen spalten am reduzierenden Zuckerende und hydrolysieren oligomere Xylose. Exo- und endo-agierende Enzyme können Di- und Oligosaccharide freisetzen (für endo nicht dargestellt). β -Xylosidasen und Substituenten hydrolysierende Enzyme setzen monomere Zucker frei, die von der Zelle aufgenommen werden können. Beim Celluloseabbau werden keine Substituenten hydrolysierende Enzyme benötigt (Dekker und Richards 1976, Kuhad und Singh 2007, Horn *et al.* 2012, Fuchs 2014). Kristalline Cellulose ist abbauresistent und kann durch manche Bakterien und Pilze oxidativ gespalten werden, wobei Strangbrüche mit Gluconsäureenden entstehen. Die Oxidasen werden als Hilfsenzyme kategorisiert, da sie nur im kombinierten Einsatz mit Hydrolasen zu einer Effizienzerhöhung führen (Forsberg *et al.* 2011, Horn *et al.* 2012). Das elongierte Ileum von höheren Termiten ist stark basisch (bis zu pH 12). Die Wasserstoffbrücken von kristalliner Cellulose werden bei diesem pH-Wert aufgelöst und β -1-4-Verbindungen werden durch die basische Katalyse partiell hydrolysiert. Dies macht die Cellulose für die enzymatische Spaltung zugänglicher (Brune 2014, Bali *et al.* 2015). Eine energieeffiziente

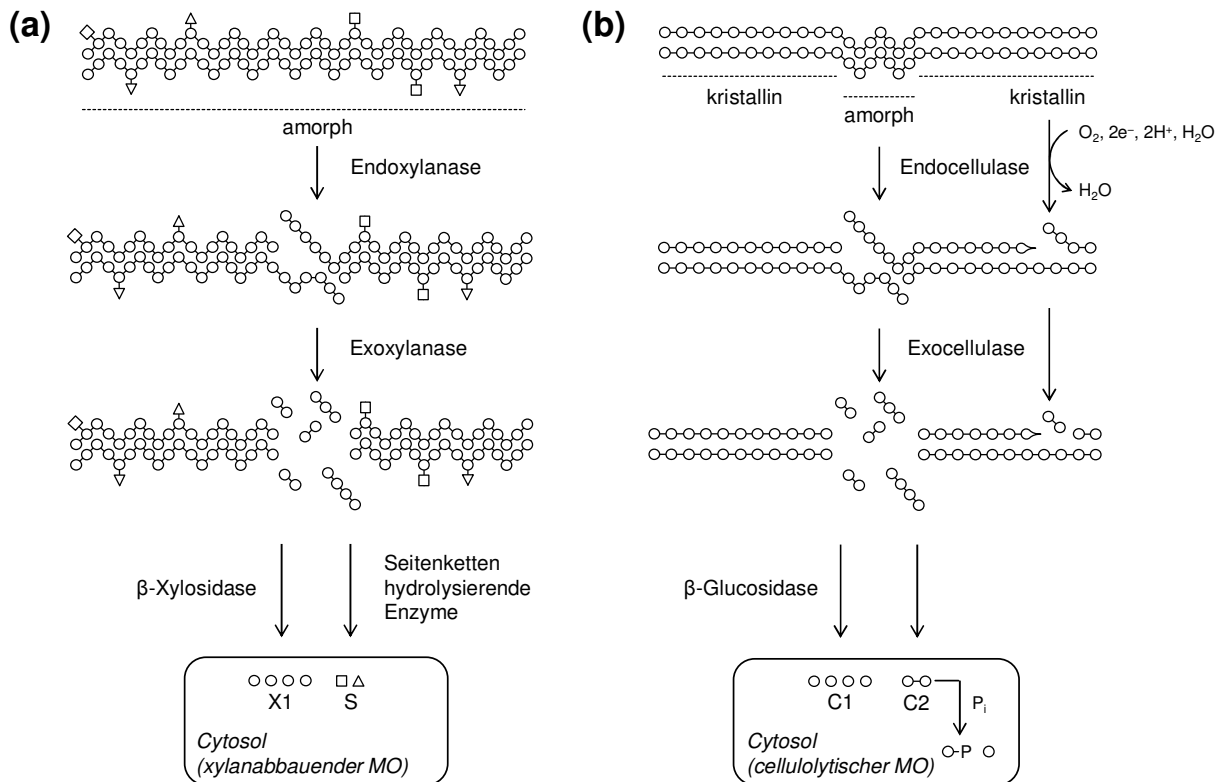


Abbildung 2.3: Enzymatischer Abbau von Xylan und Cellulose. (a) Hydrolyse von Xylan. X1: Xylose (Kreis). S: abgespaltene Substituenten (Drei- und Viereck). (b) Hydrolyse von amorphem Xylan und oxidative Spaltung von kristallinem Xylan. MO: Mikroorganismus. C1: Glucose (Kreis). C2: Cellobiose. Tropfen: Gluconsäure. e^- : Elektron. Bei der oxidativen Cellulosespaltung wird O_2 reduziert. Je zwei Elektronen stammen vom C1-Atom der β -1-4-Bindung (Oxidationszahl: +1 \rightarrow +3) und von externen Reduktionsmitteln (z. B. Glutathionsäure_(red)). Eines der reduzierten Sauerstoffatome bildet zusammen mit OH^- des einfließenden H_2O die Carboxylgruppe der Gluconsäure. Das verbleibende H^+ des H_2O bildet an C4 des nicht oxidierten Zuckers eine Hydroxylgruppe. Das zweite reduzierte Sauerstoffatom verlässt die Reaktion als H_2O . Verändert nach Horn *et al.* 2012 und Fuchs 2014.

phosphorolytische Disaccharidspaltung im Cytosol ist bisher nur für Cellobiose bekannt (Hespell 1988, Fuchs 2014).

2.5.3 – Xylanasen

Xylanasen sind ubiquitär verbreitete, hydrolytische Enzyme. Sie werden von verschiedenen Mikroorganismen produziert. Diese sind marine Algen und Bakterien, Archaea, Crustacea, Insekten, Pansenbakterien, Pilze, Protozoen, Schnecken, terrestrische Bakterien und Pflanzen sowie deren Samen (Collins *et al.* 2005, Bajpai 2014). Bisher sind keine termiteneigenen Xylanasen bekannt. Die Produktion von Xylanasen geschieht durch die mikrobiellen Symbionten der Termiten (Schäfer *et al.* 1996, König *et al.* 2013). Die Xylanasen der Termitensymbionten sind größtenteils unerforscht (Scharf 2015).

Xylanasen sind den Glycosid-Hydrolasen (GH) zugehörig, die verschiedene Kohlenhydrat hydrolysierende Enzyme umfassen (z. B. Amylasen, Cellulasen, Chitinasen, Hemicellulasen). Insgesamt sind 129 gültige GH-Familien bekannt. Die GHF 5, 7, 8, 10, 11, 30 und 43 enthalten mehr als 314 endo-1,4- β -Xylanasen. Fünf verschiedene Faltungsarten der Xylan spalten-

den Domäne sind bekannt und manche Xylanasen besitzen separate Kohlenhydrat-Bindedomänen oder Nebenaktivitäten. Exoxyylanasen sind in den häufigsten Fällen Endoxyylanasen mit exo-Nebenaktivität. Am zahlreichsten sind die GHF 10 und 11 mit etwa 95 % der bekannten Xylanasen. Der variable Aufbau des Xylans gilt als ein Grund für die Vielfalt der Xylanasen (Collins *et al.* 2005, Selvaraj *et al.* 2010, St. John *et al.* 2010, Tenkanen *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2013, Lombard *et al.* 2014).

Für die ubiquitäre Verbreitung in verschiedenen Habitaten ist die Anpassung der Xylanase-eigenschaften an diese entscheidend. Kalte oder heiße Habitate sind z. B. die Polarmeere, Thermalquellen und aufgeheizter Kompost. Psychrophile Xylanasen sind aus einigen Bakterien und Pilzen sowie antarktischem Krill bekannt. Mesophile Xylanasen sind zahlreich (optimal aktiv bei 40-60 °C). Thermophile Archaea, Bakterien und Pilze produzieren Xylanasen mit einem Temperaturoptimum von etwa 70 °C. Hyperthermophile Xylanasen aus *Thermotoga* scheinen bei bis zu 95 oder 105 °C optimal aktiv zu sein (Simpson *et al.* 1991, Antranikian *et al.* 1995, Uhl und Daniel 1999, Singh *et al.* 2003, Collins *et al.* 2005, Shin *et al.* 2010, Shi *et al.* 2013, Kalim *et al.* 2015). Die meisten Habitate der Erde haben einen pH-Wert von 5-9. Extreme pH-Werte kommen in geothermalen Regionen, Salzseen oder in Mikrohabitaten, wie dem Termitendarm vor. Aus den erstgenannten Standorten sind bakterielle und pilzliche Xylanasen mit pH-Optima von bis zu 2 oder 10 beschrieben (Ohta *et al.* 2001, Collins *et al.* 2005, Chen *et al.* 2012, Brune 2014). Weitere bekannte Anpassungen an extreme Habitate sind Ethanoltoleranz, Halotoleranz, Lösungsmitteltoleranz, Proteinstabilität oder Trockenresistenz. Extremophile Xylanasen sind für die biotechnologische Applikation, z. B. bei der Bioethanolproduktion oder Papierherstellung, von großem Interesse (Collins *et al.* 2005, Karan *et al.* 2012).

2.5.4 – Lignocellulose im Kontext der Bioethanolproduktion

Bioethanol der zweiten Generation wird aus lignocellulosehaltigen Rohstoffen produziert. Diese können entweder angebaut werden (Energiepflanzen) oder fallen als Abfallstoffe in der Land- und Forstwirtschaft an (Olsson 2007). Allein durch Verwendung von Abfallrohstoffen der ersten und zweiten Generation zur Herstellung von Ethanol-Benzin-Gemischen aus 85 Volumenprozent (% (v/v)) Ethanol könnte bis zu 32 % des globalen Treibstoffbedarfs gedeckt werden (Kim und Dale 2004). Da lignocellulosehaltige Abfallstoffe auch für die Produktion von Biogas oder Basischemikalien (z. B. Acetat, Lactat) verwendet werden, ist die tatsächliche Verfügbarkeit für die Ethanolproduktion jedoch geringer (Bondesson *et al.* 2013, Gasser *et al.* 2014).

Energiepflanzen zeichnen sich durch geringe Investitionskosten bei hohem Biomassegewinn aus. Beispiele sind Mais (*Zea mays*), Rutenhirse (*Panicum virgatum*) oder Riesen-Chinaschilf (*Miscanthus × giganteus*). Mais ist die wichtigste Energiepflanze bei der Biogasproduktion. Rutenhirse und *Miscanthus × giganteus* zeichnen sich durch einen geringen externen Nährstoffbedarf aus. Beide Pflanzen lagern ihre Mineralien vor der Ernte im Spätherbst in ein Rhizomsystem ein. Bei der Produktion von Bioethanol können hohe Mineraliengehalte die Anlagen schädigen. Während der Ethanolverbrennung würde ein hoher Stickstoffgehalt zu schädlichen Stickstoffoxiden führen und Schwefel zu SO₂ (Lewandowski und Kicherer 1997, Heaton *et al.* 2009, Williams und Douglas 2011, Bondesson *et al.* 2013).

Abfallstoffe der Land- und Forstwirtschaft sind Bagasse, Maisstroh, Papierabfälle, Sägespäne und Weizenstroh. Der Mineralienanteil dieser Rohstoffe ist mitunter hoch. Mineralien können aus Treibstoffen durch Aufreinigung entfernt werden (Bergeron und Riley 1991, Lewandowski und Kicherer 1997, Olsson 2007).

Die globale Menge an verfügbarem Weizenstroh ist groß. Weizenstroh kann zu etwa 30-40 % dem Düngkreislauf von Feldern entnommen werden (Kim und Dale 2004, Gauder *et al.* 2011). Die Relevanz des Weizenstrohs als Dünger wird in der Literatur nicht immer einkalkuliert (Glithero *et al.* 2013). In manchen Fällen wird überflüssiges Weizenstroh, welches nicht zur Düngung benötigt wird, verbrannt. Wenn Transportkosten vernachlässigt werden, könnte bei optimaler Hydrolyse und Fermentation allein daraus ein Bioethanolvolumen von etwa 30-35 × 10⁹ l/a produziert werden (Abb. 2.4).

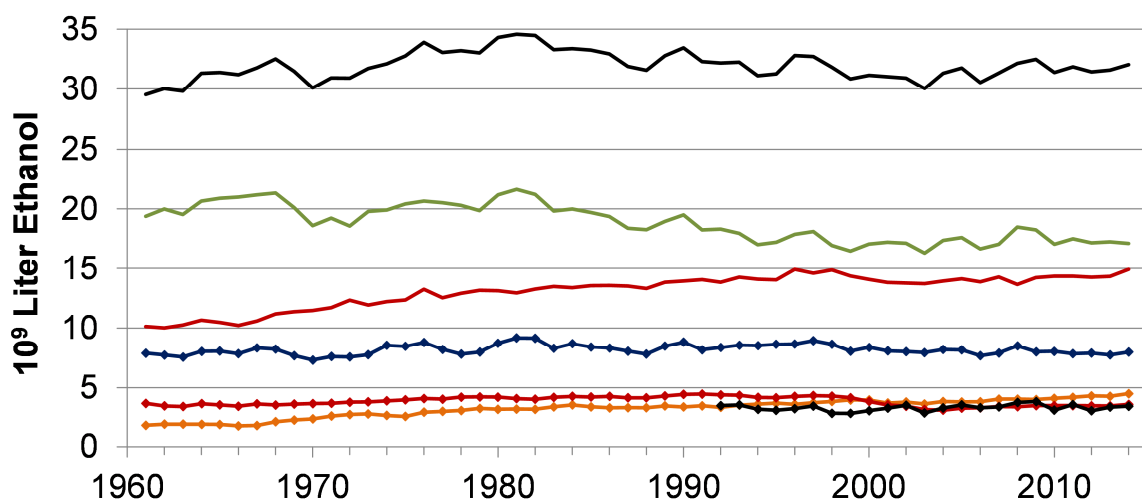


Abbildung 2.4: Theoretische jährliche Bioethanolproduktion aus verbranntem Weizenstroh. Schwarz: Global. Grün: Annex I-Länder (Kyoto-Protokoll ratifiziert). Rot: Nicht-Annex I-Länder. Blau + Raute: EU, USA, Kanada. Orange+Raute: Indien. Rot+Raute: China. Schwarz+Raute: Russland. Deutschland: nicht signifikant (Xyloseabbau mit Pentosephosphatweg) (Arisitidou 2007, Fuchs 2014, FAO 2016).

Dies würde etwa ein Drittel der aktuellen Jahresproduktion von Bioethanol decken, der überwiegend der ersten Generation entstammt. Mengenmäßig verbrennen vor allem westliche

Länder mit guter Infrastruktur viel Stroh (EU, Nordamerika). Zur vollen Nutzung des Rohstoffpotentials müssten etwa 250 moderne Bioraffinerien errichtet werden (DuPont 2015, FAO 2016, Kraan 2016).

Die globale Fördermenge von Erdöl betrug 2014 etwa 5.170×10^9 l/a. Davon sind 64,5 % für das Transportwesen verwendet worden. Die produzierte Bioethanolmenge lag im selben Jahr bei etwa 90×10^9 l/a. Dies entspricht dem Energieäquivalent von etwa 45×10^9 l Erdöl oder einem Prozent der jährlichen Ölförderung. Für die EU wird in den Jahren 2015 und 2016 eine Jahresproduktion und einen Jahresbedarf von $5,25 \times 10^9$ l/a Bioethanol geschätzt. Das Ziel der EU ist ein Austausch von 10 % der fossilen Treibstoffe durch Biotreibstoffe bis 2020 (Stand 2014: Ethanol = 3,5 %, Biodiesel = 5,3 %). Biotreibstoffe aus Nahrung sind auf einen Anteil von 7 % limitiert. Seit 2014 wird der Jahresverbrauch der EU durch die Produktion gedeckt. Der Hauptanteil des europäischen Bioethanols wird aus Futterweizen, Mais oder Zuckerrüben produziert. Der Produktionsanteil aus Lignocellulose (Weizenstroh) beträgt etwa 1,4 % in Europa. Europäische Bioethanolraffinerien, die Weizenstroh nutzen, befinden sich z. B. in Italien (75×10^6 l/a; Beta Renewables, Crescentino) oder Deutschland ($1,2 \times 10^6$ l/a; Clariant, Straubing). Die bisher effektivste Anlage produziert aus cellulosischen Abfällen nach Betreiberangaben 136×10^6 l/a (DuPont, Iowa) (DECHEMA 2015, DuPont 2015, Eni 2015, Flach *et al.* 2015, IEA 2016, Kraan 2016, Megges 2016).

Die Bioethanolproduktion wird oft dreistufig mittels einer thermochemischen Hydrolyse, einer enzymatischen Hydrolyse (Saccharifikation) und einer Fermentationsstufe durchgeführt. Daran angelehnte Prozesse vereinigen z. B. die enzymatische Hydrolyse und die Fermentation (gemeinsame Bioprozessierung) (Olsson 2007, Ballmann *et al.* 2013, Gasser *et al.* 2014). Die thermochemische Hydrolyse dient der Überwindung der Ligninbarriere und der partiellen Hydrolyse der Polysaccharide. Die Überwindung der Ligninbarriere ist wichtig, da diese die enzymatische Spaltung behindert. Ein Beispielprozess ist die Thermodruckhydrolyse (TDH). Hierbei wird 0,32 % (v/v) Salpetersäure bei 150 °C für mindestens 30 min mit losem Stroh (100 l-Reaktor) oder ganzen Strohballen inkubiert (425 l-Reaktor). Durch Säurehydrolyse werden Lignin und Zuckerpolymere gespalten. Final wird durch plötzliche Expansion bei einem Druck von 2 bar eine Trennung der flüssigen und festen Phase erreicht. Je nach Reaktortyp (100 l/425 l) können 50 %/40 % des Xylans und etwa 10 %/5 % der Cellulose durch die TDH hydrolysiert werden. Die flüssige Phase muss mit Aktivkohle behandelt werden, um hemmende Substanzen zu entfernen, die bei der TDH aus Lignin oder Zuckern entstehen können (z. B. Phenolderivate, 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF), Furfural). Die feste Phase wird vor der enzymatischen Saccharifikation gewaschen und abgepuffert. In Kombination mit

TDH werden 81 %/68 % der monomeren Zucker freigesetzt. Das Xylan kann dadurch zu 74 %/58 % gespalten werden und die Cellulose durch beide Reaktoren zu 74 % (Ballmann *et al.* 2013, Gasser *et al.* 2014). Zur simultanen Vergärung von Xylose und Glucose sind *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme entwickelt worden, die Xylose effizient transportieren und fermentieren können (Demeke *et al.* 2013, Farwick *et al.* 2014).

Eine Vorzerkleinerung des Strohs erhöht die Effizienz der TDH, ist aber energetisch zurzeit noch nicht rentabel. Dieser Schritt wäre analog zu der durch die Termitenmandibeln durchgeführten Holzzerkleinerung (siehe Kapitel 2.2) (Li *et al.* 2006, Ballmann *et al.* 2013). Zur Erhöhung der Endausbeute ist akut eine Verbesserung der enzymatischen Hydrolyse sinnvoller. Dadurch könnte die Energie- und Chemikalieninvestition während der TDH reduziert werden. Zur Verbesserung müssen neuartige Cellulasen oder Xylanasen erschlossen werden. Diese Enzyme sollten extremophile Eigenschaften und hohe Umsatzraten besitzen. Eine geringe Endprodukthemmung ist essentiell. Toleranz gegen TDH-Nebenprodukte, Ethanoltoleranz sowie Thermo- und Azidophilie sind von Vorteil (Bon und Ferrara 2007, Yang und Wyman 2008, Yang *et al.* 2011, Ballmann *et al.* 2013, Qi *et al.* 2013). Je stabiler und aktiver das Enzym ist, desto weniger Zeit und Energie muss in die enzymatische Hydrolyse, bzw. indirekt in die TDH investiert werden (Ballmann *et al.* 2013).

2.6 – Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, neuartige lignocellulolytische Hefen aus dem Termitendarm zu identifizieren. Dazu sollten neue Hefestämme aus *Mastotermes darwiniensis* isoliert werden und bekannte Hefestämme aus der Stammsammlung des IMW genutzt werden. Die Hefen sollten bis auf das Artniveau identifiziert werden. Falls dies nicht möglich war, sollten Erstbeschreibungen der neuen Hefearten angefertigt werden.

Die Persistenz von erfolgreichen Neuisolierungen sollte überprüft werden und die niedermolekularen Substanzgehalte im Darm von *Mastotermes darwiniensis* sollten ermittelt werden. Die Kenntnis über niedermolekulare Substanzgehalte im Termitendarm sollte die Interpretation der ökologischen Rolle persistenter Hefearten erleichtern.

Das Primärziel bestand darin, die Hefe mit der höchsten Xylanaseaktivität zu identifizieren. Von dieser sollte eine Endoxylanase aufgereinigt werden. Eine biochemische Charakterisierung der Xylanase sollte zeigen, in welchem Umfang diese für den Einsatz in der Bioethanolproduktion geeignet ist.

3. – Material und Methoden

3.1 – Verwendete Hefestämme aus Stammsammlungen

Hefestämme, die nicht im Rahmen dieser Arbeit isoliert wurden, sind mit ihrem Wirtsorganismus in Tab. 3.1 aufgelistet. *Reticulitermes flavipes*-Exemplare waren europäischen Ursprunges. Die von der amerikanischen *R. flavipes*-Population geographisch abgegrenzten Exemplare waren bis vor kurzem als eigenständige Spezies gruppiert (*Reticulitermes santonensis*) (Austin *et al.* 2005).

Tabelle 3.1: Verwendete Hefestämme. Die Stämme wurden größtenteils aus der Stammsammlung des IMW entnommen. CBS: Zentralbüro für Schimmelpkulturen, Niederlande. C2 Oenoferm: Erbslöh Geisenheim AG. ^T: Typstamm. ¹: Prillinger *et al.* 1996. ²: unveröffentlicht, Sammlungsort = JGU. ³: unveröffentlicht, Sammlungsort = Jawaharlal Nehru-Universität, Neu-Delhi. ⁴: Wang und Bai 2008. ⁵: Naumov *et al.* 2013.

Hefespezies	Stamm	Stammsammlungsnummer des IMW	Wirt/Quelle
<i>Apiotrichum mycotoxinivorans</i>	MYG6	H2/4-68	¹ <i>Mastotermes darwiniensis</i>
<i>Candida duobushaemulonii</i>	PAG2	H1/1-49	² <i>Pyrrhocoris apterus</i>
	ODG28-29	H1/1-75, H2/4-73	³ <i>Odontotermes distans</i>
	ODG34	H2/5-21	
<i>Candida membranifaciens</i>	ZAG1-3	H2/5-8, -9, -10	¹ <i>Zootermopsis angusticollis</i>
	ZAG4-7, ZAG5a-b	H2/5-11, H1/1-34, H2/5-33, -34, -13, -14	
	ZAG9	H2/5-16	
	ZAG8	H2/5-15	
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	RM1	H2/4-76	¹ <i>Reticulitermes flavipes</i>
	RM6	H2/4-77	
<i>Naganishia albida</i>	OO1	H2/4-78	³ <i>Odontotermes obesus</i>
	OO4	H2/4-66	
<i>Papiliotrema odontotermitis</i>	OO5 ^T	H2/4-81	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	OO3	H2/4-80	³ <i>Odontotermes assmuthi</i>
	OAG36	H2/4-69	
<i>Rhodotorula toruloides</i>	ODG30/1-30/2	H2/5-39, -40	³ <i>Odontotermes distans</i>
	ODG31	H2/5-23	
<i>Saccharomyces arboricola</i>	CBS 10644 ^T	nicht aufgenommen	⁴ <i>Quercus fabri</i>
	CBS 12748		⁵ <i>Castanopsis orthacantha</i>
	CBS 12749		⁵ <i>Auricularia polytricha</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	C2 Oenoferm		Wein
<i>Saitozyma flava</i>	OO2	H2/4-79	³ <i>Odontotermes obesus</i>
<i>Scheffersomyces coipomoensis</i>	CG1-3	H2/5-18, -19, -20	¹ <i>Cryptocercus punctulatus</i>
<i>Scheffersomyces shehatae</i>	ZM5	H2/4-63	¹ <i>Zootermopsis nevadensis</i>
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	OOG41	H2/5-41	³ <i>Odontotermes obesus</i>
	MM1	H1/1-13	
<i>Sugiyamaella mastotermitis</i>	MYG4-5	H2/5-4, -5	¹ <i>Mastotermes darwiniensis</i>
	MYG7-9	H2/5-32, -6, -7	
<i>Sugiyamaella smithiae</i>	NM1	H2/4-64	¹ <i>Neotermes jouteli</i>
	NS1	H2/5-42	
	ODG32	H1/1-75	
<i>Trichosporon asahii</i>	PAG1	H2/4-67	² <i>Pyrrhocoris apterus</i>

3.2 – Medien, Lösungen und Puffer

3.2.1 – Medien zur Kultivierung von Hefen

Die verwendeten Kulturmedien sind in Tab. 3.2 aufgelistet. Feste Medien waren in der Regel 1,5 %ig konzentrierte Agarplatten und werden im Text gegebenenfalls als „Platten“ bezeichnet.

Tabelle 3.2: Verwendete Medien zur Hefekultivierung. Allen Medien wurde Antibiotika-Stammlösung hinzugegeben. Falls kein pH-Wert angegeben ist, wurde dieser nicht eingestellt. n.v.: nicht vorhanden. ; Induktormedium. ¹: bioMérieux 2011. ²: Dr. Arno Cordes, ASA-Spezialenzyme GmbH (2016) persönliche Kommunikation. Mainz, Wolfenbüttel. ³: Korish 2003. ⁴: DSMZ 2007. ⁵: Prillinger *et al.* 1996. ⁶: Hagler und Ahearn 1981. ⁷: Vogel 1956. ⁸: Odds 1991.

Name und Referenz	Abkürzung	Komponenten; pH-Wert
¹ API C-Medium (bioMérieux)	n.v.	0,05 g/l CaCl ₂ , 0,5 g/l Geliermittel, 5 mg/l L-Histidin, 0,31 g/l KH ₂ PO ₄ , 0,45 g/l K ₂ HPO ₄ , 0,02 g/l L-Methionin, 0,2 g/l MgSO ₄ , 0,1 g/l NaCl, 0,92 g/l Na ₂ HPO ₄ , 5 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10 ml/l Spurenelemente (bioMérieux), 0,02 g/l L-Tryptophan, 1 ml/l Vitaminlösung (bioMérieux); pH 6,4-6,8
² ASA-Xylanmedium	n.v.	1 g/l CaCl ₂ × H ₂ O, 30 g/l Maisquellwasser, 1 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20 g/l Xylan; pH 6
Azocasein-Glucose-Hefeextrakt-Medium	AC/GY-Medium	20 g/l Azocasein (sterilfiltriert), 20 g/l Glucose, 10 g/l Hefeextrakt
³ CMC-Hefeextrakt-Glucosemedium	CMC/YG	5 g/l CMC, 5 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Glucose
CMC-Hefeextrakt-Peptonmedium	CMC/YP	5 g/l CMC, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Fleischpepton
CMC-YP-Induktormedium	CMC/YP _i	CMC/YP-Medium mit 0,5 g/l Cellobiose
⁴ DSMZ-Medium 53	n.v.	10 g/l Caseinpepton (tryptisch verdaut), 5 g/l Glucose, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl; pH 7,2-7,4
⁵ Glucose-Hefextrakt-Peptonmedium	GYP	20 g/l Glucose × H ₂ O, 10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Fleischpepton; pH 6,8
Hefeextrakt-Pepton-Medium	YP	3 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Fleischpepton
⁶ Hefestickstoffbasis-Glucose-Medium	YNB/G	6,7 g/l Hefestickstoffbasis (sterilfiltriert), 5 g/l Glucose
Maismehl-Medium	n.v.	100 g/l Maismehl aufquellen. Filtrat und 10 g/l Tween 80 auf 1 l auffüllen.
⁵ Malzextrakt-Medium	ME	30 g/l Malzextrakt; pH 6
Milchpulver-Medium	n.v.	10 g/l Magermilchpulver, 1 g/l Hefeextrakt; 30 min ausdampfen
⁷ MV-Induktormedium	MV _i	Vogels Minimalsalzmedium (modifiziert, siehe unten) mit 0,5 g/l Cellobiose oder Lactose
⁸ Sabouraud-Medium	SAB	30 g/l Roth Produktnummer K029 oder 50 g/l Merck Produktnummer 1.05438 (20 oder 40 g/l Glucose, 10 g/l Pepton; pH 5,6)
Tanninsäure-Kartoffelextrakt-Medium	Tanninsäure-KEX	10 g/l Tanninsäure, 26,5 g/l Roth Produktnummer CP74.1 (6,5 g/l Kartoffel-Infus, 20 g/l Glucose)
⁷ Vogels Minimalsalzmedium (modifiziert)	MV	5 g/l C-Quelle (z.B. CMC, Xylan; siehe Versuchsbeschreibungen), 6,7 g/l Hefestickstoffbasis (sterilfiltriert), 1 g/l Tween 80, Vogels Salzlösung; pH 5,86

3.2.2 – Lösungen und Puffer

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit genutzten Lösungen und Puffer sind in Tab. 3.3 aufgelistet.

Tabelle 3.3: Puffer und Lösungen. Die pH-Werte der Puffer wurden mit NaOH oder HCl eingestellt. Falls kein pH-Wert eingestellt wurde, ist dieser nicht in der Tabelle eingetragen. Kommerziell erworbene Puffer sind nicht aufgeführt. Konz.: Konzentration. ¹: Megazyme 2007. ²: GE Healthcare 2014. ³: Egen *et al.* 1984. ⁴: Ohlenschläger *et al.* 1980. ⁵: Korish 2003. ⁶: Skujins *et al.* 1962. ⁷: Vogel 1956.

Name und Referenz	Konz.	Komponenten; pH-Wert
4-MUF-Stoppuffer	1x	75 g/l Glycin, 58 g/l NaCl
¹ Acetatpuffer	0,1 M	7,5 g/l Essigsäure; pH 5,3
ADH-Lösung	1x	30 mg/ml Alkohol-Dehydrogenase (<i>S. cerevisiae</i>) in ADH-Puffer
ADH-Puffer		1,67 g/l Glycerin, 33,33 g/l Na ₄ P ₂ O ₇ , 8,33 g/l Semicarbazid; pH 8,7
² Ammoniumacetatpuffer	0,1 M	7,71 g/l Ammoniumacetat; pH 5
³ Anodenlösung IEF		9,8 g/l H ₃ PO ₄
Antibiotika-Stammlösung	500x	25 mg/ml Ampicillin und Streptomycin, sterilfiltrieren
⁴ Bernsteinsäurepuffer	50 mM	5,91 g/l Bernsteinsäure, 312,5 ml/l 0,2 N NaOH; pH 5,3
CarboPac-Standardlösung	1x	10 mg/l L-Arabinose, Xylose, Xylobiose, -triose, -tetraose, -pentaose
⁴ Citratpuffer	0,1 M	3,27 g/l Citronensäure, 9,71 g/l Natriumcitrat; pH 5,3
⁴ Citronensäure-Phosphatpuffer		8,71 g/l Citronensäure, 19,46 g/l Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O (entspricht 45 und 110 mM); pH 5,3
Coomassie-Entfärbelösung		7 % (v/v) Essigsäure, 10 % (v/v) Ethanol (vergällt)
Coomassie-Färbelösung		0,5 g/l Coomassie-Brilliantblau R-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) Ethanol (vergällt)
DNSS-Reagenz		5 g/l 3,5-Dinitrosalicylsäure, 135 g/l K-Na-Tartrat, 1 g/l NaOH, 40 g/l Na ₂ SO ₄ , 40 g/l Phenol
Hefestickstoffbasis-Lösung	1x	Sigma-Aldrich Produktnummer 51438 (2 mg/l p-Aminobenzoesäure, 2 µg/l Biotin, 0,5 mg/l Borsäure, 0,1 g/l CaCl ₂ , 0,4 mg/l Calciumpanthothenat, 40 µg/l CuSO ₄ , 0,2 mg/l FeCl ₂ , 2 µg/l Folsäure, 10 mg/l L-Histidin, 2 mg/l myo-Inositol, 0,1 mg/l KI, 1 g/l K ₃ PO ₄ , 20 mg/l L-Methionin, 0,5 g/l MgSO ₄ , 0,4 mg/l MnSO ₄ , 0,1 g/l NaCl, 0,2 mg/l Na ₂ MoO ₄ , 5 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,4 mg/l Niacin, 0,4 mg/l Pyridoxin, 0,2 mg/l Riboflavin, 0,4 mg/l Thiamin, 20 mg/l DL-Tryptophan, 0,4 mg/l ZnSO ₄)
HPX-87H-Standardlösung		87 mM Acetat, 55 mM Butyrat, 5 mM Citrat, 51 mM Glucose, 0,13 M Glycerin, 0,85 M Ethanol, 53 mM Fructose, 50 mM Lactat, 1,2 M Methanol, 67 mM Propionat, 43 mM Succinat
⁴ K-/Na-Phosphatpuffer	67 mM	8,96 g/l KH ₂ PO ₄ , 0,16 g/l Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O; pH 5,3
³ Kathodenlösung IEF	0,1 M	4 g/l NaOH (in Plätzchen)
Kongorotlösung		1,5 g/l Kongorot
Lugolsche Lösung	1x	Roth Produktnummer N052 (3,3 g/l Jod, 6,7 g/l KI)
MU-Puffer		4,67 g/l Maleinsäure (40,2 mM), 5,2 g/l Tris (43 mM); pH 5,3
NAD ⁺ -Lösung		12 mg/ml NAD ⁺
⁴ Natriumacetatpuffer	0,2 M	1,16 g/l Essigsäure, 6,62 g/l Natriumacetat; pH 5,3
¹ Natriumphosphatpuffer A	0,1 M	17,8 g/l Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O; pH 6
⁵ Natriumphosphatpuffer B	50 mM	8,9 g/l Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O, 6,9 g/l NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O; pH 7
¹ RBB-Xylanlösung	1x	10 g/l RBB-Xylan in Probenpuffer durch Aufkochen lösen
SDS-PAGE-Laufpuffer	10x	144 g/l Glycin, 10 g/l SDS, 30 g/l Tris
SDS-PAGE-Probenpuffer	4x	102,6 g/l Glycerin, 57,13 mg/l β-Mercaptoethanol, 30,8 g/l SDS, 15,53 g/l Tris; pH 6,8
TBE-Puffer	10x	108 g/l Tris, 55 g/l Borsäure, 7,44 g/l Na ₂ EDTA; pH 8,3
⁶ Universalpuffer	5x	6,3 g/l H ₃ BO ₃ , 14 g/l Citronensäure, 11,6 g/l Maleinsäure, 13 g/l Tris; pH 5,3
⁷ Vogels Salzlösung	50x	5 g/l CaCl ₂ , 250 g/l KH ₂ PO ₄ , 10 g/l MgSO ₄ × 7 H ₂ O, 100 g/l NH ₄ NO ₃ , 125 g/l Trinatriumcitrat × 2 H ₂ O

3.2.3 – Herstellung von Strohpulversubstrat

Strohpulver wurde als Substrat für enzymatische Hydrolysetests hergestellt. Als Rohstoff diente durch TDH aufgeschlossenes Stroh (Dr. Stefan Dröge, Prüf- und Forschungsinstitut Pirmasens (PFI)). Die Parameter der Thermodruckhydrolyse variierten, was zu variablen Gehalten der Hydrolyseprodukte des Strohs führte (siehe Tab. 7.1) (Ballmann *et al.* 2013). Das tiefgefrorene TDH-Stroh wurde zunächst mehrfach in eH₂O gewaschen. Die Halme wurden in 1-2 cm lange Stücke geschnitten und mit einer Schlagmühle (KSW 3306, Ciatronic) vorbehandelt. Die weitere Zerkleinerung erfolgte mit dem Gerät MiniMAHFIA (83010, CTSV) nach Herstellerangaben. Bei dem Prozess entstand eine Strohsuspension. Das zerkleinerte Stroh wurde mit Faltenfiltern von der Flüssigphase separiert. Der Filterinhalt wurde zu einer Schichthöhe von maximal 0,5 cm ausgestrichen und bei 60 °C über Nacht getrocknet. Die getrocknete Schicht wurde mit der Schlagmühle zerkleinert, bis ein homogenes Mahlbild vorlag. Die Strohpartikel wurden mikroskopisch ausgemessen und waren 30-100 µm klein (Vergleich Termiten: speziesabhängig 10-30 µm oder 100-300 µm) (Li *et al.* 2006).

3.3 – Insektenpräparation

Exemplare der niederen Termiten *Mastotermes darwiniensis* Froggatt und deren Nestmaterial wurden von der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (Berlin) bezogen. Die Präparation von Termiten erfolgte in einer sterilen Umgebung. Zur Hefeisolierung wurden die Tiere in 70 % (v/v) Ethanol betäubt und oberflächensterilisiert. Für molekularbiologische Untersuchungen des Darminhaltes wurde die Betäubung für 20 min bei 4 °C durchgeführt. Die Termiten wurden anschließend mit entionisiertem Wasser (eH₂O) gespült und dekapitiert. Das Rektum wurde mit einem Skalpell geöffnet und der Darm wurde herausgezogen (Kuhnigk *et al.* 1994). Der Darminhalt wurde nach Dissektion in 10 mM Phosphatpuffer TP aufgenommen (Hefeisolierung) oder unverdünnt gelagert (molekularbiologische Untersuchungen). Der Darm der Feuerwanze *Pyrrhocoris apterus* Linnaeus wurde durch Thomas Onchuru präpariert, geöffnet und in 10 mM Phosphatpuffer TP aufgenommen (Institut für Zoologie, Arbeitsgruppe Kaltenpoth, JGU Mainz).

3.4 – Mikrobiologische Methoden

3.4.1 – Isolierung von Hefestämmen

Die Anreicherung und Kultivierung von Hefeisolaten fand bei 30 °C in aerober Umgebung statt. Verwendete Medien waren DSMZ-Medium 53, GYP-Medium, ME-Medium, SAB-

Medium und MV-Medium. Die Medien wurden auf pH 5,6 eingestellt und den Anreicherungsmedien wurde 0,5 % Carboxymethylcellulose (CMC) zugesetzt. Anreicherungskulturen wurden 1 %ig (v/v) beimpft. Bei sichtbarem Bewuchs wurden die Kulturen dreimal nacheinander auf Agarplatten ausgestrichen, sobald ein einheitlicher Kolonietyp sichtbar war. Der Agar war auf 1,5 Gewichtsprozent (% w/v) konzentriert. Axenische Hefekulturen wurden in flüssigem GYP-Medium bis zur exponentiellen Phase kultiviert und in 30 % (v/v) Glycerin bei -76 °C gelagert. Exemplare von lignocellulolytischen Hefearten wurden in der Sammlung des Leibniz Instituts – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) hinterlegt. Neue Hefearten wurden zusätzlich in der Sammlung des Zentralbüros für Schimmelkulturen (Niederlande, CBS) hinterlegt. An Stammsammlungen verschickte Arten wurden vor der Versendung mittels Mikromanipulation aufgereinigt (Fröhlich und König 2008, Wang 2015).

3.4.2 – Kultivierung von Hefestämmen und *in vivo* Charakterisierung

Vorkulturen wurden dreimal in Folge 1 %ig (v/v) in 10 ml Flüssigkulturen überimpft. Das Nährmedium entsprach dem der Hauptkultur. Die Kultivierung wurde über Nacht bei 30 °C mit 120 UpM als Schüttelkultur (aerobe Hauptkultur) oder als Standkultur (gärende Hauptkultur) durchgeführt. Die Zellen wurden vor der Verwendung mit 0,9 % NaCl gewaschen.

Fermentationsmessungen

Die **Fermentation** durch Hefen wurde mit Durham-Röhrchen in YP-Medium überprüft. Das Medium wurde mit 2 % (w/v) Galactose, Glucose, Lactose, Maltose, Raffinose, Saccharose, Trehalose oder Xylose versetzt. Gasbildung und Änderungen des pH-Wertes wurden nach 18 h dokumentiert (InLab-Mikroelektrode, Mettler-Toledo). Ethanolbildung wurde mittels Hochleistungsflüssigchromatographie ermittelt (Kapitel 3.5.5).

Zur Erstellung von **Gärbilanzen** wurden 100 ml MV-Medium (pH 5,86) mit 1 % Cellobiose, Glucose oder Xylose mit $6,25 \times 10^4$ Hefezellen/ml inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C und 120 UpM für 72 h. Die Kultivierungsgefäße waren Gärkolben mit Gäraufsätzen (Fassungsvermögen: 100 ml). Der Gäraufsatz wurde mit 0,2 % (v/v) Schwefelsäure befüllt. Ein versiegelter Schlauch ermöglichte die Beprobung und nachfolgende Begasungen mit sterilem N_2 . Gasbildung wurde per Gewichtsmessung quantifiziert.

Wachstumsoptima und Toleranzen von Hefestämmen

Das **pH-Optimum** von Hefestämmen wurde in 10 ml SAB-Medium bei 30 °C im Aeroben gemessen (120 UpM). Die Glucosemenge des SAB-Mediums wurde auf 2 % (w/v) reduziert. Der pH-Bereich der Hauptkulturen lag zwischen 3,5-7 mit Intervallen von 0,5. Hauptkulturen

wurden auf eine scheinbare optische Dichte (OD_{λ}) von 0,1 bei einer Wellenlänge (λ) von 580 nm angeimpft. Die OD_{580} wurde in unterschiedlichen Zeiträumen aufgenommen ($\leq 14,5$ h: Stämme MD1M, MD39V^T, MD123, NM1, OO2 und OO5^T; 65,75 h: Stamm OO1). Die **Ethanoltoleranz** von Hefestämmen wurde in 10 ml SAB-Medium mit 2 % Glucose bei 30 °C im Aeroben bestimmt. Es wurden Konzentrationen von 0, 1, 5, 8, 10, 15 und 20 % (v/v) Ethanol getestet. Der pH-Wert wurde auf das ermittelte Optimum der oben genannten Hefestämme eingestellt. Die Kulturen wurden mit mehreren Schichten Parafilm versiegelt, bis ein signifikantes Wachstum sichtbar war ($OD_{580} \geq 0,3$). Dies diente zur Minimierung von Ethanolverdunstung.

Zur **Speziesbeschreibung** wurden weitere Wachstumstests in SAB-Medium bei 120 UpM und 30 °C durchgeführt. Gemessene Wachstumsbedingungen waren der Zusatz von 50 % Glucose, 60 % Glucose, 10 % NaCl mit 5 % Glucose, 0,1 % Cycloheximid und die Toleranz verschiedener Temperaturen. Stärkeproduktion wurde nach 3 Tagen mit Lugolscher Lösung nachgewiesen. Die Diazonium Blau B (DBB)-Reaktion wurde mit der Alkali-Ethanol-DBB Methode in YNB/G-Medium überprüft (Hagler und Ahearn 1981). Vitamin-Wachstumstests wurden aerob in MV-Medium mit Variation der externen Vitamine in der Hefestickstoffbasis-Lösung durchgeführt.

***In vivo* Charakterisierung von Hefestämmen**

Der **Kongorotest** wurde im Plattendiffusionsverfahren angewendet. Der Test diente dem qualitativen Cellulasenachweis während der Kultivierung von Hefen (Teather und Wood 1982). Die Stämme wurden auf CMC/YP- und CMC/YG-Platten linienförmig ausgestrichen und für 5 Tage bei 30 °C bebrütet (Abb. 3.1). Die Platten wurden mit Kongorotlösung überschichtet und 15 min gefärbt. Die Kongorotlösung wurde mit 1 M NaCl ausgetauscht und der Ansatz wurde 30 min stehen gelassen. Kongorot ist ein Farbstoff, der an Cellulose bindet. Wurde die CMC gespalten, waren entfärbte Abbauhöfe sichtbar. Das Ergebnis wurde als positiv eingestuft, wenn eine Aktivität in einem der Medien nachweisbar war.

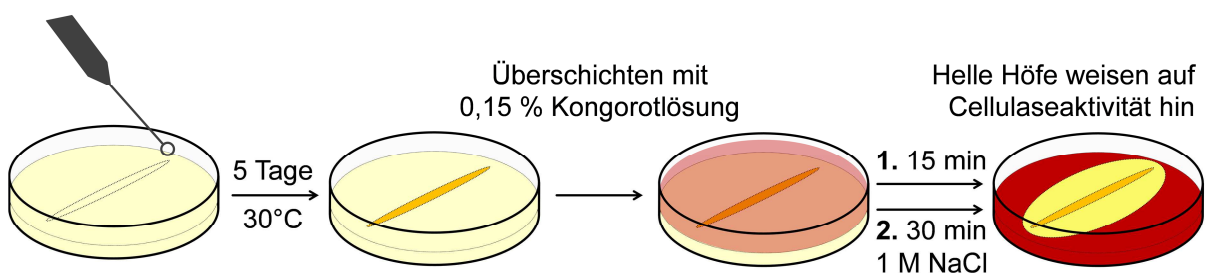


Abbildung 3.1: Durchführung des Kongorottests. CMC-haltige Platten wurden für mindestens 5 Tage bei 30 °C inkubiert und mit 0,15 % Kongorotlösung für 15 min überschichtet. Es folgte ein Waschschritt mit 1 M NaCl für 15 min. Helle Höfe waren Abbauzonen der CMC.

Im **Azurin-Substrattest** wurde der Abbau von Azurin gekoppelten Polysacchariden während des Hefewachstums oder der Enzyminkubation qualitativ überprüft (Amylose, Arabinan, Arabinoxylan, Cellulose, Chitosan, Galactan, Galactomannan, β -Glucan (aus Gerste), Xylan (von der Birke oder von Haferspelzen) (Megazyme, Wicklow). Der Test wurde in einem Reagenzglas durchgeführt, welches zwei Mediensichten beinhaltete (Abb. 3.2). Die untere feste Schicht bestand aus 2 ml C-freiem MV-Medium mit 0,75 % Agar. Die obere Schicht bestand aus 1 % Azurin-Substrat in MV- oder MV_i-Medium (MV_i für Xylanase- und Cellulasetest). Nach dem Autoklavieren der Azurinsuspension wurde diese zentrifugiert ($8.600 \times G$, 20 min) und das Sediment wurde in C-freiem Hauptkulturmedium gewaschen. Das Vorkulturmedium war GYP- und CMC/YP₁-Medium (CMC/YP₁ für Xylanase- und Cellulasetest). Die Inkubation erfolgte stehend für 2-7 Tage bei 30 °C. Eine positive Enzymaktivität wurde durch eine Blaufärbung der Agarschicht sichtbar. Dies beruhte auf der Diffusion freigesetzter Azurin-Oligomere in die untere, agarhaltige Schicht.

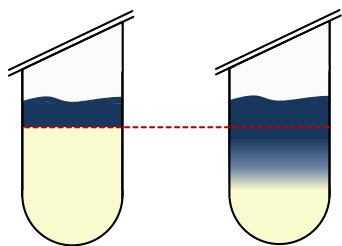


Abbildung 3.2: Zweisystems des Azurin-Substrattests. Enzymaktivität spaltete Azurin gekoppelte Biopolymere in lösliche Oligosaccharide. Diese diffundierten aus der Polymersuspension (oberhalb der roten Linie) in die agarhaltige feste Schicht (unterhalb der roten Linie). Negative Kulturen enthielten ungefärbten Agar (links) und positive Kulturen, blau gefärbten (rechts).

Laccaseaktivität wurde mittels Inkubation der Stämme bei 30 °C auf 1 % Tanninsäure-KEX-Platten ermittelt (Claus und Filip 1998). Ebenfalls wurde der Abbau von 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS, Sigma-Aldrich) nach Claus *et al.* (2002) überprüft. Dazu wurden Überstände von Übernachtskulturen in SAB-Medium mittels Zentrifugationsfiltration 15-20x aufkonzentriert ($8.000 \times G$, 4 °C; Vivaspin 20, 5 kDa, GE Healthcare) und getestet.

Proteaseaktivität wurde mit Milchpulvermedium-Platten getestet (pH 3,5 und 6,8). Die Stämme wurden für 14 Tage bei 25 °C inkubiert. Zum Test auf Azocaseinabbau wurden die Stämme in AC/GY-Medium bei 30 °C als Standkultur kultiviert. Nach 4 und 19 Tagen wurde der Kulturüberstand zentrifugiert ($16.000 \times G$, 10 min) und filtriert (0,2 μ m Porengröße). 125 μ l des Kulturüberstandes wurden mit 125 μ l 0,1 M NaOH versetzt. Der Azocaseinabbau wurde bei 500 nm gemessen (FLUOstar Omega, BMG Labtech). Casein- und Kollagenabbau wurden ebenfalls mit den Testsystemen „Protazym AK“ und „Protazym OL“ (Megazyme) in Universalpuffer (pH 3,5) bestimmt. Der GYC-Kulturüberstand wurde verwendet und die Herstellerangaben wurden befolgt.

Assimilationsprofile neuer Spezies wurden mit den analytischen Profilindex-Tests (API-Tests) 32C und API 50CH (bioMérieux) nach Herstellerangaben angefertigt. Zur Kultivierung wurde API C-Medium (bioMérieux) verwendet. Der API *Candida*-Test (bioMérieux) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, um Säurebildung oder Enzymaktivitäten zu bestimmen.

Kulturen für proteinbiochemische Methoden

Zur **Xylanaseproduktion** wurde der Hefestamm *Saitozyma flava* OO2 in MV-Medium mit 1 % Xylan in Schikanekolben aerob kultiviert (120 UpM, 30 °C). Die Inokulation der Hauptkulturmedien wurde mit $6,25 \times 10^4$ Zellen/ml durchgeführt.

Im **4-Methylumbelliferyl-Test** wurde zur Hefekultivierung GYP- und MV-Medium verwendet. Das MV-Medium wurde in zwei Varianten hergestellt. Diese unterschieden sich in der C-Quelle und bestanden entweder aus 1 % Xylan (Buchenholz) oder 0,25 % Xylan (Buchenholz) mit 0,75 % CMC. Die Kulturen wurden aerob bei 30 °C für 4 Tage (GYP-Medium) oder 5 Tage (MV-Medium) inkubiert. Der **p-Nitrophenoltest** nutzte GYP-Medium und 2x CYP-Medium. Der Stamm *Saitozyma flava* OO2 wurde aerob bei 30 °C für 2 Tage inkubiert.

3.4.3 – Morphologie von Mikroorganismen und Mikroskopie

Die Kolonief orm von Hefestämmen wurde auf GYP-Platten ermittelt. Die Duplikatplatten wurden bei 25 °C oder 30 °C für 7 Tage inkubiert. Zellmorphologien wurden nach 3 Tagen Inkubation bei 30 °C und 120 UpM in GYP-Medium untersucht. Pseudohyphenbildung wurde durch Inkubation bei 25 °C auf Maismehlmedium-Platten induziert. Nach Dreistrich-Ausstrich der Vorkultur mit einer rauen Impföse wurden sterile Objektträger auf dem Inokulat platziert (Dalmau-Technik) (Wickerham 1951). Eine Ascusbildung wurde durch Kreuzung zweier Hefestämme auf 5 % ME-Medium-2 % (w/v) Agarplatten überprüft. Die Kulturen wurden bei 25 °C für 7 Wochen bebrütet (Kurtzman 2007).

Die Auszählung von Hefezellen erfolgte mit einer Zählkammer ($0,1 \text{ mm} \times 0,0025 \text{ mm}^2$ /Quadrat, Thoma) im Phasenkontrast. Licht- und Phasenkontrastmikroskopie wurde mit den Mikroskopen BZ-8000K (Keyence) und Axioskop 40 (Zeiss) durchgeführt.

3.5 – Molekularbiologische Methoden

3.5.1 – Isolierung genomischer DNA

Über Nacht kultivierte Hefezellen wurden durch Zentrifugation ($8.600 \times G$, 10 min) geerntet und mit 0,9 % sterilem NaCl gewaschen. Ein Zellpellet mit einem Durchmesser von 1 mm wurde in 100 μl InstaGene-Matrix suspendiert (mit negativ geladenen Chelexkugeln) (Bio-

rad). Zu dem Ansatz wurden 10 µl Lytikase gegeben (Konzentration: 3 U) (Sigma-Aldrich). Die Suspension wurde für eine Stunde bei 37 °C und 400 UpM im Thermomixer inkubiert. Die Temperatur und die Rotation wurden für 30 min auf 56 °C und 1.400 UpM erhöht. Danach wurde die Temperatur für 8 min auf 99 °C eingestellt und das Schütteln wurde beendet. Die Zelltrümmer und Chelexkugeln wurden mittels Zentrifugation pelletiert (8.600 × G, 4 min, 4 °C). Genomische DNA wurde aus dem oberen Bereich der Flüssigkeit entnommen.

3.5.2 – Primer für die Polymerase-Kettenreaktion

Die in Tab. 3.4 gezeigten Primer dienen der gerichteten Amplifikation von Genomregionen und der Sequenzierung der Amplifikate. Die Sequenzen wurden für die Artbestimmung von Hefestämmen oder die Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen verwendet.

Tabelle 3.4: Primer für die PCR und Sanger-Sequenzierung. Die Tabelle zeigt die PCR- und Sequenzierungsprimer. Hergestellt und salzfrei aufgereinigt durch Sigma-Aldrich (^{SIGMA}) oder MWG Eurofins (^{MWG}). Bp: Basenpaare. mod: modifiziert. T_m: Schmelztemperatur. (V): vorwärts gerichtet. (R): rückwärtig gerichtet. Ungewöhnliche Nukleotidabkürzungen: H = Kein Guanin. N = jedes Nukleotid. R = Purin. Y = Pyrimidin.

Primernamen und Hersteller	T _m [°C]	Länge [Bp]	Sequenz (5'-3')	Referenz
18S-NS-1 (mod, V) ^{SIGMA}	60,0	21	CTG CCA GTA GTC ATA TGC TTG	
18S-NS-8 (mod, R) ^{SIGMA}	59,8	17	TCC GCA GGT TCA CCT AC	
<i>COX2</i> MD39V (V1) ^{MWG}	53,2	20	CCA GCT ATG ACA ATT AAA GC	¹ Diese Arbeit
<i>COX2</i> MD39V (V2) ^{MWG}	52,4	19	GAT AGT GGT GAA ACA GTT C	
<i>COX2</i> MD39V (R) ^{MWG}	52,4	19	CAA CTG GTA TTA CAA CAC G	
D1/D2-NL-1S (V) ^{SIGMA}	65,4	24	GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG	O'Donnell 1993, Kurtzman und Robnett 1998
D1/D2-NL-4S (R) ^{SIGMA}	65,6	19	GGT CCG TGT TTC AAG ACG G	
ITS5 (V) ^{SIGMA}	58,9	22	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	White <i>et al.</i> 1990
ITS4 (R) ^{SIGMA}	62,0	20	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	
<i>RPB1</i> MD39V (V) ^{MWG}	57,3	20	TTC TAC GGT GTG ACC AAG AG	
<i>RPB1</i> MD39V (R) ^{MWG}	58,4	22	GTG GAG AAA CGA TTT GCA ATG G	Diese Arbeit
<i>RPB2</i> MD39V (V) ^{MWG}	57,3	20	GTC TGA GCA AGA ATG GTT GC	
<i>RPB2</i> MD39V (R) ^{MWG}	56,7	20	ACG TCT CTC TAG AGC AAC C	
<i>TEF1</i> MD39V (V) ^{MWG}	57,3	20	CGA GAC TCC TAA GTA CTA CG	Diese Arbeit
<i>TEF1</i> MD39V (R) ^{MWG}	57,3	19	TGA AAC CAA CGT TGT CAC CG	
<i>TEF1</i> (V) ^{MWG}	57,5	22	TAC AAR TGY GGT GGT ATY GAC A	Morehouse <i>et al.</i> 2003
<i>TEF1</i> (R) ^{MWG}	56,3	20	ACN GAC TTG ACY TCA GTR GT	² Rehner 2015
<i>TEF1</i> 526 (V) ^{MWG}	58,0	20	GTC GTY GTY ATY GGH CAY GT	
<i>TEF1</i> 1567 (R) ^{MWG}	60,3	23	ACH GTR CCR ATA CCA CCR ATC TT	Rehner und Buckley 2005

¹Das Primerpaar „18S-NS-1 (mod, V)“ und „18S-NS-8 (mod, R)“ war aufgrund einer stark abweichenden Schmelztemperatur des Ausgangsprimerpaares modifiziert (O'Donnell 1993, Kurtzman und Robnett 1998).

²Dr. Stephen A. Rehner (2015) Persönliche Kommunikation. Mainz, Beltsville.

3.5.3 – Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diente der gezielten Amplifikation von DNA-Molekülen (Mullis *et al.* 1986). Das verwendete PCR-H₂O wurde aus der Millipore-Anlage (Milli-Q_{plus} 185) gewonnen, autoklaviert und mit 20 J/cm² UV-Licht bestrahlt.

Die **Taq-Polymerase** wurde zur Amplifikation des 5,8S rRNA-Gens und der internen, transkribierten Trenn-DNA-Sequenz 1 & 2 (ITS-Region) verwendet. Die ITS-Region liegt repetitiv vor. Auch kleine DNA-Mengen bieten somit eine ausreichende Menge an nutzbarer Matrize. Dies erhöht die Erfolgsrate der PCR im Vergleich zu Genen, die als einzelne Kopien vorliegen (Schoch *et al.* 2012). Die Primer ITS4 und ITS5 schließen die ITS-Region ein. Nachfolgend werden die gewählten Parameter der PCR gezeigt:

Komponente	Volumen [μ l]	Temperatur	Dauer [min]	Anzahl
10x <i>Taq</i> -Polymerasepuffer	5	1. 95 °C	05:00	1×
MgCl ₂ (25 mM)	2	2. 94 °C	01:00	35×
Primer ITS5 (10 pmol)	2	$T_m - 5$ °C	01:00	
Primer ITS4 (10 pmol)	2	72 °C	02:00	
dNTP's (10 mM)	1	3. 72 °C	10:00	1×
DNA-Matrize	1	4. 4 °C	∞	
<i>Taq</i> -Polymerase (0,1 U/ μ l)	0,15			
MQ-H ₂ O (autoklaviert und bestrahlt)	36,85			
	Σ 50			

Für die Amplifikation stark konservierter Genomregionen wurde die **Pfu-Polymerase** verwendet. Diese war aufgrund einer 3'-5'-Korrekturlesefunktion genauer als die Taq-Polymerase. Stark konservierte Genomregionen waren das 18S rRNA-Gen (SSU), die D1/D2-Region des 26/28S rRNA-Gens (LSU), das Gen des Transkriptionselongationsfaktors EF1 α (*TEF1*), das Cytochrom c Oxidase 2-Gen (*COX2*) und die RNA-Polymerase II-Gene 1 und 2 (*RPB1/2*). Bei der Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen war eine niedrige Fehler-rate in den Sequenzen dieser Gene wichtig.

Komponente	Volumen [μ l]	Temperatur	Dauer [min]	Anzahl
10x <i>Pfu</i> -Polymerasepuffer mit MgSO ₄	5	1. 95 °C	03:00	1×
Vorwärts-Primer (10 pmol)	5	2. 95 °C	00:30	30×
Reverser-Primer (10 pmol)	2	$T_m - 5$ °C	00:30	
dNTP's (je 2 mM)	2	72 °C	02:00 / kb	
DNA-Matrize (50 pg-1 μ g)	1	3. 72 °C	15:00	1×
<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/ μ l)	1	4. 4 °C	∞	
MQ-H ₂ O (autoklaviert und bestrahlt)	34			
	Σ 50			

3.5.4 – Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung von Isolaten auf das Artniveau wurde eine **Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse** (RFLP-Analyse) mit den ITS-DNA-Amplifikaten durchgeführt (Divol und Lonvaud-Funel 2005, Christ *et al.* 2015). 8,7 μ l des ITS-Amplifikates wurden mit 0,3 μ l des Enzyms *Hha*I, *Hinf*I oder *Hae*III (Thermo Scientific) verdaut. Dazu wurde 1 μ l 10x Endonukleasepuffer (Thermo Scientific) gegeben. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 20 min und anschließend bei 65 °C für 20 min inkubiert. Das artspezifische RFLP-Muster wurde mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe unten). Isolate mit gleichem Muster wurden in

dieselbe Spezies-Gruppe eingeteilt. ITS-Amplifikate von Vertretern einer Gruppe wurden sequenziert.

Die **Agarose-Gelelektrophorese** diente der Trennung von DNA-Molekülen nach ihrer Größe und ihrer Konformation. Bei der Herstellung des Gels wurde Agarose zweiprozentig in 1x TBE-Puffer konzentriert. Der Ansatz wurde aufgekocht, bis keine Schlierenbildung mehr sichtbar war. Die DNA-Proben wurden in 1x Gel Pilot-Auftragspuffer (Qiagen) auf das erstarrte Gel überführt. Ebenfalls wurde der Marker „Gene Ruler Mix“ (Thermo Scientific) in eine unbesetzte Geltasche aufgetragen. Bei einer konstanten Spannung von 55 V wurde das Gel in 1x TBE-Puffer laufen gelassen. Die DNA-Banden konnten nach 20-60 min Inkubation in Ethidiumbromidlösung (10 mg/l) und 30 s Waschung in eH₂O unter UV-Licht nachgewiesen werden (Thorne 1966, Aaij und Borst 1972).

3.5.5 – Sequenzierungen

Die PCR-DNA-Amplifikate wurden aufgereinigt (GenElute PCR Clean-Up Kit, Sigma-Aldrich) und mit der Sanger-Methode sequenziert (Seqlab, Göttingen) (Sanger *et al.* 1977). Das Genom der Stämme MD39V^T, MD123D, MYG6, OO2 und OO5^T wurde mittels der Illumina-Methode nach Anbieterangaben sequenziert (Seqlab, Göttingen) (Bentley *et al.* 2008). Von *Mastotermes darwiniensis*-Arbeitern wurde Kopfgewebe entnommen und dessen komplementäre DNA (cDNA) wurde durch Seqlab extrahiert und sequenziert (Dr. Bernd Peter Ernst, Dr. Andreas Wolf). Unvollständige Gensequenzen aus der Illumina-Sequenzierung (*COX2*, *TEF1*) wurden mittels PCR und Sanger-Sequenzierung ergänzt (Primer siehe Tab. 3.4). Die Auswertung erfolgte bioinformatisch (siehe Kapitel 3.7.1). Die Hinterlegung von Gensequenzen erfolgte in der GenBank-Datenbank des Nationalen Zentrums für biotechnologische Informationen (NCBI, Zugang siehe Tab. 7.10) (Benson *et al.* 2009). Die cDNA- und Genomsequenzen wurden in der zugangsbeschränkten Sequenzdatenbank des IMW gespeichert (imw-1.zdv.uni-mainz.de, zuletzt geprüft am 23.11.2016).

3.5.6 – Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die HPLC diente der Quantifizierung von niedermolekularen Substanzen. Mittels HPLC untersuchte Proben wurden vor der Analyse bei 13.000 UpM für 30 min zentrifugiert. Der Überstand und die HPLC-Pufferlösungen wurden filtriert (0,2 µm Porengröße). Die HPLC-Pufferlösungen wurden im Exsikkator mit einer Vakuumpumpe entgast.

Zur Quantifizierung von **Mono- und Oligosacchariden** wurde eine CarboPac PA200-Anionenaustauschersäule (Dionex) verwendet (Xu *et al.* 2013). Die HPLC-Anlage bestand aus den Shimadzu-Geräten SIL-10Ai (Probengeber), DGU-20A_{5R} (Entgasungseinheit), LC-

10Ai (2×, Kolbenpumpe), CTO-20AC (Säulenofen) und CBM-20A (Steuerungseinheit). Der Stromstärkedetektor war vom Typ „ED40 Electrochemical Detector“ (Dionex). Der Detektormodus war Quadrupel-Pulsamperometrie (0-40 s = 1 V; 0,41-0,42 s = -2 V; 0,43 s = 6 V; 0,44-0,5 s = -1 V). Die Säulentemperatur betrug 30 °C, die Flussrate 0,3 ml/min und das Probenvolumen 5 µl. CarboPac-Standardlösung wurde zur Kalibration verwendet. Die Auflösung war 0,1 M NaOH (pH > 12). Die Eluentlösung enthielt zusätzlich 0,5 M Natriumacetat. Der Eluentgradient stieg während der Analyse von 0-25 min linear auf 20 % (v/v) an. Die Regenerationsphase mit 0,1 M NaOH dauerte weitere 10 min. Durch das anionische Acetat wurden die im Basischen negativ geladenen Zucker vom Säulenmaterial verdrängt. Bei der Pulsamperometrie waren zwei Elektroden im Säulenausfluss platziert, mit denen ein elektrisches Potential an die Ausflusslösung angelegt wurde. Die Stromstärke zwischen den Elektroden änderte sich durch die Potentialänderung während der Zuckeroxidation an der Goldanode. Die Messung der Stromstärke ermöglichte eine Quantifizierung von Zuckern in der Ausflusslösung (Dionex 1995).

Die Quantifizierung von **kurzkettigen Fettsäuren und Alkoholen** erfolgte mit der Kationenaustauschersäule Aminex HPX-87H (Biorad) (Pfeiffer und Radler 1985). Die HPLC-Anlage setzte sich aus den Shimadzu-Geräten SIL-10A (Probengeber), LC-10AT (Kolbenpumpe), CTO-10A (Säulenofen), SCL-10 (Steuerungseinheit) und dem Brechungsindex-Detektor RID-10A (Shimadzu) zusammen. Die Säulentemperatur betrug 65 °C, die Flussrate 0,8 ml/min und das Probenvolumen 5 µl. HPX-87H-Standardlösung wurde zur Kalibration verwendet. Die Analyse erfolgte isokratisch für 30 min und die mobile Phase enthielt 6,5 mM H₂SO₄. Die sauren Analyten wurden durch die mobile Phase von der Kationenaustauschersäule verdrängt und ihr Refraktionsindex wurde gemessen.

3.6 – Proteinbiochemische Methoden

3.6.1 – Proteinaufreinigung

Ein Enzym mit endo-1,4-β-Xylanaseaktivität des Stammes *Saitozyma flava* OO2 wurde aufgereinigt. Der Kulturüberstand wurde am Tag des Aktivitätsmaximums zentrifugiert (14.300 × G, 30 min) und unter Vakuum filtriert (0,2 µm Porengröße). Die Proteinaufreinigung wurde nacheinander mittels Ammoniumsulfatfällung, isoelektrischer Fokussierung und schneller Protein-Flüssigchromatographie (FPLC) durchgeführt. Die Probentemperatur betrug stets 4 °C, mit Ausnahme der FPLC (20 °C). Die Xylanaseaktivität wurde mit dem RBB-Xylantest ermittelt (siehe Kapitel 3.6.5).

Die **Ammoniumsulfatfällung** basierte auf der Dehydratisierung der Proteine durch das Ammoniumsulfat. Vorteile dieser Fällung waren die geringe Lösungsenthalpie des Ammoniumsulfates (geringe Wärmeentwicklung) und dessen bakteriostatische Wirkung (Pingoud und Urbanke 1997). Die Fällung diente der Aufkonzentrierung der Proteinlösung. Bei konstantem Rühren wurden 559 g gemörsertes Ammoniumsulfat zu 1 l Kulturüberstand gegeben (85 % Sättigung). Der pH-Wert wurde mit NaOH-Plätzchen neutralisiert. Die Proteinfällung erfolgte über Nacht. Das ausgefällte Protein wurde abzentrifugiert ($14.300 \times G$, 45 min) und das Sediment wurde in 1/10 des Ausgangsvolumens aufgenommen (steriles MQ-H₂O). Per Dialyse mit MQ-H₂O wurden niedermolekulare Verbindungen aus der Proteinlösung entfernt. Die Dialyseschläuche hatten eine Porengröße von 3,5 kDa (Zellutrans, Roth). Das Dialysat wurde 2-mal täglich gewechselt und die Dialyse erfolgte für 72 h bei langsamem Rühren.

Die **isoelektrische Fokussierung (IEF)** ist ein elektrophoretisches Verfahren, bei der ein Protein durch ein elektrisches Feld in einem pH-Gradienten wandert, bis seine Nettoladung null ist. Dieser pH-Wert wird als isoelektrischer Punkt (pI) bezeichnet (Lottspeich und Engels 2006). Der pH-Gradient wurde über eine saure Anodenlösung, eine basische Kathodenlösung und Ampholyte in der Proteinlösung eingestellt. Die Anodenlösung war 0,1 M H₃PO₄ und die Kathodenlösung 0,1 M NaOH. Die Ampholyte waren vom Typ Servalyt 2-9 (Seed Mix, Serva) und Servalyt 7-9 (Serva) für die Proteinaufreinigung und respektive die pI-Bestimmung. 1 ml der Ampholytlösung wurde mit 50 ml dialysierter Proteinlösung und 9 ml MQ-H₂O versetzt. Die Mischlösung wurde luftblasenfrei in eine Rotoforzelle (Biorad) überführt und die 20 Kammern der Zelle wurden versiegelt (Scotch Tape, 3M). Das elektrische Feld wurde für 4,5 h mit einer Spannung von 2000 V und einer Leistung von 15 W aufgebaut (Rotofor Preparative IEF-Cell, Biorad). Die Versiegelung der Kammern wurde mit dem Rotofor-Erntesystem (Biorad) durchstoßen und die 20 Fraktionen wurden separat abgesaugt (Egen *et al.* 1984, Schwentke 2013). Fraktionen mit signifikanter endo-1,4- β -Xylanaseaktivität wurden für die weitere Aufreinigung vereinigt und mittels Zentrifugationsfiltration (Vivaspin 20, 5 kDa, Sartorius) 3-mal in 0,1 M Natriumphosphatpuffer A gewaschen und 10x konzentriert ($8.000 \times G$, ca. 2-4 h).

Die **schnelle Protein-Flüssigchromatographie (FPLC)** stellt eine Form der Flüssigkeitschromatographie dar, die zur Proteinaufreinigung aus komplexen Gemischen eingesetzt wurde. Eine Flüssigkeitschromatographie bezeichnet alle chromatographischen Methoden mit einer meist festen immobilen Phase und einer flüssigen mobilen Phase. In Abhängigkeit der gewünschten Aufreinigungsmethode der Proteine werden Säulen mit verschiedenen stationären Phasen bei der FPLC eingesetzt (Richey 1982, Madadlou *et al.* 2011). Die hier eingesetzte

Säule war eine Gelchromatographiesäule vom Typ „Superose 12 10/300 GL“ (Trennbereich 1-300 kDa; GE Healthcare). Gelöste Moleküle konnten mittels dieser Säule nach Größe und Form getrennt werden. Die Trennung basierte auf der unterschiedlichen Permeation der Proteine im Trägermaterial mit definierter Porengröße (Striegel *et al.* 2009). Die verwendete FPLC-Anlage der Firma Pharmacia bestand aus dem Steuerungsgerät GP-250, der Pumpe P-500, dem UV-Detektor „Single Path Monitor UV-1“ und dem Fraktionssammler FRAC-100. Als Eluent wurde Natriumphosphatpuffer A eingesetzt. Die Flussrate war 0,5 ml/min und die Fraktionsgröße 0,5 ml. Die relative Proteinmenge der Fraktionen wurde bei 280 nm mit einem Schreiber (Pharmacia 19-8004-01) aufgezeichnet. Fraktionen mit signifikanter Xylanaseaktivität wurden auf den Proteingehalt und ihre Reinheit überprüft (siehe Kapitel 3.6.2 und 3.6.3).

3.6.2 – Proteinkonzentrationsbestimmung nach Smith und Warburg-Christian

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde photometrisch nach Smith *et al.* (1985) sowie nach Warburg und Christian (1941) bestimmt. Nach der Anwendung beider Methoden wurde der Mittelwert der Proteinkonzentration gebildet. Im **Smith-Assay** wurde Cu^{2+} im Komplex mit vier Peptidbindungen (Biuret-Reaktion) im Alkalischen zu Cu^+ reduziert. Cu^+ chelatierte mit zwei Bicinchoninsäuremolekülen und wurde als Komplex photometrisch quantifiziert. Der Test wurde mit dem „Roti-Quant universal“-System (Roth) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Proben wurden im Mikrotiterplatten (MTP)-Photometer FLUOstar Omega (BMG Labtech) bei 492 nm gemessen. Zur Kalibration wurden 0-2 mg/ml bovines Serumalbumin in Probenpuffer verwendet. Die Proteinbestimmung nach **Warburg-Christian** erfolgte im Biophotometer (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 280 nm (A_{280}). Potentielle Verunreinigungen durch Nukleinsäuren wurden bei 260 nm (A_{260}) gemessen und bei der Berechnung der Proteinkonzentration (c) mit der Warburg-Christian-Formel berücksichtigt:

$$c \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = (1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260})$$

3.6.3 – Darstellung von Proteinlösungen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE

Proteine in Gemischen wurden nach ihrem Molekulargewicht (MW) mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (**SDS-PAGE**) aufgetrennt (Laemmli 1970). SDS linearisierte Proteine und erschuf ein festes Verhältnis der Oberflächenladung zum MW. Zusätzlich wurde β -Mercaptoethanol zur Spaltung von Disulfidbrücken eingesetzt. Durch die negative Ladung des SDS wanderten die Proteine im elektrischen Feld zur Anode. Die SDS-PAGE verwendete ein Sammelgel und ein Trenngel. Im grobmaschige-

ren Sammelgel konzentrierten sich die Proteine am Übergang zum Trenngel auf, was zu einer besseren Auflösung der Proteinbanden führte. Die engen Maschen des Trenngels verursachten eine stärkere Retention großer Proteine. Das Acrylamidgel setzte sich wie folgt zusammen:

Komponente	4,94 % Sammelgel	12,87 % Trenngel
eH ₂ O	1,85 ml	1,575 ml
40 % (w/v) Acrylamid	312,5 µl	1,875 ml
1,0 M Tris-HCl (pH 6,8)	312,5 µl	-
1,0 M Tris-HCl (pH 8,8)	-	2,26 ml
10 % SDS		60 µl
10 % Ammoniumpersulfat		48 µl
TEMED		5 µl

Das Trenngel wurde während der Auspolymerisierung mit n-Butanol überschichtet.

Das Acrylamidgel wurde in eine Mini-PROTEAN-Kammer (Biorad) gegeben, welche mit SDS-PAGE-Laufpuffer gefüllt war. 2-15 µg der Proteinprobe wurden mit SDS-PAGE-Probenpuffer ergänzt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Als Massenstandard wurden 0,5 µl PageRuler Plus (Thermo Scientific) verwendet und als Lauffront-Indikator diente SDS-PAGE-Probenpuffer mit 2,5 mg/ml Bromphenolblau. Es wurde eine Spannung von 70 V für 5 min und anschließend von 100 V angelegt, bis die Bromphenolblau-Bande vollständig in die Kammer ausgelaufen war.

Mittels **Silberfärbung** wurden Proteinbanden im Acrylamidgel angefärbt. Die Proteine wurden mittels denaturierender Agenzien (Essigsäure und Ethanol) im Gel ausgefällt. Silbernitrat wurde hinzugegeben und das Ag⁺ lagerte sich an negativ geladene Aminosäuren an. Nach Zugabe reduzierender Agenzien (Formaldehyd) entstand sichtbares Ag⁰ (Switzer *et al.* 1979). Zur Färbung wurde das „Pierce Silver Stain Kit“ (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. Diese Methode zeichnete sich durch eine sehr niedrige Detektionsschwelle von 0,25 ng Protein pro Bande aus.

Die **Coomassie-Färbung** diente zur schonenden Anfärbung von Proteinen. Die angefärbten Proteinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) analysiert (siehe Kapitel 3.6.4). Coomassie-Brilliant-Blau R-250 ist ein Farbstoff, der mit basischen Aminosäuren komplexierte (Fazekas de St. Groth *et al.* 1963). Das Acrylamidgel wurde mit Coomassie-Färbelösung für 20 min bei 55 UpM auf dem Rotationschüttler entwickelt und fixiert. Das Gel wurde in MQ-H₂O gespült. Der Hintergrund wurde mit Coomassie-Entfärbelösung über Nacht bei 55 UpM entfärbt. Die Lagerung des Gels erfolgte bei 4 °C (Meyer und Lamberts 1965).

3.6.4 – Proteinsequenzierung mittels Illumina und MS/MS

Die Sequenzermittlung der Proteine erfolgte unter Verwendung einer Kombination aus Next Generation-Sequenzierung (Illumina) und MS/MS. Aus den Illumina-Sequenzierungsdaten des Stammes *Saitozyma flava* OO2 wurde eine Exomdatenbank erstellt (siehe Kapitel 3.5.4 und 3.7.1). Die MS/MS-Analyse wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Stefan Tenzer (JGU) nach Fronk *et al.* (2015) durchgeführt. Die Proteine wurden reduziert, alkyliert und mit Trypsin verdaut. Nachfolgend wurden die tryptischen Peptide mittels ultraschneller Flüssigchromatographie (UPLC) aufgetrennt (NanoAcquity UPLC-System, Waters). Die MS/MS-Analyse erfolgte gekoppelt an die UPLC mit einem Synapt G2-S-Massenspektrometer (Waters). Die gewonnenen Fragmentspektren wurden mit dem Programm „ProteinLynx Global Server“ (V.3.02, Waters) ausgewertet. Die jeweiligen Proteine wurden anhand der Fragmentspektren der tryptischen Peptide mittels Datenbanksuche der Exomdatenbank identifiziert.

3.6.5 – Quantifizierung von Xylanabbau

Xylanaseaktivitäten wurden mit dem RBB-Xylantest, mittels 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNS)-Test oder mittels HPLC-Analyse bestimmt (Miller 1959, Korish 2003, Megazyme 2007, Xu *et al.* 2013).

Im **RBB-Xylantest** kam Birkenholz-Xylan zum Einsatz, bei dem jedes 30te Xylosemolekül mit RBB gekoppelt vorlag (S-AXBP, Megazyme). Der Farbstoff ermöglichte einen indirekten Rückschluss auf abgespaltene Xylooligosaccharide. Das RBB-Xylan wurde durch Aufkochen 1 %ig in Lösung gebracht. 0,5 ml RBB-Xylanlösung wurden mit 0,5 ml gepuffertem Enzym versetzt (Abb. 3.3). Der Puffer und der pH-Wert sowie die Inkubationstemperatur und -dauer variierten je nach Testsituation (siehe Kapitel 4.4). Alle Lösungen wurden für 2,5 min im Wasserbad vorgewärmt. Die Inkubation wurde mit 2,5 ml 95 % (v/v) vergälltem Ethanol bei Raumtemperatur gestoppt. Während das Xylan durch Dehydratisierung ausfiel, blieben die RBB gekoppelten Xylooligosaccharide in Lösung. Das gefällte Xylan wurde abzentrifugiert (1.000 × G, 10 min). Die Extinktionsmessung des Überstandes erfolgte im Zentrifugationsröhrchen bei 590 nm mit einem Tischphotometer (Colorimeter Model 45, Fisher Scientific). Die Messungen wurden mit enzymfrei-inkubierten Negativkontrollen und nicht inkubierten Blankwerten korrigiert. Die spezifische Aktivität war wie folgt definiert:

$$1 \text{ spezifische RBB-Unit [RU]} = \frac{(1 \mu\text{M Remazol-Brilliantblau R})}{(1 \mu\text{g Enzym} \times 1 \text{ min})}$$

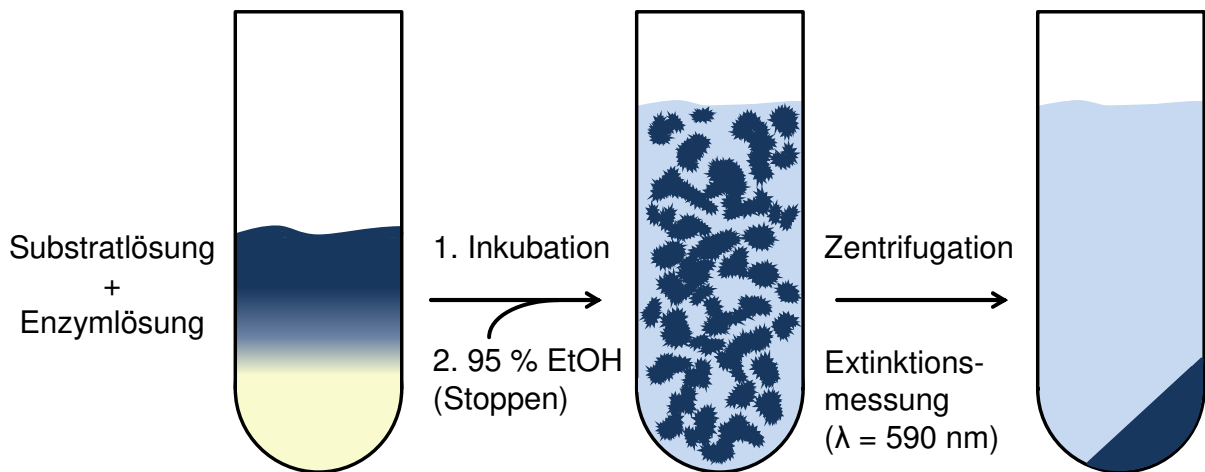


Abbildung 3.3: Remazol-Brilliantblau R-Xylantest. Das Remazol-Brilliantblau R (RBB) gekoppelte Xylan wurde mit gepufferter Enzymlösung versetzt. Der Ansatz wurde inkubiert und mittels 95 % Ethanol erfolgte eine Ausfällung der verbliebenen Zuckerpolymere durch Dehydratisierung. Nach Zentrifugation wurde die Extinktion bei $\lambda = 590 \text{ nm}$ im Überstand gemessen und die Freisetzung von RBB konnte quantifiziert werden.

Der Einfluss von potentiell enzymhemmenden Substanzen wurde mit dem RBB-Xylantest überprüft. Die 0,5 ml gepufferte Enzymlösung wurde hierfür auf 0,1 ml gepufferte 5x Enzymlösung und 0,4 ml gepufferte Substanzlösung aufgeteilt. Dies sollte frühzeitige Enzymschädigungen durch die Substanzen verhindern. Getestete, wasserlösliche Substanzen waren Borsäure, Ethanol, Furfural, 5-HMF, Phenol, Tween 80 sowie die Zucker L-Arabinose, Cellobiose, Glucose, Lactose, Xylose und Xylobiose. Wasserunlösliche Substanzen wurden durch 20 % (v/v) Ethanol in Lösung gebracht. Dies waren Benzoesäure, Coniferylalkohol, p-Cumarsäure, Ferulasäure, 4-Hydroxybenzaldehyd (4-HB), Sinapinsäure, Sinapylalkohol (80 %), Syringaldehyd, Vanillin und Vanillinsäure. Fällende Wirkungen durch hochkonzentrierte Substanzen auf Xylooligosaccharide mussten durch nachträgliche Zugabe zu einem gestoppten Inkubationsansatz ausgeschlossen werden. Bei der Verwendung von wertvollen Substanzen (Coniferylalkohol, Sinapylalkohol, Xylobiose) wurde das Testvolumen um den Faktor 10 reduziert. Die Inkubation erfolgte dann im Heizblock (Eppendorf) und die Auswertung im MTP-Photometer (FLUOstar Omega, BMG Labtech).

Der **DNSS-Test** ermöglichte die Quantifizierung von reduzierenden Zuckern und gab somit einen Rückschluss auf enzymatische Spaltungsereignisse. Die Zucker reduzierten das DNSS (gelb) zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure (ANSS, rotbraun; Abb. 3.4). Zur Durchführung wurden 1,5 ml modifizierter 2x Universalpuffer (MU-Puffer) mit 2 g/90 ml Substrat versetzt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 50 °C und 750 UpM im Thermomixer (Eppendorf) vorgewärmt. Die Reaktion erfolgte nach Zugabe von 0,5 ml gepuffertem Enzym für 20 min und 750 UpM. Die Proben wurden für 5 min bei 99 °C und 750 UpM abgestoppt und auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation ($16.000 \times G$, 20 min, 4 °C) wurden die Überstände mit einem Spritzenaufsatzfilter von Substratresten getrennt (Porengröße 0,2 μm). 0,5 ml des filtrierten

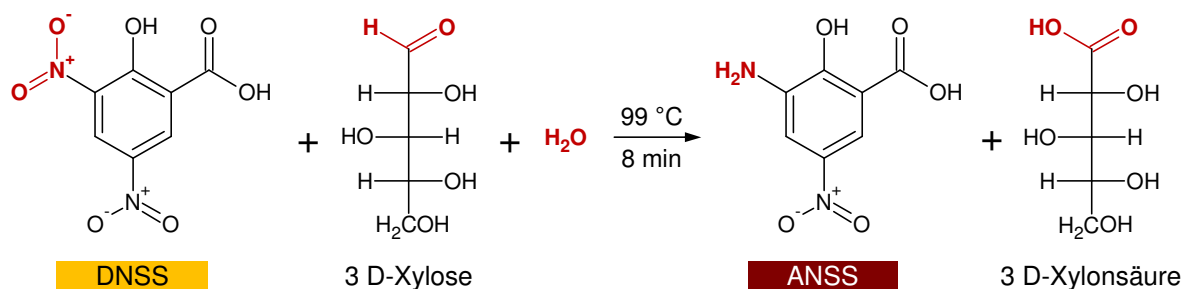


Abbildung 3.4: Reduktion von DNSS zu ANSS. DNSS wurde mit drei Aldehydgruppen eines Zuckers (hier D-Xylose) bei 99 °C reduziert. Es entstand ANSS und 3 Moleküle einer Zuckersäure (hier D-Xylonsäure). ANSS war rotbraun gefärbt und konnte bei 546 nm quantifiziert werden (Miller 1959).

Überstandes wurden mit 1 ml DNSS-Reagenz versetzt und für 8 min bei 99 °C gekocht. Die Entwicklung wurde für 5 min auf Eis gestoppt. Die Ansätze wurden bei 546 nm und Raumtemperatur gemessen (MTP, FLUOstar Omega, BMG Labtech). Die Kalibration des Tests und die Bestimmung der Detektionsschwelle erfolgten mit Konzentrationen von 0,08-0,5 g/l Xylose in MU-Puffer. Vermeintlich zuckerfreie Proben wurden nachgemessen, nachdem eine Xyloseabsättigung auf die Detektionsschwelle erfolgte. Die Messdaten wurden durch Negativkontrollen (inkubiert, enzymfrei) und Blindwerte (nicht inkubiert, enzymfrei) korrigiert. Die spezifische Aktivität wurde wie folgt berechnet:

$$1 \text{ spezifische Unit [U]} = \frac{(1 \mu\text{M Xyloseäquivalent})}{(1 \mu\text{g Enzym} \times 1 \text{ min})}$$

Die **HPLC** ermöglichte die genaue Konzentrationsbestimmung von freigesetzten Mono- und Oligosacchariden aus Xylan (Kapitel 3.5.5, Xu *et al.* 2013). Die Xylanaseinkubation glich der oben beschriebenen Inkubation für den DNSS-Test. Eine angepasste Variante diente zur Messung der Xylanaseaktivität in Kulturüberständen der Hefe *Saitozyma flava* OO2 (siehe Kapitel 3.4.2). Der Kulturüberstand wurde zentrifugiert (8.600 × G, 30 min, 4 °C) und mit Spritzenaufsatzfiltern filtriert (0,2 μm Porengröße). 250 μl Kulturüberstand wurden mit 450 μl Natriumphosphatpuffer B versetzt. Die Inkubation wurde bei 40 °C und 750 UpM für 24 h durchgeführt. Die Probe und die enzymfreie Negativkontrolle wurden bei 99 °C für 5 min abgestoppt.

3.6.6 – Methylumbelliferyl- und Nitrophenoltest zum Enzymaktivitätsnachweis

Das Substratspektrum von lignocellulolytischen Hefen und Enzymen wurde mit 4-Methylumbelliferyl (4-MUF) und 2-/4-Nitrophenol (NP) gekoppelten Substraten überprüft. Die getesteten Substrate sind in Tab. 7.9 aufgeführt. Bei der enzymatischen Spaltung der gekoppelten Substrate wurde fluoreszierendes 4-Methylumbelliferon (4-MUB) oder gelbes NP freigesetzt. Eine Überführung ins Alkalische intensivierte die Fluoreszenzreaktion des 4-MUB

beziehungsweise die Gelbfärbung des NP durch Protonierung (Chen 1968, Handel 2013). Die Nachweisgrenze von 4-MUB ist sehr gering (10^{-10} M, John 2002). Die Tests enthielten 20 μ M 4-MUF- oder 2 mM NP gekoppelte Substrate in 0,1 M Natriumphosphatpuffer B. Zum Reaktionsstart wurde eine adäquate Menge Kulturüberstand oder Zellextrakt hinzugegeben, je nach Aktivitätsstärke. Der Zellaufschluss erfolgte mit einer FastPrep-24 Zelmühle (MP Bio-medicals) bei 5,5 m/s für 20 s mit ca. 0,5 g Glaskugeln (\varnothing 0,25-0,5 mm). Nach 15-120 min Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion gestoppt. Dazu wurden 71,5 μ l 4-MUF-Stoppuffer oder 10 μ l 1 M NaOH (NP-Test) verwendet. Das finale Volumen betrug 260 μ l und 250 μ l für den 4-MUF-Test und respektive den NP-Test. Die Messung der Aktivität erfolgte photometrisch bei 420 nm (NP) oder fluoreszenzphotometrisch bei 355 nm Exzitation und 460 nm Emission (4-MUB; MTP-Photometer, FLUOstar Omega, BMG Labtech). Die Quenchprobe und die Negativkontrolle bestanden aus 200 μ l Enzymlösung mit einem 50 μ l Zusatz von 0,1 M 4-MUB und respektive Substratlösung. Die Enzymlösung der Negativkontrolle wurde hitzeinaktiviert (99 °C, 10 min). Zur Kalibration wurde ein 4-MUB-Standard und NP-Standards bis 0,1 M und respektive bis 25 nM eingesetzt. Das Ergebnis wurde als positiv eingestuft, wenn die spezifische Aktivität der Probe größer war als die der Kontrollwerte.

3.6.7 – Enzymatische Nachweise von Ethanol und Formiat

Die **Alkohol-Dehydrogenase (ADH)** setzte Ethanol und NAD^+ zu Acetaldehyd und $\text{NADH}+\text{H}^+$ um (Theorell und McKee 1961). Die NADH-Bildung konnte photometrisch quantifiziert werden. Dies ermöglichte die Ethanolbestimmung in komplexen Proben, die mittels HPLC nicht aufgetrennt werden konnten. 0,05 ml NAD^+ -Lösung und 0,1 ml ADH-Lösung wurden zu 1,5 ml ADH-Pufferlösung gegeben. Die Kontrollen enthielten 1,6 ml Pufferlösung und 0,05 ml NAD^+ -Lösung. Die Proben wurden bei 37 °C für 30 min und 450 UpM im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Die Extinktion wurde vor und nach der Reaktion bei 365 nm gemessen (UV-Vis Spektrophotometer UV-2450, Shimadzu) (Kägi und Vallee 1960).

Durch die **Formiat-Dehydrogenase** wurde Formiat, H_2O und NAD^+ zu Bicarbonat und $\text{NADH}+\text{H}^+$ umgewandelt (Bergmeyer 1974). Der Formiatgehalt konnte, wie auch beim ADH-Test, über die NADH-Bildung photometrisch bestimmt werden. Der Formiat-Dehydrogenase-Test wurde mit dem Formiat-UV-Test von R-Biopharm nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.7 – Bioinformatische Methoden

Für die bioinformatischen Untersuchungen wurden diverse Programme und Datenbanken verwendet. Eine Übersicht über diese und zu deren Zugang ist in Tab. 7.10 dargestellt.

3.7.1 – Sequenzvergleiche und phylogenetische Analysen

Die Chromatogramme der Sanger-Sequenzierungen wurden mit dem Programm Finch TV ausgewertet (V.1.4.0, Geospiza). Annotierte Bereiche wurden exportiert und mit dem Programm „Basic local alignment search tool“ (BLAST) des NCBI gegen die GenBank-Datenbank aligniert (Altschul *et al.* 1990, Benson *et al.* 2009). Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm GeneDoc analysiert (V.2.7.000, Nicholas *et al.* 1997).

Phylogenetische Analysen wurden in Kooperation mit Dr. Andrey Yurkov (DSMZ) durchgeführt (Handel *et al.* 2016). Multiple Sequenzvergleiche wurden mittels einer Onlineversion des MAFFT-Algorithmus angefertigt (E-INS-i Option, Standardparameter) (Katoh und Standley 2013). Sequenzalignierungen von Hefen der *Sugiyamaella*-Gattung wurden zusätzlich mit dem Programm Gblocks bearbeitet (Castresana 2000). Phylogenetische Verwandtschaften wurden mittels der Methode der maximalen Wahrscheinlichkeit bestimmt (ML-Methode, engl. „maximum likelihood“) (Fisher 1922). Hierfür wurde das Programm RAXML (V.7.4.2) mit der Oberfläche raxmlGUI (V.1.3.1) verwendet. Das generalisierte, zeitreversible Modell (GTRCAT-Annäherung) mit 1.000-Bootstrap-Wiederholungen wurde angewendet (Tavaré 1986, Silvestro und Michalak 2012, Stamatakis 2014).

Die Exomdatenbank des Stammes *Saitozyma flava* OO2 wurde in Kooperation mit Dr. Andreas Wolf (Seqlab, Göttingen) erstellt. Dazu wurden alle Peptide mit einer Mindestgröße von sechs Aminosäuren aus den Genomsequenzen translatiert und an den Stopcodons geteilt (EMBOSS V.6.6.0.0: getorf, Rice *et al.* 2000).

3.7.2 – Erstellung und Analyse von 3D-Homologiemodellen

Die 3D-Homologiemodelle der Xylanase wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Elmar Jaenicke (JGU) mittels des Programmes Modeller (V.9.16) erstellt (Fiser und Šali 2003). Die verwendeten Muster aus der Proteindatenbank (PDB) waren die Einträge 1UKR und 2QZ2 (substratfrei und -gebunden) der endo-1,4- β -Xylanase XYNA aus *Aspergillus niger* (Bernstein *et al.* 1977, Kregel und Dijkstra 1996, Vandermarliere *et al.* 2008). Je 50 Modelle wurden generiert und das Modell mit der geringsten diskret-optimierten Proteinenergie (DOPE) wurde ausgewählt. DOPE ist ein statistisches Potential, mit dem Aussagen über den nativen Faltungszustand der Modelle getroffen wurden. Das globale Minimum von DOPE korrespondierte zur nativen Faltung bekannter Proteine und zur niedrigsten Faltungsenergie (Shen und Sali

2006). Die Raumstruktur der Homologiemodelle wurde mit dem Programm UCSF Chimera untersucht (V.1.9, Pettersen *et al.* 2004).

3.7.3 – Berechnung von Enzymeigenschaften: isoelektrischer Punkt, Molekulargewicht, Signalpeptide und Enzymkinetik

Mit bioinformatischen Methoden war es möglich, Vorhersagen über Proteineigenschaften zu treffen, die sich von der Primärstruktur ableiteten. Der pI und das MW wurden mit dem Programm „Compute pI/Mw“ von ExPASy berechnet (Gasteiger *et al.* 2005). Signalpeptide von Exoenzymen wurden mit dem Programm Signal-BLAST vorhergesagt (Standardparameter 1, 2 und 4) (Frank und Sippl 2008).

Der K_m -Wert und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) wurden mit einem Iterationsverfahren berechnet. Die Annäherung erfolgte in 3.000 Schritten und einem Inkrement (ΔK_m) von 10^{-5} . Die Methode bediente sich der nichtlinearen Regression und der Methode der kleinsten Quadrate. Der Vorteil gegenüber der linearen Regression nach Lineweaver und Burk (1934) lag in der geringeren Fehlerbehaftung kleiner Messwerte. Das verwendete Programm „Enzymkinetik-Iteration.xls“ wurde bisher nicht publiziert und ist in der Datenbank des IMW hinterlegt worden (Dr. Jürgen Fröhlich (2016) Persönliche Kommunikation. Mainz, Geisenheim).

4. – Ergebnisse

4.1 – Identifizierung lignocellulolytischer Hefearten

Der Termitendarm ist von einer Vielzahl unterschiedlicher Mikroorganismen besiedelt, die an unterschiedlichen Stoffwechselwegen beteiligt sind. Gewöhnliche Symbionten sind Bakterien, Archaea und, im Falle der niederen Termiten, Flagellaten (König *et al.* 2013, Brune 2014). Die Präsenz und die Beteiligung von Hefen am Lignocelluloseabbau werden seltener beschrieben (Prillinger *et al.* 1996, Schäfer *et al.* 1996, Suh *et al.* 2005, Yoro *et al.* 2014, Handel *et al.* 2016). Für andere Insektenfamilien ist die Darmbesiedlung durch Hefen bekannt (Vega und Blackwell 2005).

4.1.1 – Identifizierung von Hefearten aus dem Darm von Termiten, einer holzfressenden Schabe und einer Feuerwanze

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 142 Hefestämme verwendet. 46 der Hefestämme wurden aus Stammsammlungen entnommen (Arten und Insektenwirte siehe Tab. 3.1). Die neu isolierten Hefearten aus *Mastotermes darwiniensis* wurden mit der Stammsbezeichnung „MD“ versehen. Zur Isolierung neuer Hefestämme aus Insektendärmen wurde der Darminhalt in diversen Medien angereichert. Bei Bewuchs wurden Vereinzelausstriche auf Agarplatten angefertigt. Diese wurden dreimal wiederholt, sobald ein einheitlicher Kolonietyp sichtbar war. Während des Isolierungsverlaufs wurde der Medientyp beibehalten (siehe unten).

Mit Ausnahme der Hefesymbionten mit den Wirtsgattungen *Odontotermes* und *Pyrrhocoris* sind die bestehenden Hefestämme durch Prillinger *et al.* (1996) biochemisch und physiologisch auf Artniveau beschrieben. Diese Klassifizierungsmethode ist durch Kurtzman *et al.* (2011) als nicht mehr zeitgemäß eingestuft worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine präzisere Einordnung der untersuchten Hefestämme mittels ITS-Sequenzierung und der GenBank-Datenbank durchgeführt (Tab. 4.1, Sequenzidentitäten mit Typstämmen: 98-100 %). Vor diesem Schritt erfolgte eine Einteilung der Hefestämme in Speziesgruppen anhand der ITS-RFLP-Muster (Tab. 4.2, siehe Abb. 7.1-7.2). Dies reduzierte die Anzahl der erforderlichen Sequenzierungen. Stämme mit einer ITS-Abweichung von ≥ 2 % oder lignocellulolytische Arten wurden zusätzlich in der Stammsammlung der DSMZ oder des CBS hinterlegt (siehe Tab. 7.2 und Kapitel 4.1.2).

Insgesamt konnten dreizehn verschiedene Hefearten aus dem Darm von acht Termiten identifiziert werden. *Odontotermes obesus* war von fünf verschiedenen Hefearten kolonisiert (*Naganishia albida* OO1 und OO4, *Papiliotrema odontotermitis* OO5^T, *Rhodotorula*

Tabelle 4.1: Speziesbestimmung anhand von ITS-Sequenzvergleich mit Typmaterial. Der letzte Buchstabe des Stammmamens bezieht sich auf das Anreicherungsmedium (D: DSMZ-Medium 53; G, O: GYP-Medium; M: ME-Medium; S: SAB-Medium; V: MV-Medium). ¹: Typstamm. Hinterlegung oder Abrufung in der GenBank- oder der CBS-Datenbank. ¹: Eintrag vom 23/04/2007 (Isotypstamm). ²: 11/06/2008. ³: 21/01/2006.

Wirt	Hefespezies	Stamm	GenBank-Eintrag	ITS-Identität mit Typstamm	Referenz (Typstamm)	
<i>Cryptocercus punctulatus</i>	<i>Scheffersomyces coipomoensis</i>	CG1	KU883326	100 % (602/602 Bp)	AJ606466	
<i>Mastotermes darwiniensis</i>	<i>Apiotrichum mycotoxinivorans</i>	MD123D	KX118281	100 % (521/521 Bp)	AJ601389	
		MYG6	KX118283			
		MD1M	KX118278			
	<i>Candida tropicalis</i>	MD29V	KX118279	100 % (426/426 Bp)	AY939810	
		MD133V	KX118280			
MM1		KU883294				
<i>Sugiyamaella mastotermitis</i>		MD17G	KU883296	100 % (635/635 Bp)	KU883293	
		MD39V ¹	KU883293			
<i>Neotermes jouteli</i>	<i>Sugiyamaella smithiae</i>	NM1	KU883305	99 % (525/526 Bp)	CBS 7522.2 ¹	
		NS1	KU883306			
<i>Odontotermes assmuthi</i>	<i>Rhodotorula toruloides</i>	OAG36	KU883302	98 % (575/589 Bp)	CBS 6016 ²	
		ODG30/1	KU883303	98 % (569/582 Bp)		
<i>Odontotermes distans</i>	<i>Candida membranifaciens</i>	ODG28	KU883320	99 % (616/617 Bp)	AY452740	
		ODG29	KU883321	99 % (599/602 Bp)		
		ODG34	KU883322	99 % (601/602 Bp)		
		ODG32	KU883304	99 % (527/528 Bp)		
<i>Odontotermes obesus</i>	<i>Naganishia albida</i>	OO1	KU883297	99 % (611/612 Bp)	AF444346	
		OO4	KU883298			
	<i>Papiliotrema odontotermitis</i>		OO5 ^T	KU883277	100 % (545/545 Bp)	KU883277
			OO3	KU883300	99 % (572/573 Bp)	AF444541
			OO2	KU883299	99 % (511/514 Bp)	AF444338
			OOG41	KU883301	99 % (601/605 Bp)	CBS 5773 ³
<i>Pyrrhocoris apterus</i>	<i>Candida duobushaemulonii</i>	PAG2	KX423535	100 % (392/392 Bp)	JX459666	
		PAG3	KY053845	98 % (566/579 Bp)	AY046217	
			KY053846	98 % (563/574 Bp)		
	<i>Trichosporon asahii</i>	PAG1	KX118282	99 % (451/454 Bp)	AB018013	
<i>Reticulitermes flavipes</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	RM1	KU883324	100 % (565/565 Bp)	EF568003	
		ZAG8	KU883323	99 % (564/565 Bp)		
		ZAG1a	KU883307	99 % (616/617 Bp)		
		ZAG1b	KU883308	99 % (612/614 Bp)		
		ZAG2a	KU883309	99 % (601/602 Bp)		
<i>Zootermopsis angusticollis</i>	<i>Candida membranifaciens</i>	ZAG2b	KU883310	99 % (598/599 Bp)	AY452740	
		ZAG3a	KU883311	100 % (540/540 Bp)		
		ZAG3b	KU883312	99 % (613/614 Bp)		
		ZAG4	KU883313	99 % (601/602 Bp)		
		ZAG5-7	KU883314- KU883318	99 % (598/599 Bp)		
		ZAG9	KU883319			
<i>Zootermopsis nevadensis</i>	<i>Scheffersomyces shehatae</i>	ZM5	KU883325	99 % (622/624 Bp)	AJ606464	

Tabelle 4.2: Speziesidentifikation anhand von ITS-RFLP-Analyse. Die Isolate wurden neu isoliert oder aus der Stammsammlung des IMW entnommen. Der letzte Buchstabe des Stammmamens bezieht sich jeweils auf das Anreicherungsmedium (D: DSMZ-Medium 53, G: GYP-Medium, M: ME-Medium, S: SAB-Medium, V: MV-Medium). MDE: Isolate aus Nestmaterial. ITS-RFLP-Muster siehe Abb. 7.1 und 7.2.

Wirt	Hefespezies	Stamm
<i>Cryptocercus punctulatus</i>	<i>Scheffersomyces</i> sp.	CG2, CG3
<i>Mastotermes darwiniensis</i>	<i>Apiotrichum mycotoxinivorans</i>	MDE1G-MDE3G, MDE7G, MDE8G, MDE10G, MDE12G, MDE13G
	<i>Candida tropicalis</i>	MD1G, MD1S, MD20V, MD23V, MD28V, MD30V, MD35V-MD37V, MD40V, MD46V, MD48V-MD56V, MD58V, MD59V, MD60D-MD69D, MD99D-MD111D, MD113D-MD118D, MD125V, MD127V, MD130V-MD132V, MD135D, MD147V, MD150V, MDE4G, MDE5G, MDE9G, MDE11G, MDE14G
	<i>Sugiyamaella mastotermitis</i>	MYG4-5, MYG7-9, MD15M, MD16G, MD16S, MD17M, MD17S, MD18G, MD18M, MD18S, MD19G, MD19M, MD19S, MD72V-75V, MD88V, MDE6G
<i>Odontotermes distans</i>	<i>Rhodotorula toruloides</i>	ODG30/2, ODG31
<i>Reticulitermes flavipes</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	RM6

mucilaginoso OO3, *Saitozyma flava* OO2, *Scheffersomyces stipitis* OOG41). Der Darm von *Odontotermes assmuthi* und *Odontotermes distans* enthielt die Hefeart *Rhodotorula toruloides* (Stämme OAG36; ODG30/1, ODG30/2, ODG31). *Odontotermes distans* und *Neotermes jouteli* enthielten die Hefespezies *Sugiyamaella smithiae* (Stämme ODG32; NM1, NS1). Eine große Zahl von *Candida membranifaciens*-Stämmen aus dem Darm von *Zootermopsis angusticollis* wurde bestimmt (13 Stämme: ZAG1-7, ZAG9). *Candida membranifaciens* wurde ebenfalls aus *Odontotermes distans* isoliert (Stämme ODG28-29, ODG34). Die Termiten *Reticulitermes flavipes* und *Zootermopsis angusticollis* enthielten die Hefe *Meyerozyma guilliermondii* (Stämme RM1, RM6; ZAG8). *Zootermopsis nevadensis* enthielt die Hefe *Scheffersomyces shehatae* ZM5. *Mastotermes darwiniensis* war mit den Darmsymbionten *Apiotrichum mycotoxinivorans*, *Candida tropicalis* und *Sugiyamaella mastotermitis* besiedelt (10, 57 und 25 Stämme) (Handel *et al.* 2016). Vertreter der drei Arten konnten konstant bei verschiedenen Beprobungen in einem Zeitraum von 0,5 bis 2 Jahren isoliert werden. *M. darwiniensis* ist die primitivste lebende Termitenart: Sie ist nahe verwandt mit der holzfressenden Schabe *Cryptocercus punctulatus* (Lo *et al.* 2003). Der Schabendarm enthielt die Hefe *Scheffersomyces coipomoensis* (Stamm CG1). Die Stämme *Scheffersomyces* sp. CG2-3 konnten aufgrund eines ähnlichen ITS-RFLP-Musters zu *Scheffersomyces shehatae* und *S. stipitis* nicht auf das Artniveau beschrieben werden (siehe Abb. 7.2). Die Feuerwanze *Pyrrhocoris apterus* (Ordnung Hemiptera) ist ein vergleichsweise entfernter Verwandter der Termiten (Misof *et al.* 2014). Ihr Darm enthielt die Hefestämme *Trichosporon asahii* PAG1 und

Candida duobushaemulonii PAG2. Die Hefestämme PAG3 und PAG4 wurden im Rahmen dieser Arbeit isoliert und als *Eremothecium coryli* identifiziert.

Die von Prillinger *et al.* (1996) postulierte Zugehörigkeit der Stämme RM1 und RM6 zu *Meyerozyma guilliermondii* (damals *Pichia guilliermondii*) sowie von MYG6 zur Gattung *Apiotrichum* (damals *Trichosporon*) wurde bestätigt (Wirte: *R. flavipes*; *M. darwiniensis*).

4.1.2 – Hefearten mit lignocellulolytischen Enzymaktivitäten

Das lignocellulolytische Potential der untersuchten Hefestämme aus Termiten, der holzfressenden Schabe *Cryptocercus punctulatus* und der Feuerwanze *Pyrrhocoris apterus*, ist bisher nur im Ansatz dokumentiert worden (Schäfer *et al.* 1996, Korish 2003). Zur Findung neuartiger Cellulasen und Hemicellulasen wurden deswegen alle verfügbaren Hefestämme auf Lignocelluloseabbau überprüft (siehe Tab. 3.1, 4.1 und 4.2). Für 8 von 17 untersuchte Hefearten konnten lignocellulolytische Eigenschaften identifiziert werden (Tab. 4.3).

Tabelle 4.3: Lignocellulolytische Hefestämme. Die in Tab. 3.1, 4.1 und 4.2 aufgeführten Stämme wurden auf Cellulase, CMCCase und Xylanaseaktivität mit dem RBB-Substrattest und dem Kongorottest (CMCase) überprüft. cellulase- und xylanasepositive Stämme wurden auf Laccaseaktivität mit Tanninsäure und ABTS getestet. Aufgeführt sind nur lignocellulolytische Arten. *Eremothecium coryli* wurde nur auf CMCCase-Aktivität überprüft. ¹: CMCCase nicht getestet. –: keine lignocellulolytische Aktivität.

Hefespezies	Stamm	Enzym	Wirt
<i>Apiotrichum mycotoxinivorans</i>	MD123D, MYG6	Cellulase, CMCCase, Laccase (Tanninsäure)	<i>Mastotermes darwiniensis</i>
<i>Naganishia albida</i>	OO1, OO4	Xylanase	<i>Odontotermes obesus</i>
<i>Papiliotrema odontotermis</i>	OO5 ^T		
<i>Saccharomyces arboricola</i>	CBS 10644 ^T	Cellulase ¹ , Xylanase	<i>Quercus fabri</i>
	CBS 12749		<i>Auricularia polytricha</i>
	CBS 12748	–	<i>Castanopsis orthacantha</i>
<i>Saitozyma flava</i>	OO2	Cellulase, CMCCase, Xylanase	<i>Odontotermes obesus</i>
<i>Sugiyamaella mastotermis</i>	Alle in Tab. 4.1 und Tab. 4.2 genannten	Xylanase	<i>Mastotermes darwiniensis</i>
<i>Sugiyamaella smithiae</i>	NM1, NS1	–	<i>Neotermes jouteli</i>
	ODG32		<i>Odontotermes distans</i>
<i>Trichosporon asahii</i>	PAG1	Cellulase, CMCCase	<i>Pyrrhocoris apterus</i>

Cellulaseaktivität konnte für alle untersuchten Stämme der Arten *Apiotrichum mycotoxinivorans*, *Saitozyma flava* und *Trichosporon asahii* ermittelt werden. Die Hefestämme *Saccharomyces arboricola* CBS 10644^T und CBS 12749 besaßen Cellulase- und Xylanaseaktivität. Der Stamm *S. arboricola* CBS 12748 teilte diese Eigenschaften nicht. Die Ursprünge der drei *S. arboricola* Stämme waren verschieden (CBS 10644^T: *Quercus fabri*-Rinde, CBS 12749: *Auricularia polytricha* (chinesische Morchel), CBS 12748: *Castanopsis orthacantha*-Rinde) (Wang und Bai 2008, Naumov *et al.* 2013). Laccaseaktivität konnte nur für die Stämme *Apiotrichum mycotoxinivorans* MD123D und MYG6 festgestellt werden. Alle getesteten

Stämme der Arten *Naganishia albida*, *Papiliotrema odontotermitis*, *Saitozyma flava* und *Sugiyamaella mastotermitis* besaßen Xylanaseaktivität. Für *Sugiyamaella smithiae* konnte Xylanaseaktivität bei den Stämmen NM1 und NS1, nicht aber beim Stamm ODG32, festgestellt werden. Die Stämme wurden aus verschiedenen Termiten isoliert (NM1, NS1: *Neotermes jouteli*, ODG32: *Odontotermes distans*).

Die Suche nach lignocellulolytischen Enzymen wurde für ausgewählte Stämme mit 4-MUF-Substraten erweitert und ist im Anhang dargestellt (siehe Tab. 7.3). Hervorzuheben ist das der Stamm *Saitozyma flava* OO2 eine große Verfügbarkeit an lignocellulolytischen und nicht lignocellulolytischen Enzymen zeigte. In vorangehenden Studien wurden von dem Stamm OO2 neben der Cellulase und Xylanase auch die polymerspaltenden Enzyme Amylase, Arabinanase und β -Glucanase produziert (Wang 2015). Ebenfalls spaltete der Stamm die 4-NP gekoppelten Substrate α -L-Arabinofuranosid, α -D-Galactopyranosid, α/β -D-Glucopyranosid, β -D-Cellobiosid, β -D-Fucopyranosid, β -D-Xylosid sowie 2-NP- β -D-Galactopyranosid. Entgegen diesen Daten beschreibt Wang (2015) einen ausbleibenden Abbau von 4-NP- α -L-Arabinofuranosid, - α -D-Galactopyranosid, und - β -D-Cellobiosid. Die Abspaltung von α -L-Arabinofuranosid und β -Cellobiosid durch den Stamm OO2 wurde durch die 4-MUF-Substrattests bestätigt.

4.2 – Erstbeschreibung von *Sugiyamaella mastotermitis* sp. nov. und *Papiliotrema odontotermitis* f.a., sp. nov.

Die Zahl der gültig beschriebenen Hefearten beläuft sich auf mehr als 1.630. Nach Schätzungen entspricht dies etwa 1 % der extanten Hefearten – viele Biome der Erde sind noch unerforscht. Die Einführung der ITS- und LSU-Sequenzierung führte zu einem fünffachen Anstieg der Hefe-Neubeschreibungen in der Dekade von 2000-2010 im Vergleich zu 1990-2000. Hefestämme einer Art unterscheiden sich, mit Ausnahme von Hybriden, nicht mehr als 1 % in der ITS- oder LSU-Sequenz (Kurtzman und Fell 2006, Kurtzman *et al.* 2015).

Die Unterschiede der ITS- und LSU-Sequenz des Stammes *Sugiyamaella mastotermitis* MD39V^T zum nächsten gültig beschriebenen Verwandten war 19 % und respektive 7 % (*Sugiyamaella smithiae* Stamm Y-17850^I; GenBank-Einträge DQ911455 und DQ438218). Der Typstamm *Papiliotrema odontotermitis* OO5^T unterschied sich vom nächsten beschriebenen Verwandten um 4 % in der ITS-Sequenz und um 2 % in der LSU-Sequenz (*Papiliotrema rajasthanensis* Stamm CBS 10406^T; GenBank-Einträge AM262325 und AM262324). Für beide Arten wurde demgemäß eine Neubeschreibung unter Berücksichtigung der Mindeststandards durchgeführt (Kurtzman *et al.* 2011).

4.2.1 – Phylogenie

Die für die Stammbaumerstellung verwendeten Nukleotidsequenzen sind in Tab. 7.4 und 7.5 aufgelistet.

***Sugiyamaella mastotermitis* sp. nov.** (mas.to.ter'mi.tis, neulateinisch, Genitiv des Nomens *Mastotermes*. Mycobank-Eintrag 816574, Handel *et al.* 2016):

Die neue Ascomycetenart wurde aus der Termitenart *Mastotermes darwiniensis* isoliert. Die Hefeart wurde in die Gattung *Sugiyamaella* mit guter statistischer Unterstützung positioniert (ML-Analyse, 94 %). Die Einordnung erfolgte mittels Multilokus-Analyse, welche auf einer Alignierung der ITS-, LSU- und COX2-Sequenz sowie des Gens für die mitochondrielle kleine rRNA-Untereinheit (MtSSU) basierte (Abb. 4.1). Die Art befand sich in einer monophyletischen Gruppe (Klade) mit *Sugiyamaella smithiae*, *Su. marilandica* und *Su. chiloensis* mit guter statistischer Unterstützung (ML-Analyse, 86 %). Die Klade war ebenfalls in der LSU-basierten Einzellokus-Analyse präsent (siehe Abb. 7.3). Die neu isolierten Stämme *Sugiyamaella mastotermitis* MD15M, MD17G und MD39V^T gruppieren sich in der LSU-Einzellokus-Analyse zusammen mit dem Stamm *Sugiyamaella* sp. MM1 (NCBI-Taxonomie ID: 78167). Zwischen den drei Stämmen und dem Stamm MM1 bestand eine 99 %ige Identität der LSU- oder SSU-Sequenzen. Die Identität der ITS-Sequenzen war 100 %, sodass der Stamm MM1 der neuen *Sugiyamaella*-Art zugeordnet wurde. Der Stamm MM1 wird auch als *Galactocandida mastotermitis* MM1 bezeichnet, aber weder die Gattung, noch die Art sind in gültiger Weise beschrieben worden (Prillinger *et al.* 1996, Schweigkofler *et al.* 2000).

Anhand des LSU-basierenden Stammbaumes (siehe Abb. 7.3) konnte zusätzlich die Art *Candida qingdaonensis* in die Gattung *Sugiyamaella* als *Sugiyamaella qingdaonensis* comb. nov. präziser zugeordnet werden (Mycobank-Eintrag 514463, Wang *et al.* 2010, Handel *et al.* 2016). Dies ist auch von Daniel *et al.* (2014) beschrieben worden.

***Papiliotrema odontotermitis* f.a., sp. nov.** (o.don.to.ter'mi.tis, neulateinisch, Genitiv des Nomens *Odontotermes*. Mycobank-Eintrag 816575, Handel *et al.* 2016):

Die phylogenetische Multilokus-Analyse der neuen Basidiomycetenart aus der Termitenart *Odontotermes obesus* basierte auf einem Vergleich der verbundenen ITS- und LSU-Sequenzen. Die Art wurde in eine Klade aus *Papiliotrema laurentii*, *P. rajasthanensis* und *P. aspenensis* positioniert (ML-Analyse, 97 %; Abb. 4.2). Die LSU-Region der neuen Spezies unterschied sich in 13 (2 %) und 15 Nukleotiden (3 %) zu der von *P. aspenensis* und respektive von *P. rajasthanensis*. Die Gattung *Papiliotrema* besteht seit kurzem und war Bestandteil der Gattung *Cryptococcus* (Liu *et al.* 2015, Yurkov *et al.* 2015). Der Hefestamm *Cryptococcus* sp. BC-2011 könnte konspezifisch zu *Papiliotrema odontotermitis* sein (NCBI-Taxonomienummer:

1081692). Die ITS-Sequenzen hatten eine Übereinstimmung von 99 %. Im GenBank-Eintrag JN635412 wird als Wirt des Stammes BC-2011 eine undefinierte indische Termitenart erwähnt.

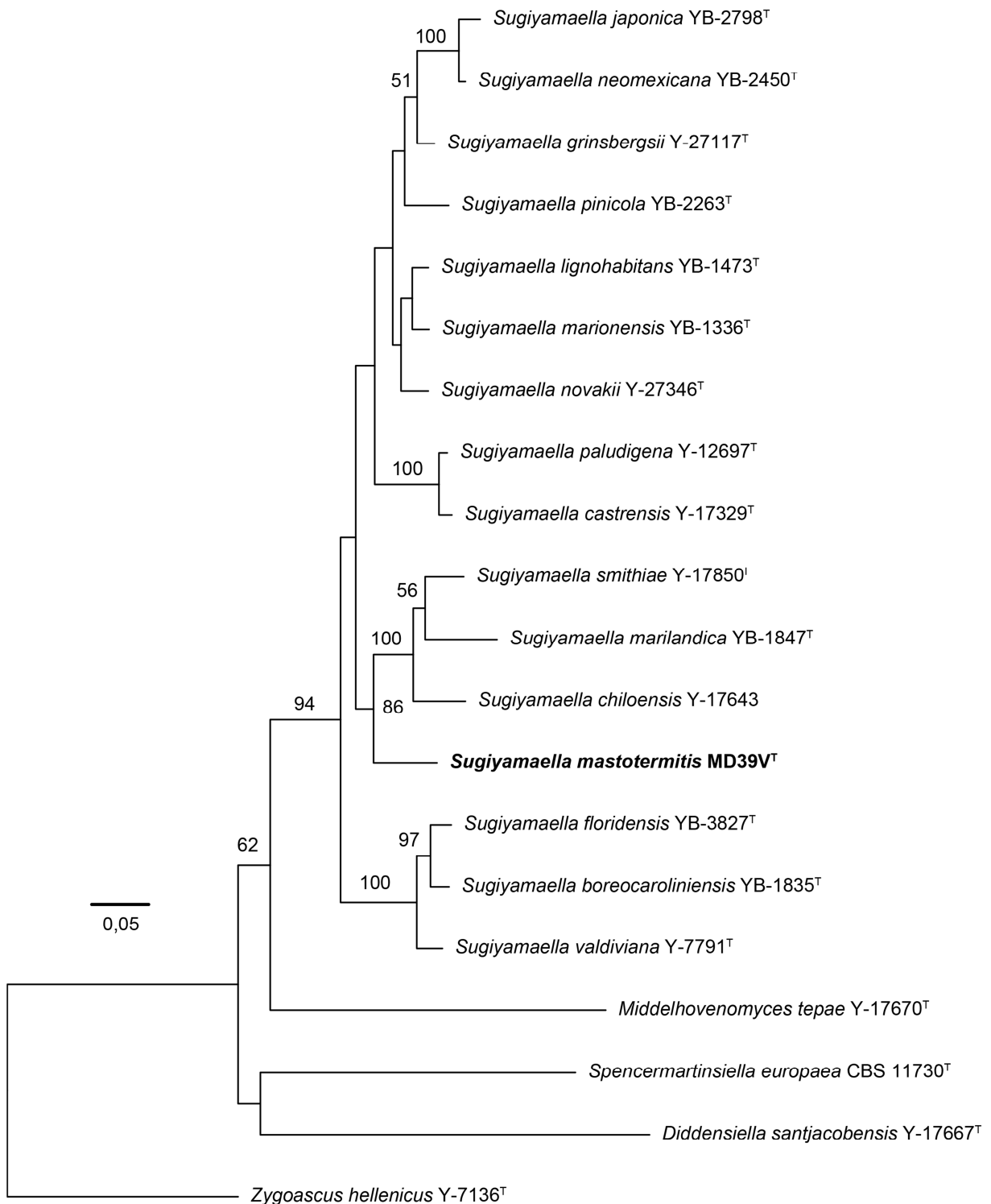


Abbildung 4.1: Phylogenetische Position des Typstammes *Sugiyamaella mastotermitis* MD39V^T. ML-Analyse der ITS-, LSU-, MtSSU- und COX2-Nukleotidsequenzen. Die Nummern an den Verzweigungspunkten sind die prozentualen Frequenzen, mit denen ein bestimmter Verzweigungspunkt bei 1.000 Bootstrap-Wiederholungen auftrat (nur > 50 % dargestellt). Die Skala gibt die Anzahl der erwarteten Nukleotidaustausche pro Stelle an. ^T: Typstamm. ^I: Isotypstamm (Handel *et al.* 2016).

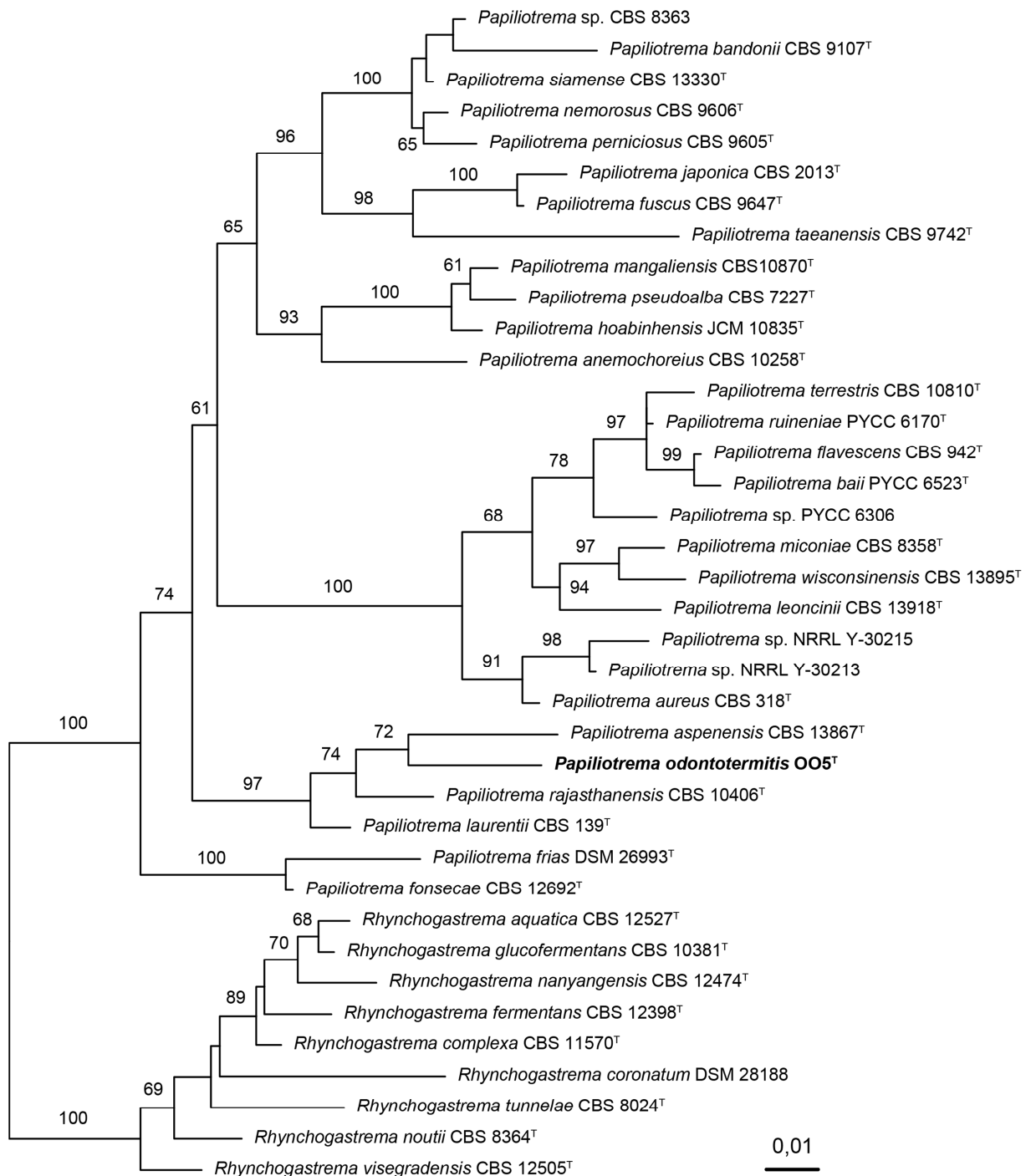


Abbildung 4.2: Phylogenetische Position des Typstammes *Papiliotrema odontotermitis* OO5^T. Nicht gewurzelter Stammbaum, erstellt mittels ML-Analyse der ITS- und LSU-Region. Die Nummern an den Verzweigungspunkten sind die prozentualen Frequenzen, mit denen ein bestimmter Verzweigungspunkt bei 1.000 Bootstrap-Wiederholungen auftrat (nur > 50 % dargestellt). Die Skala gibt die Anzahl der erwarteten Nukleotidaustausche pro Stelle an. ^T: Typstamm (Handel *et al.* 2016).

4.2.2 – Physiologie

Die Beschreibung des physiologischen Profils neuer Hefearten erlaubt wichtige Rückschlüsse auf z. B. deren ökologische Nische, metabolische Eigenschaften oder industrielle Perspektiven (Kurtzman *et al.* 2011). Das Assimilations- und Fermentationsprofil der Typstämme *Sugiyamaella mastotermitis* MD39V^T und *Papiliotrema odontotermitis* OO5^T ist in Tab. 4.4

gezeigt. Assimilation bezeichnet das Zellwachstum mit definierten C-Quellen und Fermentation die Zuckervergärung zu Ethanol, Säuren und Gasen. Enzymaktivitäten und das Wachstumsverhalten sind in Tab. 4.5 aufgelistet.

Tabelle 4.4: Assimilations- und Fermentationsprofil von *Sugiyamaella mastotermitis* MD39V^T und *Papiliotrema odontotermitis* OO5^T. +: positiv (≤ 48 h). -: negativ. s: schwach positiv. (x %): 100-x % der Reaktionen waren negativ. (x h): Wachstum trat verzögert nach x h auf (verändert nach Handel *et al.* 2016).

Physiologischer Test	<i>Su. mastotermitis</i>	<i>P. odontotermitis</i>	Physiologischer Test	<i>Su. mastotermitis</i>	<i>P. odontotermitis</i>
Fermentation			Assimilation		
D-Galactose	+	-	Inulin	-	-
D-Glucose	+	-	Milchsäure	-	s
D-Lactose	-	-	D-Lactose (Rind)	-	+
D-Maltose	+	-	Lävulinsäure	-	-
D-Raffinose	-	-	D-Lyxose	s	-
D-Saccharose	+	-	D-Maltose	+	+
D-Trehalose	-	-	D-Mannitol	+ (72 h)	+ (72 h)
D-Xylose	-	-	D-Mannose	+	+
			D-Melezitose	+	+
Assimilation			D-Melibiose	+	s (83 %)
D-Adonitol	-	+	Methyl- α -D-Glucopyranosid	+	-
Aesculin Eisen-citrat	+	+	Methyl- α -D-Mannopyranosid	-	-
Amidon (Stärke)	s (96 h)	+	Methyl- β -D-Xylopyranosid	+ (96 h)	-
Amygdalin	-	+	N-Acetylglucosamin	+	+
D-Arabinose	-	+	Palatinose	+	+
L-Arabinose	+	+	Kalium 2-Ketogluconat	+	+
D-Arabitol	+	+	Kalium 5-Ketogluconate	+	+
L-Arabitol	+	+ (72 h)	Kaliumgluconat	+	+
Arbutin	+	+	D-Raffinose	+	+
D-Cellobiose	+	+	L-Rhamnose	+	+
Cycloheximid (Actidion)	+	-	D-Ribose	-	+
Dulcitol	s (96 h)	s	D-Saccharose	+	+
Erythritol	+	+	Salicin	+	+
D-Fructose	+	+	Natriumglucuronat	+	+
D-Fucose	-	s	D-Sorbitol	+	+
L-Fucose	-	+ (72 h)	L-Sorbose	+	-
D-Galactose	+	+	D-Tagatose	-	s
Gentiobiose	+	+	D-Trehalose	+	+
Glucosamin	+	-	D-Turanose	+	+
D-Glucose	+	+	Xylitol	+	+
Glycerin	-	s	D-Xylose	+	+
Glycogen	-	s	L-Xylose	-	s (72 h)
Inositol	s	s			

Tabelle 4.5: Enzymatisches und Wachstumsprofil von *Sugiyamaella mastotermitis* MD39V^T und *Papiliotrema odontotermitis* OO5^T. +: positiv (≤ 48 h; ¹: API Candida, ≤ 24 h; Laccase, Protease: nach 14 Tagen). -: negativ. s: schwach positiv. (x %): 100-x % der Reaktionen waren negativ. (x h): Reaktion trat verzögert nach x h auf. AZCL: Azurin gekoppeltes Substrat. SACL: Sulfanilamid gekoppeltes Substrat (Handel *et al.* 2016).

Physiologischer Test	<i>Su. mastotermitis</i>	<i>P. odontotermitis</i>	Physiologischer Test	<i>Su. mastotermitis</i>	<i>P. odontotermitis</i>
Enzymaktivität			Weitere Tests		
α -Amylase	–	+	Diazoniumblau B-Reaktion	–	+
Caseinase (pH 3,5)	s	s	Ethanoltoleranz	5 % (v/v)	1 % (v/v)
Caseinase (pH 6,8)	–	–	pH Optimum	4,0	5,5
Caseinase (AZCL, pH 3,5)	s	+	Stärkeproduktion	–	–
Caseinase (SACL, pH 3,5)	s (450 h)	+	Wachstum bei 25 °C	+	+
β -Galactosidase ¹	s (25 %)	+ (48 h)	Wachstum bei 30 °C	+	+
β -Glucuronidase ¹	–	–	Wachstum bei 32 °C	+	+
Kollagenase (AZCL, pH 3,5)	s (450 h)	+	Wachstum bei 35 °C	+	s
Laccase (ABTS)	–	–	Wachstum bei 37 °C	+	–
Laccase (Tanninsäure)	–	–	Wachstum bei 40 °C	+	–
β -Maltosidase ¹	–	+	Wachstum bei 42 °C	–	–
β -N-Acetylglucosaminidase ¹	–	+	Wachstum bei 45 °C	–	–
Urease ¹	–	+	Wachstum bei 10 % NaCl und 5 % Glucose	–	+
β -Xylosidase ¹	–	–	Wachstum bei 50 % Glucose	–	–
pH-Veränderung (API Candida)			Wachstum bei 60 % Glucose	–	–
D-Galactose ¹	+	+ (75 %)	Wachstum mit 0,1 % Cycloheximid	+	–
D-Glucose ¹	+	+	Wachstum ohne Biotin	+	+
D-Raffinose ¹	s (75 %)	s	Wachstum ohne Thiamin	+	+
D-Saccharose ¹	+	+	Wachstum ohne Biotin und Thiamin	+	+
D-Trehalose ¹	–	s (96 h)	Wachstum ohne Vitamine	+	+

Der Lignocelluloseabbau wird in Tab 4.3 und 7.3 gezeigt. Biopolymerabbau ist von Wang (2015) mit dem AZCL-Substrattest überprüft worden: Beide Arten bauten Arabinoxylan aus Weizen ab. Eine Spaltung von Amylose, Arabinan und β -Glucan (aus Gerste) wurde für *Papiliotrema odontotermitis* beschrieben.

Sugiyamaella mastotermitis konnte vom nächsten Verwandten (*Su. chiloensis*) dadurch unterschieden werden, dass D-Galactose, D-Glucose, D-Maltose und D-Saccharose fermentiert wurden sowie D-Arabinose, D-Ribose, Glycerin und Ribitol (Adonitol) assimiliert wurden. *Su. chiloensis* ist nicht dazu fähig, bei 37 °C zu wachsen (Kurtzman 2007). Im Gegensatz dazu konnte *Papiliotrema odontotermitis* von *P. aspenensis* nicht anhand des Phänotyps differenziert werden (Ferreira-Paim *et al.* 2014). Die neue Spezies unterschied sich von *P. rajasthanensis* bezüglich der Assimilation von D-Glucosamin, L-Sorbose und löslicher Stärke (Saluja und Prasad 2007). Die Temperaturtoleranz beträgt für *P. aspenensis* 37 °C und für *P. rajasthanensis* 30 °C, während *P. odontotermitis* bei bis zu 35 °C wuchs (Handel *et al.* 2016).

4.2.3 – Morphologie und Reproduktion

Kolonie- oder Zellformen können bei der Identifizierung von Hefestämmen helfen. Allerdings ist morphologische Heterogenität innerhalb eines Hefestammes üblich. Dies wird auch durch die Wachstumsbedingungen beeinflusst (Feldmann 2012). Weitere morphologisch sichtbare Identifizierungsmerkmale sind sexuelle Strukturen, wie z. B. Asci (Kurtzman *et al.* 2011).

Die *Sugiyamaella mastotermitis*-Stämme wurden mit Ausnahme von MDE6G, MM1, MYG4-5 und MYG7-9 in allen Kombinationen gekreuzt. Tubuläre Asci mit zwei Sporen wurden für die Kreuzungen der Stämme MD17G × MD16S, MD17G × MD18S, MD17G × MD74V, MD17G × MD75V, MD17G × MD88V, MD17M × MD72V, MD17S × MD75V, MD39V^T × MD16S und MD39V^T × MD18M beobachtet (Abb. 4.3b). Tubuläre Asci mit vier Sporen wurden von den gekreuzten Stämmen MD17G × MD72V, MD17S × MD18G, MD19S × MD16S und MD39V^T × MD18S gebildet. Die Stämme MD17G, MD17M, MD17S, MD19S und MD39V^T wurden demgemäß dem Kreuzungstyp „a“ zugeordnet und die Stämme MD16S, MD18G, MD18M, MD18S, MD72V, MD74V, MD75V und MD88V dem Kreuzungstyp „α“. Die Art war heterothallisch, da ungekreuzte Stämme keine Asci zeigten.

Nach drei Tagen Inkubation bei 25 °C und 30 °C auf GYP-Agarplatten war die Koloniefarbe mattweiß. Nach sieben Tagen war die Oberfläche buttrig-glänzend und glatt. Die Kolonief orm war erhaben und ganzrandig. Ein Hyphensaum konnte nach fünf Wochen auf Maismehl-Agarplatten beobachtet werden (Abb. 4.3d). Hefezellen in Flüssigkultur waren sphärisch bis ovoid (2,5-6,2 µm × 2,3-6,0 µm) und proliferierten mittels multilateraler Knospung. Die Zellen traten einzeln oder in Paaren auf (Abb. 4.3a, c). Pseudohyphen mit Blastokonidien konnten in Dalmau-Plattenkultur auf Maismehl-Agar beobachtet werden (Abb. 4.3e, f).

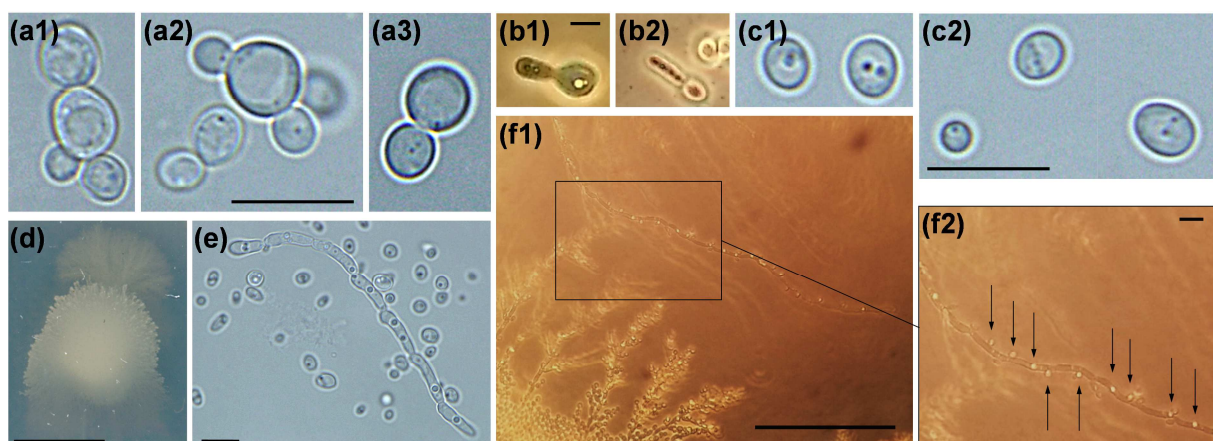


Abbildung 4.3: Morphologie von *Sugiyamaella mastotermitis* MD39V^T. (a1-3) Sprossende Zellen nach 3 Tagen bei 30 °C in GYP-Medium. Lichtmikroskopie (LM). Balken: 10 µm. (b1-2) Ascus mit 2 oder 4 Sporen. Kreuzungstyp a und α nach 7 Wochen bei 25 °C auf 5 % ME-Platten. Phasenkontrastmikroskopie (PM). Balken: 10 µm. (c1-2) Einzelne Zellen nach 3 Tagen bei 30 °C in GYP-Medium. LM. Balken: 10 µm. (d) Kolonie mit Hyphensaum nach 5 Wochen auf Maismehl-Platten bei 25 °C. Eingescannte Plattenunterseite. Balken: 5 mm. (e) Pseudohyphenfragment und einzelne Zellen nach 7 Tagen auf Maismehl-Platten bei 25 °C. LM. Balken: 10 µm. (f1-2) Pseudohyphen mit Blastokonidien (helle hyphenständige Auswüchse, Pfeile) nach 7 Tagen auf Maismehl-Platten bei 25 °C. Dalmau-Technik und PM. Balken: 100 µm (f1), 10 µm (f2).

Papiliotrema odontotermitis war wahrscheinlich anamorph, da keine sexuellen Strukturen sichtbar waren. Nach einer Woche Inkubation bei 25 °C und 30 °C auf GYP-Agarplatten war die Koloniefarbe gelblich-braun. Die Oberfläche war glänzend und glatt, die Kolonieform erhaben und ganzrandig. Hefezellen in Flüssigkultur waren ovoid, ellipsoid oder globulär (2,4-11,8 µm × 2,4-11,9 µm) und bildeten sich durch multilaterale Knospung. Sie traten einzeln, paarig oder als kurze Ketten auf (Abb. 4.4a). Kurze Ketten von bis zu sechs Zellen und elongierte Zellen wurden in Dalmau-Plattenkultur auf Maismehl-Agar beobachtet (Abb. 4.4b). Die elongierten Zellen waren durchschnittlich 3,9 µm × 11,7 µm groß.

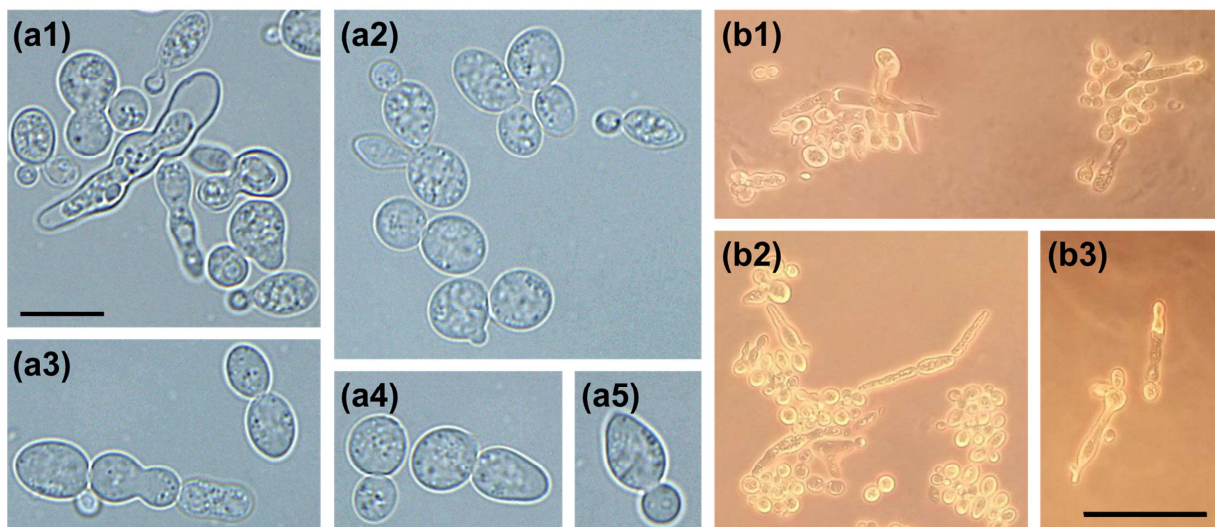


Abbildung 4.4: Morphologie von *Papiliotrema odontotermitis* Oo5^T. (a1-5) Sprossende Zellen mit diversen Formen (ellipsoid, elongiert, globulär und ovoid). 3 Tage Inkubation bei 30 °C in GYP-Medium. Lichtmikroskopie. Balken: 10 µm. (b1-3) Elongierte Zellen in kurzen Ketten und sprossende Zellen. 7 Tage Inkubation auf Maismehl-Platten bei 25 °C. Dalmau-Technik und Phasenkontrastmikroskopie. Balken: 50 µm.

4.3 – Ethanolproduktion im Darm von *Mastotermes darwiniensis*

Acetat ist der wichtigste von Symbionten bereitgestellte Nährstoff für Termiten (König *et al.* 2013, Brune 2014). Die Acetatkonzentration im Hinterdarm der Termiten *Incisitermes schwarzi*, *Nasutitermes walkeri*, *Reticulitermes flavipes* und *Zootermopsis angusticollis* beträgt 31,9-80,6 mM. Dies macht 94-98 mol% der kurzkettigen, flüchtigen Fettsäuren aus (Odelson und Breznak 1983, Slaytor *et al.* 1997). Ethanol ist bisher nicht als niedermolekulare Substanz des Termitendarms beschrieben worden.

4.3.1 – Niedermolekulare Substanzen im Darm von *Mastotermes darwiniensis*

Der Darminhalt von 72 Arbeitern und 150 Soldaten der Art *Mastotermes darwiniensis* wurde separat vermischt. Der Hefezelltiter betrug $3,9 \times 10^8$ Zellen/ml und $3,1 \times 10^8$ Zellen/ml für die Arbeiterkaste und respektive die Soldatenkaste. Beide Darminhalte waren leicht sauer (pH 5,5 und pH 5,27). Die niedermolekularen Substanzen waren hauptsächlich Acetat (10,96 mM und 11,39 mM) und Ethanol (6,43 mM und 11,07 mM; Abb. 4.5).

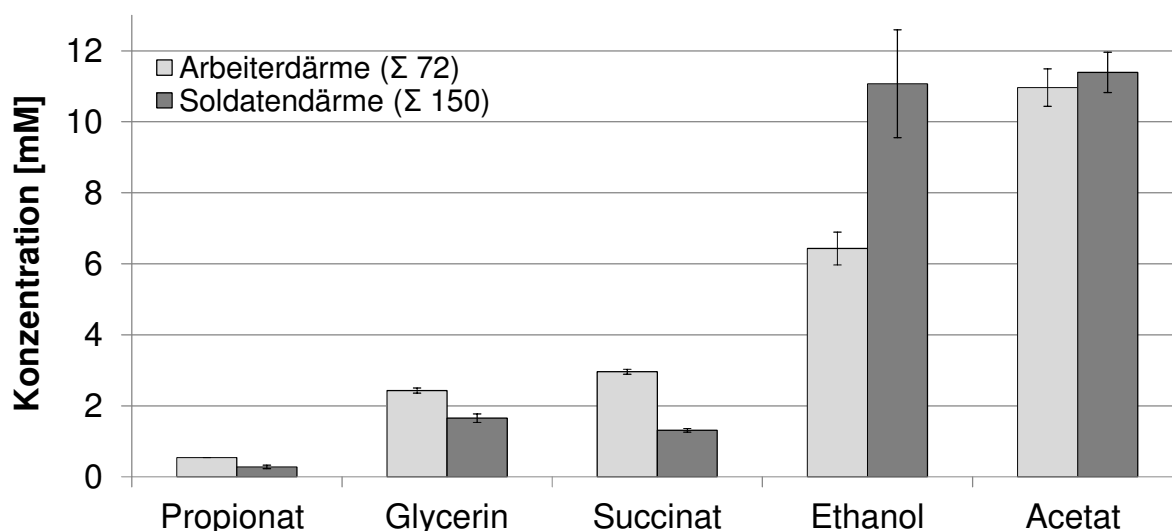


Abbildung 4.5: Niedermolekulare Substanzen im Darm von *Mastotermes darwiniensis*. Die Inhalte von 72 Arbeiterdärmen (hellgrau) und 150 Soldatendärmen (dunkelgrau) wurden separat vermischt. Die Ethanolkonzentration wurde mit dem ADH-Test bestimmt, Formiat mit dem Formiat-UV-Test (R-Biopharm) und andere Stoffe mittels HPLC. Butyrat, Formiat, Lactat und Methanol wurden nicht detektiert.

Zusätzlich wurden geringe Konzentrationen Propionat (0,54 mM und 0,28 mM), Glycerin (2,43 mM und 1,65 mM) und Succinat (2,96 mM und 1,31 mM) entdeckt. Butyrat, Formiat, Lactat und Methanol wurden nicht detektiert. Acetat entsprach demnach 96,4 mol% der kurz-kettigen, flüchtigen Fettsäuren (Acetat, Propionat, Butyrat).

4.3.2 – Ethanolproduktion und -toleranz von Hefen aus *Mastotermes darwiniensis*

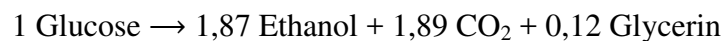
Mastotermes darwiniensis enthielt die Hefesymbionten *Apiotrichum mycotoxinivorans*, *Candida tropicalis* und *Sugiyamaella mastotermitis* (siehe Tab. 4.1). Ausgewählte Stämme dieser Symbionten wiesen eine Ethanoltoleranz von bis zu 5 % (v/v) auf (Tab. 4.6).

Tabelle 4.6: Erhöhte Ethanoltoleranz von *Mastotermes darwiniensis*-Hefesymbionten. Die Inkubation wurde bei 30 °C und 120 UpM in SAB-Medium durchgeführt. Das SAB-Medium war auf das ermittelte pH-Optimum eingestellt. Die Hefen wurden von ethanolfreiem Medium in Medium mit Ethanolkonzentrationen von 0, 1, 5, 8, 10, 15 und 20 % überimpft. Als Kontrollgruppen wurden Hefen aus Termiten und eine Weinhefe verwendet. v: Wachstum war verzögert (mehr als 3 Tage). ¹: Narendranath und Power 2005.

Wirt/Quelle	Hefespezies	Stamm	pH-Optimum	Ethanoltoleranz
<i>Mastotermes darwiniensis</i>	<i>Apiotrichum mycotoxinivorans</i>	MD123D	4,5	5 % (v, 8 Tage)
	<i>Candida tropicalis</i>	MD1M		
	<i>Sugiyamaella mastotermitis</i>	MD39V ^T	4	5 %
<i>Neotermes jouteli</i>	<i>Sugiyamaella smithiae</i>	NM1	5	1 %
	<i>Naganishia albida</i>	OO1	7	
<i>Odontotermes obesus</i>	<i>Papiliotrema odontotermitis</i>	OO5 ^T	5,5	1 %
	<i>Saitozyma flava</i>	OO2	6,5	
Wein	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	C2 Oenoferm	ca. 5,5 ¹	10 %

Als Kontrollgruppe wurden Hefestämme aus den Termiten *Neotermes jouteli* und *Odontotermes obesus* verwendet (*Sugiyamaella smithiae* NM1; *Naganishia albida* OO1, *Saitozyma flava* OO2, *Papiliotrema odontotermitis* OO5^T). Deren Ethanoltoleranz betrug bis zu 1 %

(v/v). Die Positivkontrolle war *Saccharomyces cerevisiae* C2 Oenoferm und wuchs bei Anwesenheit von bis zu 10 % (v/v) Ethanol an (hohe Toleranz: Direktüberimpfung, 30 °C). Der Stamm *Apiotrichum mycotoxinivorans* MD123D war cellulasepositiv (siehe Tab. 4.3), fermentierte aber keine Cellobiose in MV-Medium. Dies war in Übereinstimmung mit der mangelnden Glucosefermentation des Typstammes (Molnar *et al.* 2004). Der Stamm *Sugiyamaella mastotermitis* MD39V^T produzierte Ethanol aus Glucose, nicht aber aus Xylose (siehe Tab. 4.4). Die Art *Candida tropicalis* ist dafür bekannt, Glucose oder Xylose in Ethanol umzusetzen (Granström *et al.* 2002, Sánchez *et al.* 2008). Der Stamm *C. tropicalis* MD1M zeigte keine Ethanolproduktion aus Xylose in MV-Medium. Jedoch fermentierte er 56,8 mol Glucose in einer alkoholischen Gärung zu 85,18 mol Ethanol, 85,91 mol CO₂ und 5,49 mol Glycerin. Die Menge des wiedergefundenen Kohlenstoffs betrug 80 %. Dies impliziert, dass 20 % Kohlenstoff im Zellstoffwechsel fixiert wurden. Die Bilanz lautete wie folgt:



4.4 – Analyse der endo-1,4-β-Xylanase „Xyl1“ der Hefe *Saitozyma flava* OO2

Xylanasen hydrolysieren das β-1,4-Rückgrat des Xylans und sind den Glycosid-Hydrolasen zugehörig. Für Mitglieder der GH-Familien 5, 7, 8, 10, 11, 30 und 43 ist ein 1,4-β-Xylose hydrolysierendes Zentrum bekannt. Die Heterogenität und Komplexität des Xylans reflektiert den Bedarf der Vielzahl unterschiedlich agierender Xylanasen (Collins *et al.* 2005, St. John *et al.* 2010). Neuartige robuste Xylanasen sind von großem Interesse für die biotechnologische Erschließung des Xylans als Pentosequelle (Juturu und Wu 2012, Kalim *et al.* 2015). Anforderungen an Xylanasen im Prozess der Bioethanolproduktion sind hohe Umsatzraten, eine geringe Endprodukthemmung, Toleranz gegen TDH-Nebenprodukte, Ethanoltoleranz sowie Thermo- und Azidophilie (Bon und Ferrara 2007, Yang und Wyman 2008, Yang *et al.* 2011, Ballmann *et al.* 2013, Qi *et al.* 2013). Die Xylanasen von Termitensymbionten sind weitestgehend unerforscht (Scharf 2015).

Von den in Tab. 4.3 genannten Stämmen wurde der Termitensymbiont *Saitozyma flava* OO2 zur Aufreinigung und Charakterisierung einer Xylanase ausgewählt. Projektpartner beschrieben eine 13- bis 14-fach erhöhte Xylanaseaktivität von Kulturüberständen und Lyophilisaten im Vergleich zum nächstaktiveren Stamm OO5^T. Die Stämme OO1, MD39V^T und NM1 waren weniger aktiv als der Stamm OO5^T (Kultivierungsbedingungen: ASA-Xylanmedium in Schikanekolben, 30 °C und 120 UpM für 7 Tage) (Dr. Arno Cordes, ASA-Spezialenzyme GmbH (2016) persönliche Kommunikation. Mainz, Wolfenbüttel).

4.4.1 – Xyl1-Aufreinigung sowie Bestimmung des Molekulargewichtes und des pI

Das **Xyl1-Produktionsmaximum** wurde bestimmt, um die Xylanaseausbeute bei der Aufreinigung zu erhöhen. Dazu wurde die Xylanaseaktivität von *Saitozyma flava* OO2-Kulturüberständen beim Wachstum in xylanhaltigem MV-Medium untersucht (Abb. 4.6).

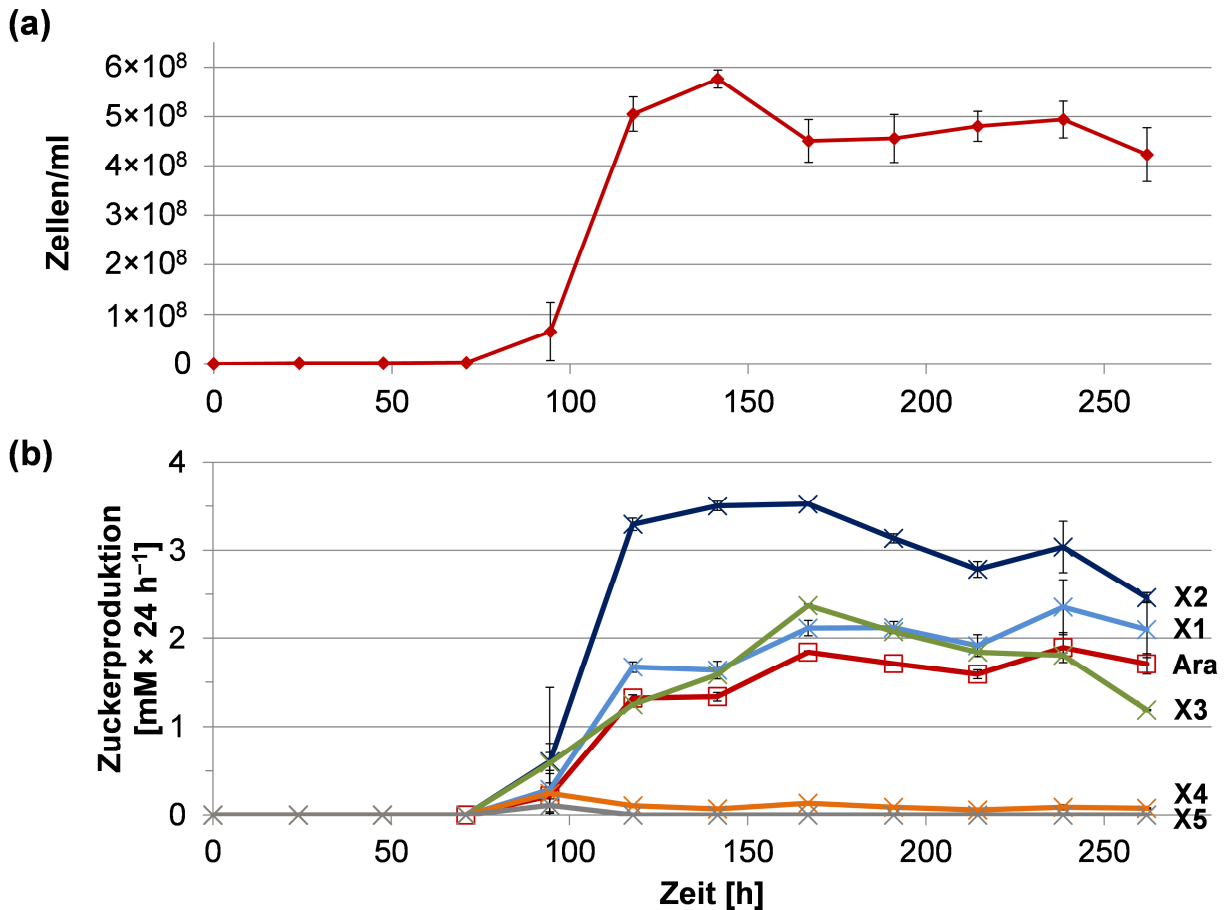


Abbildung 4.6: Wachstum und Xylanaseaktivität von Stamm *Saitozyma flava* OO2. (a) Wachstumskurve. Inkubation bei 30 °C und 120 UpM in Schikanekolben, befüllt mit Vogel-Minimalsalzmedium mit 1 % Haferspelzenxylan. (b) Zuckerabspaltung durch Enzyme im Kulturüberstand. Es wurden 250 μl des filtrierten Kulturüberstandes mit 450 μl Natriumphosphatpuffer B versetzt (mit 1 % Haferspelzenxylan). Inkubation bei 40 °C und 750 UpM für 24 h. Zuckerquantifizierung mittels HPLC. Ara (rot): L-Arabinose. X1 (hellblau): Xylose. X2 (dunkelblau): Xylobiose. X3 (grün): Xylotriose. X4 (orange): Xylotetraose. X5 (grau): Xylopentaose.

Die exponentielle Phase war im Zeitraum von 95-115 h am stärksten. Danach war ein schwaches Wachstum zu beobachten (bis 140 h). Die Kulturen traten dann in eine kurze Absterbephase ein (140-165 h), gefolgt von einer Stationärphase. Zur Aktivitätsmessung wurde eine nachträgliche separate Inkubation der filtrierten Kulturüberstände mit Xylan durchgeführt (Abb. 4.6b). Zu Beginn der exponentiellen Phase (95 h) trat eine generelle, schwache Zuckerfreisetzung ein. Die Xylose- und Arabinosefreisetzung war bei 115 h relativ moderat und ähnelte sich im gesamten Kurvenverlauf ($1,25\text{-}2,25 \text{ mM} \times 24 \text{ h}^{-1}$). Die Xylobiosefreisetzung stieg zum Ende der exponentiellen Phase (115 h) stark an und erreichte ihr Maximum mit dem Einsetzen der Stationärphase (140-165 h). Die Xylotriosekonzentration stieg bis 165 h annä-

hernd linear an und nahm danach ab (bis zu $2,4 \text{ mM} \times 24 \text{ h}^{-1}$). Xylotetraose wurde in sehr geringen Konzentrationen freigesetzt (Niveau ab 115 h bis zu $0,25 \text{ mM} \times 24 \text{ h}^{-1}$). Eine Xylopentaoseproduktion war nur bei 95 h erkennbar ($0,1 \text{ mM} \times 24 \text{ h}^{-1}$). Die Xylanaseaktivität erreichte bei 165 h ihr Maximum, was sich in der hohen Gesamtzuckerproduktion äußerte.

Nach der **Proteinaufreinigung** mittels Ammoniumsulfatfällung, IEF und FPLC konnte aus 5.124 mg initialem Gesamtprotein 3,6 mg Xylanase gewonnen werden (Tab. 4.7).

Tabelle 4.7: Aufreinigerungsverlauf der Xylanase Xyl11. Gezeigt sind die aufeinander folgenden Aufreinigerungs-schritte beginnend mit 1. dem unbehandelten Kulturüberstand, 2. dem gefällten und dialysierten Kulturüberstand sowie 3. der IEF gefolgt von der FPLC. Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität wurde der RBB-Xylantest in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 6) bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min durchgeführt.

Schritt	Aufreinigerungs-stand	Gesamtprotein-menge [mg]	Gesamt-volumen [ml]	Spezifische Proteinmenge [mg/ml]	Spezifische Aktivität [RU]
1.	Kulturüberstand	5.124	2.800	1,8	1,4
2.	Fällung und Dialyse	235,9	332,5	0,7	6,8
3.	IEF und FPLC	3,6	38	0,094	243,3

Die 2.800 ml Ausgangsvolumen wurden dabei um den Faktor 75 auf 38 ml reduziert. Ein 174-facher Anstieg der spezifischen Aktivität deutete eine Reinheitserhöhung an. Bei der IEF sammelte sich die Xylanase ab pH-Werten von $> 7,6 \pm 0,2$ an (9 Läufe, Ampholyte Servalyt 2-10). Bei der FPLC betrug die Retentionszeit der Xylanase $38,1 \pm 0,4$ min bis $41,3 \pm 1,1$ min. Dies galt für 21 Durchgänge mit einer Flussrate von $0,5 \text{ ml/min}$. Die Erhöhung des Einspritzvolumens von $200 \text{ } \mu\text{l}$ auf $500 \text{ } \mu\text{l}$ beeinflusste die Retentionszeit nicht. Der Aufreinigerungsverlauf der xylanspaltenden Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE dokumentiert (Abb. 4.7).

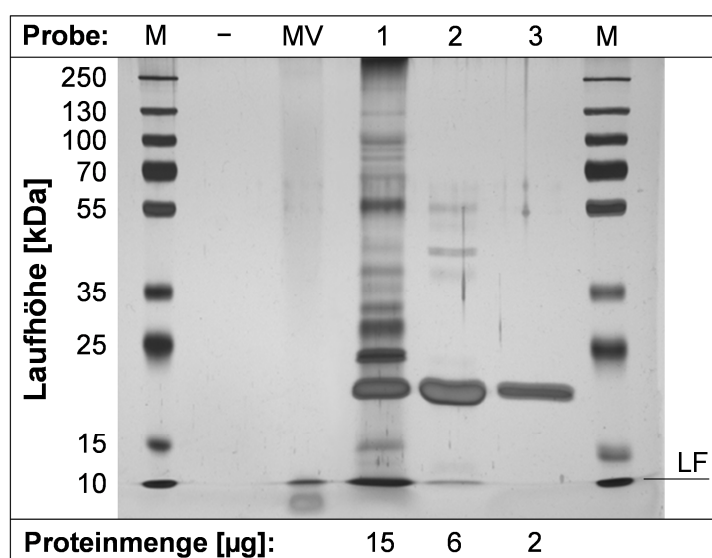


Abbildung 4.7: Aufreinigerungsstadien und Masse von Xyl11. Silberfärbung. Detektionsschwelle: $0,25 \text{ ng/Proteinbande}$. M: $0,5 \text{ } \mu\text{l}$ Massenstandard (Page Ruler Plus, Thermo Fisher). -: $12 \text{ } \mu\text{l}$ Negativkontrolle (FPLC-Eluent: Natriumphosphatpuffer A). MV: $3 \text{ } \mu\text{l}$ unbeimpftes Medium. 1: Kulturüberstand nach Ammoniumsulfatfällung und Dialyse. 2: Probe Nr. 1 nach IEF mit Ampholyte Servalyt 2-9 (Seed Mix, Serva). 3: Probe Nr. 2 nach FPLC. Die Xylanaseaktivität der Proben 1-3 wurde mit dem RBB-Xylantest verifiziert. LF: Lauffront.

Nach der IEF war bereits eine deutliche Steigerung der Reinheit sichtbar. Die Größenaufreinigung mittels FPLC resultierte in einer einzelnen verbleibenden Xylanasebande bei etwa 20-23 kDa. Eine bioinformatische Berechnung des MW mit der prozessierten Proteinsequenz (siehe Kapitel 4.4.2) ergab ein MW von $20,39 \text{ kDa}$ (ExPASy, Compute pI/MW).

Der **isoelektrische Punkt** wurde mittels präparativer isoelektrischer Fokussierung der dialysierten Fällung ermittelt (Abb. 4.8).

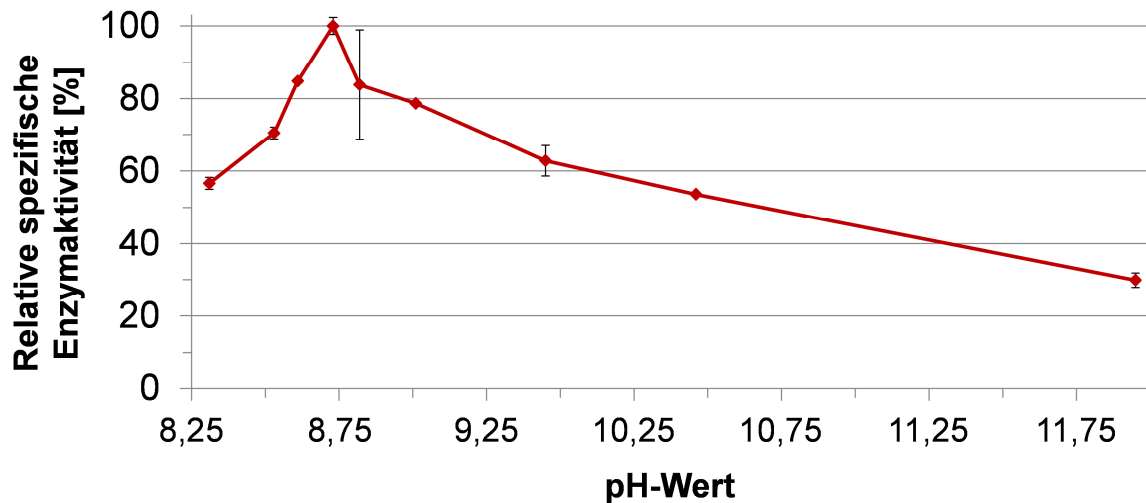


Abbildung 4.8: Ermittlung des isoelektrischen Punktes der Xylanase Xyl11. Dargestellt ist die relative spezifische Aktivität der IEF-Fractionen von pH 8,25-11,75. Die Aktivitäten von Fractionen mit geringerem pH-Wert waren nicht signifikant. Der RBB-Xylantest wurde in Natriumphosphatpuffer A für 10 min bei 40 °C durchgeführt. Die verwendete Ampholyte Servalyt 7-9 (Serva) baute einen steilen Gradienten bei pH 7-9 auf.

Der pI lag nahe pH 8,61, da diese IEF-Fraktion die größte spezifische Aktivität hatte. Dies bestätigte die Daten eines analytischen IEF-Geles, bei dem eine intensive Proteinbande mit Xylanaseaktivität zwischen den Markerbanden bei pH 7,8 und 9,5 lokalisiert war (Durchführung nach Schwentke (2013), Daten nicht gezeigt). Die bioinformatische pI-Berechnung mit der prozessierten Proteinsequenz (siehe Kapitel 4.4.2) ergab einen pI von 8,40 (ExpPASy, Compute pI/MW).

4.4.2 – Zuordnung der Xylanase zu einer GH-Familie und Strukturanalyse

Die **Primärstruktur** der Xylanase wurde durch MS/MS in Fragmenten ermittelt. Per Sequenzvergleich mit der Exomdatenbank des Stammes OO2 konnte dann das Xylanasegen identifiziert werden. Dieses bestand aus vier Exons. Die Primärstruktur und das Gen der Xylanase sind unter dem GenBank-Eintrag KX601695 hinterlegt. In den MS/MS-Daten fehlte die aus dem Gen abgeleitete, N-terminale Aminosäuresequenz MVASAAPVAEA-EDGQAATPIAIEK (24 Aminosäuren). Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um eine Signalsequenz, die während der Translokation prozessiert wurde. Vorhersagen des Signalpeptids deuteten auf eine kürzere Variante dieser Signalsequenz hin (Aminosäuren 1-16). Das Programm Signal-BLAST traf diese Vorhersage aufgrund von Ähnlichkeiten zur *Aspergillus niger*-Xylanase „XYNA“ (siehe Tab. 7.10) (Frank und Sippl 2008). Der Ausnahmewert betrug $2E^{-06}$ und gab die Frequenz an, mit der ein zufälliger Treffer in einer Datenbank der durchsuchten Größe auftritt. Die Xylanase war zur GHF 11 zugehörig. Dies äußerte sich in

einer hohen Sequenzhomologie zur GHF 11- Xylanase CfXYN1 aus dem Isolat *Saitozyma flava* I-11 (Parachin *et al.* 2009). Die Übereinstimmung betrug 96 % zum CfXYN1-Eintrag in der GenBank-Datenbank (EU330207) und 99 % zu der in der Veröffentlichung dargestellten Sequenz. In beiden Fällen ist davon auszugehen, dass es sich um homologe Proteine handelte. Die **Tertiärstruktur** von Xyl1 wurde als substratfreies und -gebundenes 3D-Homologie-modell dargestellt. Als Modell wurde die *Aspergillus niger*-Xylanase XYNA der GHF 11 gewählt. Das Enzym hatte von allen bekannten Xylanasen mit Kristallstruktur die größte Sequenzübereinstimmung zu Xyl1 (55 %). Von XYNA existieren Kristalle mit und ohne Substratbindung (PDB-Nummern 1UKR und 2QZ2, Kregel und Dijkstra 1996, Vandermarliere *et al.* 2008). Aus je 50 erstellten Xyl1-Homologiemodellen wurden diejenigen mit den niedrigsten DOPE-Werten ausgewählt (-20255, -20376). Das Modell von Xyl1 hatte die für die GHF 11 typische Tertiärstruktur. Hierbei bildete das aktive Zentrum eine aus sechs β -Faltblättern bestehende Furche, die von einer Schleife („Loop“) überlagert war (Abb. 4.9).

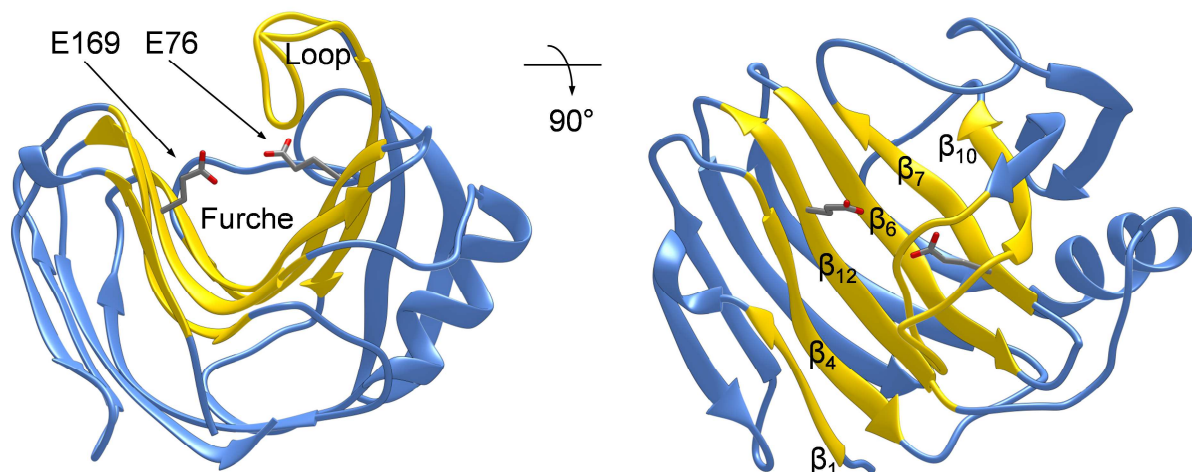


Abbildung 4.9: 3D-Homologiemodell von Xyl1 mit aktivem Zentrum. Gelb: Furche und Schleifenregion (Loop) des aktiven Zentrums mit den katalytisch aktiven Resten E76 und E169. Hellblau: restliches Protein. Das Modell basiert auf der substratfreien GHF 11-Xylanase XYNA von *Aspergillus niger* (PDB-Eintrag 1UKR).

Die Struktur erinnerte an eine leicht geöffnete rechte Hand, mit der Furche als Handinnenfläche und der Schleife als darauf zeigender Daumen. Der vom aktiven Zentrum abgewandte Bereich des Proteins zeigte eine für GHF 11-Xylanasen typische Struktur aus acht antiparallelen β -Faltblättern (β_1/β_2 , β_3/β_4 , β_{12}/β_{13} , β_5/β_6). Dieser Faltungstyp wird als β -Biskuitrolle bezeichnet (engl. „ β -jelly roll“) (Collins *et al.* 2005). An der breitesten Stelle betrug der Durchmesser des globulären Enzymes etwa 46 Å und an der schmalsten etwa 25 Å. Der Hydrolysemechanismus von GHF 11-Xylanasen verwendet je ein Glutamat als aktives Nukleophil (XYNA: E79) und als Säure/Base-Katalysator (XYNA: E170) (Kregel und Dijkstra 1996). In Xyl1 waren die Reste E76 und E169 zu E79_{XYNA} und respektive zu E170_{XYNA} konserviert und somit wahrscheinlich von homologer Funktion. Ebenfalls waren die E79_{XYNA}- und

E170_{XYNA}-stabilisierenden Aminosäuren in Xyl1 konserviert. (siehe Abb. 7.4, Wasserstoffbrückenpartner: E76–Y66, –W68, –Q128; E169–D33, –Y78). Eine Distanz von $< 4 \text{ \AA}$ wurde als Grenze gesetzt, um stabile Wasserstoffbrücken zu bestätigen (Jeffrey 1997). Die zwei Wasserstoffbrücken zwischen E169 und D33 hatten eine Distanz von 3,36 und 3,41 \AA (siehe Abb. 7.5). Diese Distanz vergrößerte sich mit der Bindung von Xylobiose scheinbar auf $> 4 \text{ \AA}$. Gegen die Signifikanz der Distanzerhöhung konnte erhoben werden, dass der katalytisch aktive Rest E170_{XYNA} im Xylobiose gebundenen XYNA-Kristall durch Alanin ausgetauscht worden ist. Der Austausch diente der Stabilisierung der Xylobiosebindung im XYNA-Kristall und hatte bei der Xyl1-Modellierung das Potential lokale Ungenauigkeiten zu verursachen (Vandermarliere *et al.* 2008).

Ein Sequenzvergleich zwischen Xyl1 und XYNA ergab, dass die Xylobiose bindenden Aminosäuren des aktiven Zentrums vollständig konserviert waren (Abb. 4.10; Q6, Y8, D33, Y66, E76, Y78, P118, S119, Q128, Y163, E169).

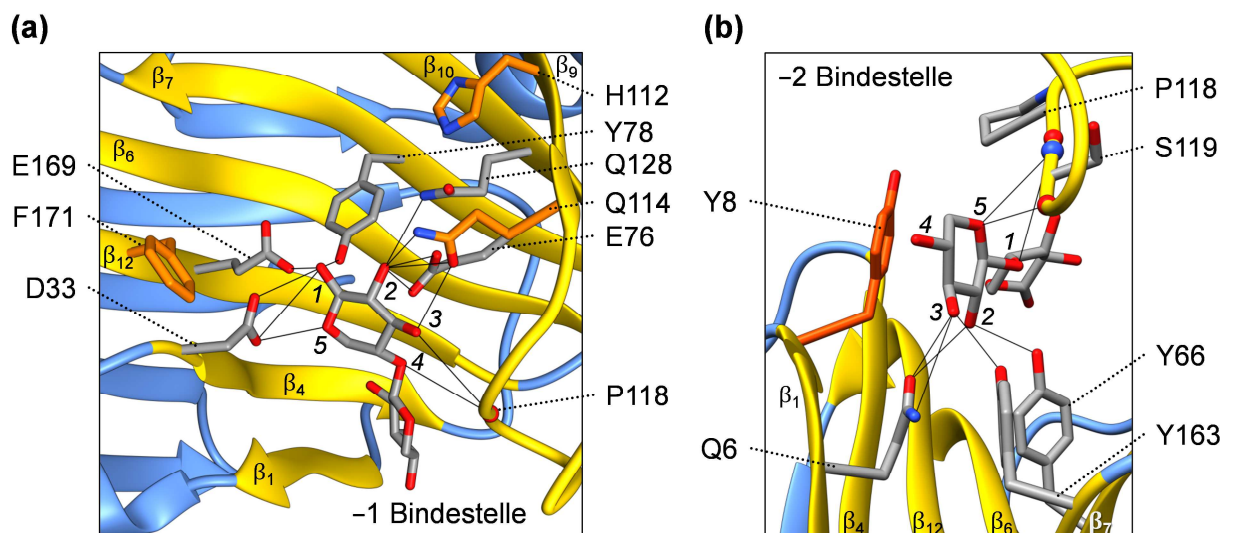


Abbildung 4.10: Xylobiosebindung an der -1 Bindestelle und der -2 Bindestelle von Xyl1. Gelb: Aktives Zentrum mit Xylobiose bindenden Aminosäureresten. Rot/dunkelblau/grau: O-/N-/C-Atome. Schwarze Linien: potentielle Wasserstoffbrücken zu den O-Atomen 1-5 der Xylose (siehe auch Abb. 7.5). Hellblau: restliches Protein. (a) -1 Bindestelle. Orange: nicht konserviert (H112, Q114 und F171). (b) -2 Bindestelle. Orange: konserviert und potentiell Stapelkräfte ausbildend (Y8). Das Modell basiert auf der Xylobiose gebundenen Xylanase XYNA aus *Aspergillus niger* (PDB-Eintrag: 2QZ2).

Das aktive Zentrum bestand aus der -2 und -1 Bindestelle, die in XYNA je eine Xylose binden. Der Rest Q114_{Xyl1} kam nicht in XYNA vor und bildete wahrscheinlich zwei zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen mit dem O2-Atom der Xylose (O2_X) aus. Die Wasserstoffbrücken Q6N_e–O3_X, D33O_{δ2}–O1_X und E76O_{e2}–O2_X hatten eine Distanz von $\geq 4 \text{ \AA}$, was gegen ihre Relevanz sprach, falls das Modell an dieser Stelle zutrefflich war (siehe Abb. 7.5) (Jeffrey 1997). Die Aromaten H112 und F171 waren einzigartig in Xyl1 und lagen in der Peripherie des aktiven Zentrums (Abb. 4.10, Abb. 4.11). Die Stabilisierung von oligomerer

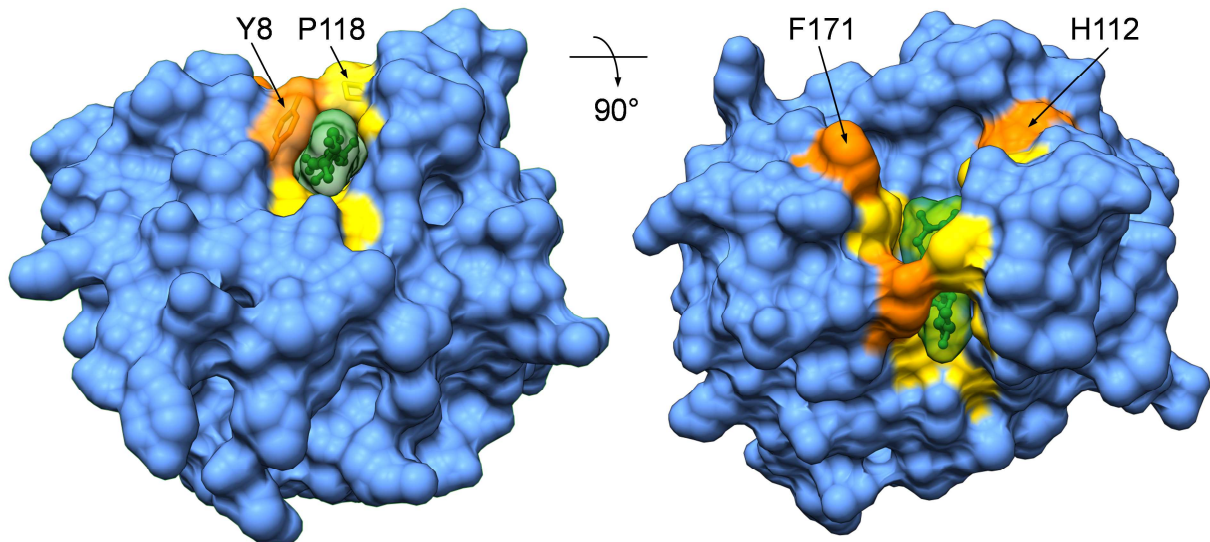


Abbildung 4.11: Oberflächenstruktur des aktiven Zentrums von Xyl1. Gelb: Potentiell Wasserstoffbrücken ausbildende Reste (siehe auch Abb. 7.5). Orange: Potentiell Stapelkräfte ausbildende Aromaten (Y8, H112, F171). Grün: Xylobiose. Blau: restliches Protein. Das Modell basiert auf der Xylobiose gebundenen Xylanase XYNA aus *Aspergillus niger* (PDB-Eintrag: 2QZ2).

Xylose oder Xylan außerhalb der -2 und -1 Bindestelle durch Stapelkräfte ist für GHF 11-Xylanasen beschrieben (Gruber *et al.* 1998, Kumar *et al.* 2013). Die Reste Y8 und P118 schienen die Xylobiose durch Stapelkräfte und respektive sterische Effekte im aktiven Zentrum zu fixieren. Beide Aminosäuren umfassten die Xylobiose mit einem Ringschluss an der Oberseite des aktiven Zentrums (siehe Abb. 4.11). Dies trifft ebenfalls für die homologen Reste der *Aspergillus niger*-Xylanase XYNA und für eine *Bacillus subtilis* GHF 11-Xylanase zu (Vandermarliere *et al.* 2008).

Eine vom aktiven Zentrum abgewandte Xylotriose-Bindestelle unbekannter Funktion war schlecht konserviert (siehe Tab. 7.6). Diese Bindestelle wird bei der Vorlage XYNA in die I-, II- und III-Stelle unterteilt, die je eine Xylose bindet (Vandermarliere *et al.* 2008).

4.4.3 – Substratspezifität, TDH-Strohabbau und Endprodukte

GHF 11-Xylanasen weisen eine auf Xylan beschränkte Substratspezifität auf (Collins *et al.* 2005). Ein Großteil der pilzlichen endo-1,4- β -Xylanasen ist nicht in der Lage, den Substituent α -L-Arabinose freizusetzen. Diese Xylanasen werden in zwei Kategorien unterteilt: Xylanasen der Kategorie 1 spalten nur, wenn die Spaltstelle von β -1,4-Verknüpfungen flankiert ist und die verknüpften Xylosen keine β -1,3-Substituenten tragen. Da das kürzeste akzeptierte Substrat demnach Xylotetraose ist, ist das kleinste Endprodukt Xylobiose. Xylanasen der Kategorie 2 spalten nicht, wenn Xylosen mit β -1,2-/1,3-Substituenten an der β -1,4-Spaltstelle vorkommen. Xylose ist das kleinste Endprodukt (Dekker und Richards 1976, Kuhad und Singh 2007).

Die **Substratspezifität** von Xyl1 wurde hinsichtlich des Polymerabbaus und des Abbaus von 4-MUF oder NP gekoppelten Substraten überprüft. Der Abbau von Arabinoxylan, Birkenxylan und Haferspелzenxylan war positiv. Die Biopolymere Amylose, Arabinan, Chitosan, Cellulose, CMC, Galactan, Galactomannan und β -Glucan (Gerste) wurden nicht gespalten. Ebenfalls wurden keine der 4-MUF oder NP gekoppelten Fette, Furanosen oder Pyranosen abgespalten (α -L-Arabinose, Caprylat, β -D-Cellobiose, β -D-Cellotriose, β -D-Cellotetraose, β -D-Cellopentaose, β -D-Fucose, α -/ β -D-Galactose, α -/ β -D-Glucose, β -(1,3:1,4)-Glucotriose, β -D-Glucuronid, α -D-Mannose, α -L-Rhamnose, β -D-Xylose, β -D-Xylobiose, β -D-Xylotriase).

Der **Abbau von Stroh** wurde nach thermochemischer Vorbehandlung mittels TDH und mechanischer Zerkleinerung getestet. Es lagen sechs unterschiedlich vorbehandelte Strohfraktionen vor (S1-6, siehe Tab. 7.1). Die Standardparameter der TDH waren 0,32-0,33 % (v/v) Salpetersäure, 150-160 °C und 60-90 min. Die Strohfraktion S1 wurde bei einer schonenderen Temperatur von 120 °C behandelt. Die Fraktion S2 wurde nicht mit Salpetersäure vorbehandelt und die Fraktion S6 wurde mit einer erhöhten Menge von 0,5 % (v/v) Salpetersäure supplementiert. Die durch die TDH gelöste Glucose- und Xylosemenge war für die Strohfraktionen S1-2 im Durchschnitt etwa 5-fach geringer konzentriert als für die Fraktionen S3-6. Eine enzymatische Hydrolyse konnte nur mit dem Substrat S1 festgestellt werden (29,3 mg/l freigesetztes Xyloseäquivalent, Abb. 4.12).

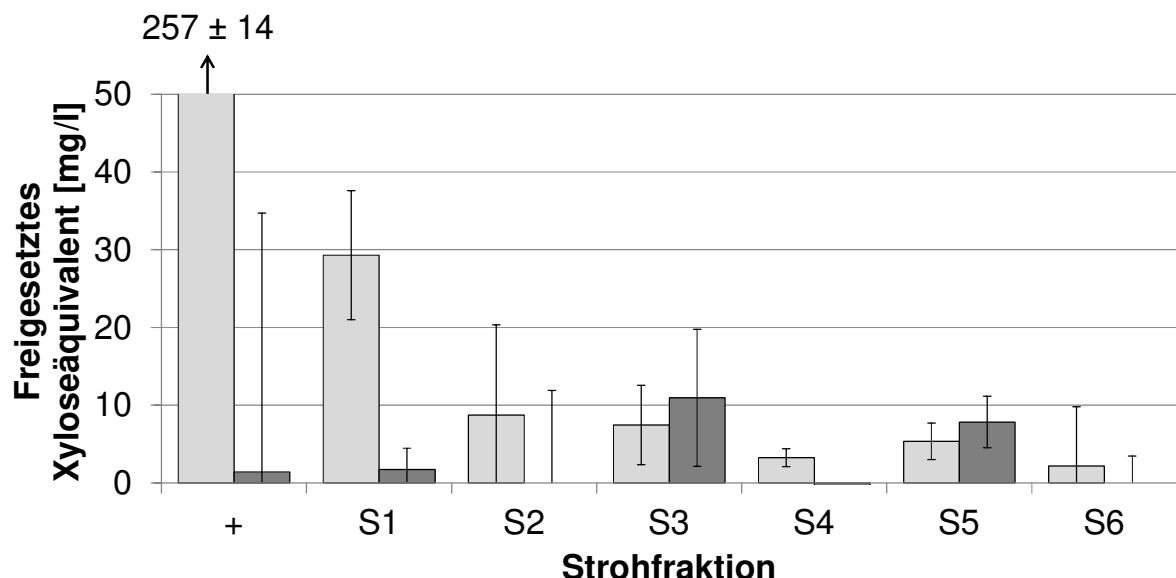


Abbildung 4.12: Abbau von Strohfraktionen durch Xyl1. Inkubation von 0,14 μ g/ml Xyl1 in MU-Puffer (pH 5,3) mit 16,67 g/l thermochemisch behandeltem Stroh (Fraktionen S1-6, Tab. 7.1) bei 50 °C und 750 UpM für 60 min. Die Messung erfolgte mit dem DNSS-Test. Hellgrau: Probe. Dunkelgrau: enzymfreie Negativkontrolle. +: Positivkontrolle (Buchenholzxyylan, 20 min Inkubation).

Im Vergleich zur Positivkontrolle (Buchenholzxyylan) war diese Freisetzung 8,75-fach reduziert. Wurde die Positivkontrolle für 60 min inkubiert, stieg der Faktor nichtlinear auf 16 an

(Daten nicht gezeigt). Das reine Buchenholzxyylan lag zugänglicher vor als das native Strohxyylan und der prozentuale Anteil des Xylans der Fraktion S1 betrug 13,4 %. Dies entsprach einem 7,5-fach reduzierten Gehalt an Strohxyylan bei gleicher Einwaage (Ballmann *et al.* 2013; Dr. Stefan Dröge, PFI (2015) persönliche Kommunikation. Mainz, Pirmasens). Durch die enzymatische Behandlung wurden für die Strohfraktionen S2-6 keine signifikanten Zuckermengen freigesetzt. Die Fraktion S2 wurde säurefrei vorbehandelt und die Fraktionen S3-6 wurden unter Standardparametern hydrolysiert (siehe oben). Bei TDH-Standardbedingungen wurde das Xylan stärker hydrolysiert, als unter schonenden Bedingungen (S3-6: 4,3-fache Abnahme *versus* S1-2: 1,9-fache Abnahme; siehe Tab. 7.1) (Ballmann *et al.* 2013). Die **Spaltprodukte** durch Xyl1 waren mit abnehmender Menge Xylotriase, Xylotetraose, Xylopentaose und Xylobiose (Abb. 4.13).

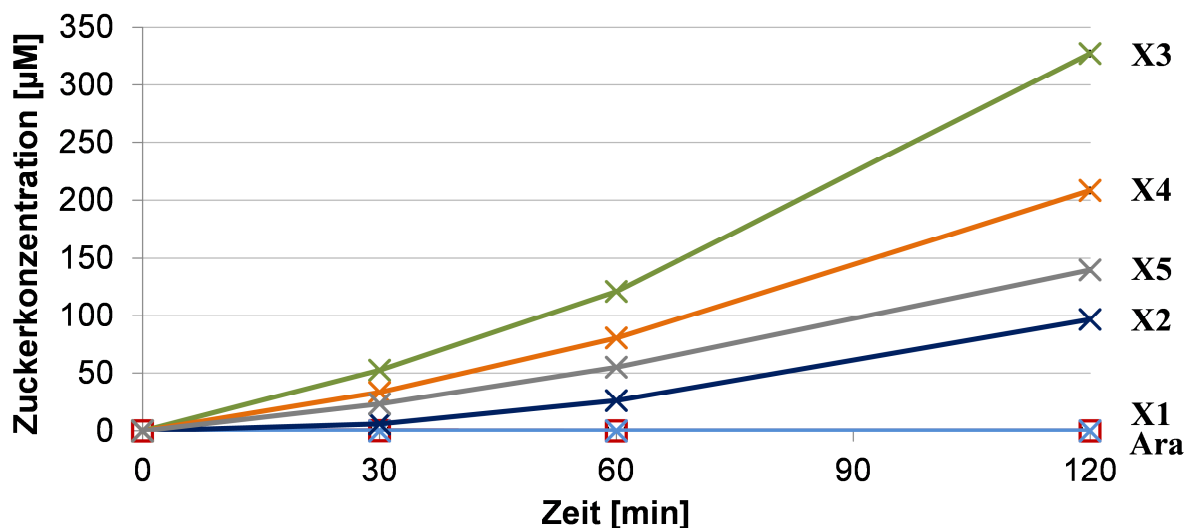


Abbildung 4.13: Messbare Spaltprodukte durch Xyl1. Inkubation von 0,14 µg/ml Xyl1 in MU-Puffer (pH 5,3) mit 16,67 g/l Buchenholzxyylan bei 50 °C und 750 UpM für 0-120 min. Die Messung erfolgte mittels HPLC. Ara (rot): L-Arabinose. X1 (hellblau): Xylose. X2 (dunkelblau): Xylobiose. X3 (grün): Xylotriase. X4 (orange): Xylotetraose. X5 (grau): Xylopentaose.

Größere Produkte waren wahrscheinlich vorhanden, konnten aufgrund des Standards aber nicht erfasst werden. Im Vergleich zum häufigsten Produkt, Xylotriase, lag Xylobiose nach 120 min Inkubation 3,4-fach reduziert vor. Es konnte keine Freisetzung von Xylose oder L-Arabinose gemessen werden. Dieses Muster entsprach der am Anfang des Kapitels erläuterten Kategorie 1, der nicht Arabinose freisetzenden endo-1,4-β-Xylanasen.

4.4.4 – Bestimmung des Temperatur-, pH- und Pufferoptimums

Ein Großteil der bekannten pilzlichen und bakteriellen Xylanasen haben ihr Aktivitätsoptimum im mesophilen Bereich (40-60 °C). Das pH-Optimum pilzlicher Xylanasen liegt in der Regel im Sauren (Collins *et al.* 2005). Für den Großteil der Pilzxylanasen sind inerte Neutralpuffer, wie Good's-Puffer, demnach ungeeignet (Good *et al.* 1966, Ferguson *et al.* 1980).

Das **Temperaturoptimum** von Xyl1 lag bei 50 °C (Abb. 4.14). Die Aktivitätskurve verlief von 0-25 °C und 25-50 °C annähernd linear. Der Temperaturkoeffizient Q_{10} wurde ermittelt und repräsentiert den Aktivitätsmultiplikator bei einer Erhöhung um 10 °C (Ahlgren 1987).

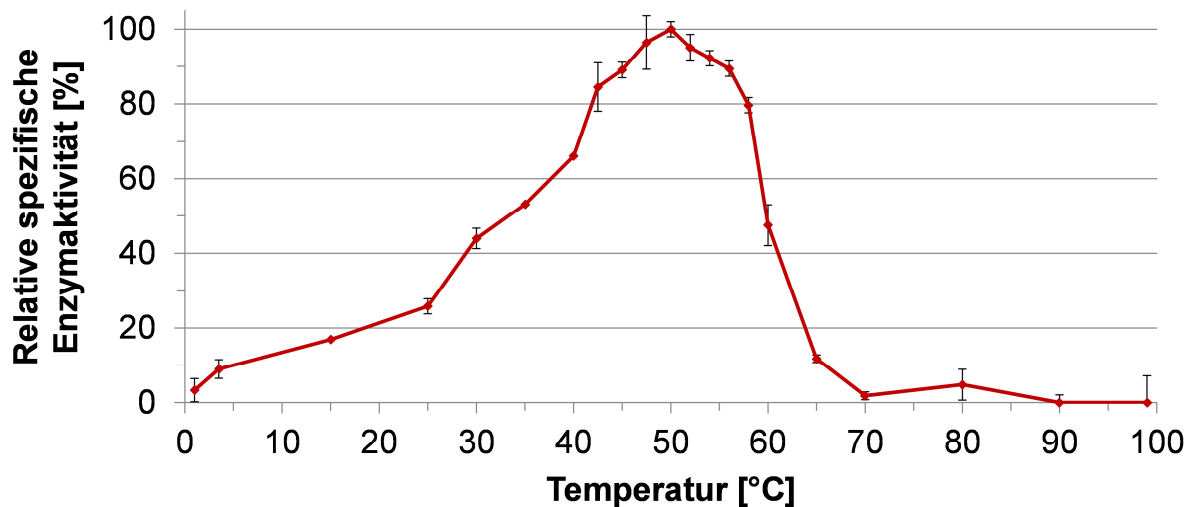


Abbildung 4.14: Ermittlung des Temperaturoptimums von Xyl1. RBB-Xylantest mit Natriumphosphatpuffer A bei 1-99 °C für 15 min. Die Proben wurden vor dem Reaktionsstart für je 2,5 min vorgewärmt. Die maximale spezifische Aktivität bei 50 °C wurde als 100 % definiert.

Im Bereich von 3,5-50 °C lag der Q_{10} -Wert bei 1,68. In den Abschnitten von 3,5-25°C und 25-50°C unterteilte sich der Q_{10} -Wert auf 1,64 und respektive 1,71. Auf das Temperaturoptimum folgte bis 58 °C eine geringe Aktivitätsabnahme mit dem Q_{10} -Wert 0,75. Im Bereich 58-70 °C sank die Aktivität mit dem Q_{10} -Wert 0,04 rapide auf fast null.

Die **Temperaturstabilität** wurde bei 50-57,5 °C bestimmt. Die Xylanase zeigte nach einer Vorbehandlungszeit von 2,5-120 min bei 50 und 52,5 °C keine Aktivitätsverluste (Abb. 4.15).

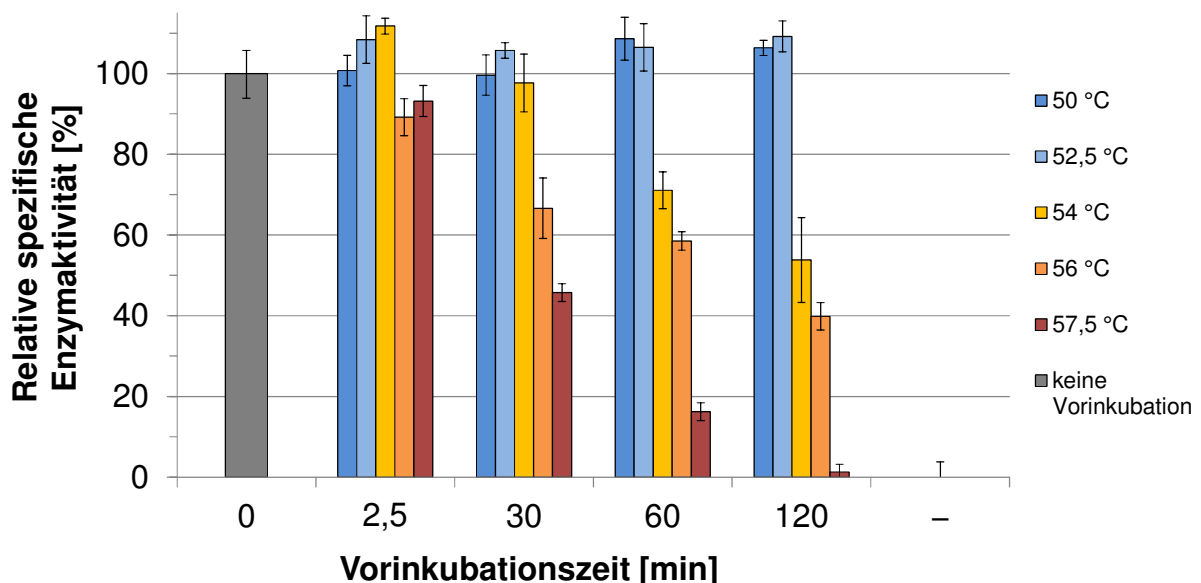


Abbildung 4.15: Ermittlung der Temperaturstabilität von Xyl1. RBB-Xylantest mit Natriumphosphatpuffer A bei 50 °C für 15 min. Die Proben wurden vor dem Reaktionsstart für 2,5-120 min bei verschiedenen Temperaturen vorinkubiert: 50 °C (dunkelblau), 52,5 °C (hellblau), 54 °C (gelb), 56 °C (orange) oder 57,5 °C (rot). 100 % Aktivität wurde als spezifische Aktivität einer nicht vorinkubierten Probe definiert (grau, 0 min). -: Negativkontrolle (Enzym für 60 min bei 99 °C vorinkubiert).

Das **pH-Optimum** der Xylanase lag im leicht Sauren bei pH 5,3 (Abb. 4.16). Das Aktivitätsmaximum war nicht in Sockelform – eine deutliche Erhöhung gegenüber den Nachbarwerten

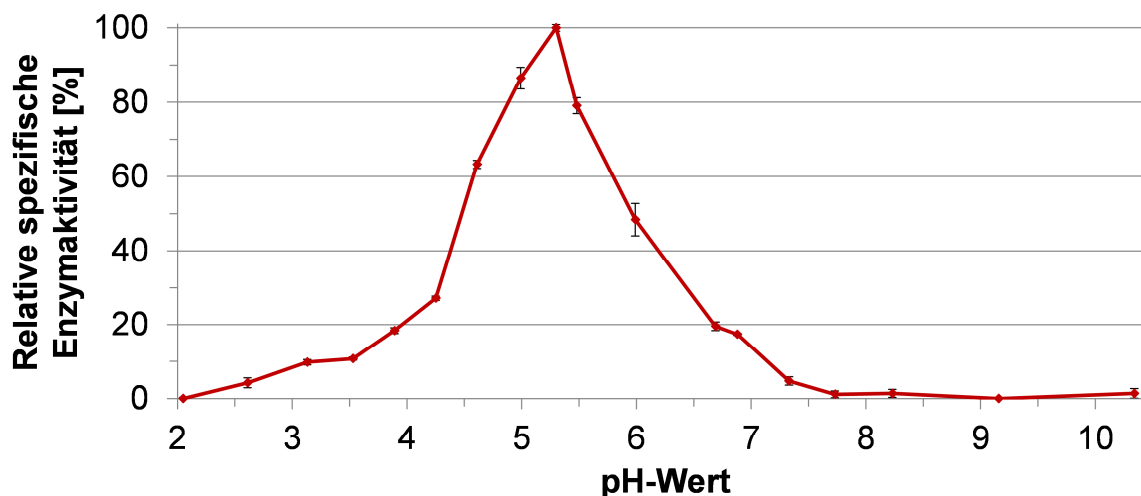


Abbildung 4.16: Ermittlung des pH-Optimums von Xyl1. RBB-Xylantest mit 0,5x Universalpuffer (pH 2,05-10,34) bei 50 °C für 15 min. Die Proben wurden vor dem Reaktionsstart für je 2,5 min vorgewärmt. Die maximale spezifische Aktivität bei pH 5,3 wurde als 100 % definiert.

war messbar (+13,5 und +21 %). Mehr als 50 % Enzymaktivität war im engen pH-Bereich von 4,5-6 messbar und mehr als 20 % im Intervall von pH 4-6,7. Ein vollständiger Aktivitätsverlust lag bei pH-Werten von etwa < 2,1 und > 7,7 vor.

Puffersysteme, die für pH 5,3 geeignet waren, wurden mit Xyl1 versetzt und auf Xylanaseaktivität getestet. Die größtmögliche gemessene Aktivität bot der trishaltige Universalpuffer nach Skujins *et al.* (1962) (Abb. 4.17, U).

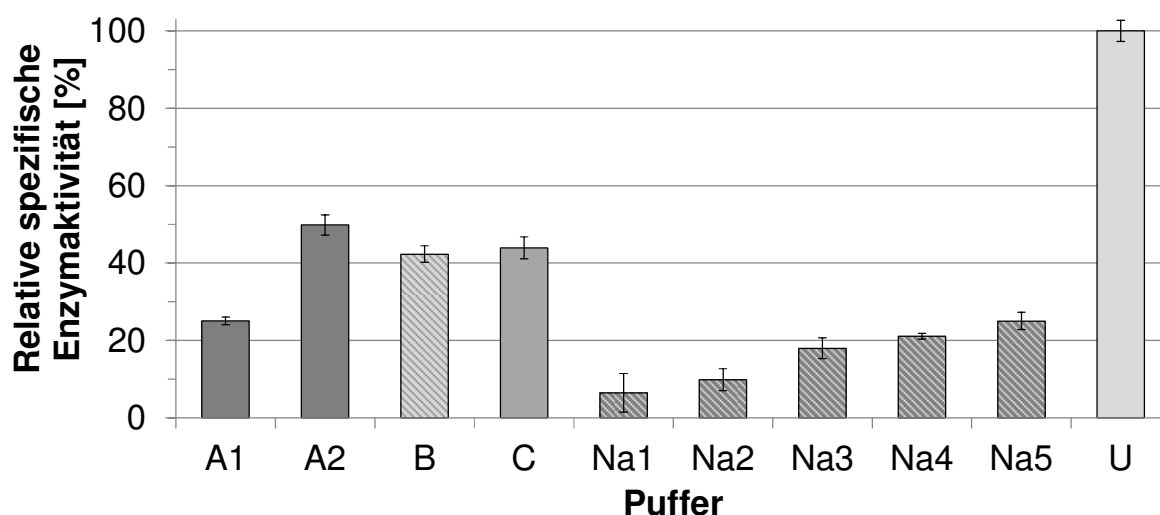


Abbildung 4.17: Ermittlung der optimalen Pufferbedingungen für Xyl1. RBB-Xylantest mit zehn verschiedenen Puffern (pH 5,3; siehe auch Tab. 3.3) bei 50 °C für 15 min. **A1-2:** Acetatpuffer, dunkelgrau. A1 = 0,1 M Acetatpuffer. A2 = 0,1 M Ammoniumacetatpuffer. Siehe auch Na4. **B:** 50 mM Bernsteinsäurepuffer, hellgrauschraffiert. **C:** 0,1 M Citratpuffer, grau. Siehe auch Na1. **Na1-5:** Natriumhaltige Puffer, grauschraffiert. Na1 = Citronensäure-Natriumphosphatpuffer (45 mM, 110 mM). Na2 = 66,7 mM Kalium-/Natriumphosphatpuffer. Na3 = Natriumphosphatpuffer B (50 mM). Na4 = 0,2 M Natriumacetatpuffer. Na5 = Natriumphosphatpuffer A (0,1 M). **U:** Universalpuffer, hellgrau (20,3 mM Borsäure, 14,6 mM Citronensäure, 20,1 mM Maleinsäure, 21,5 mM Tris). Die maximale spezifische Aktivität mit Universalpuffer wurde als 100 % definiert.

Mit fast 50 % Aktivität stellte 0,1 M Ammoniumacetatpuffer (A2) das zweitbeste Puffersystem dar, gefolgt von 0,1 M Citratpuffer (C, 44 %) und 50 mM Bernsteinsäurepuffer (B, 42 %). Die Enzymaktivitäten sanken unter Verwendung der Puffer A1 und Na3-5 auf 18-25 %. Der 66,7 mM Natrium-/Kaliumphosphatpuffer (Na2) ermöglichte eine geringe Aktivität von 10 %. Die Aktivität in Citronensäure-Natriumphosphatpuffer (Na1) war mit 6,5 % am geringsten.

Bei Zugabe von 0,2 M NaCl zu einer inkubierten und gestoppten Kontrollprobe in MU-Puffer (15 min, 50 °C, pH 5,3) entstand eine Abweichung von -3-10 %. Die tatsächliche Aktivität in natriumhaltigen Puffern (Na1-5) könnte demnach um bis zu 1,1-fach erhöht sein. Der Grund lag vermutlich in einer durch Natrium verstärkten Fällung der RBB-Oligomere. Bei pH-Justierungen während der Pufferherstellung kamen nur geringe NaOH-Mengen zum Einsatz (ca. 10-20 mM).

Eine **erste Modifizierung des Universalpuffers** wurde hinsichtlich dessen Zusammensetzung durchgeführt. Der Puffer sollte bezüglich der Xylanaseaktivität und Anwendungssicherheit optimiert werden. Getestete Modifikationen waren die Streichung von Borsäure und/oder Citronensäure. Borsäure kandidiert gemäß der EU-Verordnung 1907 (REACH) als Substanz sehr hoher Besorgnis und war demnach für Routineuntersuchungen ungeeignet (EU 2006, ECHA 2010). Citronensäure schien Hemmwirkungen zu besitzen (siehe Abb. 4.17, Na1). Maleinsäure verblieb im Puffer, um einen pH-Wert von 5,3 zu ermöglichen (siehe Abb. 4.16). Die Entfernung von Bor- oder Citronensäure führte zu einer Aktivitätssteigerung auf 164 % oder 184 % (Abb. 4.18). Wurden beide Substanzen nicht eingesetzt, stieg die Aktivität auf 197 % an.

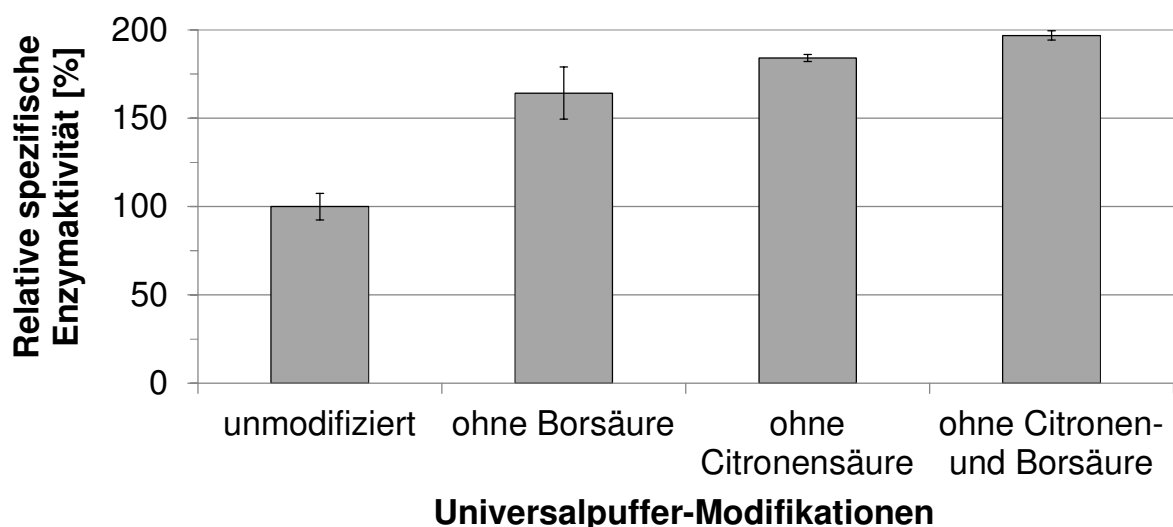


Abbildung 4.18: Auswirkung von Universalpuffer-Modifikationen auf die Xyl1-Aktivität. RBB-Xylantest mit Universalpuffer-Modifikationen (pH 5,3) bei 50 °C für 15 min. Die Aktivität in unmodifiziertem Universalpuffer (20,3 mM Borsäure, 14,6 mM Citronensäure, 20,1 mM Maleinsäure, 21,5 mM Tris) wurde als 100 % definiert.

Die **zweite Modifizierung des Universalpuffers** erfolgte hinsichtlich dessen Konzentration. Als Grundlage diente der modifizierte Universalpuffer ohne Bor- und Citronensäure (MU-Puffer, siehe Abb. 4.18). Relativ zum MU-Puffer verursachte der 2x konzentrierte MU-Puffer eine kaum signifikante Aktivitätssteigerung auf 103 % (Abb. 4.19).

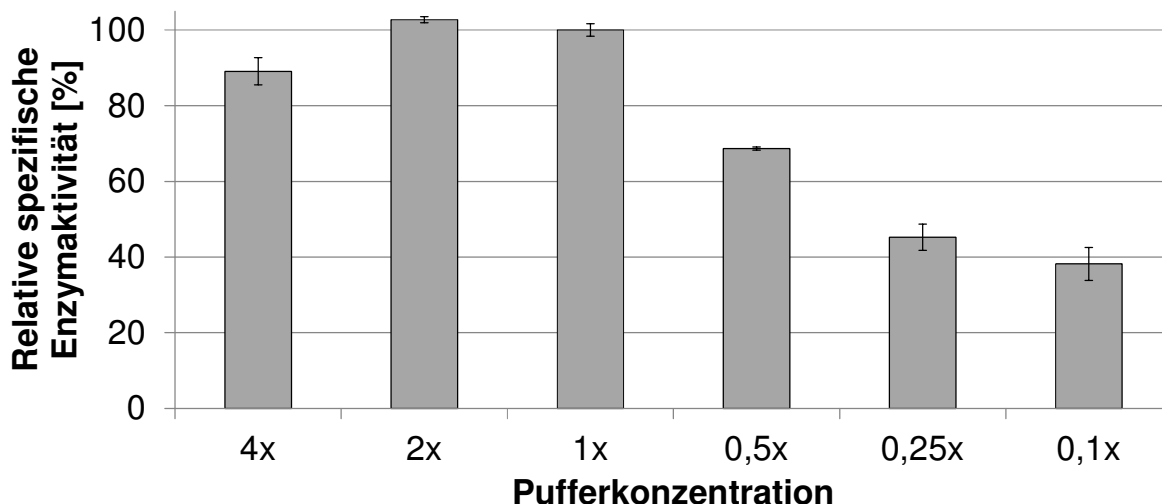


Abbildung 4.19: Auswirkung verschiedener Konzentrationen von modifiziertem Universalpuffer auf die Xyl11-Aktivität. RBB-Xylantest bei 50 °C für 15 min mit modifiziertem Universalpuffer (pH 5,3) unterschiedlicher Konzentrationen/Verdünnungen. Die Aktivität in modifiziertem 1x Universalpuffer (21,5 mM Tris, 20,1 mM Maleinsäure) wurde als 100 % definiert.

Eine reduzierte Enzymaktivität wurde bei Benutzung von 4x konzentriertem MU-Puffer (89 %) und von 0,5x verdünntem MU-Puffer (69 %) gemessen. Die Aktivität sank mit zunehmenden Verdünnungstufen (0,25x und 0,1x) weiter auf 45 % und 38 %.

4.4.5 – Enzymkinetik

Die Ermittlung von Xylanasekinetiken per DNSS-Test wird seit der Standardisierung durch Bailey *et al.* (1992) gängig praktiziert. Eine solide Basis an verfügbaren Referenzdaten ist in der Literatur aufgearbeitet (Beg *et al.* 2001, Motta *et al.* 2013). Der größte bekannte V_{\max} -Wert für Xylan liegt bei 96,7 U und ist einer Xylanasemutante des Pilzes *Neocallimastix* sp. zugehörig (Chen *et al.* 2012). Typische K_m -Werte von Hefexylanasen liegen bei 5,3-7,6 g/l Xylan (Beg *et al.* 2001). Für den DNSS-Test sind hohe Fehlerraten durch DNSS-Überreduktion, ausgehend von Oligosaccharid-Überoxidation, bekannt (McIntyre *et al.* 2013). Deshalb wurden K_m und V_{\max} zusätzlich mit dem RBB-Xylantest bestimmt, der von Bailey *et al.* (1992) als Alternative empfohlen wird.

Die aus dem Iterationsverfahren stammenden Gleichungen konnten linear und nichtlinear aufgetragen werden (Abb. 4.20). Die Annäherungen waren statistisch sehr gut bis gut unterstützt: Das Bestimmtheitsmaß (R^2) für RBB-Xylan und Buchenholzxytan (DNSS-Test) betrug 0,997 und respektive 0,923. Der V_{\max} -Wert lag für RBB-Xylan bei 663,4 RU und für

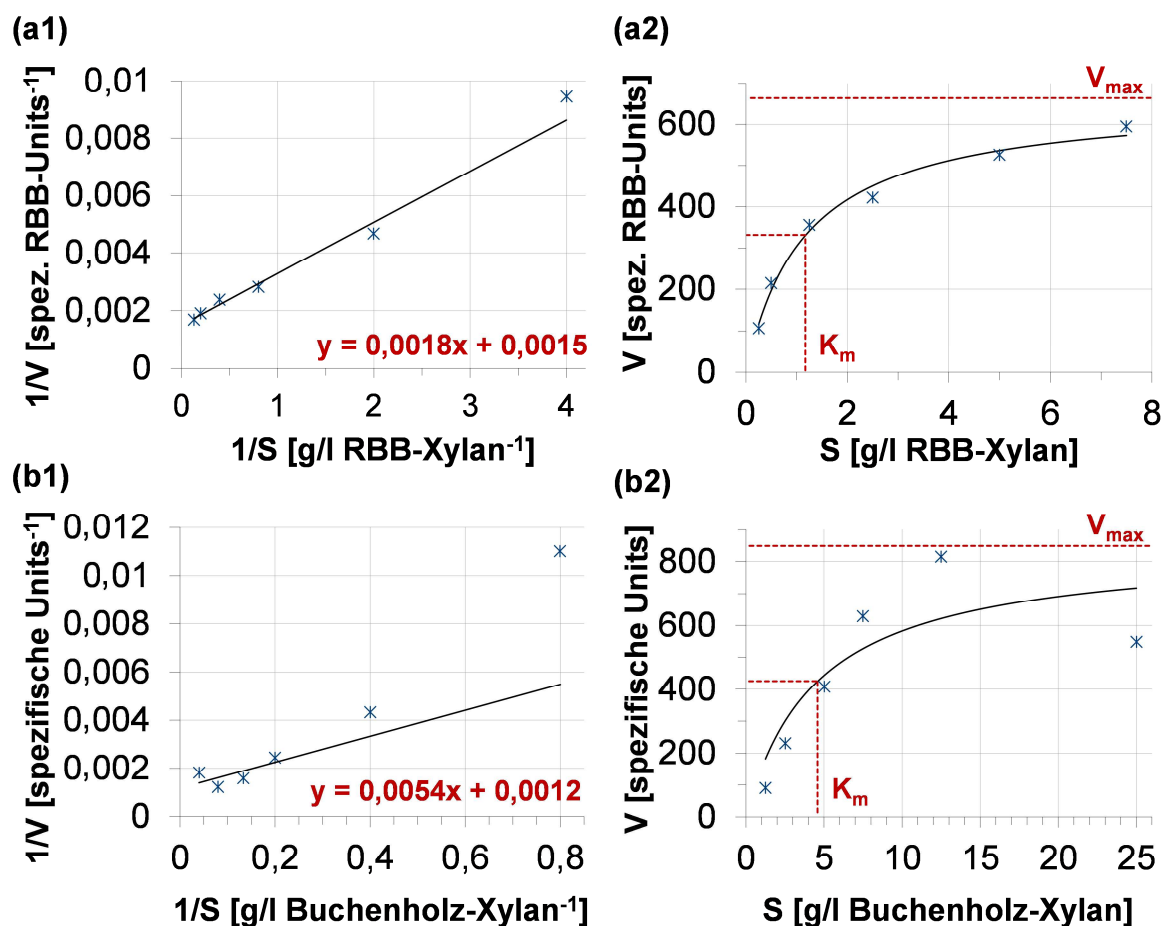


Abbildung 4.20: Substratkinetik der Xylanase Xyl11. Inkubation in MU-Puffer (pH 5,3) mit 0-25 g/l Xylan bei 50 °C für 15 min. **(a)** RBB-Xylankinetik mittels RBB-Xylantest. **(b)** Buchenholzxylin-Kinetik mittels DNSS-Test auf reduzierende Zuckergruppen. **1:** Lineare Auftragung. **2:** Nichtlineare Auftragung.

Buchenholzxylin bei 848,8 U. Der K_m -Wert von RBB- und Buchenholzxylin war 1,18 g/l und respektive 4-fach erhöht, nämlich 4,57 g/l. Die Kinetik in 0,5x MU-Puffer mit RBB-Xylan ergab einen K_m -Wert von 1,19 g/l RBB-Xylan (Daten nicht gezeigt). Substrathemmung konnte durch RBB-Xylan bei Konzentrationen von 12,5 und 25 g/l RBB-Xylan beobachtet werden (470,2 RU und 344,6 RU). Die Hemmung durch Buchenholzxylin trat bei 25 g/l Xylan auf (548,4 U). Dieser Wert wurde in die V_{max} -Iteration einbezogen. Zwischen 0,25 bis 12,5 g/l Xylan war keine signifikante Abflachung der Steigung und somit kein Scheitelpunkt der Enzymaktivität erkennbar. Aufgrund dieser hohen Steigung wäre ohne Berücksichtigung des substratgehemmten Aktivitätswertes ein unrealistisch hoher V_{max} -Wert iteriert worden.

4.4.6 – Hemmung und Aktivierung der Xylanaseaktivität durch Substanzen

Weizenstroh kann durch thermochemische Verfahren (z. B. TDH) und enzymatische Saccharifikation hydrolysiert und zu Ethanol vergoren werden. Zusätzlich zu den erwünschten Monosacchariden entstehen beim thermochemischen Lignocelluloseabbau diverse Nebenprodukte, die auf den Ligninbausteinen basieren (Olsson 2007, Ballmann *et al.* 2013, Megges

2016). Die Lignin-Grundbausteine sind Coniferylalkohol, Sinapylalkohol und Cumarylalkohol. Weitere Ligninbestandteile sowie dessen Abbauprodukte sind p-Cumarsäure, Ferulasäure, 4-HB, Vanillin und Vanillinsäure. Beim Ligninabbau können zudem die Substanzen Benzoesäure, Phenol und Syringaldehyd gebildet werden (Sun *et al.* 2000, Funk 2007, Kleinert und Barth 2008, Wang *et al.* 2014). Aus Hexosen und Pentosen wird oft 5-HMF und respektive Furfural gebildet (Ballmann *et al.* 2013). Ein relevanter Baustein von Graszellwänden und Weizenkorn ist die Sinapinsäure (Bunzel *et al.* 2003). Endprodukte des enzymatischen Strohabbaus sind Xylose, Xylobiose und L-Arabinose (Xylan) sowie Glucose und Cellobiose (Cellulose). Eine hohe Toleranz von Xyl1 gegenüber diesen potentiellen Hemmstoffen ist für die Applikation in Bioraffinerien von Relevanz (Bon und Ferrera 2007, Qi *et al.* 2013). Als Kategorisierungsmaß der Hemmwirkung wurde die inhibitorische Substanzkonzentration, die zu 50 % Aktivitätsverlust führte, bestimmt (IC_{50}). Die Hemmkategorien lauteten schwach, moderat, stark, sehr stark und die zugehörigen IC_{50} -Werte waren > 1 M; 0,1-1 M; 0,05-0,1 M; $< 0,05$ M.

Die Toleranz gegenüber Phenol und Phenolderivaten aus Lignin ist in Abb. 4.21 gezeigt.

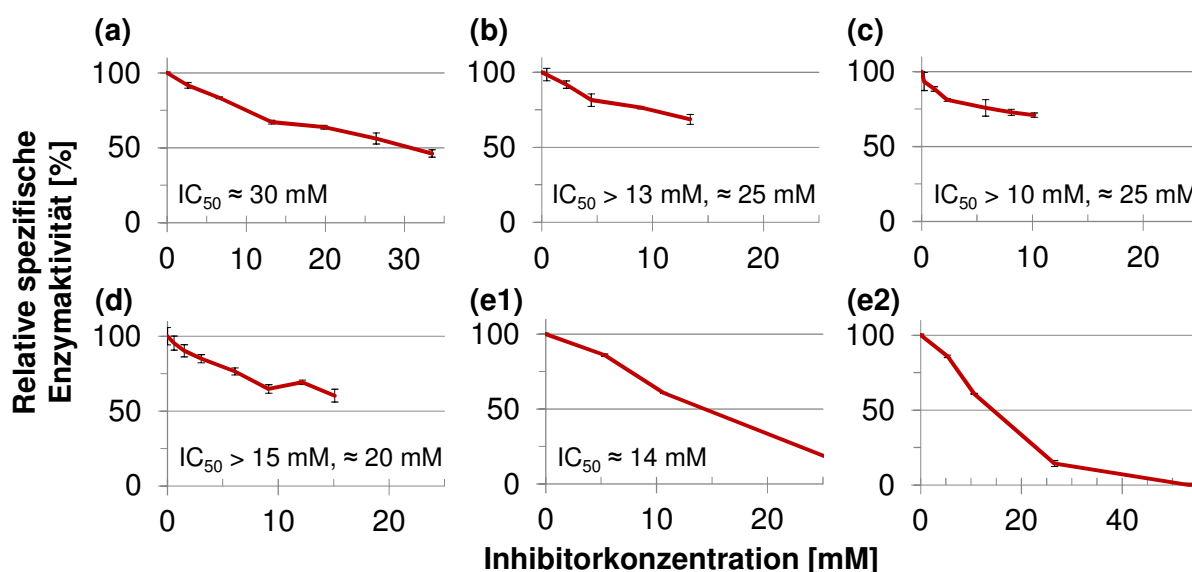


Abbildung 4.21: Hemmung von Xyl1 durch Lignin-assoziierte Phenolderivate und Phenol. RBB-Xylantest mit MU-Puffer (pH 5,3) bei 50 °C für 15 min. Die getesteten Substanzen sind in aufsteigender Reihenfolge nach zunehmender Hemmwirkung sortiert. (a) Vanillinsäure. (b) Sinapinsäure. (c) Ferulasäure. (d) p-Cumarsäure. (e1, e2) Phenol (unterschiedliche Achsenskalierung). Rot: sehr starke Hemmung ($IC_{50} < 50$ mM). ≈: extrapoliert.

Getestete Derivate des Phenols waren Vanillinsäure, Sinapinsäure, Ferulasäure und p-Cumarsäure. Deren Hemmwirkung war sehr stark ($IC_{50} < 50$ mM) und nahm mit aufsteigender Nennung zu. Phenol war der stärkste gemessene Hemmstoff mit einem extrapolierten IC_{50} -Wert bei etwa 14 mM. Phenol ist ein sehr apolares Lösungsmittel, das zur Proteinfällung verwendet wird (Sambrook und Russel 2001).

Die Hemmwirkung von Benzaldehyd ähnlichen Stoffen und von Lignin-Grundbausteinen ist in Abb. 4.22 dargestellt.

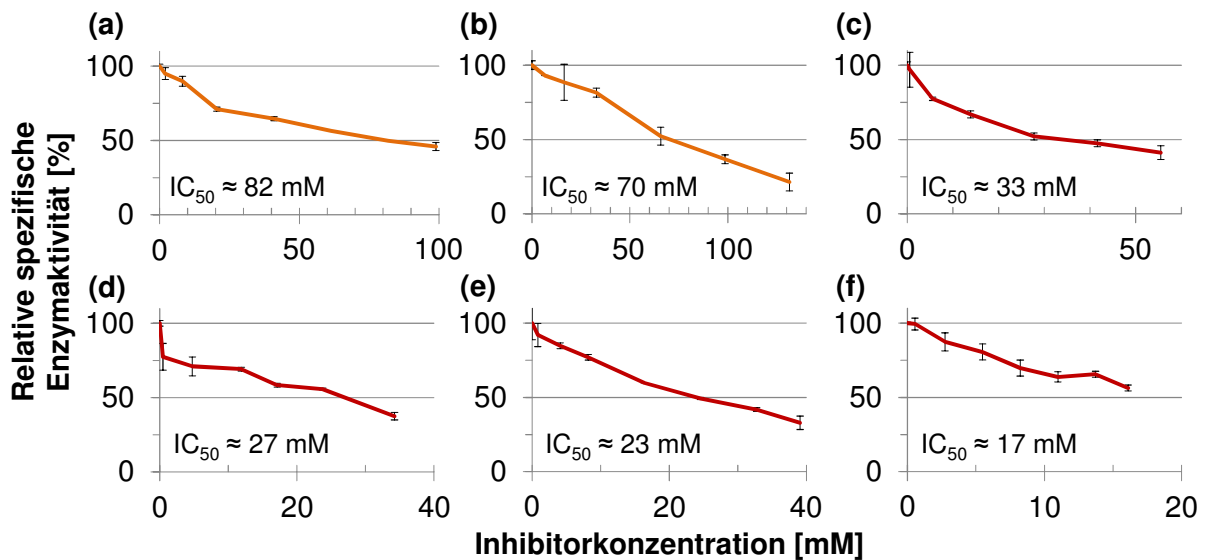


Abbildung 4.22: Hemmung von Xyl1 durch Monolignole und Benzaldehyd ähnliche Substanzen. RBB-Xylantest mit MU-Puffer (pH 5,3) bei 50 °C für 15 min. Die getesteten Substanzen sind in aufsteigender Reihenfolge nach zunehmender Hemmwirkung sortiert. (a) 4-HB. (b) Vanillin. (c) Coniferylalkohol. (d) Sinapylalkohol (80 %). (e) Benzoesäure. (f) Syringaldehyd. Orange: starke Hemmung ($IC_{50} = 50-100$ mM). Rot: sehr starke Hemmung ($IC_{50} < 50$ mM). \approx : extrapoliert.

4-HB und Vanillin hemmten stark ($IC_{50} = 50-100$ mM). Die Substanzen Coniferylalkohol, Sinapylalkohol (80 %), Benzoesäure und Syringaldehyd hemmten sehr stark und die Wirkung nahm in der genannten Reihenfolge zu. Alle Substanzen sind, wie die sehr stark hemmenden Phenolderivate, apolar (siehe Abb. 4.21).

Neben Ethanol und den TDH-Zuckerderivaten 5-HMF und Furfural wurden auch Borsäure und Tween 80 auf Hemmwirkung getestet (Abb. 4.23).

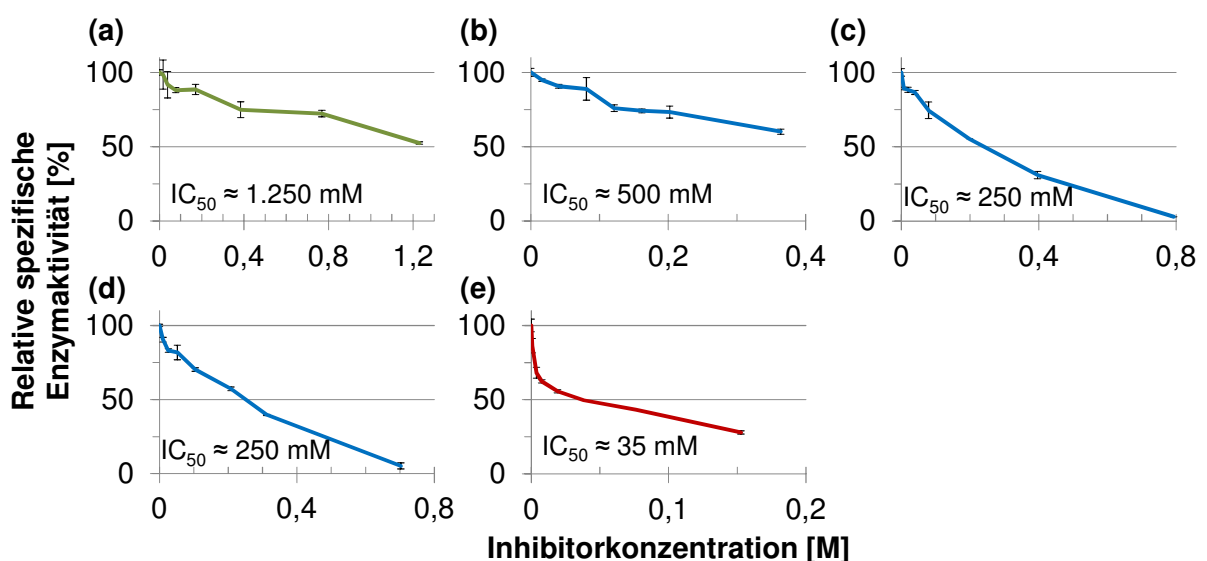


Abbildung 4.23: Hemmung von Xyl1 durch Zuckerderivate der Thermodruckhydrolyse, Borsäure, Ethanol und Tween 80. RBB-Xylantest mit MU-Puffer (pH 5,3) bei 50 °C für 15 min. Die getesteten Substanzen sind in aufsteigender Reihenfolge nach zunehmender Hemmwirkung sortiert. (a) Ethanol. (b) Borsäure. (c) 5-HMF. (d) Furfural. (e) Tween 80. Grün: schwache Hemmung ($IC_{50} > 1$ M). Blau: moderate Hemmung ($IC_{50} = 0,1-1$ M). Rot: sehr starke Hemmung ($IC_{50} < 50$ mM). \approx : extrapoliert.

Die Hemmwirkung von Ethanol war schwach ($IC_{50} > 1$ M). Borsäure, 5-HMF und Furfural hemmten moderat ($IC_{50} = 0,1-1$ M). Die Hemmwirkung nahm mit aufsteigender Nennung zu. Tween 80 hemmte sehr stark, was sich in Bezug auf das relativ hohe MW aber relativierte ($M = 1.310$ g/mol, Lu *et al.* 2015).

Der Einfluss von Xylanase- und Cellulaseendprodukten sowie von Lactose auf die Xylanaseaktivität ist in Abb. 4.24 dargestellt.

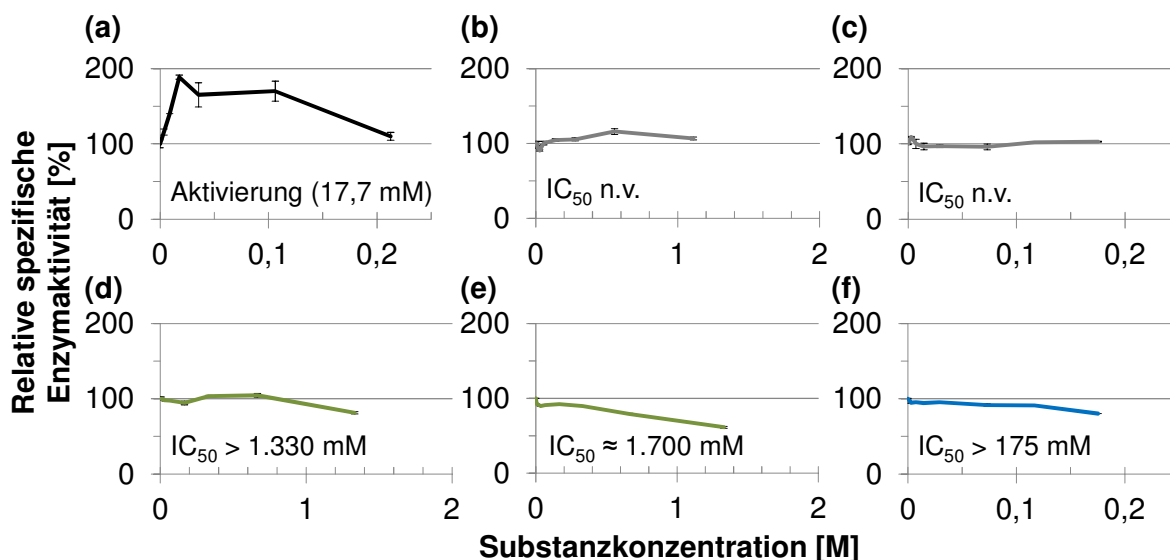


Abbildung 4.24: Wirkung von Xylan-/Cellulose-Abbauprodukten und Lactose auf Xyl1. RBB-Xylantest mit MU-Puffer (pH 5,3) bei 50 °C für 15 min. Die getesteten Substanzen sind in aufsteigender Reihenfolge nach zunehmender Hemmwirkung sortiert. (a) Xylobiose. (b) Glucose. (c) Cellobiose. (d) Xylose. (e) L-Arabinose. (f) Lactose. Schwarz: Aktivierung. Grau: Keine signifikante Wirkung. Grün: schwache Hemmung ($IC_{50} > 1$ M). Blau: moderate Hemmung ($IC_{50} = 0,1-1$ M). n.v.: nicht vorhanden. ≈: extrapoliert. >: weit über.

Xylobiose verursachte eine Aktivierung deren Maximum bei 17,7 mM Xylobiose und 187 % Enzymaktivität lag. Glucose und Cellobiose zeigten keine erkennbare Hemmwirkung. Die Hemmung durch Xylose und L-Arabinose war schwach ($IC_{50} > 1$ M). Lactose hemmte moderat ($IC_{50} 0,1-1$ M).

Eine **Aktivierung durch Xylobiose** ist für keine bekannte Xylanase beschrieben. Aus diesem Grund sollte die gemessene Aktivierung mit dem DNSS-Test bestätigt werden (Abb. 4.25).

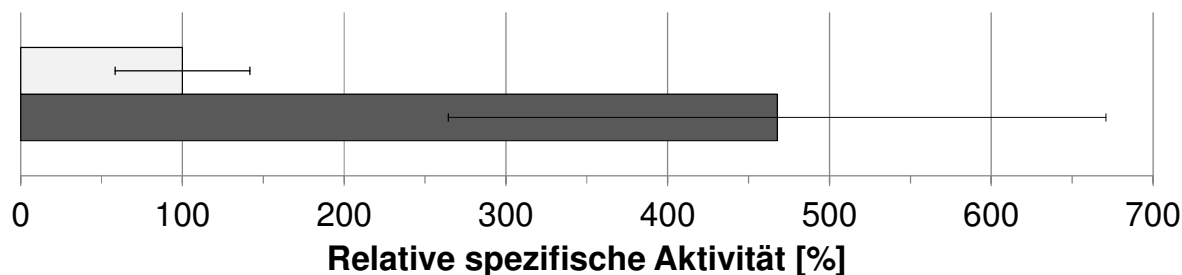


Abbildung 4.25: Aktivierung der Xyl1-Aktivität durch 17,7 mM Xylobiose. Die Messung wurde mit dem DNSS-Test durchgeführt. Die Inkubation erfolgte in MU-Puffer (pH 5,3) mit 16,67 g/l Buchenholzxyylan bei 50 °C und 750 UpM für 15 min. Die homogene Xylansuspension wurde nach dem Autoklavieren gewaschen, um gelöste Zucker zu entfernen. Hellgrau: ohne Xylobiose. Dunkelgrau: Zusatz von 17,7 mM Xylobiose. Negativkontrollen und Blankwerte wurden gemessen und sind subtrahiert.

Ein Zusatz von 17,7 mM Xylobiose verursachte eine Steigerung der Aktivität auf 468 %. Im Vergleich zum RBB-Xylantest war der beobachtete Aktivierungseffekt demnach 2,5-fach erhöht (siehe Abb. 4.24). Da eine äquimolare Xylobiosemenge auch in den Negativkontrollen und Blanks vorhanden war, konnte eine Verfälschung der DNSS-Messdaten durch Xylobiose-Überoxidation ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 4.4.5, McIntyre *et al.* 2013). Eine hohe Standardabweichung konnte für die xylobiosehaltige Probe beobachtet werden. Diese schnitt sich nicht mit dem Fehler des Referenzwertes – die beobachtete Aktivitätssteigerung blieb demgemäß auch bei der Annahme der Maximalfehler bestehen. Zudem glich der Quotient „(Enzymaktivität / Messfehler)“ etwa dem Referenzwert (2,31; Referenz: 2,38).

5. – Diskussion

5.1 – Hefen in ligninreichen Habitaten: Kontinuität und Polysaccharidabbau

Lignocellulosereiche Biotop von Hefen sind vielfältig: Baumrinden, baumansässige Pilze, Blätter, Waldböden, Därme und Gallerien holzfressender Insekten sowie das Nager- und Pferdecaecum werden als Isolierungsquellen beschrieben (van Uden *et al.* 1958, Callaham und Shifrine 1960, Spencer und Spencer 1997, Sláviková und Vadkertiová 2000, Vega und Blackwell 2005, Sláviková *et al.* 2009, Naumov *et al.* 2013). Hefen unterstützen holzfressende Insekten beim Verdau von Pflanzenmaterial und der Synthese essentieller Substanzen (Spencer und Spencer 1997, Vega und Blackwell 2005). Der Termitendarm enthält eine Vielzahl verschiedener mikrobieller Symbionten. Neben der gut beschriebenen Gemeinschaft der Bakterien, Archaea und Flagellaten wird über Hefen nur selten berichtet und ihr lignocellulolytisches Potential ist kaum erfasst. Alle in der Literatur beschriebenen Hefearten aus Termitendärmen sind im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden (siehe Tab. 4.1) (Prillinger *et al.* 1996, Schäfer *et al.* 1996, Suh *et al.* 2005, Yoro *et al.* 2014, Brune 2014).

5.1.1 – Die Darmhefen von *Mastotermes darwiniensis*

Insgesamt sind 10 Stämme der Art *Apiotrichum mycotoxinivorans*, 57 *Candida tropicalis*-Stämme und 25 *Sugiyamaella mastotermis*-Stämme bekannt, die mit *Mastotermes darwiniensis* assoziiert sind. Die Isolierungen aus dem Darm und dem Nestmaterial sind in einem Zeitraum von 0,5 bis 2 Jahren unabhängig gelungen. Weitere Isolierungen von *Apiotrichum mycotoxinivorans* und *Sugiyamaella mastotermis* aus *M. darwiniensis* reichen 20 Jahre zurück (Prillinger *et al.* 1996, Molnar *et al.* 2004). Diese Darmgemeinschaft kann folglich als konstant angenommen werden. *Candida tropicalis* wird zudem als Darmhefe der Termiten *Macrotermes subhyalinus* beschrieben und der Darm der Termiten *Reticulitermes flavipes* enthält ein *Candida tropicalis*-Protein (Bauwens *et al.* 2013, Yoro *et al.* 2014). Eine speziessübergreifende Besiedlung verschiedener Termitenarten durch *C. tropicalis* könnte demnach möglich sein.

Candida tropicalis hat vermutlich keine Beteiligung an der Lignocellulosespaltung in *Mastotermes darwiniensis*. Cellulolytische *C. tropicalis*-Stämme sind bekannt (Sulman und Rehman 2013). *Apiotrichum mycotoxinivorans* sekretiert unter *in vitro*-Bedingungen eine Cellulase und könnte *Mastotermes darwiniensis* beim Celluloseabbau unterstützen. *Sugiyamaella mastotermis* ist aufgrund seiner hemicellulolytischen Eigenschaften wahrscheinlich an der Xylanspaltung im Hinterdarm beteiligt (siehe Kapitel 5.2.3 und 5.3.2).

5.1.2 – Verbreitung von Hefen im Darm von Termiten und einer holzfressenden Schabe

Mit Insekten assoziierte Hefen sind nicht in einer einzelnen monophyletischen Gruppe (Klade) konzentriert, sondern über den gesamten Hefestammbaum verteilt. Im Hefestammbaum gibt es Kladen nahe verwandter Arten, die hauptsächlich mit Insekten assoziiert sind. Deren Wirte müssen nicht, aber können verwandt sein (Suh *et al.* 2005).

Die Mitglieder der *Candida membranifaciens*-Klade sind oft mit Insekten assoziiert. In der Literatur wird *Candida membranifaciens* als Darmbewohner der Termiten *Zootermopsis angusticollis* und vieler Insekten beschrieben. Dies kann im Rahmen dieser Arbeit durch die Identifikation von 13 *Candida membranifaciens*-Stämmen aus *Z. angusticollis* bestätigt werden. Ebenfalls sind drei artgleiche Stämme aus der Termiten *Odontotermes distans* bekannt. Es wird diskutiert, ob die Hefe mutualistischer oder symbiotischer Rolle ist (Suh *et al.* 2005).

Die Gattung *Scheffersomyces* besteht aus Hefen, die häufig mit holzfressenden Insekten assoziiert sind (Urbina und Blackwell 2012, Suh *et al.* 2013, Urbina *et al.* 2013). Der Fund von *Scheffersomyces stipitis* in der Termiten *Odontotermes obesus*, von *S. shehatae* in der Termiten *Zootermopsis nevadensis* und von *S. coipomoensis* in der holzfressenden Schabe *Cryptocercus punctulatus* unterstützt diese Beobachtung. Eine weitere *Scheffersomyces*-Art, *S. cryptocercus*, wird als Darmhefe von *Cryptocercus* sp. angegeben (Urbina *et al.* 2013).

Die Termiten *Odontotermes distans* und *Neotermes jouteli* sind mit *Sugiyamaella smithiae* assoziiert. *Sugiyamaella smithiae* ist der nächste Verwandte des *Mastotermes darwiniensis*-Symbionten *Su. mastotermis*. Der Ursprung der *Sugiyamaella*-Arten teilt sich auf holzfressende Insekten oder holzreiche Habitate auf (siehe Kapitel 5.2.1) (Urbina *et al.* 2013, Handel *et al.* 2016, Sena *et al.* 2016).

Manche der Hefespezies kamen in bis zu zwei Termitenarten vor, unabhängig von der Distanz des geographischen Habitats. Dies wird auch für sulfatreduzierende Bakterien der Gattung *Desulfovibrio* beschrieben, die in Termitendärmen leben (Kuhnigk *et al.* 1996). *Rhodotorula toruloides* kam im Darm von *Odontotermes assmuthi* und *Odontotermes distans* vor. Beide Termiten leben in Indien, Pakistan und Bangladesch (Thakur 1981, Bose und Das 1982). *Sugiyamaella smithiae* stammt aus den Därmen von *Odontotermes distans* und *Neotermes jouteli*, unabhängig von dem Fakt, dass diese Termiten auf verschiedenen Kontinenten vorkommen (*N. jouteli*: zentrale Bahamas, Kuba, Florida, Mexiko) (Scheffrahn *et al.* 2000). Die *Candida membranifaciens*-Wirte *Zootermopsis angusticollis* und *Reticulitermes flavipes* unterscheiden sich ebenfalls in ihrer geographischen Ansiedlung (*R. flavipes*: Frankreich) (Vieau 2001).

Die Termiten mit der größten Zahl verschiedener, möglicherweise transienter Hefearten ist *Odontotermes obesus*. Neben der bereits erwähnten Art *Scheffersomyces stipitis* enthält ihr Darm auch die Hefearten *Naganishia albida*, *Rhodotorula mucilaginosa* und *Saitozyma flava*. Vier konstante Besiedlungen von Termiten mit Hefen sind nachgewiesen (*Apiotrichum mycotoxinivorans*, *Candida membranifaciens*, *Candida tropicalis*, *Sugiyamaella mastotermittis*) (Suh *et al.* 2005, Bauwens *et al.* 2013, Yoro *et al.* 2014). Darüber hinaus ist eine im Mindesten zeitlich begrenzte Besiedlung von Termitendärmen mit neun Hefearten dargestellt. Bei einer zu geringen Anzahl generationsübergreifender Isolierungen einer Darmhefe kann keine verlässliche Aussage darüber getroffen werden, ob deren Vorkommen transient oder konstant ist (Dillon und Dillon 2004). Dennoch ist die Anzahl der bekannten Hefeisolierungen aus speziesübergreifenden Termitendärmen groß. Eine zufällige, transiente Aufnahme von vitalen Hefezellen mit dem Nahrungsbrei in die Gärkammer (P3) erscheint zudem für höhere Termiten unwahrscheinlich, da deren Ileum (P1) extrem basische pH-Werte von bis zu 12 aufweist (Brune 2014). Die häufige Hefeisolierung aus Därmen verschiedener Termitenarten ist als Indikator für eine übliche Wechselwirkung von Termiten und Hefen zu interpretieren.

Hefesymbionten unterstützen holzfressende Insektenwirte bei der Polymerspaltung (Vega und Blackwell 2005). Der Hefezelltiter im Darm der höheren Termiten *Zootermopsis angusticollis* und *Neotermes castaneus* liegt zwischen 10^7 Zellen/ml und 5×10^8 Zellen/ml (Prillinger und König 2006). Die Hefezellzahl im *Mastotermes darwiniensis*-Darm bestätigt diesen Wert und beträgt im Schnitt $3,5 \times 10^8$ Zellen/ml. Etwa 45 % der identifizierten Hefearten aus dem Darm von Termiten haben lignocellulolytische Eigenschaften (6 von 13). Für Termitendärme mit Hefezelltitern in dieser Größenordnung wäre es möglich, dass *in vitro* beobachtete Cellulasen und Xylanasen auch im holzreichen Termitendarm signifikante Katalysearbeit leisten.

5.1.3 – Transient-assoziierte Darmhefen in der Feuerwanze *Pyrrhocoris apterus*

Die Feuerwanze *Pyrrhocoris apterus* ernährt sich oft saugend von proteinreichen Malvensamen (z. B. Baumwoll- und Lindensamen) (Tischler 1959, Kristenová *et al.* 2011). Dies stellt eine vitaminarme Ernährung dar (Whitsitt 1933, Salem *et al.* 2012). Der ausgeprägte Mitteldarm von *P. apterus* wird in die vier Bereiche M1-4 unterteilt. Der M3-Bereich enthält eine anaerobe Bakteriengemeinschaft, welche in einer Symbioseleistung Vitamine produziert. Die aeroben Bakterien der Bereiche M1, M2 und M4 sind wahrscheinlich transient (Haas und König 1987, Salem *et al.* 2012, Sudakaran *et al.* 2012).

Die Hefestämme *Trichosporon asahii* PAG1 und *Candida duobushaemulonii* PAG2 (= CBS 9754) stammen aus einer nicht definierten Darmregion von *Pyrrhocoris apterus* (Korish 2003). Ebenfalls sind zwei *Eremothecium coryli*-Stämme aus dem Darmbereich M1-2 be-

kannt (PAG3, PAG4). Die Erfolgsrate bei der Hefeisolierung aus dem Feuerwanzendarm ist im Vergleich zum Termitendarm gering. Eine signifikante Hefekolonisierung des Mitteldarms würde in mikroskopischen Untersuchungen wahrscheinlich auffallen und ist nicht bei solchen beschrieben (Haas und König 1987). Hefen im Darm von *P. apterus* sind demnach wahrscheinlich transient, ähnlich wie die Bakterien der M1- und M2-Region.

Trichosporon asahii ist eine in der Umwelt gewöhnlich vorkommende Hefe, die Holz als Vektor für Hautinfektionen nutzt (Sugita *et al.* 2000, König *et al.* 2013). Eine Assoziierung des cellulolytischen Stammes *T. asahii* PAG1 mit der verholzten Fruchtschale harter Linden-samen und in Folge dessen, eine Aufnahme durch *Pyrrhocoris apterus* beim Anstechen der selbigen, ist denkbar (Pigott 2012). *Eremothecium coryli* wird oft von Pflanzensamen isoliert und verursacht die Pflanzenkrankheit Stigmatomycose (z. B. Baumwolle, Haselnuss, Senf, Sojabohnen, Tomaten). Die Art ist in vielen Insekten verbreitet, die sich saugend-stechend ernähren. Interessanterweise kommen die Ascosporen der Hefe in den Stilettkammern der nahe verwandten Pyrrhocoridae-Wanze *Dysdercus suturellus* vor und überwintern in der Wanze *Riptortus clavatus* (Gastmann *et al.* 2007, Kimura *et al.* 2008, Kurtzman *et al.* 2011).

5.1.4 – Lignocelluloseabbau durch *Saccharomyces arboricola*-Stämme

Die Gattung *Saccharomyces* besteht zum einen aus primär in der Umwelt vorkommenden Wildhefen, wie *Saccharomyces arboricola*, und zum anderen aus hauptsächlich durch den Menschen kultivierte Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* (Naumov *et al.* 2013). Ein gemeinsames physiologisches Merkmal der Gattung *Saccharomyces* ist die alkoholische Vergärung von D-Glucose (Barnett 1992, Naumov *et al.* 2000, Wang und Bai 2008). *Saccharomyces arboricola* kommt in ligninreichen Habitaten vor (Baumrinden, baumansässige Morchel) (Wang und Bai 2008, Naumov *et al.* 2013).

Der Fund einer Cellulase- und Xylanaseaktivität bei den Stämmen *S. arboricola* CBS 10644^T und CBS 12749 könnte ein erstmaliger Beleg für lignocellulolytische Aktivitäten in der Gattung *Saccharomyces* sein. Der Typstamm 10644^T kann allerdings kein aerobes Wachstum mit Cellobiose oder Xylose betreiben (Wang und Bai 2008). Ein gleicher Hefestamm kann bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen verschiedene Ausprägungen des Metabolismus ausbilden – in diesem Falle unterscheidet sich z. B. das Kulturmedium (Deák 2008). Ferner ist es auffällig, dass zwei von drei Stämme cellulase- und xylanasepositiv sind und die beobachteten Enzymaktivitäten zum holzreichen Habitat passen. Ein abweichendes physiologisches Verhalten für *Saccharomyces*-Stämme einer Art ist bekannt (Naumov *et al.* 2013). Ethanolbildung aus Cellulose oder Xylan ist nicht überprüft worden. Die potentielle Cellulase oder Xylanase aus der Gattung *Saccharomyces* wäre für die industrielle Direktkonversion von

Lignocellulose zu Ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* von Vorteil: Typische Fehlerquellen bei der rekombinanten Expression, wie eine abweichende Codonnutzung oder Proteinprozessierung sowie eine N-terminale Überglykosylierung könnten aufgrund der Verwandtschaft abgeschwächt werden (Gellissen 2005, Illmén *et al.* 2011, Komar 2016).

5.2 – *Sugiyamaella mastotermitis* sp. nov. und *Papiliotrema odontotermitis* sp. nov.

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind etwa 1.630 Hefearten beschrieben, was nach Schätzungen 1 % der extanten Hefearten entspricht (Kurtzman und Fell 2006, Kurtzman *et al.* 2015). Viele Habitate der Erde enthalten demnach unbeschriebene Hefespezies. Besonders artenreiche „Hotspots“ sind die Bäume der tropischen Regenwälder oder die vielseitige Klasse der Insekten, deren Darm oft Hefesymbionten enthält (Morais *et al.* 2006, Blackwell 2011). Das biotechnologische Potential der 163.000 abgeschätzten Hefearten wird als enorm eingeschätzt (Johnson 2013a, b).

5.2.1 – Die Gattung *Sugiyamaella*: unerschlossene Quelle neuartiger Xylanasen

Die Ascomycetengattung *Sugiyamaella* ist durch Kurtzman und Robnett (2007) aus Vertretern der Gattungen *Candida* und *Stephanoascus* gebildet worden. Insgesamt sind bis heute 28 Spezies in dieser Gattung beschrieben (van der Walt und Nel 1968, Kurtzman 2007, Wang *et al.* 2010, Houseknecht *et al.* 2011, Morais *et al.* 2013, Urbina *et al.* 2013, Handel *et al.* 2016, Sena *et al.* 2016). Neben *Sugiyamaella mastotermitis* sp. nov. sind sieben weitere Arten erst seit kurzem bekannt (Handel *et al.* 2016, Sena *et al.* 2016). Ein gemeinsames Merkmal der Gattung ist die Assimilierung von D-Xylose (Urbina *et al.* 2013, Sena *et al.* 2016).

24 der 28 *Sugiyamaella*-Arten, inklusive *Su. mastotermitis* sp. nov., stammen aus ligninreichen Habitaten (verrottetes Holz, Torf, Därme und Kot holzfressender Insekten). Die Habitate der Gattung deuten auf eine Spezialisierung für den Lignocelluloseabbau hin. Der Fund einer Xylanaseaktivität für *Su. mastotermitis* sp. nov. und für zwei Stämme der Art *Sugiyamaella smithiae* (NM1, NS1) unterstützen diese Hypothese (Schäfer *et al.* 1996, Handel *et al.* 2016). In der Literatur sind zudem zwei weitere *Su. smithiae*-Stämme und neun kürzlich beschriebene Arten als xylanasepositiv beschrieben. Interessanterweise fermentieren diese neun Arten den Grundbaustein des Xylans, D-Xylose, zu Ethanol (Morais *et al.* 2013, Lara *et al.* 2014, Sena *et al.* 2016). Die anderen bekannten *Sugiyamaella*-Spezies sind nicht auf Xylanaseaktivität getestet (van der Walt und Nel 1968, Kurtzman 2007, Wang *et al.* 2010, Houseknecht *et al.* 2011, Urbina *et al.* 2013). Die junge Gattung *Sugiyamaella* hat demnach ein großes Potential für die Beschreibung neuartiger Xylanasen und die Bioethanolforschung.

5.2.2 – *Papiliotrema odontotermis*: gemeinsamer Ursprung mit *P. rajasthanensis*

Die Gattung *Papiliotrema* umfasst zurzeit 29 basidiomycetische Hefearten und ist vor kurzem aus Mitgliedern der Gattung *Cryptococcus* gebildet worden (Liu *et al.* 2015, Yurkov *et al.* 2015). Die Art *Papiliotrema rajasthanensis* stammt vom Blütenstand des Falschen Amaranth (*Digera* sp.) und von *Andrographis echiioides* aus der indischen Provinz Rajasthan (Saluja und Prasad 2007). Sie ist der nächste Verwandte der neuen Hefespezies *Papiliotrema odontotermis*. Deren Wirtstermite *Odontotermes obesus* kommt in Rajasthan vor (Roonwal und Bose 1978). Der zum Typstamm *P. odontotermis* OO5^T scheinbar konspezifische Hefestamm *Cryptococcus* sp. BC-2011 wird als Darmbewohner einer unbekanntes Termite in Indien angegeben (GenBank-Eintrag: JN635412). Diese *Papiliotrema*-Subklade könnte demnach einen gemeinsamen Ursprung in pflanzen- oder holzfressenden Termiten haben, eventuell in geographischer Lokalisierung um Rajasthan.

5.2.3 – Symbioseleistungen der neuen Hefearten

Die Mikrobengemeinschaft des Termitendarmes unterstützt den Wirt bei der Polymerspaltung durch die Produktion von Cellulasen und Xylanasen (Schäfer *et al.* 1996, König *et al.* 2013, Brune 2014). Eine weitere wichtige Leistung der Darmsymbionten ist die Wiederverwertung von Harnsäure mittels Uricase und Urease sowie die N₂-Fixierung zu NH₃ mittels Nitrogenase. Dies ist nötig, da der Nährstoff Holz einen sehr geringen Stickstoffgehalt besitzt. Aus NH₃ und Kohlenstoffverbindungen produzieren die Symbionten Aminosäuren und Vitamine (Brune 2014). Eine mögliche Rolle von Hefesymbionten bei der Synthese von essentiellen Aminosäuren oder Vitaminen wird vermutet (Vega und Blackwell 2005, Ganter 2006).

Das häufige Auftreten von *Su. mastotermis* im Darm und Nest von *Mastotermes darwiniensis* lässt auf eine konstante Gemeinschaft zwischen den Organismen schließen (siehe Kapitel 5.1.1). Die Hefeart *Papiliotrema odontotermis* könnte konstant mit Termiten assoziiert sein, da ein weiterer, vermutlich konspezifischer Stamm aus einer unbekanntes indischen Termite existiert (siehe Kapitel 5.2.2). Beide neuen Hefespezies, *Sugiyamaella mastotermis* und *Papiliotrema odontotermis*, zeigen eine physiologische Anpassung an den Termitendarm. Sie haben enzymatische Aktivitäten gemein, die es ihnen ermöglichen am Lignocelluloseabbau teilzunehmen. Beide Hefearten besitzen eine Xylanase. Ebenfalls sind sie in der Lage Cellulose- oder Hemicellulose-nahe Substrate zu assimilieren (D-Cellobiose; D-Mannose, D-Xylose, L-Arabinose, Natriumglucuronat). Ferner ist *Papiliotrema odontotermis* in der Lage L-Fucose als C-Quelle zu nutzen. Die Nutzung dieser Substrate kann als Merkmal für Darmbewohner von Pflanzen- und Holzfressern angesehen werden. Weitere Aktivitäten, die auf die Anpassung an den Termitendarm hindeuten, sind die Spaltung der Substrate 4-MUF- α -D-

Xylobiosid, α -D-Xylotriosid, α -D-Glucopyranosid, α -L-Arabinofuranosid (nur *P. odontotermitis*) und α -D-Mannopyranosid (nur *Su. mastotermitis*). Diese Enzymaktivitäten könnten die Versorgung der mikrobiellen Symbiontengemeinschaft im Termitendarm mit mono- und oligomeren Xylanbausteinen unterstützen.

Dreizehn *Sugiyamaella*-Spezies sind auf das Wachstum ohne externe Vitamine getestet (Kurtzman 2007, Wang *et al.* 2010, Houseknecht *et al.* 2011). Von diesen sind nur die vier Spezies *Su. chiloensis*, *Su. qingdaonensis*, *Su. marilandica* (schwach) und *Su. grinsbergii* (variabel) in der Lage, ohne externe Vitamine zu wachsen. Die drei erstgenannten Spezies gehören in dieselbe Subklade wie *Sugiyamaella mastotermitis*. Deswegen erscheint es so, als ob Vitaminunabhängigkeit eine Eigenschaft dieser Subklade ist. Das Wachstum ohne externe Aminosäuren ist allen acht getesteten *Sugiyamaella*-Arten möglich (Morais *et al.* 2013, Sena *et al.* 2016). *Papiliotrema odontotermitis* ist ureasepositiv, was es der Hefe ermöglicht, Harnstoff zur NH_3 -Mobilisierung zu nutzen ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2 \text{NH}_3$). Harnstoff entsteht z. B. beim Harnsäure- und Argininabbau (Kaltwasser 1969, Gottschalk 1986). Da die zwei neuen Hefearten *Su. mastotermitis* und *P. odontotermitis* ohne externes Biotin, Thiamin oder externe Vitamine wachsen können, sind sie scheinbar dazu fähig, diese Komponenten aus NH_3 und Kohlenstoffverbindungen zu synthetisieren. Dies würde die Bereitstellung von Vitaminen für den Wirt ermöglichen.

5.2.4 – Temperaturtoleranz der neuen Hefearten

Die Kerntemperatur in Termitennestern wird durch deren einzigartige Bauweise gut reguliert und beträgt je nach Termitenart und Außentemperatur 26-36°C (Peakin und Josens 1978, Hadlington 1996). Die Lufttemperaturen in Australien und Indien steigen vielerorts an heißen Tagen über 35 °C an (Collins *et al.* 2000, Kothawale *et al.* 2010).

Die Temperaturtoleranz von 40 °C durch *Sugiyamaella mastotermitis* und von 35 °C durch *Papiliotrema odontotermitis* ist für Ascomyceten und respektive Basidiomyceten ungewöhnlich hoch (Raspor und Zupan 2006, Deák 2008). Für cellulolytische Mikroorganismen in Termitenhügeln von *Odontotermes obesus* wird berichtet, dass deren Zahl durch großen Temperaturstress (45-50 °C) in Sommermonaten auf ein Minimum abnimmt (Kumari *et al.* 2006). Termiten, die in heißen Habitaten leben, zeigen eine größere Resistenz gegen Pilzinfektionen bei hoher Umgebungstemperatur als artgleiche Exemplare aus kälteren Habitaten (Fuller *et al.* 2011). Die Schutzfunktion von Darmmikroben gegen Pathogenbefall ist für Termiten und andere Insekten bekannt (Rosengaus *et al.* 2011, Engel und Moran 2013). Es ist demnach denkbar, dass besonders temperaturresistente lignocellulolytische Darmsymbionten eine

erhöhte Fitness für die Termiten durch eine konstantere Nährstoffzufuhr und durch Pathogenschutz bieten.

5.3 – Ethanol und niedermolekulare Substanzen im Darm von *M. darwiniensis*

Die Darmmikroben von Termiten scheiden kurzkettige, flüchtige Fettsäuren als Fermentationsprodukte in das Darmlumen aus. Diese dienen der Termiten als Nährstoff (König *et al.* 2013, Brune 2014). Der Hinterdarm von vier verschiedenen Termiten enthält 31,9 bis 80,6 mM Acetat (*Incisitermes schwarzi*, *Nasutitermes walkeri*, *Reticulitermes flavipes*, *Zootermopsis angusticollis*). Kleine Mengen Butyrat und Propionat sind ebenfalls vorhanden. Acetat macht 94 bis 98 mol% der kurzkettigen, flüchtigen Fettsäuren aus (Odelson und Breznak 1983, Slaytor *et al.* 1997). Eine detaillierte Untersuchung der niedermolekularen Darmsubstanzen von *Mastotermes darwiniensis* wird hier erstmalig beschrieben.

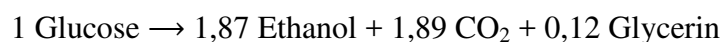
5.3.1 – Dominanz von Acetat und Ethanol

Die Acetatkonzentration in *Mastotermes darwiniensis* ist signifikant niedriger als die bisher bekannten Werte (11 mM). Propionat ist in geringen Mengen vorhanden, Butyrat scheinbar nicht. Der Anteil von Acetat an den kurzkettigen, flüchtigen Fettsäuren entspricht mit 96,4 mol% der Erwartungshaltung (Odelson und Breznak 1983). Geringe Succinat- und Lactatmengen werden in europäischen *Reticulitermes flavipes*-Termiten möglicherweise durch die Darmmikroben produziert (Breznak und Switzer 1986). Dementsprechend sind 2,96 mM Succinat in Arbeiterdärmen und 1,31 mM Succinat in Soldatendärmen von *Mastotermes darwiniensis* vorhanden. Um effizient Succinat aus dem Darm aufzunehmen, müsste *M. darwiniensis* wahrscheinlich C₄-Dicarboxylattransporter im Darmgewebe exprimieren. Für *Drosophila melanogaster* ist dies beschrieben, für Termiten liegen dazu jedoch keine bekannten Untersuchungen vor (Rogina *et al.* 2000). Eine sauerstoffabhängige Succinatverwertung durch Mikroorganismen in der mikrooxygenen Zone der Gärkammer könnte zur Aufrechterhaltung des Sauerstoffgradienten dienen (Brune 2014). Lactat wird in niederen Termiten von Flagellaten und Milchsäurebakterien gebildet. Die scheinbare Abwesenheit von Lactat im Darm von *Mastotermes darwiniensis* liegt vermutlich an der für gewöhnlich schnellen Umsetzung zu Acetat durch die Darmsymbionten (Bauer *et al.* 2000, Brune 2014). Methanotrophe Mikroorganismen aus *Mastotermes darwiniensis* sind bekannt. Als Zwischenstufen bei der Methanoxidation zu CO₂ entstehen Methanol, Formaldehyd und schließlich Formiat (Reuß *et al.* 2015). Weder Formiat, noch Methanol, sind in der Darmflüssigkeit detektiert worden. Dies spricht für einen schnellen Umsatz oder eine nicht signifikante Methanotrophie *in vivo*.

Der Glycerinfund von 2,43 und 1,65 mM in Arbeiter- und respektive Soldatendärmen ist noch nicht für andere Termiten beschrieben. Glycerin könnte als Vorstufe für Dihydroxyacetonphosphat dienen, welches in der Glykolyse verwertet wird (McArdle *et al.* 2006). Ethanol ist sowohl im Darm von Arbeitern, als auch im Soldatendarm vorhanden (6,43 mM und respektive 11,07 mM). Im Vergleich zur Acetatmenge (11 mM) ist die Ethanolkonzentration auf ähnlichem Niveau. Bis heute ist keine Ethanolpräsenz in Termitendärmen beschrieben.

5.3.2 – Alkoholische Gärung: Grundlage für die Ethanol- und Glycerinpräsenz

Alle bekannten *Mastotermes darwiniensis*-Darmhefen (*Apiotrichum mycotoxinivorans*, *Candida tropicalis*, *Sugiyamaella mastotermitis*) besitzen eine Ethanoltoleranz von bis zu 5 % (v/v). Der Vergleich mit der Kontrollgruppe aus Darmhefen anderer Termiten zeigt, dass es sich hierbei um keine gewöhnliche Eigenschaft von Termitensymbionten handelt. Deren Ethanoltoleranz reicht bis zu 1 % (v/v). Die Darmhefe *Sugiyamaella mastotermitis* bildet Ethanol, Säure und vermutlich CO₂ aus Glucose sowie glucosehaltigen Verbindungen. Der Stamm *Candida tropicalis* MD1M aus dem Termitendarm fermentiert Glucose in einer alkoholischen Gärung:



Ethanol und Glycerin sind im Darm von *Mastotermes darwiniensis* vorhanden (siehe Kapitel 5.3.1). Glycerin ist bei der alkoholischen Gärung durch Hefen ein bekanntes Nebenprodukt (Gancedo *et al.* 1968). CO₂ wird im Darm niederer Termiten zur Acetogenese verwendet (Brune 2014). *Candida tropicalis* ist in der Literatur als Glucose vergärende Hefe beschrieben. Crabtreepositive und -negative Stämme sind bekannt (de Deken 1966, Jamai *et al.* 2001, Papanikolaou *et al.* 2016). Das Wachstum von Hefen benötigt eine Restsauerstoffmenge zur Sterolsynthese und für die Desaturasereaktion von langkettigen Fettsäuren (Martin *et al.* 2002, Dupont *et al.* 2011). Der Termitendarm stellt ein komplexes anaerobes Gradientensystem dar. Dessen Gärkammer enthält einen ansteigenden Sauerstoffgradienten vom anaeroben Zentrum zur aeroben Darmwandzone (P_{O_2} : etwa 0,03 bar). Mikroaerobe bis aerobe Zonen existieren im Kolon (P_{O_2} : bis zu 0,09-0,15 bar). Geeignete Sauerstoffverhältnisse zur Fermentation sollten folglich vorliegen (Brune 1998, König *et al.* 2013, Brune 2014). Demnach könnte die Ethanolpräsenz im Termitendarm auf Fermentation durch die Hefesymbionten *Candida tropicalis* und *Sugiyamaella mastotermitis* beruhen.

5.3.3 – Ethanol als Edukt für die Acetatproduktion

Der wichtigste durch mikrobielle Darmsymbionten bereitgestellte Nährstoff für die Wirtstermite ist Acetat. Dieses wird durch die termiteneigene Acetyl-CoA Synthetase zu Acetyl-CoA umgewandelt und im Citratzyklus oxidiert. Eine Bereitstellung von gluconeogenen Substraten durch Darmsymbionten der Termiten wird durch die Literatur abgelehnt. Es wird davon ausgegangen, dass die Termiten Glucose ausschließlich aus dem Celluloseabbau im Mitteldarm bezieht (Slaytor 1992, Slaytor *et al.* 1997, Brune 2014). Der Fund von Ethanol im Darm von *Mastotermes darwiniensis* führt zur Frage nach dessen Rolle im Wirtsmetabolismus. ADH wandelt Ethanol in Acetaldehyd um. Dieses ist noch toxischer als Ethanol und wird durch die Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) schnell in Acetat umgesetzt (Ulrich 1994).

ADH und ALDH sind in allen Lebewesen weit verbreitet (Ulrich 1994, Atrian *et al.* 1998, Brogna *et al.* 2001, Wang *et al.* 2011). Die kurzkettigen ADH mancher Insekten sind wahrscheinlich konvergenten Ursprungs zu den ubiquitären ADH der Klasse III. Der genaue gemeinsame Vorfahre der kurzkettigen ADH ist nicht bekannt (Brogna *et al.* 2001, Ladenstein *et al.* 2008). Termiteneigene ADH und ALDH sind für die niederen Termiten *Reticulitermes flavipes* und *Zootermopsis nevadensis* bekannt (Tartar *et al.* 2009, Raychoudhury *et al.* 2013, Sen *et al.* 2013, Terrapon *et al.* 2014). Ebenfalls existieren Berichte über ADH und ALDH im Digestom von Termiten – dem Verdauungssystem, inklusive Mikroorganismen. Eine sauerstoffabhängige Ethanoloxidation ist für das Darmbakterium *Enterococcus* sp. Stamm RFL6 aus *Reticulitermes flavipes* bekannt (Tholen *et al.* 1997, Scharf und Tartar 2008, Raychoudhury *et al.* 2013). Interessanterweise sind die einzigen auf die Enzymklasse bestimmten ADH von *Reticulitermes flavipes* und *Zootermopsis nevadensis* der ubiquitären Klasse III zugehörig (Raychoudhury *et al.* 2013, Terrapon *et al.* 2014). *Mastotermes darwiniensis* besitzt eine potentielle ADH der Klasse III und eine potentielle ALDH mit 95 %iger und respektive 90 %iger Primärstrukturübereinstimmung zur ADH und ALDH aus *Zootermopsis nevadensis* (GenBank-Einträge KY130514/KDR14152, KY130515/KDR23477) (Dr. Andreas Wolf, Seqlab GmbH (2016) persönliche Kommunikation. Mainz, Göttingen).

Die Präsenz von funktionellen ADH und ALDH im Stoffwechsel oder Digestom von *Mastotermes darwiniensis* ist demnach sehr wahrscheinlich. Erstens ist eine ADH- und ALDH-Synthese durch Vertreter der vielfältigen Mikrobengemeinschaft des Darms denkbar. Zweitens deutet der Fund von termiteneigenen ADH und ALDH in *Reticulitermes flavipes* und *Zootermopsis nevadensis* an, dass diese Enzyme auch durch die verwandte Art *Mastotermes darwiniensis* produziert werden könnten. Diese Vermutung wird durch den Fund der potentiellen ADH und ALDH in der cDNA-Datenbank von *Mastotermes darwiniensis* gut unterstützt

einer gravierenden Intoxikation gesprochen werden. Hyperaktivität tritt hier erst ab Hämolympfkonzentrationen von 15 mM Ethanol auf und Haltungsstörungen ab 35 mM Ethanol (Devineni und Heberlein 2009). Für *Mastotermes darwiniensis* bleibt es offen, ob die Ethanolkonzentration im Darm zeitlichen Schwankungen unterliegt und ob Ethanol in der Hämolymphe vorkommt. Es erscheint unwahrscheinlich, dass Hyperaktivität durch eine erhöhte Ethanolproduktion im Darm und/oder Akkumulation in der Hämolymphe induziert wird.

5.4 – Die endo-1,4- β -Xylanase Xyl1 des Hefestammes *Saitozyma flava* OO2

Xylanasen sind für die industrielle Anwendung und im speziellen die Bioethanolproduktion von großem Interesse (Juturu und Wu 2012, Kalim *et al.* 2015). Bioethanol der zweiten Generation wird aus abbauresistenten lignocellulosehaltigen Rohstoffen gewonnen, wie z. B. Weizenstroh. Ein bisher gängiger Produktionsprozess besteht aus einer initialen thermochemischen Hydrolyse, einer enzymatischen Saccharifikation und einer abschließenden Fermentation (z. B. TDH) (Olsson 2007, Ballmann *et al.* 2013, Gasser *et al.* 2014). Der thermochemische Schritt ist energieintensiv und kann Zucker zerstören (Horn *et al.* 2012, Yang *et al.* 2013). Eine für die Zucker schonende Alternative zur TDH stellt die mechanische Zerkleinerung der Rohstoffe dar. Der im Rahmen dieser Arbeit etablierte Zerkleinerungsprozess ermöglicht die Produktion von Strohpartikeln geringer Größe (30-100 μm). Dieser Wert liegt auf dem Niveau der mechanischen Holzzerkleinerung durch Termiten (je nach Spezies 10-30 μm oder 100-300 μm) (Li *et al.* 2006). Pilotanlagen, welche in der Literatur beschrieben werden, verwenden Kolloid- und Kugelmühlen zur Rohstoffzerkleinerung. Die Partikelgrößen betragen im Mittel 10-20 μm . Das zerkleinerte Substrat senkt die Verweildauer bei der Biogasproduktion (Haefner *et al.* 2010). Durch die hohe Energieinvestition ist die mechanische Zerkleinerung der TDH jedoch noch unterlegen (Ballmann *et al.* 2013). Eine Verbesserung der Energiebilanz des Bioethanol-Produktionsprozesses ist auch unter Vorbehandlung mittels TDH nötig, um die Konkurrenzfähigkeit mit klassischen Treibstoffen zu erhöhen. Dies soll durch eine Effizienzsteigerung des Saccharifikationsprozesses erreicht werden und bedarf der Einführung neuartiger Enzyme, wie Xylanasen (Ballmann *et al.* 2013).

Der Hefestamm *Saitozyma flava* OO2 aus der Termitenart *Odontotermes obesus* ist in der Lage, die Biopolymere Cellulose und Xylan zu hydrolysieren (Wang 2015). Die Xylanaseaktivität ist bereits in unaufgereinigten Kulturüberständen vergleichbar mit kommerziellen Enzympräparaten von *Trichoderma reesei* (2 U versus 2-7 U) (Dr. Arno Cordes, ASA-Spezialenzyme GmbH (2016) persönliche Kommunikation, Mainz, Wolfenbüttel). Die Xylanase Xyl1 des Stammes OO2 kann in zwei Schritten aufgereinigt werden. Xyl1 zeichnet sich durch TDH-

Strohabbau, eine hohe Umsatzrate, hohe Substrataffinität und Toleranz gegenüber 5-HMF, Furfural und Ethanol aus. Die Xylanase wird durch Endprodukte der Cellulose- oder Xylanhydrolyse kaum oder nicht gehemmt. Die Xylanspaltung wird durch Xylobiose aktiviert.

5.4.1 – Substratspektrum, Strohabbau und Endprodukte

Xyl1 ist der Glycosid-Hydrolase Familie 11 angehörig. Diese bauen nur Xylan ab und haben keine Nebenaktivitäten. Xylanasen ohne cellulolytische Nebenaktivitäten sind für die Papierindustrie wichtig. Bei der Zellstoffherstellung wird durch Xylanasen eine bessere Zugänglichkeit des Lignins für Chemikalien erreicht. Dadurch steigt die Papierqualität (Buchert *et al.* 1994, Collins *et al.* 2005). Die Xylanase setzt Xylobiose bis Xylopentaose frei, nicht aber Xylose oder Arabinose. Das Enzym ist dementsprechend der Kategorie 1, der nicht Arabinose freisetzenden Xylanasen angehörig. Diese spalten die zentrale β -1,4-Bindung von Xylo-tetraose, wenn die äußeren Xylosen keine β -1,3-Seitengruppen tragen. Xylo-tetraose ist in diesem Fall das kleinstmögliche Substrat. GHF 11-Enzyme sind dafür bekannt, größere Xylooligosaccharide zu spalten. Im aktiven Zentrum befinden sich mindestens sieben Xylosebindstellen (Dekker und Richards 1976, Collins *et al.* 2005, Kuhad und Singh 2007). An dieser Kategorisierung lässt sich die bei der Xylanspaltung auftretende überproportionale Xylo-triosemenge erklären. Da das kleinste akzeptierte Substrat Xylo-tetraose ist, akkumuliert sich Xylo-triose als Endprodukt. Xylobiose kann nur bei Xylo-tetraosespaltung oder randständiger Spaltung gebildet werden. Die niedrige Menge des Endproduktes Xylobiose spricht dafür, dass Xyl1 die mittige Spaltung größerer Xylooligosaccharide präferiert.

Nach der Strohvorbehandlung mit TDH-Standardparametern, der mechanischen Zerkleinerung und der enzymatischen Saccharifikation durch Xyl1 wird keine Zuckerfreisetzung detektiert – bis zu 50 % der Hemicellulose ist bereits nach der TDH gelöst (Ballmann *et al.* 2013). Wird die TDH ohne Salpetersäure durchgeführt, gehen nur sehr geringe Zuckermengen aus dem Stroh in Lösung. Die Xyl1-Saccharifikation ist dann nicht effektiv, da die Lignocellulosematrix des Strohs wahrscheinlich noch stark vernetzt vorliegt (Horn *et al.* 2012). Nach der schonenden TDH (120 °C) mit Säure ist wenig Xylan gespalten. Eine signifikante Zuckerfreisetzung aus dem Stroh liegt hier erst nach der Xyl1-Saccharifikation vor. Dies spricht dafür, dass durch die schonende TDH eine zumindest partielle Hydrolyse der Ligninmatrix erreicht wird. Gleichzeitig geht weniger Xylan in Lösung als unter TDH-Standardbedingungen. Dieses Vorgehen dürfte energiesparender sein und müsste in Hinblick auf die Ausbeute wahrscheinlich optimiert werden, z. B. durch einen kombinierten Einsatz von verschiedenen lignocellulolytischen Enzymen.

5.4.2 – Konventionelles Temperatur- und pH-Optimum

Hohe Temperaturen sind bei der enzymatischen Spaltung ligninreicher Rohstoffe förderlich. Die Pflanzenzellwand wird dann vermutlich besser durch Enzyme penetriert, wodurch deren Effizienz steigt. Das Risiko der mikrobiellen Kontamination und die Substratviskosität sinken (Paës und O'Donohue 2006, Nigam 2013). Das Temperaturoptimum von Xyl1 beträgt 50 °C und liegt im bekannten Durchschnitt von 50 bis 56 °C (Gessesse 1998, Kalim *et al.* 2015). Die Temperaturstabilität besteht für mindestens 2 h bei 52,5 °C. Für die enzymatische Saccharifikation als TDH-Folgeschritt ist dieser mesophile Bereich geeignet. Diese wird bisher bei 50 °C durchgeführt (Ballmann *et al.* 2013). Bevor das Enzym in hochtemperierten Prozessen einsatzfähig ist, muss es per Mutagenese optimiert werden: Thermophile Xylanasen mit einem Optimum von etwa 70 °C sind bekannt (Shin *et al.* 2010, Kalim *et al.* 2015). Thermostabile Xylanasen bis zu 70 °C sind kommerziell erhältlich (Sigma-Aldrich X3254). Hyperthermophile Xylanasen stammen aus der Gattung *Thermotoga* und haben Aktivitätsoptima von bis zu 95 oder 105 °C (Simpson *et al.* 1991, Antranikian *et al.* 1995, Shi *et al.* 2013).

Der pH-Wert des Strohhydrolysates, welches am TDH-Stroh anhaftet, beträgt etwa pH 2 (Dr. Stefan Dröge, PFI (2015) persönliche Kommunikation, Mainz, Pirmasens). Bisher wird der pH-Wert der Strohsuspension für die enzymatische Saccharifikation auf pH 5 abgepuffert (Ballmann *et al.* 2013). Die Kosten, die hierbei entstehen, könnten durch den Einsatz azidophiler Xylanasen reduziert werden (Brunecky *et al.* 2014). Die azidophilsten bekannten Xylanasen stammen aus den Pilzen *Aureobasidium pullulans* und *Neocallimastix* sp. und haben ein pH-Optimum von 2 (Ohta *et al.* 2001, Chen *et al.* 2012). Die größte Säuretoleranz kommerziell verfügbarer Xylanasen besteht für *Trichoderma longibrachiatum* und *T. viride*-Xylanasen mit einer Aktivität bei pH 4,5 (Sigma-Aldrich X2629, X3876). Das durchschnittliche pH-Optimum pilzlicher Xylanasen liegt im Schnitt bei pH 5 (Kalim *et al.* 2015). Xyl1 hat ein eng abgegrenztes pH-Optimum bei pH 5,3. Dieser Wert impliziert eine mögliche Verwendung in der etablierten auf pH 5 gepufferten Saccharifikationsmethode von Ballmann *et al.* (2013).

5.4.3 – Partiiell unkonventionelles Signalpeptid

Signalpeptide dienen während der Proteintranslokation zur Adressierung. Die Signalpeptide eukaryotischer Proteine teilen sich kein gut definiertes Sequenzmotiv. Allerdings existiert eine gemeinsame Struktur. Diese wird von Xyl1 und der nächstähnlichen bekannten Xylanase XYNA nur partiell einhalten (Krengel und Dijkstra 1996, Nielsen 1999). Der N-Terminus hat normalerweise eine positive Nettoladung, was für XYNA zutrifft (1-5 Aminosäuren, n-Region). Bei Xyl1 ist die Nettoladung des wahrscheinlich kurzen N-Terminus aufgrund der N-terminalen Aminogruppe positiv (Abb. 5.2).

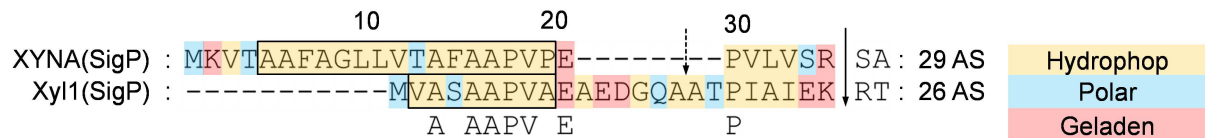


Abbildung 5.2: Unkonventionelle Signalpeptide von XYNA und Xyl1. Orange/blau/rot: Hydrophobe/polare/geladene Aminosäuren. Pfeile: Spaltungsstellen (Gestrichelt: Xyl1 = Nach Signal-BLAST-Vorhersage. Durchgezogen: Xyl1 = nach MS/MS, XYNA = nach Signal-BLAST). Schwarzer Kasten: hydrophober Kern. SigP: Signalpeptid. AS: Aminosäure. Der C-terminale Bereich der Alignierung ist ausgeblendet.

Hinter dem N-Terminus liegt ein hydrophober Kern (7-15 Aminosäuren, h-Region). Dieser zeichnet sich bei XYNA und Xyl1 zwischen den Aminosäuren 5-20 und respektive 2-9 ab. Der Kern von Xyl1 scheint sehr nahe am N-Terminus zu liegen. Die h-Region beider Proteine enthält Einschübe polarer Aminosäuren, was auch für einige *Aspergillus*-Proteine bekannt ist (Madhavan und Sukumaran 2015). Vor der Spaltstelle liegt die c-Region, die aus 3-7 Aminosäuren besteht. Diese sind polar und meist ungeladenen. In der c-Region von XYNA, Xyl1 und einiger *Aspergillus*-Proteine sind neben polaren Aminosäuren auch Hydrophobe enthalten (Madhavan und Sukumaran 2015). Die drittletzte und letzte Aminosäure (-3, -1) vor der Spaltstelle sollte klein und ungeladen sein. Dies trifft für XYNA und Xyl1 nicht zu.

Die bioinformatische Vorhersage des Signalpeptides beschränkt dieses auf eine Länge von 16 Aminosäuren. Die -3 und -1 Stelle wären dann durch kleine Aminosäuren besetzt (G, A) und die c-Region wäre in der Summe polarer. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass der prozessierte N-Terminus nach der MS/MS-Analyse nicht vollständig aufgelöst ist. Falls die Spaltstelle um 1-3 Aminosäuren versetzt wäre (nach A, AT, ATP), würde die Wahrscheinlichkeit eines Detektionsfehlers bestehen und pro Aminosäure steigen. Dies beruht auf der Verkleinerung des Fragments und einer schlechten Säulenbindung durch Hydrophobizitätsabnahme (Prof. Dr. Stefan Tenzer, Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz (2016) persönliche Kommunikation. Mainz). Aufgrund der Ähnlichkeit zu *Aspergillus niger* XYNA erscheint es allerdings wahrscheinlicher, dass die Bindung der membranständigen Protease nicht an kleinen Aminosäuren stattfindet, wie in der -3/-1-Regel beschrieben (von Heijne *et al.* 1983).

5.4.4 – Molekulargewicht, pI, Tertiärstruktur und Katalysemechanismus

GHF 11-Xylanasen sind im Durchschnitt etwa 19-25 kDa klein und haben einen basischen pI (Collins *et al.* 2005, Ahmed *et al.* 2009, Wakiyama *et al.* 2009). Xyl1 passt in dieses Schema: Das Enzym ist etwa 20,4 kDa groß und hat einen pI nahe pH 8,61. Es ist denkbar, dass kleine, kompakt gefaltete Enzyme besser in enge Winkel von zerkauten Holzfasern oder in die Mikroporen des Holzes eindringen können. Dies dürfte für den Holzabbau förderlich sein. Die Mikroporen sind bis zu 18-800 Å breit, während der Durchmesser des globulären Xyl1-Homologiemodelles maximal etwa 46 Å beträgt (Plötze und Niemz 2011). Wie die meisten

GHF 11-Enzyme besteht Xyl1 aus einer einzigen Domäne (Collins *et al.* 2005). Ein separates Kohlenhydrat-Bindemodul zur Steigerung der Bindungsstärke ist abwesend. Im Termitendarm sind hochspezifische Bindemodule möglicherweise nicht notwendig. Die Mandibeln der Termiten verursachen eine starke Oberflächenvergrößerung der Lignocellulose, welche die Enzymbindung fördert (Partikelgröße 10-30 μm oder 100-300 μm) (Li *et al.* 2006).

Die Struktur des aktiven Zentrums besteht aus sechs β -Faltblättern und einer Schleife. Das aktive Zentrum kann als halb geöffnete rechte Hand (β -Faltblätter) mit darauf zeigendem Daumen (Schleife) visualisiert werden kann. Zusammen mit der vom aktiven Zentrum abgewandten β -Biskuitrollenstruktur (acht antiparallele β -Faltblätter) stellt dies die reguläre GHF 11-Faltung dar (Collins *et al.* 2005). Das aktive Zentrum ist hoch konserviert zu *Aspergillus niger* XYNA (siehe Kapitel 4.4.2) (Krengel und Dijkstra 1996, Vandermarliere *et al.* 2008). An der Außenseite ist für beide Xylanasen ein Ringschluss auffällig, der das Substrat sterisch in Position halten könnte. Dies trifft auch für Kristalle von GHF 11-Xylanasen aus *Bacillus subtilis*, *Dictyoglomus thermophilum* und *Trichoderma reesei* zu (McCarthy *et al.* 2000, Vandermarliere *et al.* 2008, Wan *et al.* 2015).

Eine einzige zusätzliche funktionelle Aminosäure, Q114, ist in der -1 Bindestelle lokalisiert. Q114 bildet scheinbar zwei weitere stabilisierende Wasserstoffbrücken zum Substrat. Die positionsgleiche Aminosäure in XYNA, Arg114, ist vom aktiven Zentrum abgewandt. Für eine ähnliche GHF 11-Xylanase aus *Bacillus subtilis* ist die Aminosäure Arg112 dem aktiven Zentrum zugewandt und bildet in scheinbar homologer Funktion zu Q114_{Xyl1} Wasserstoffbrücken zum Substrat aus (Vandermarliere *et al.* 2008). In der Peripherie des aktiven Zentrums von Xyl1 befinden sich zwei schlecht konservierte Aromaten, H112 und F171. Es ist denkbar, dass diese bei der Bindung von Xylooligosacchariden Stapelkräfte ausbilden könnten. Für andere GHF 11-Xylanasen sind Stapelkräfte ausbildende Aromaten in äußeren Xylosebindestellen des aktiven Zentrums beschrieben (Gruber *et al.* 1998, Kumar *et al.* 2013).

Aufgrund der hohen Konservierung des aktiven Zentrums ist es wahrscheinlich, dass Xyl1 den klassischen Katalysemechanismus von GHF 11-Xylanasen und XYNA ausführt. Bei der Xylanhydrolyse durch GHF 11 sind in der Regel zwei Glutamate katalytisch aktiv. Im Falle von Xyl1 fällt E79 wahrscheinlich die Rolle des aktiven Nukleophils zu, während E169 ein Säure-/Basekatalysator sein könnte (Abb. 5.3).

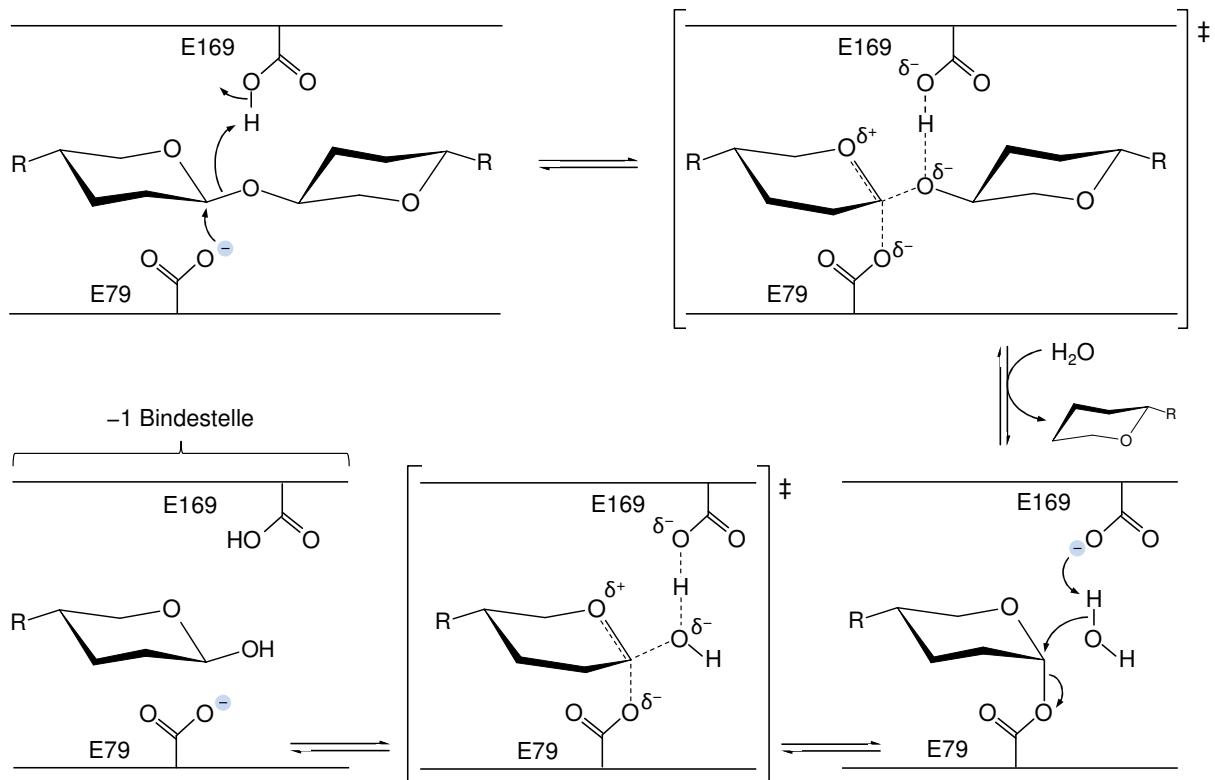


Abbildung 5.3: Wahrscheinlicher Katalysemechanismus von Xyl1. Die -1-Bindestelle umfasst unter anderem E79 und E169, nicht aber die Abgangsgruppe (rechts im Bild). Ringmoleküle: Xylose. ‡: Übergangszustand. R: Xylanrest. Verändert nach Rye und Withers (2000) und Collins (2005).

Nach einem nukleophilen Angriff durch E79 auf das Substrat überträgt E169 als Säure ein Proton auf das Substrat (erste Substitution). Das gebundene Substrat befindet sich dann in einem Übergangszustand, in welchem die in der -1-Stelle gebundene Xylose von der β -Konfiguration in die α -Konfiguration wechselt. Die Abgangsgruppe wird durch ein nukleophiles Wassermolekül ausgetauscht. E169 agiert nun als Base und zieht ein Proton des Wassermoleküls (zweite Substitution). Ein zweiter Übergangszustand tritt ein und das Substrat wechselt in die α -Konfiguration. Die Ausgangskonfiguration in der -1-Bindestelle bleibt dadurch erhalten.

5.4.5 – Xyl1 und CfXYN1: Homologe Xylanasen mit abweichendem pH-Optimum

Das Isolat *Saitozyma flava* I-11 stammt von nicht spezifizierten Blättern der brasilianischen Cerrado. Die Cerrado ist die größte Savannenfläche des südamerikanischen Kontinents (Parachin *et al.* 2009, Sano *et al.* 2010). Die Xylanase Xyl1 des Stammes *Saitozyma flava* OO2 und die Xylanase CfXYN1 aus dem Isolat *Saitozyma flava* I-11 sind wahrscheinlich homolog. Die Übereinstimmung der Primärstruktur beträgt 99 oder 96 %, je nach Sequenzangabe der Autoren im Artikel oder im GenBank-Eintrag (EU330207; 3 oder 8 Unterschiede auf 209 Aminosäuren). Aufgrund dieser Abweichung besteht der Verdacht, dass einer der Einträge fehlerbehaftet ist.

Das Signalpeptid von CfXYN1 wird als 16 Aminosäuren lange Sequenz angegeben (Parachin *et al.* 2009). Die Vorhersage beruht, wie bei Xyl1, auf Sequenzvergleichen mit XYNA aus *Aspergillus niger*. Der N-Terminus von CfXYN1 und Xyl1 ist fast vollständig konserviert. Der einzige Austausch besteht für Ala8 zu Val8 im CfXYN1-GenBank-Eintrag. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass die homologen Xylanasen das gleiche Signalpeptid nutzen, welches wahrscheinlich 16 oder 24 Aminosäuren lang ist (siehe Kapitel 5.4.3).

Ein Vergleich der Xylanaseeigenschaften ergibt Gemeinsamkeiten und Unterschiede: Der pI von prozessiertem CfXYN1 weicht für den Artikeleintrag leicht ab (7,85; Xyl1 = 8,61). Für den GenBank-Eintrag ist der pI ähnlich (8,70). Prozessiertes CfXYN1 hat in beiden Varianten eine theoretische Größe von etwa 20,6 kDa (Xyl1 = 20,4 kDa). Die Temperaturoptima der Xylanasen sind identisch (50 °C). Die signifikanteste Abweichung besteht im deutlich niedrigeren pH-Optimum von CfXYN1 (pH 3, Xyl1 = pH 5,3). Im pH-Bereich 2-5 besteht mehr als 80 % der CfXYN1-Maximalaktivität. Für Xyl1 liegt dieses 80 %-Intervall dagegen im engen pH-Bereich von 5-5,5. Diese Beobachtung ist interessant, da sich die beiden Enzyme in der Aminosäuresequenz kaum unterscheiden (1 % bzw. 4 %). Zum einen könnte das abweichende pH-Optimum demnach an den Sequenzunterschieden liegen, zum anderen aber auch an der heterologen Expression von CfXYN1 in *Saccharomyces cerevisiae* (Gellissen 2005, Illmén *et al.* 2011, Komar 2016). Die abweichenden Aminosäuren könnten bei der Verbesserung von Xyl1 als Mutageneseziele genutzt werden.

Um einen umfassenderen Vergleich mit den weiteren bekannten Xyl1-Eigenschaften treffen zu können, existieren zu wenige Informationen über CfXYN1. Das Substratspektrum und die Endprodukte von CfXYN1 sind nicht bekannt. 3D-Homologiemodelle existieren nicht. Es sind keine Kinetiken publiziert. Die Maximalaktivität wird zwar als hoch angegeben, ist aber nicht auf die Proteinmenge normiert. Ebenfalls werden keine Aussagen über den Einfluss potentieller Hemmstoffe getroffen (Parachin *et al.* 2009).

5.4.6 – Überdurchschnittlich hohe Umsatzrate und Substrataffinität

Xyl1 hat wahrscheinlich eine überdurchschnittlich hohe Substrataffinität. Der K_m -Wert für Buchenholzxytan beträgt 4,57 g/l Xylan und liegt unter dem Durchschnitt typischer K_m -Werte von Hefexylanasen (5,3-7,6 g/l Xylan) (Beg *et al.* 2001). Xyl1 kann RBB-Xylan besser umsetzen als Buchenholzxytan. Dies äußert sich in einer K_m -Senkung von 4,57 g/l Buchenholzxytan zu 1,18 g/l RBB-Xylan. Das RBB-Xylan ist aufgrund der Quervernetzung mit RBB wahrscheinlich besser zugänglich als Buchenholzxytan (Ida Lazewska, Megazyme (2014) persönliche Kommunikation. Mainz, Wicklow).

Obwohl die V_{\max} -Werte beider Substrate die gleiche Dezimalpotenz besitzen (RBB-Xylan: 663,4 RU; Buchenholzxytan: 848,8 U), kann V_{\max} nicht direkt miteinander verglichen werden. Das DNSS-Reagenz reagiert mit allen verfügbaren reduzierenden Xylooligosaccharidenden und misst Spaltungsereignisse (Miller 1959). Der RBB-Xylantest misst die Freisetzung eines RBB pro etwa 30 Xyloseresten und gibt einen indirekten Rückschluss auf die totale freigesetzte Zuckermenge (Megazyme 2007). Aufgrund der vorherrschenden Präferenz für den DNSS-Test existieren keine bekannten Kinetiken mit RBB-Xylan (Bailey *et al.* 1992, McIntyre *et al.* 2013). Der mit Buchenholzxytan bestimmte V_{\max} -Wert ist im Vergleich zu den meisten Referenzwerten hoch (durchschnittlich 1,4 U) (Beg *et al.* 2001, Furniss *et al.* 2002). Eine stark aktive Xylanase ist aus *Bacillus subtilis* bekannt (V_{\max} , Xylan: 36,6 U) (Guo *et al.* 2012). Die stärkste bekannte Xylanase stammt aus dem Pilz *Neocallimastix* sp. (V_{\max} , Xylan: 96,7 U) (Chen *et al.* 2012). Xyl1 könnte somit 8,7-fach aktiver sein als die bisher stärkste bekannte Xylanase. Die homologe Xylanase CfXYN1 wird ebenfalls als stark aktiv beschrieben (Parachin *et al.* 2009). Eine bis zu etwa dreifache DNSS-Überreduktion durch Xylooligosaccharide könnte eine artifizielle Steigerung zu den Werten von Chen *et al.* (2012) hervorrufen. Die DNSS-Überreduktion nimmt mit der Oligosaccharidlänge zu und könnte an sekundären Hydroxylgruppen von Xylooligosacchariden stattfinden (McIntyre *et al.* 2013). Xylose wird nicht durch Xyl1 gebildet, Xylobiose ist das am wenigsten konzentrierte Spaltprodukt und die Freisetzung von Xylotriose bis Xylopentaose dominiert (siehe Kapitel 5.4.1). Selbst bei maximaler Verfälschung durch DNSS-Überreduktion kann Xyl1 als Xylanase mit einer hohen Umsatzrate und hoher Substrataffinität eingestuft werden.

Die hohe Umsatzrate könnte durch den Fund eines nichtreaktiven Puffersystems aus zwitterionischen Komponenten noch gesteigert werden. Im besten bekannten Puffer (2x MU-Puffer) wird der pK_s -Wert von Tris (= 8,3) mit Maleinsäure ausgeglichen (Skujins *et al.* 1962, Meyer 2009). Good's-Puffer kommen für das Xyl1 pH-Optimum von 5,3 nicht in Frage, da diese zu hohe pK_s -Werte besitzen (Good *et al.* 1966, Ferguson *et al.* 1980).

Die hohe Umsatzrate von Xyl1 wäre in der industriellen Applikation von Vorteil. Eine zeitliche Verkürzung des Saccharifikationsprozesses bei der Bioethanolproduktion ist denkbar. Kurze Prozesszeiten sind generell erstrebenswert und sparen Energie und Kosten. Alternativ dazu könnten bestehende Prozesszeiten beibehalten werden: Xyl1 könnte bisher verwendete Xylanasen in geringerer Konzentration ersetzen, um Materialkosten zu sparen. Im TDH-Stroh sind denaturierende Hemmstoffe enthalten. Die Beschleunigung des Saccharifikationsprozesses durch Xyl1 würde in diesem Fall auch den Enzymbedarf senken, da weniger Xylanase in der verkürzten Zeit denaturiert wird (Yang und Wyman 2008, Ballmann *et al.* 2013).

5.4.7 – Hemmung und Aktivierung der Xylanase

Bei der TDH entstehen aus dem Strohlinigin diverse apolare Substanzen, wie Phenol und dessen Derivate (siehe Kapitel 4.4.6) (Kleinert und Barth 2008, Ballmann *et al.* 2013). Eine Toleranz der Xylanasen gegenüber diesen Hemmstoffen ist für den Einsatz bei der Bioethanolproduktion nützlich (Bon und Ferrera 2007, Qi *et al.* 2013). Xyl1 hat eine generell niedrige Toleranz gegenüber apolaren Hemmstoffen. Phenol ist der stärkste getestete Hemmstoff mit einem IC_{50} -Wert von 14 mM. Die apolaren Eigenschaften des Phenols werden bei der Proteinfällung genutzt. Das Phenol verändert die Proteinfaltung und wirkt denaturierend auf Enzyme (Sambrook und Russel 2001). Eine ähnliche Wirkungsweise besitzen wahrscheinlich die apolaren starken Hemmstoffe Benzoesäure, Coniferylalkohol, p-Cumarsäure, Ferulasäure, 4-HB, Sinapinsäure, Sinapylalkohol (80 %), Syringaldehyd, Vanillin und Vanillinsäure. Wie das Phenol besitzen diese meist eine reaktive Hydroxylgruppe, die eine Konformationsänderung nach Wechselwirkung mit der Xylanaseoberfläche auslösen könnte (Boukari *et al.* 2011). Die Toleranz gegenüber phenolischen Stoffen ist eine seltene Eigenschaft (de Souza Moreira *et al.* 2013). Die totale phenolische Stoffkonzentration nach der TDH ist bekannt und kann in Molaritäten umgerechnet werden (Ballmann *et al.* 2013). Bei Vernachlässigung der Verdrängung durch das Stroh im Drucktank (13,5 % (w/v)) ergibt sich ein Wert zwischen 14,5 mM (Ferulasäure, größtes Molekulargewicht) bis 30 mM (Phenol, kleinstes Molekulargewicht). Die Ligningrundbausteine und Sinapinsäure sind nicht mit einbezogen, da diese nicht explizit als phenolische TDH-Nebenprodukte aufgeführt werden (Sun *et al.* 2000, Funk 2007, Kleinert und Barth 2008, Wang *et al.* 2014). Etwaige Aldehydgruppen dürften zudem gut mit Aminogruppen zu Iminen reagieren (Heo *et al.* 2014). Für den Einsatz von Xyl1 bei der enzymatischen Strohsaccharifikation bedeutet dies, dass hemmstoffbelastetes TDH-Stroh weiterhin gewaschen werden sollte. Die am Stroh anhaftenden Hemmstoffreste würden die Xyl1-Aktivität vermutlich senken (Ballmann *et al.* 2013).

5-HMF und Furfural entstehen bei der TDH aus Hexosen und respektive Pentosen des Strohs. Beide Substanzen sind dafür bekannt, glycolytische Enzyme zu hemmen (Ballmann *et al.* 2013, Bonomi 2014). Die Hemmung durch diese Substanzen könnte in den Kontext der Maillard-Reaktion eingeordnet werden. Diese Reaktion ist aus der Lebensmitteltechnik bei der Braunfärbung von Fleisch bekannt. Die Aldehydgruppe von 5-HMF oder Furfural reagiert in einer Nebenreaktion mit Aminogruppen und stellt gefärbte, kovalent verknüpfte Verbindungen mit Aminosäuren her (Murata *et al.* 2007). Xyl1 besitzt eine moderate Toleranz gegenüber 5-HMF und Furfural ($IC_{50} = 250$ mM). Das TDH-Strohhydrolysat enthält nach 30 min Vorbehandlungsdauer etwa 10,7 mM 5-HMF und 22,8 mM Furfural (Berechnung

siehe oben) (Ballmann *et al.* 2013). Xyl1 zeigt bei diesen Konzentrationen eine relative spezifische Aktivität von > 85 %. Da die Konzentration von 5-HMF und Furfural bei einer Erhöhung der Vorbehandlungsdauer steigt, empfiehlt es sich, bei der alleinigen Betrachtung dieser zwei Hemmstoffe, das TDH-Stroh vor der Xyl1-Saccharifikation zu waschen (Ballmann *et al.* 2013).

Effiziente Xylose fermentierende *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme vergären Strohhydrolysate vollständig zu bis zu 5,8 % (v/v) Ethanol (Demeke *et al.* 2013). Eine Direktfermentation von Xylan zu Ethanol (gemeinsame Bioprozessierung) könnte die Produktionskosten von Bioethanol aus Lignocellulose senken (Olsson 2007). Die Kokultivierung verschiedener Hefearten für die Bioethanolproduktion ist für Hefestämme mit niedriger Ethanoltoleranz nicht möglich (Chen 2011). Dies trifft auch für den Xyl1 produzierenden Stamm *Saitozyma flava* OO2 zu (1 % (v/v) Ethanoltoleranz). Für Xyl1 beträgt der Ethanol-IC₅₀-Wert 1,25 M, was in wässriger Lösung etwa 7,3 % (v/v) entspricht. Ethanolestabilität ist für wenige Xylanasen bekannt (10-80 % (v/v)) (Sato *et al.* 2010, Zhou *et al.* 2012). Die Ethanoltoleranz zeichnet Xyl1 für eine heterologe Expression in effizienten Xylose fermentierenden *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen aus (Demeke *et al.* 2013, Farwick *et al.* 2014).

Enzyme, die bei der enzymatischen Saccharifikation von TDH-Stroh eingesetzt werden, sollten eine Toleranz gegenüber Endprodukten aus dem Cellulose- und Xylanabbau besitzen (Yang *et al.* 2011). Xyl1 wird nur schwach durch diese Endprodukte gehemmt: Eine Präsenz der Cellulosebausteine Glucose und Cellobiose hat keinen messbaren Effekt. Die monomeren Xylanbausteine Xylose und L-Arabinose hemmen Xyl1 nur schwach. Xylobiose scheint nicht zu hemmen und aktiviert wahrscheinlich die Xylanaseaktivität bei geringen Konzentrationen (Optimum: etwa 17,7 mM). In der Literatur wird für keine Xylanase eine Aktivierung durch Xylobiose beschrieben und die niedrige Hemmung durch Xylan- und Cellulosebausteine ist selten (Bachmann und McCarthy 1991, Royer und Nakas 1991, Ribeiro *et al.* 2014, Ribeiro *et al.* 2015). Da die Aktivierung durch Xylobiose in einem breiten Intervall stattfindet, könnte sie während der enzymatischen Saccharifikation von Weizenstroh förderlich sein. Eine signifikante Aktivierung findet bei 3,5-50 g/l Xylobiose statt. Nach der enzymatischen Saccharifikation von 1 kg TDH-vorbehandelter Stroh trockenmasse beträgt die Xylosemenge etwa 202 g (Ballmann *et al.* 2013). Der Xylose-IC₅₀-Wert von Xyl1 liegt über 200 g/l (> 1,33 M). Die niedrige Endprodukthemmung und die Aktivierung durch Xylobiose sind seltene und wichtige Eigenschaften, die dieses Enzym für die Bioethanolproduktion wertvoll machen.

5.4.8 – Aktivierung durch Xylobiose

Der Nahrungsbrei im Darm der Termiten hat eine geringe Verweildauer von 24 h (König *et al.* 2013). Die Fütterungsrate und die Xylankonzentration im Darm dürften nicht limitiert sein. Eine effiziente Umsetzung von Lignocellulose wird beschrieben (König *et al.* 2013, Brune 2014). Da Evolution auf vorhandene Strukturen beschränkt ist, wäre es möglich, dass die durch Xylobiose ausgelöste Aktivitätssteigerung kein Regulationsmechanismus, sondern ein Mechanismus zur Effizienzsteigerung des Enzyms im Termitendarm darstellt (Scott und Matzke 2007).

Die positive Rückkopplung der Xyl1-Aktivität durch Xylobiose lässt darauf schließen, dass bisher noch nicht identifizierte Regulationsmechanismen zur Enzymhemmung und -stimulierung vorhanden sein könnten. Es ist wahrscheinlich, dass die Regulationsmechanismen sowohl innerhalb der vielseitigen, synergetisch agierenden Mikrobengemeinschaft, als auch zwischen der Termiten und deren Symbionten komplex sind (Dillon und Dillon 2004). Für Xyl1 im speziellen sind zeitlich begrenzte Aktivitätsabnahmen *in vitro* für bis zu 120 min nicht sichtbar, sodass eine geringe Halbwertszeit ausgeschlossen werden kann. Eine Regulation über das enge pH-Optimum wäre aufgrund der Produktion von kurzkettigen, flüchtigen Fettsäuren im Darm von Termiten denkbar, erscheint aber im speziellen Fall von *Odontotermes obesus* als unwahrscheinlich: der pH-Wert beträgt vor dem enterischen Ventil (P2) bis zu pH 10,4 und nimmt für höhere Termiten erst im hinteren Darmbereich (P4-5) auf pH 5 ab (König *et al.* 2006, Brune 2014). Da Xylotriose als häufigstes Endprodukt akkumuliert, ist es möglich, dass diese Substanz eine Endprodukthemmung hervorrufen könnte.

In der ähnlichen *Aspergillus niger*-Xylanase XYNA ist eine zweite Substratbindestelle für Xylotriose vorhanden. Diese ist von unbekannter Funktion. Bei Xyl1 sind einige der polaren Aminosäuren schlecht konserviert (Vandermarliere *et al.* 2008). Die Existenz einer zweiten Substratbindestelle erscheint jedoch wahrscheinlich: Eine Xylobiosebindung in der hypothetischen zweiten Bindestelle könnte die Konformation des aktiven Zentrums verändern und das Protein aktivieren (17,7 mM Xylobiose). Die postulierte zweite Bindestelle hätte einen niedrigeren K_m -Wert für Xylobiose als die Bindestellen im aktiven Zentrum. Eine Erhöhung der Xylobiosekonzentration (= 215 mM) könnte die Bindestellen im aktiven Zentrum blockieren und die Xylanaseaktivität senken.

5.5 – Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Rolle der Hefen im Termitendarm neu definiert werden muss. Eine Vitaminproduktion und eine lignocellulolytische Aktivität durch Hefen ist aufgrund von hohen Hefezelltitern wahrscheinlich. Zur ökologischen Analyse des Termitendarms würden sich demnach weitere Hefeisolierungen aus den in dieser Arbeit thematisierten Termitenspezies anbieten.

Eine Präsenz von *Candida tropicalis* oder gärenden Hefen könnte bei der Suche nach Ethanol im Darm von weiteren Termitenarten als Ansatzpunkt dienen (Bauwens *et al.* 2013, Yoro *et al.* 2014).

Ein breites Spektrum lignocellulolytischer Enzyme aus Termitenhefen ist jetzt bekannt. Die Hefen könnten bei der Suche nach neuartigen lignocellulolytischen Enzymen genutzt werden. Besonderes Interesse sollte hier auf (hemi-)cellulolytische *Saccharomyces arboricola*-Stämme gelegt werden. Die nahe Verwandtschaft zu *Saccharomyces cerevisiae* könnte sich positiv auf heterologe Expressionen in dieser Hefespezies auswirken (Gellissen 2005, Illmén *et al.* 2011, Komar 2016). Ebenfalls wäre es lohnend zu überprüfen, ob *Saccharomyces arboricola* und Xylanase-positive *Sugiyamaella*-Arten zur Direktfermentation von Xylan und/oder Glucose zu Ethanol befähigt sind.

Aus den zwei neu beschriebenen Hefearten und *Saitozyma flava* OO2 könnten zukünftig folgende Enzyme mit neuartigem Potential isoliert werden: saure Proteasen, Amylasen, eine Arabinanase, β -Glucanasen, Xylanasen und Hemicellulose-Substituenten spaltende Enzyme. Hohe Temperaturtoleranzen der neu beschriebenen Hefearten und eine Halotoleranz von *Papiliotrema odontotermitis* sp. nov. OO5^T könnten für biotechnologische Prozesse als Kontaminationsschutz oder zur Umwandlung mariner Substrate nützlich sein (Garg und Johri 1999, Johnson 2013a, Zaky *et al.* 2014).

Die Genomsequenzen der lignocellulolytischen Hefestämme MD39V^T, MD123D, MYG6 OO2 und OO5^T liegen vor und könnten zur Genidentifizierung von physiologisch beobachteten Enzymen verwendet werden.

Die Funktionalität der potentiellen ADH und ALDH von *Mastotermes darwiniensis* könnte durch Gensynthese und heterologe Expression überprüft werden. Die Hämolympfkonzentration von Ethanol für *Mastotermes darwiniensis* sollte bestimmt werden. Bei Anwesenheit von Hämolympfethanol sollten zeitliche Konzentrationsschwankungen untersucht werden. Ethanol induzierte Hyperaktivität könnte durch Fütterungsversuche bestätigt oder abgelehnt werden (Maze *et al.* 2006, Devineni und Heberlein 2009).

Xyl1 könnte heterolog überexprimiert werden und durch Mutagenese verbessert werden. Zur Erhöhung der Aktivität bei sauren pH-Werten wären die zu CfXYN1 bestehenden Aminosäureaustausche zu überprüfen (Parachin *et al.* 2009). Die Mutagenese des Enzymes sollte auf einen klaren Prozess ausgerichtet sein, z. B. auf die Direktkonversion von TDH-vorbehandeltem Stroh in effizienten Xylose fermentierenden *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen (Demeke *et al.* 2013, Farwick *et al.* 2014).

Das Signalpeptid wäre durch Mutagenese der zwei potentiellen -3/-1-Stellen eindeutig identifizierbar (von Heijne *et al.* 1983). Der vermutete Katalysemechanismus könnte durch Mutagenese der Reste E79 und E169 bestätigt werden (Rye und Withers 2000, Collins *et al.* 2005). Mit einem substratgebundenen Proteinkristall könnten Substratbindestellen außerhalb des aktiven Zentrums gefunden werden (Vandermarliere *et al.* 2008). Die hohe Umsatzrate sollte aufgrund der beschriebenen DNSS-Überreduktion durch Oligosaccharide mittels ähnlicher Methoden überprüft werden (McIntyre *et al.* 2013). Die Hemmwirkung von Xylotriase, Xylo-tetraose und Xylopentaose sollte ermittelt werden.

6. – Literatur

- Aaij C, Borst P (1972) The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta* **269**, 192-200.
- Ahmed S, Riaz S, Jamil A (2009) Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol* **84**, 19-35.
- Ahlgren G (1987) Temperature functions in biology and their application to algal growth constants. *Oikos* **49**, 177-190.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Antranikian G, Rüdiger A, Canganella F, Klingenberg M, Sunna A (1995) Biodegradation of polymers at temperatures up to 130 °C. *J Macromol Sci A*, **32**, 661-669.
- Aristidou AA (2007) Application of metabolic engineering to the conversion of renewable resources to fuels and fine chemicals: current advances and future prospects. In: *Fermentation Microbiology and Biotechnology*. 2te Auflage, S. 249-286. El-Mansi EMT, Bryce CFA, Demain AL, Allman AR (Hrsg.). CRC Press, Boca Raton.
- Atrian S, Sánchez-Pulido L, González-Duarte R, Valencia A (1998) Shaping of *Drosophila* alcohol dehydrogenase through evolution: relationship with enzyme functionality. *J Mol Evol* **47**, 211-221.
- Austin JW, Szalanski AL, Scheffrahn RH, Messenger MT, Dronnet S, Bagnères A-G (2005) Genetic evidence for the synonymy of two *Reticulitermes* species: *Reticulitermes flavipes* and *Reticulitermes santonensis*. *Ann Entomol Soc Am* **98**, 395-401.
- Bachmann SL, McCarthy AJ (1991) Purification and cooperative activity of enzymes constituting the xylan-degrading system of *Thermomonospora fusca*. *Appl Environ Microbiol* **57**, 2121-2130.
- Bailey MJ, Biely P, Poutanen K (1992) Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol* **23**, 257-270.
- Bajpai P (2014) *Xylanolytic Enzymes*. Academic Press, New York.
- Bali G, Meng X, Deneff JJ, Sun Q, Ragauskas AJ (2015) The effect of alkaline pretreatment methods on cellulose structure and accessibility. *Chem Sus Chem* **8**, 275-279.
- Ballmann P, Müller M, Gasser E, Dröge S, König H (2013) Improved pretreatment process of wheat straw with direct steam injection. Konferenz: *21st European Biomass Conference and Exhibition*. 3.-7. Juni 2013, Kopenhagen, Dänemark.
- Banno I (1967) Studies on the sexuality of *Rhodotorula*. *J Gen Appl Microbiol* **13**, 167-196.
- Barnett JA (1992) The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Reess: a short review for non-taxonomists. *Yeast* **8**, 1-23.
- Batra LR, Batra SWT (1979) Termite-fungus mutualism. In: *Insect-Fungus Symbiosis: Mutualism and Commensalism*, S. 117-163. Batra LR (Hrsg.). Allaheld and Osmun, Montclair.
- Bauer S, Tholen A, Overmann J, Brune A (2000) Characterization of abundance and diversity of lactic acid bacteria in the hindgut of wood- and soil-feeding termites by molecular and culture-dependent techniques. *Arch Microbiol* **173**, 126-137.
- Bauwens J, Millet C, Tarayre C, Brasseur C, Destain J, Vandenberg M, Thonart P, Portetelle D, De Pauw E, Haubruge E, Francis F (2013) Symbiont diversity in *Reticulitermes santonensis* (Isoptera: Rhinotermitidae): investigation strategy through proteomics. *Environ Entomol* **42**, 882-887.
- Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**, 326-338.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW (2009) GenBank. *Nucleic Acids Res* **37**, D26-31.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, Hall KP, Evers DJ, Barnes CL, Bignell HR und 184 weitere Autoren (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* **456**, 53-59.
- Berchtold M, Chatzinotas A, Schönhuber W, Brune A, Amann R, Hahn D, König H (1999) Differential enumeration and *in situ* localization of microorganisms in the hindgut of the lower termite *Mastotermes darwiniensis* by hybridization with rRNA-targeted probes. *Arch Microbiol* **172**, 407-416.
- Bergeron PW, Riley CJ (1991) Wastepaper as a feedstock for ethanol production. *NREL*. Reportnummer: TP-232-4237.
- Bergmeyer HU (Hrsg.) (1974) *Methoden der enzymatischen Analyse, Band 2*. 3te Auflage. Verlag Chemie, Weinheim.
- Bernstein FC, Koetzle TF, Williams GJ, Meyer EF, Brice MD, Rodgers JR, Kennard O, Shimanouchi T, Tasumi M (1977) The protein data bank. A computer-based archival file for macromolecular structures. *J Mol Biol* **112**, 535-542.
- bioMérieux (2011) *ID 32 C. System zur Identifizierung von Hefen*. Technische Notiz Nr. 07990H - de - 2011/07 des Produkts 32 200.
- Blackwell M (2011) The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot* **98**, 426-438.

- Blomquist GJ (2010) Biosynthesis of cuticular hydrocarbons In: *Insect Hydrocarbons. Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*, S. 35-52. Blomquist GJ, Bagnères A-G (Hrsg.). Cambridge University Press, Cambridge.
- BMAS – Bundesministerium für Arbeit und Soziales (2002) Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe 460: Einstufung von Pilzen in Risikogruppen. *Bundesarbeitsblatt* 10/2002.
- Boga HI, Brune A (2003) Hydrogen-dependent oxygen reduction by homoacetogenic bacteria isolated from termite guts. *Appl Environ Microbiol* **69**, 779-786.
- Boga HI, Ludwig W, Brune A (2003) *Sporomusa aerivorans* sp. nov., an oxygen-reducing homoacetogenic bacterium from the gut of a soil-feeding termite. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1397-1404.
- Boga HI, Ji R, Ludwig W, Brune A (2007) *Sporotalea propionica* gen. nov. sp. nov., a hydrogen-oxidizing, oxygen-reducing, propionigenic firmicute from the intestinal tract of a soil-feeding termite. *Arch Microbiol* **187**, 15-27.
- Bondesson P-M, Galbe M, Zacchi G (2013) Ethanol and biogas production after steam pretreatment of corn stover with or without the addition of sulphuric acid. *Biotechnol Biofuels* **6**, 1-11.
- Bon EPS, Ferrara MA (2007) Bioethanol production via enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. Konferenz: *The Role of Agricultural Biotechnologies for Production of Bioenergy in Developing Countries. FAO-Seminar*. 12. Oktober 2007, Rom, Italien.
- Bonomi A (2014) Workshop on the hydrolysis of lignocellulosic material. In: *Sugarcane Bioethanol – R&D for Productivity and Sustainability*, S. 679-696. Cortez LAB (Hrsg.). Editora Edgar Blücher, São Paulo.
- Bose G, Das BC (1982) Termite fauna of Orissa state, eastern India. *Rec Zool Surv India* **80**, 197-213.
- Boukari I, O'Donohue M, Rémond C, Chabbert B (2011) Probing a family GH11 endo- β -1,4-xylanase inhibition mechanism by phenolic compounds: Role of functional phenolic groups. *J Mol Catal B: Enzym* **72**, 130-138.
- Breznak JA (1994) Acetogenesis from carbon dioxide in termite guts. In: *Acetogenesis*, S. 303-330. Drake HL (Hrsg.). Chapman & Hall, New York.
- Breznak JA, Switzer JM (1986) Acetate synthesis from H₂ plus CO₂ by termite gut microbes. *Appl Environ Microbiol* **52**, 623-630.
- Brogna S, Benos PV, Gasperi G, Savakis C (2001) The *Drosophila* alcohol dehydrogenase gene may have evolved independently of the functionally homologous medfly, olive fly, and flesh fly genes. *Mol Biol Evol* **18**, 322-329.
- Brune A (1998) Termite guts: the world's smallest bioreactors. *Trends Biotechnol* **16**, 16-21.
- Brune A (2014) Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nat Rev Microbiol* **12**, 168-180.
- Brunecky R, Donohoe BS, Selig MJ, Wei H, Resch M, Himmel ME (2014) Basic biological research relevant to feedstock conversion. In: *Compendium of Bioenergy Plants: Corn*, S. 33-77. Goldman SL, Kole C (Hrsg.). CRC Press, Boca Raton.
- Buchert J, Tenkanen M, Kantelinen A, Viikari L (1994) Application of xylanases in the pulp and paper industry. *Bioresour Technol* **50**, 65-72.
- Bunzel M, Ralph J, Kim H, Lu F, Ralph SA, Marita JM, Hatfield RD, Steinhart H (2003) Sinapate dehydromers and sinapate-ferulate heterodimers in cereal dietary fiber. *J Agric Food Chem* **51**, 1427-1434.
- Caffall KH, Mohren D (2009) The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr Res* **344**, 1879-1900.
- Callaham RZ, Shifrine M (1960) The yeasts associated with bark beetles. *Forest Sci* **6**, 146-154.
- Candy DJ, Kilby BA (Hrsg.) (1975) *Insect Biochemistry and Function*. Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht.
- Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* **17**, 540-52.
- Chen RF (1968) Fluorescent pH indicator. Spectral changes of 4-methylumbelliferon. *Anal Lett* **1**, 423-428.
- Chen Y (2011) Development and application of co-culture for ethanol production by co-fermentation of glucose and xylose: a systematic review. *J Ind Microbiol Biotechnol* **38**, 581-597.
- Chen Y-C, Chian Y-C, Hsu F-Y, Tsai L-C, Cheng H-L (2012) Structural modeling and further improvement in pH stability and activity of a highly-active xylanase from an uncultured rumen fungus. *Bioresour Technol* **123**, 125-134.
- Christ E, Kowalczyk M, Żuchowska AM, Claus H, Löwenstein R, Szopinska-Morawska A, Renaut J, König H (2015) An exemplary model study for overcoming stuck fermentation during spontaneous fermentation with the aid of *Saccharomyces* triple hybrid. *J Agricult Sci* **7**, 18-34.
- Claus H, Filip Z (1998) Degradation and transformation of aquatic humic substances by laccase-producing fungi *Cladosporium cladosporioides* and *Polyporus versicolor*. *Acta Hydrochim Hydrobiol* **26**, 180-185.
- Claus H, Strong PJ (2010) Laccase. In: *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, S. 1-22. Flickinger C (Hrsg.). John Wiley & Sons, Hoboken.
- Claus H, Faber G, König H (2002) Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**, 672-678.
- Collins MS (1969) Water relations in termites. In: *Biology of Termites. Volume 1*, S. 393-448. Krishna K, Weesner FM (Hrsg.). Academic Press, New York.
- Collins T, Gerday C, Feller G (2005) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 3-23.

- Collins DA, Della-Marta PM, Plummer N, Trewin BC (2000) Trends in annual frequencies of extreme temperature events in Australia. *Aust Met Mag* **49**, 277-292.
- Costa-Leonardo AM, Laranjo LT, Janei V, Haifig I (2013) The fat body of termites: Functions and stored materials. *J Insect Physiol* **59**, 577-587.
- Daher FB, Braybook SA (2015) How to let go: pectin and plant cell adhesion. *Front Plant Sci* **6**, 1-8.
- Daniel H-M, Lachance M-A, Kurtzman CP (2014) On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. *Antonie van Leeuw J Microb* **106**, 67-84.
- de Deken RH (1966) The crabtree effect: a regulatory system in yeasts. *J Gen Microbiol* **44**, 149-156.
- de Souza WR (2013) Microbial degradation of lignocellulosic biomass. In: *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*, S. 207-247. Chandel A (Hrsg.). InTech, Rijeka.
- de Souza Moreira LR, de Carvalho Campos M, de Siqueira PHVM, Silva LP, Ricart CAO, Martins PA, Queiroz RML, Filho EDF (2013) Two β -xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. *Fungal Genet Biol* **60**, 46-52.
- Deák T (2008) *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. 2te Auflage. CRC Press, Boca Raton.
- DECHEMA (2015) Bioethanol and biodiesel fuel the bioeconomy. Trend report no. 4. *Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V.* Pressemitteilung im Januar 2015.
- Dekker RFH, Richards GN (1976) Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action. *Adv Carbohydr Chem Biochem* **32**, 277-352.
- Demeke MM, Dietz H, Li Y, Foulquié-Moreno MR, Mutturi S, Deprez S, Den Abt T, Bonini BM, Liden G, Dumortier F, Verplaetse A, Boles E, Thevelein JM (2013) Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. *Biotechnol Biofuels* **6**, 1-24.
- Devineni AV, Heberlein U (2009) Preferential ethanol consumption in *Drosophila* models features of addiction. *Curr Biol* **19**, 2126-2132.
- Dillon RJ, Dillon VM (2004) The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol* **49**, 71-92.
- Dionex (1995) *ED40 Electrochemical Detector Operator's Manual*. Document No. 034855. Revision 03.
- Divol B, Lonvaud-Funel A (2005) Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *J Appl Microbiol* **99**, 85-93.
- DSMZ (2007) Medium 53. *Corynebacterium* Agar. Nährmedien-Katalog des Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium53.pdf. Zuletzt überprüft am 24.11.2016.
- Du X, Pérez-Boada M, Fernández C, Rencoret J, del Río JC, Jiménez-Barbero J, Li J, Gutiérrez A, Martínez AT (2014) Analysis of lignin-carbohydrate and lignin-lignin linkages after hydrolase treatment of xylan-lignin, glucomannan-lignin and glucan-lignin complexes from spruce wood. *Planta* **239**, 1079-1090.
- DuPont (2015) DuPont celebrates the opening of the world's largest cellulosic ethanol plant. *The DuPont Media Center*, Pressemeldung vom 30.10.2015.
- Dupont S, Lemetais G, Ferreira T, Cayot P, Gervais P, Beney L (2011) Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life and land? *Evolution* **66**, 2961-2968.
- ECHA – European Chemicals Agency (2010) Inclusion of substances of very high concern in the candidate list. Decision by the Executive Director Geert Dancet, Helsinki, 17.6.2010. Dokumentnummer ED/30/2010. Online verfügbar unter www.echa.europa.eu/documents/10162/cb5d0f51-2692-4f23-90f6-0ec89a1388fa. Zuletzt abgerufen am 21.09.2016.
- Egen NB, Thormann W, Twitty GE, Bier M (1984) Separation of ampholytes from focused proteins by rotofor cell. In: *Electrophoresis '83: Advanced Methods, Biochemical and Clinical Applications: Proceedings of the International Conference on Electrophoresis, Tokyo*, S. 547-550. Hirai H (Hrsg.). De Gruyter Verlag, Berlin.
- Emerson AE, Krishna K (1975) The termite family Serritermitidae (Isoptera). *Am Mus Novit* **2570**, 1-31.
- Engel P, Moran N (2013) The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev* **37**, 699-735.
- Eni (2015) O & G. World oil and gas review 2015. *Eni S.p.A.* Report.
- EU – Europäische Union (2006) Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18th December 2006. *OJ L* **396**, 1-849.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations (2016) FAOSTAT Datenbank. Rom, Italien: FAO. faostat3.fao.org. Zuletzt überprüft am 26.10.2016.
- Farwick A, Bruder S, Schadeweg V, Oreb M, Boles E (2014) Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 5159-5164.
- Fazekas de St. Groth S, Webster RG, Datyner A (1963) Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta* **71**, 377-391.
- Feldmann H (Hrsg.) (2012) *Yeast: Molecular and Cell Biology*. 2te Auflage. John Wiley & Sons, Hoboken.
- Ferguson WJ, Braunschweiger KI, Braunschweiger WR, Smith JR, McCormick JJ, Wasmann CC, Jarvis NP, Bell DH, Good NE (1980) Hydrogen ion buffers for biological research. *Anal Biochem* **104**, 300-310.

- Ferreira-Paim K, Ferreira TB, Andrade-Silva L, Mora DJ, Springer DJ, Heitman J, Fonseca FM, Matos D, Melhem MS, Silva-Vergara ML (2014) Phylogenetic analysis of phenotypically characterized *Cryptococcus laurentii* isolates reveals high frequency of cryptic species. *PLoS ONE* **9**, e108633.
- Fiser A, Šali A (2003) Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods Enzymol* **374**, 461-491.
- Fisher RA (1922) On the mathematical foundations of theoretical statistics. *Philos Trans Roy Soc London Ser A* **222**, 309-368.
- Flach B, Lieberz S, Rondon M, Williams B, Teiken C (2015) EU-28 Biofuels Annual 2015. *Global Agricultural Information Network (GAIN)*. Reportnummer: NL5028.
- Forsberg Z, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Bunæs AC, Stenstrøm Y, MacKenzie A, Sørli M, Horn SJ, Eijsink VGH (2011) Cleavage of cellulose by a CBM33 protein. *Protein Sci* **20**, 1479-1483.
- Frank K, Sippl MJ (2008) High performance signal peptide prediction based on sequence alignment techniques. *Bioinformatics* **24**, 2172-2176.
- Fröhlich J, König H (1999) Rapid isolation of single microbial cells from mixed natural and laboratory populations with the aid of a micromanipulator. *System Appl Microbiol* **22**, 249-257.
- Fröhlich J, König H (2008) Micromanipulation and identification of single microbial cells. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*, S. 1823-1837. Kowalchuk GA, Akkermans AD, Head IM, de Bruijn FJ, van Elsas JD (Hrsg.). Springer, Berlin Heidelberg.
- Frönk P, Hartmann H, Bauer M, Solem E, Jaenicke E, Tenzer S, Decker H (2015) Polyphenoloxidase from Riesling and Dornfelder wine grapes (*Vitis vinifera*) is a tyrosinase. *Food Chem* **183**, 49-57.
- Fuchs G (Hrsg.) (2014) *Allgemeine Mikrobiologie*, 9te Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Fuller CA, Postava-Davignon MA, West A, Rosengaus RB (2011) Environmental conditions and their impact on immunocompetence and pathogen susceptibility of the Caribbean termite *Nasutitermes acajutlae*. *Ecol Entomol* **36**, 459-470.
- Funk C (2007) Einfluss von Lignin und Ferulasäurederivaten auf die Adsorptionseigenschaften von Ballaststoffen und den fermentativen Abbau durch die menschliche Darmflora. Dissertation. Universität Hamburg.
- Furniss CSM, Belshaw NJ, Alcocer MJC, Williamson G, Elliot GO, Gebruers K, Haigh NP, Fish NM, Kroon PA (2002) A family 11 xylanase from *Penicillium funiculosum* is strongly inhibited by three wheat xylanase inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **1598**, 24-29.
- Gancedo C, Gancedo JM, Sols A (1968) Glycerol metabolism in yeasts. Pathways of utilization and production. *European J Biochem* **5**, 165-172.
- Ganter PF (2006) Yeast and invertebrate associations. In: *The Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, S. 303-370. Rosa CA, Gábor P (Hrsg.). Springer, Berlin Heidelberg.
- Garg, SK, Johri BN (1999) Proteolytic enzymes. In: *Thermophilic Moulds in Biotechnology*, S. 191-218. Johri BN, Tulasi S, Olsen J (Hrsg.). Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht.
- Gasser E, Ballmann P, Dröge S, Bohn J, König H (2014) Microbial production of biopolymers from the renewable resource wheat straw. *J Appl Microbiol* **117**, 1035-1044.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: *The Proteomics Protocols Handbook*, S. 571-607. Walker JM (Hrsg.). Humana Press, New York.
- Gastmann S, Dünkler A, Walther A, Klein K, Wendland J (2007) A molecular toolbox for manipulating *Eremothecium coryli*. *Microbiol Res* **162**, 299-307.
- Gauder M, Graeff-Hönniger S, Claupein W (2011) Identifying the regional straw potential for energetic use on the basis of statistical information. *Biomass Bioenerg* **35**, 1646-1654.
- Gay FJ, Calaby JH (1970) Termites of the Australian region. In: *Biology of Termites. Volume 2*, S. 393-448. Krishna K, Weesner FM (Hrsg.). Academic Press, New York.
- GE Healthcare (2014) Superose™ 6 10/300 GL and Superose 12 10/300 GL. Instructions 71-5017-95 AI, 03/14.
- Gellissen G (Hrsg.) (2005) *Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Gessesse A (1998) Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* sp. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3533-3535.
- Glithero NJ, Wilson P, Ramsden SJ (2013) Straw use and availability for second generation biofuels in England. *Biomass Bioenerg* **55**, 311-321.
- Gomathi V, Ramasamy K, Reddy MRVP, Ramalakshmi A, Ramanathan A (2009) *Acad J Plant Sci* **2**, 189-194.
- Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RMM (1966) Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* **5**, 467-477.
- Gottschalk G (1986) *Bacterial Metabolism*. 2te Auflage. Springer, Berlin Heidelberg.
- Granström T, Aristidou AA, Leisola M (2002) Metabolic flux analysis of *Candida tropicalis* growing on xylose in an oxygen-limited chemostat. *Metab Eng* **4**, 248-256.
- Gruber K, Klintschar G, Hayn M, Schlacher A, Steiner W, Kratky C (1998) Thermophilic xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: high-resolution X-ray structure and modeling studies. *Biochemistry* **37**, 13475-13485.

- Gu J, Catchmark JM (2013) The impact of cellulose structure on binding interactions with hemicellulose and pectin. *Cellulose* **20**, 1613-1627.
- Guo G, Liu Z, Xu J, Liu J, Dai X, Xie D, Peng K, Feng X, Duan S, Zheng K, Cheng L, Fu Y (2012) Purification and characterization of a xylanase from *Bacillus subtilis* isolated from the degumming line. *J Basic Microbiol* **52**, 419-428.
- Haas F, König H (1987) Characterization of an anaerobic symbiont and the associated aerobic bacterial flora of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *FEMS Microbiol Ecol* **45**, 99-106.
- Hadlington PW (1996) *Australian Termites and Other Common Timber Pests*, 2te Auflage. UNSW Press, Sydney.
- Haeffner B, Nied C, Voigt J, Sommer K (2010) Verweilzeitverkürzung bei der Biogasentstehung durch Zerkleinerung von lignocellulosehaltigen Substraten. *Chem Ing Tech* **82**, 1261-1264.
- Hagler AN, Ahearn DG (1981) Rapid diazonium blue B test to detect basidiomycetous yeasts. *Int J Syst Bacteriol* **31**, 204-208.
- Handel S (2013) Das Dreikomponentensystem NreABC – Dimerisierungs- und Expressionsstudien an *Staphylococcus carnosus* NreA. Diplomarbeit. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Handel S, Wang T, Yurkov AM, König H (2016) *Sugiyamaella mastotermitis* sp. nov. and *Papiliotrema odontotermitis* f.a., sp. nov. from the gut of the termites *Mastotermes darwiniensis* and *Odontotermes obesus*. *Int J Syst Evol Microbiol*, DOI: 10.1099/ijsem.0.001397. Im Druck.
- Heaton EA, Dohleman FG, Long SP (2009) Seasonal nitrogen dynamics of *Miscanthus* × *giganteus* and *Panicum virgatum*. *GCB Bioenergy* **1**, 297-307.
- Heo SH, Cho S, Wooley KL (2014) Aldehyde-functional polycarbonates as reactive platforms. *Polym Chem* **5**, 3555-3558.
- Hespell RB (1988) Microbial digestion of hemicellulose in the rumen. *Microb Sci* **5**, 362-365.
- Hirsch RL, Bezdek R, Wendling R (2005) Peaking of world oil production: impacts, mitigation, & risk management. SAIC, U.S. DOE, NETL. Report.
- Horn SV, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Eijsink VGH (2012) Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol Biofuels* **5**, 1-12.
- Houseknecht JL, Hart EL, Suh S-O, Zhou JJ (2011) Yeasts in the *Sugiyamaella* clade associated with wood-ingesting beetles and the proposal of *Candida bullrunensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 1751-1756.
- Hussender C, Ho H-Y, Blackwell M (2010) Comparison of the bacterial symbiont composition of the formosan subterranean termite from its native and introduced range. *Open Microbiol J* **4**, 53-66.
- IEA – International Energy Agency (2016) Key world energy statistics. OECD/IEA. Report.
- Illmén M, den Haan R, Brevnova E, McBride J, Wiswall E, Froehlich A, Koivula A, Voutilainen SP, Siika-aho M, la Grange DC, Thorngren N, Ahlgren S, Mellon M, Deleault K, Rajgarhia V, van Zyl WH, Penttilä M (2011) High level secretion of cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* **4**, 1-15.
- Jamai L, Sendide K, Ettayebi K, Errachidi F, Hamdouni-Alami O, Tahri-Jouti MA, McDermott T, Ettayebi M (2001) Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **204**, 375-379.
- Jeffrey GA (1997) *An Introduction to Hydrogen Bonding*. Oxford University Press, Oxford.
- John RA (2002) Photometric assays. In: *Enzyme Assays: A Practical Approach*. 2te Auflage, S. 49-78. Eisenthal R, Danson M (Hrsg.). Oxford University Press, Oxford.
- Johnson EA (2013a) Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts—the ascomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 503-517.
- Johnson EA (2013b) Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts—the basidiomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 7563-7577.
- Juturu V, Wu JC (2012) Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. *Biotechnol Adv* **30**, 1219-1227.
- Kägi JHR, Vallee BL (1960) The role of zinc in alcohol dehydrogenase: V. The effect of metal-binding agents on the structure of the yeast alcohol dehydrogenase molecule. *J Biol Chem.* **235**, 3188-3192.
- Kalim B, Böhringer N, Ali N, Schäberle TF (2015) Xylanases—from microbial origin to industrial application. *Br Biotechnol J* **7**, 1-20.
- Kaltwasser H (1969) Harnsäureabbau und Biosynthese der Enzyme Uricase, Glyoxylatcarboligase und Urease bei *Hydrogenomonas* H 16. *Arch Mikrobiol* **65**, 288-302.
- Kambhampati S, Peterson AT (2007) Ecological niche conservation and differentiation in the wood-feeding cockroaches, *Cryptocercus*, in the United States. *Biol J Linn Soc* **90**, 457-466.
- Kamm B, Kamm M (2007) Biorefineries – multi product processes. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology Volume 105: White Biotechnology*, S. 175-204. Ulber R, Sell D (Hrsg.). Springer, Berlin Heidelberg.
- Karan R, Capes MD, DasSarma S (2012) Function and biotechnology of extremophilic enzymes in low water activity. *Aquat Biosyst* **8**, 1-15.
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* **30**, 772-780.

- Kim S, Dale BE (2004) Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenerg* **26**, 361-375.
- Kimura S, Tokumaru S, Kuge K (2008) *Eremothecium ashbyi* causes soybean yeast-spot and is associated with stink bug, *Riptortus clavatus*. *Plant Pathol* **74**, 275-280.
- Kirschbaum M, Carter J, Grace P, Keenan R, Landsberg J, McKeon G, Moore A, Paul K, Pepper D, Probert M, Sands P, Simpson R, Skjemstad J (2001) The control of ecosystem carbon dynamics by the linkages between above and belowground processes. In: *Net Ecosystem Exchange*, S. 82-88. Kirschbaum M, Mueller R (Hrsg.). CRC for Greenhouse Accounting, Canberra.
- Kleinert M, Barth T (2008) Phenols from lignin. *Chem Eng Technol* **31**, 736-745.
- Komar AA (2016) The yin and yang of codon usage. *Hum Mol Gen* **25**, R77-R85.
- König H, Fröhlich J, Hertel H (2006) Diversity and lignocellulolytic activities of cultured microorganisms. In: *Intestinal Microorganisms of Termites and other Invertebrates*, S. 271-301. König H, Varma A (Hrsg.). Springer, Berlin Heidelberg.
- König H, Li L, Fröhlich J (2013) The cellulolytic system of the termite gut. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 7943-7962.
- König H, Fröhlich J, Li L, Wenzel M, Berchtold M, Dröge S, Breunig A, Pfeiffer P, Radek R, Brugerolle G (2007) The flagellates of the Australian termite *Mastotermes darwiniensis*: Identification of their symbiotic bacteria and cellulases. *Symbiosis* **44**, 51-65.
- Korish M (2003) Production, Purification, Properties and Application of the Cellulases from a Wild type Strain of a Yeast isolate. Dissertation. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Kothawale DR, Revadekar JV, Rupa Kumar K (2010) Recent trends in pre-monsoon daily temperature extremes over India. *J Earth Syst Sci* **119**, 51-65.
- Kraan S (2016) Seaweed and alcohol: biofuel or booze? In: *Seaweed in Health and Disease Prevention*, S. 169-184. Florence J, Levine I (Hrsg.). Academic Press Inc., San Diego.
- Krengel U, Dijkstra BW (1996) Three-dimensional structure of endo-1-4- β -xylanase I from *Aspergillus niger*: molecular basis for its low pH-optimum. *J Mol Biol* **263**, 70-78.
- Krishna K, Grimaldi DA, Krishna V, Engel MS (2013) Treatise on the Isoptera of the world. *Bull Am Mus Nat Hist* **377**, 1-200.
- Kristenová M, Exnerová A, Štys P (2011) Seed preferences of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae): Are there specialized trophic populations? *Eur J Entomol* **108**, 581-586.
- Kuhad RC, Singh A (2007) *Lignocellulose Biotechnology. Future Prospects*. I K International Publishing House, Neu-Delhi.
- Kuhnigk T, Branke J, Krekeler D, Cypionka H, König H (1996) A feasible role of sulfate-reducing bacteria in the termite gut. *Syst Appl Microbiol* **19**, 139-149.
- Kuhnigk T, Borst E-M, Ritter A, Kämpfer P, Graf A, Hertel H, König H (1994) Degradation of lignin monomers by the hindgut flora of xylophagous termites. *System Appl Microbiol* **17**, 76-85.
- Kumar L, Dutt D, Tapas S, Kumar P (2013) Purification, bio-chemical characterization, homology modeling and active site binding mode interactions of thermo-alkali-tolerant β -1,4 endoxylanase from *Coprinus cinereus* LK-D-NCIM-1369. *Biocat Agricult Biotechnol* **2**, 267-277.
- Kumari R, Sachdev M, Prasad R, Garg AP, Sharma S, Huong Giang P, Varma A (2006) Microbiology of termite hill (mound) and soil. In: *Intestinal Microorganisms of Termites and other Invertebrates*, S. 351-372. König H, Varma A (Hrsg.). Springer, Berlin Heidelberg.
- Kurtzman CP (2007) Eleven new species of *Sugiyamaella* and *Candida* from forest habitats. *FEMS Yeast Res* **7**, 1046-1063.
- Kurtzman CP, Fell JW (2006) Yeast systematics and phylogeny – implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: *The Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, S. 11-30. Rosa CA, Péter G (Hrsg.). Springer, Berlin Heidelberg.
- Kurtzman CP, Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Ant v Leeuw J Microb* **73**, 331-371.
- Kurtzman CP, Robnett CJ (2007) Multigene phylogenetic analysis of the *Trichomonascus*, *Wickerhamiella* and *Zygoascus* yeast clades, and the proposal of *Sugiyamaella* gen. nov. and 14 new species combinations. *FEMS Yeast Res* **7**, 141-151
- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (Hrsg.) (2011) *The Yeasts, a Taxonomic Study. Volume 2*. 5te Auflage. Elsevier B.V., Amsterdam.
- Kurtzman CP, Mateo RQ, Kolecka A, Theelen B, Robert V, Boekhout T (2015) Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways. *FEMS Yeast Res* **15**, 1-17.
- Ladenstein R, Winberg J-O, Benach J (2008) Structure-function relationships in short-chain alcohol dehydrogenases. *Cell Mol Life Sci* **65**, 3918-3935.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lara CA, Santos RO, Cadete RM, Ferreira C, Marques S, Gírio F, Oliveira ES, Rosa CA, Fonseca C (2014) Identification and characterisation of xylanolytic yeasts isolated from decaying wood and sugarcane bagasse in Brazil. *Antonie van Leeuw J Microb* **105**, 1107-1119.
- Lewandowski I, Kicherer A (1997) Combustion quality of biomass: practical relevance and experiments to modify the biomass quality of *Miscanthus × giganteus*. *Eur J Agron* **6**, 163-177.
- Li L, Fröhlich J, König H (2006) Cellulose digestion in the termite gut. In: *Intestinal Microorganisms of Termites and other Invertebrates*, S. 221-241. König H, Varma A (Hrsg.). Springer, Berlin Heidelberg.
- Lighton JRB, Ottesen EA (2005) To DGC or not to DGC: oxygen guarding in the termite *Zootermopsis nevadensis* (Isoptera: Termopsidae). *J Exp Biol* **208**, 4671-4678.
- Lineweaver H, Burk D (1934) The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* **56**, 658-666.
- Liu X-Z, Wang Q-M, Göker M, Groenewald M, Kachalkin AV, Lumbsch HT, Millanes AM, Wedin M, Yurkov AM, Boekhout T, Bai F-Y (2015). Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. *Stud Mycol* **81**, 85-147.
- Lo N, Bandi C, Watanabe H, Nalepa C, Beninati T (2003) Evidence for cocladogenesis between diverse dictyopter-an lineages and their intracellular endosymbionts. *Mol Biol Evol* **20**, 907-913.
- Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* **42**, D490-495.
- Lottspeich F, Engels JW (Hrsg.) (2006) *Bioanalytik*. Spektrum Verlag, Berlin Heidelberg.
- Lu X, Wenslow R, Newman A (2015) Monographs on polymers and surfactants. In: *Pharmaceutical Amorphous Solid Dispersions*, S. 433-454. Newman A (Hrsg.). John Wiley & Sons, Hoboken.
- Madadlou A, O'Sullivan S, Sheehan D (2011) Fast protein liquid chromatography. In: *Protein Chromatography. Methods and Protocols*, S. 439-448. Walls D, Loughran ST (Hrsg.). Springer, New York.
- Madhavan A, Sukumaran RK (2015) Signal peptides from filamentous fungi efficiently mediate the secretion of recombinant proteins in *Kluyveromyces lactis*. *Biochem Eng J* **102**, 31-37.
- Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP (2013) *Brock Mikrobiologie*, 13te Auflage. Pearson Deutschland, Hallbergmoos.
- Martin CE, Oh CS, Kandasamy P, Chellapa R, Vernula M (2002) Yeast desaturases. *Biochem Soc Trans* **30**, 1080-1082.
- Maze IS, Wright GA, Mustard JA (2006) Acute ethanol ingestion produces dose-dependent effects on motor behavior in the honey bee (*Apis mellifera*). *J Insect Physiol* **52**, 1243-1253.
- McArdle WD, Katch FI, Katch VL (2006) *Essentials of Exercise Physiology*. 3te Auflage. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore.
- McCarthy AA, Morris DD, Bergquist PL, Baker EN (2000) Structure of XynB, a highly thermostable β -1,4-xylanase from *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1, at 1.8 Å resolution. *Acta Cryst* **D56**, 1367-1375.
- McIntyre AP, Mukerjee R, Robyt JF (2013) Reducing values: dinitrosalicylate gives over-oxidation and invalid results whereas copper bichinchoninate gives no over-oxidation and valid results. *Carbohydr Res* **380**, 118-123.
- Megazyme (2007) Assay of *endo*-1,4- β -xylanase using azo-xylan (birchwood). Produktnummern: S-AXBP, S-AXBL. 10/07.
- Megges B (2016) Neuartiger Biospirit aus Stroh. *CHEManager* **5**, 20.
- Meyer TS, Lamberts BL (1965) Use of Coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim Biophys Acta* **107**, 144-145.
- Meyer VR (2009) *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. 10te Auflage. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* **31**, 426-428.
- Miller RG, Sorrel SR (2014) The future of oil supply. *Phil Trans R Soc A* **372**, 20130179.
- Misof B, Liu S, Meusemann K, Peters RS, Donath A, Mayer C, Frandsen PB, Ware W, Flouri T, Beutel RG und 91 weitere Autoren (2014) Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* **346**, 763-767.
- Molnar O, Schatzmayr G, Fuchs E, Prillinger H (2004) *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Syst Appl Microbiol* **27**, 661-671.
- Monties B (1989) Lignins. In: *Methods in Plant Biochemistry. Volume 1: Plant Phenolics*, S. 113-158. Dey PM, Harborne JB (Hrsg.). Academic Press Inc., San Diego.
- Morais CG, Lara CA, Marques S, Fonseca C, Lachance M-A, Rosa CA (2013) *Sugiyamaella xylanicola* sp. nov., a xylan-degrading yeast species isolated from rotting wood. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 2356-2360.
- Morais PB, Pagnocca FC, Rosa CA (2006) Yeast communities in tropical rain forests in Brazil and other South American ecosystems. In: *The Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, S. 461-484. Rosa CA, Péter G (Hrsg.). Springer, Berlin Heidelberg.
- Morehouse EA, James TY, Ganley ARD, Vilgalys R, Berger L, Murphy PJ, Longcore JE (2003) Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Mol Ecol* **12**, 395-403.
- Motta FL, Andrade CCP, Santana MHA (2013) A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. In: *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass – Techniques, Applications and Commercialization*, S. 251-275. Chandel A (Hrsg.). InTech, Rijeka.

- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quantit Biol* **51**, 263-273.
- Murata M, Totsuka H, Ono H (2007) Browning of furfural and amino acids, and a novel yellow compound, furpipate, formed from lysine and furfural. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 1717-1723.
- Narendranath NV, Power R (2005) Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2239-2243.
- Nation Sr JL (2016) *Insect Physiology and Biochemistry*. 3te Auflage. CRC Press, Boca Raton.
- Naumov GI, Lee C-F, Naumova ES (2013) Molecular genetic diversity of the *Saccharomyces* yeasts in Taiwan: *Saccharomyces arboricola*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* **103**, 217-228.
- Naumov GI, James SA, Naumova ES, Louis EJ, Roberts IN (2000) Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1931-1942.
- Ni J, Tokuda G (2013) Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. *Biotechnol Adv* **31**, 838-850.
- Nicholas KB, Nicholas HB, Deerfield W (1997) GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMB-net.news* **4**, 1-4.
- Nielsen H (1999) From Sequence to Sorting: Prediction of Signal Peptides. Dissertation. Universität Stockholm.
- Nigam PS (2013) Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules* **3**, 597-611.
- Noirot C (1995) The gut of Termites (Isoptera). Comparative anatomy, systematics, phylogeny. I. Lower Termites. *Ann Soc Entomol Fr* **31**, 197-226.
- O'Donnell K (1993) Fusarium and its near relatives. In: *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*, S. 225-233. Reynolds DR, Taylor JW (Hrsg.). CAB International, Wallingford.
- Odds FC (1991) Sabouraud('s) agar. *J Med Vet Mycol* **29**, 355-359.
- Odelson DA, Breznak JA (1983) Volatile fatty acid production by the hindgut microbiota of xylophagous termites. *Appl Environ Microbiol* **45**, 1602-1613.
- Ohlenschläger G, Berger I, Depner W (1980) *Synopsis der Elektrophoresetechniken*. G-I-T Verlag Ernst Giebel, Darmstadt.
- Ohta K, Moriyama S, Tanaka H, Shige T, Akimoto H (2001) Purification and characterization of an acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* and sequence analysis of the encoding gene. *J Biosci Bioeng* **92**, 262-270.
- Olempska-Beer ZS, Merker RI, Ditto MD, DiNovi MJ (2006) Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. *Regul Toxicol Pharmacol* **45**, 144-158.
- Olsson L (Hrsg.) (2007) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology Volume 108: Biofuels*. Springer, Berlin Heidelberg.
- Paës G, O'Donohue MJ (2006) Engineering increased thermostability in the thermostable GH-11 xylanase from *Thermobacillus xylanilyticus*. *J Biotech* **125**, 338-350.
- Papanikolaou S, Rontou M, Belka A, Athenaki M, Gardeli C, Mallouchous A, Kalantzi O, Koutinas AA, Kookos IK, Zeng A-P, Aggelis G (2016) Conversion of biodiesel-derived glycerol into biotechnological products of industrial significance by yeast and fungal strains. *Eng Life Sci*. DOI: 10.1002/elsc.201500191. Im Druck.
- Parachin NS, Siqueira S, de Faria FP, Torres FAG, de Moraes LMP (2009) Xylanases from *Cryptococcus flavus* isolate I-11: Enzymatic profile, isolation and heterologous expression of CfXYN1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Catal B: Enzym* **59**, 52-57.
- Peakin GJ, Josens G (1978) Respiration and energy flow. In: *Production Ecology of Ants and Termites*, S. 111-164. Brian MV (Hrsg.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605-1612.
- Pfeiffer P, Radler F (1985) Hochleistungsflüssigchromatographische Bestimmung von organischen Säuren, Zucker, Glycerin und Alkohol im Wein an einer Kationenaustauschersäule. *Z Lebensm-Unters -Forsch* **181**, 24-27.
- Pigott D (2012) *Lime-trees and Basswoods: A Biological Monograph of the Genus Tilia*. Cambridge University Press, New York.
- Pingoud A, Urbanke C (1999) *Arbeitsmethoden der Biochemie*. De Gruyter Verlag, Berlin.
- Plötze M, Niemi P (2011) Porosity and pore size distribution of different wood types as determined by mercury intrusion porosimetry. *Eur J Wood Prod* **69**, 649-657.
- Prillinger H, König H (2006) The intestinal yeasts. In: *Intestinal Microorganisms of Termites and other Invertebrates*, S. 319-334. König H, Varma A (Hrsg.). Springer, Berlin Heidelberg.
- Prillinger H, Messner R, König H, Bauer R, Lopandic K, Molnar O, Dangel P, Weigang F, Kirisits T, Nakase T, Sigler L (1996) Yeasts associated with termites: a phenotypic and genotypic characterization and use of coevolution for dating evolutionary radiations in asco- and basidiomycetes. *System Appl Microbiol* **19**, 265-283.

- Qi B, Chen X, Yi S, Wan Y (2013) Inhibition of cellulase, β -glucosidase, and xylanase activities and enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated wheat straw by acetone-butanol-ethanol fermentation products. *Environ Prog Sustain Energy* **33**, 1-7.
- Raspor P, Zupan J (2006) Yeasts in extreme environments. In: *The Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, S. 371-418. Rosa CA, Gábor P (Hrsg.). Springer, Berlin Heidelberg.
- Raychoudhury R, Sen R, Cai Y, Sun Y, Lietze V-U, Boucias DG, Scharf ME (2013) Comparative meta-transcriptomic signatures of wood and paper feeding in the gut of the termite *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Insect Mol Biol* **22**, 155-171.
- Rehner SA, Buckley E (2005) A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* **97**, 84-98.
- Reuß J (2015) Entwicklung eines biologischen Verfahrens zur Reduktion des Methanschlupfes von Gasaufbereitungsanlagen mittels Einsatz methanotropher Mikroorganismen. Dissertation. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Reuß J, Rachel R, Kämpfer P, Rabenstein A, Küver J, Dröge S, König H (2015) Isolation of methanotrophic bacteria from termite gut. *Microbiol Res* **179**, 29-37.
- Rhodes JS, Keith DW (2008) Biomass with capture: negative emissions within social and environmental constraints: an editorial comment. *Clim Chang* **87**, 321-328.
- Ribeiro LF, Nicholes N, Tullman JM, Ribeiro LFC, Fuzo CA, Vieira DS, Furtado GP, Ostermeier M, Ward RJ (2015) Insertion of a xylanase in xylose binding protein results in a xylose-stimulated xylanase. *Biotechnol Biofuels* **8**, 1-15.
- Ribeiro LFC, Ribeiro LF, Jorge JA, Polizeli MLTM (2014) Screening of filamentous fungi for xylanases and cellulases not inhibited by xylose and glucose. *Br Biotechnol J* **4**, 30-39.
- Rice P, Longden I, Bleasby A (2000) EMBOSS: the European molecular biology open software suite. *Trends Genet* **16**, 276-277.
- Richey J (1982) FPLC: a comprehensive separation technique for biopolymers. *Am Lab* **14**, 104-129.
- Rocha M, Constantini JP (2015) Internal ornamentation of the first proctodeal segment of the digestive tube of Syntermitinae (Isoptera, Termitidae). *Dtsche Entomol Z* **62**, 29-44.
- Rogina B, Reenan RA, Nilsen SP, Helfand SL (2000) Extended life-span conferred by cotransporter gene mutations in *Drosophila*. *Science* **290**, 2137-2140.
- Roonwal ML, Bose G (1978) Vegetational distribution of termites of Rajasthan (India) and their economic importance. *Proc Indian Natn Sci Acad* **44**, Part B, 320-329.
- Rosengaus RB, Zecher CN, Schultheis KF, Brucker RM, Bordenstein SR (2011) Disruption of the termite gut microbiota and its prolonged consequences for fitness. *Appl Environ Microbiol* **77**, 4303-4312.
- Royer JC, Nakas JP (1991) Purification and characterization of two xylanases from *Trichoderma longibrachiatum*. *Eur J Biochem* **202**, 521-529.
- Rubin EM (2008) Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* **454**, 841-845.
- Rye CS, Withers SG (2000) Glycosidase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 573-580.
- Sabree ZK, Huang CY, Arakawa G, Tokuda G, Lo N, Watanabe H, Moran NA (2012) Genome shrinkage and loss of nutrient-providing potential in the obligate symbiont of the primitive termite *Mastotermes darwiniensis*. *Appl Environ Microbiol* **78**, 204-210.
- Salem H, Kreutzer E, Sudakaran S, Kaltenpoth M (2012) Actinobacteria as essential symbionts in firebugs and cotton stainers (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Environ Microbiol* **15**, 1956-1968.
- Saluja P, Prasad GS (2007) *Cryptococcus rajasthanensis* sp. nov., an anamorphic yeast species related to *Cryptococcus laurentii*, isolated from Rajasthan, India. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 414-418.
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Volume 3*. 3te Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sánchez S, Bravo V, García JF, Cruz N, Cuevas M (2008) Fermentation of D-glucose and D-xylose mixtures by *Candida tropicalis* NBRC 0618 for xylitol production. *World J Microbiol Biotechnol* **24**, 709-716.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.
- Sano EE, Rosa R, Brito JLS, Ferreira LG (2010) Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. *Environ Monit Assess* **166**, 113-124.
- Sato Y, Fukuda H, Zhou Y, Mikami S (2010) Contribution of ethanol-tolerant xylanase G2 from *Aspergillus oryzae* on Japanese sake brewing. *J Biosci Bioeng* **110**, 679-683.
- Schäfer A, Konrad R, Kuhnigk T, Kämpfer P, Hertel H, König H (1996) Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut. *J Appl Bacteriol* **80**, 471-478.
- Scharf ME (2015) Termites as targets and models for biotechnology. *Annu Rev Entomol* **60**, 77-102.
- Scharf ME, Tartar E (2008) Termite digestomes as sources for novel lignocellulases. *Biofuels Bioprod Biorefin*. DOI: 10.1002/bbb.107.
- Scharf ME, Karl ZJ, Sethi A, Boucias DG (2011) Multiple levels of synergistic collaboration in termite lignocellulose digestion. *PLoS ONE* **6**, e21709.

- Scheffrahn RH, Krecek J, Su N-Y (2000) Redescriptions of the dampwood termites *Neotermes jouteli* and *N. luykxi* (Isoptera: Kalotermitidae) from Florida, Cuba, Bahamas, and Turks and Caicos Islands. *Ann Entomol Soc Am* **93**, 785-794.
- Scheller HV, Ulkskov P (2010) Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 263-289.
- Schlüter T (1989) Neue Daten über harzkonservierte Arthropoden aus dem Cenomanium NW-Frankreichs. *Doc Naturae* **56**, 59-70.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Fungal Barcoding Consortium (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* **109**, 6241-6246.
- Schweigkofler W, Suzuki M, Lopandic K, Prillinger H (2000) *Galactocandida mastotermitis* and *G. reticulitermitis*: two new ascomycetous yeast species associated with termites. *Programs, Abstracts and Papers: 3rd Int Congr Symbiosis*, Marburg, Germany, 186.
- Schwentke J (2013) Reinigung und biochemische Charakterisierung einer exo- β -1,3-Glucanase mit β -Glucosidase-Aktivität von *Wickerhamomyces anomalus* AS1. Diplomarbeit. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Scott EC, Matzke NJ (2007) Biological design in science classrooms. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 8669-8676.
- Selvaraj T, Kim SK, Kim YH, Jeong YS, Kim YJ, Phoung ND, Jung KH, Kim J, Yun HD, Kim H (2010) The role of carbohydrate-binding module (CBM) repeat of a multimodular xylanase (XynX) from *Clostridium thermocellum* in cellulose and xylan binding. *J Microbiol* **48**, 856-861.
- Sen R, Raychoudhury R, Cai Y, Sun Y, Lietze V-U, Boucias DG, Scharf ME (2013) Differential impacts of juvenile hormone, soldier head extract and alternate caste phenotypes on host and symbiont transcriptome composition in the gut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *BMC Genomics* **14**, 1-18.
- Sena LMF, Morais CG, Lopes MR, Santos RO, Uetanabaro APT, Morais PB, Vital MJS, de Morais Jr MA, Lachance M-A, Rosa CA (2016) D-Xylose fermentation, xylitol production and xylanase activities by seven new species of *Sugiyamaella*. *Antonie van Leeuw J Microb*. DOI: 10.1007/s10482-016-0775-5. Im Druck.
- Shaomei H, Ivanova N, Kirton E, Allgaier M, Bergin C, Scheffrahn RH, Kyrpidis NC, Warnecke F, Tringe SG, Hugenholtz P (2013) Comparative metagenomic and metatranscriptomic analysis of hindgut paunch microbiota in wood- and dung-feeding higher termites. *PLoS ONE* **8**, e61126.
- Shen M-Y, Šali A (2006) Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci* **15**, 2507-2524.
- Shi H, Zhan Y, Li X (2013) A novel highly thermostable xylanase stimulated by Ca^{2+} from *Thermotoga thermarum*: cloning, expression and characterization. *Biotechnol Biofuels* **6**, 1-9.
- Shin K, Jeya M, Lee JK, Kim YS (2010) Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Fomitopsis pinicola*. *J Microbiol Biotechnol* **20**, 1412-1423.
- Shinzanto N, Muramatsu M, Watanabe Y, Matsui T (2005) Termite-regulated fungal monoculture in fungus combs of a Macrotermite termite *Odontotermes formosanus*. *Zool Sci* **22**, 917-922.
- Silvestro D, Michalak I (2012) raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Org Divers Evol* **12**, 335-337.
- Simpson HD, Haufler UR, Daniel RM (1991) An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga*. *Biochem J* **277**, 413-417.
- Singh S, Madlala AM, Prior BA (2003) *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 3-16.
- Skujins JJ, Braal Tabatabai L, McLaren AD (1962) Characterization of phosphatase in a terrestrial soil sterilized with an electron beam. *Enzymologia* **25**, 125-133.
- Sláviková E, Vadkertiová R (2000) The occurrence of yeasts in the forest soils. *J Basic Microbiol* **40**, 207-212.
- Sláviková E, Vadkertiová R, Vránová D (2009) Yeasts colonizing the leaves of fruit trees. *Ann Microbiol* **59**, 419-424.
- Slaytor M (1992) Cellulose digestion in termites and cockroaches: what role do symbionts play? *Comp Biochem Physiol* **103B**, 775-784.
- Slaytor M, Veivers PC, Lo N (1997) Aerobic and anaerobic metabolism in the higher termite *Nasutitermes walkeri* (Hill). *Insect Biochem Molec Biol* **27**, 291-303.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Smith RE (1977) Rapid tube test for detecting fungal cellulase production. *Appl Environ Microbiol* **33**, 980-981.
- Spencer JFT, Spencer DM (Hrsg.) (1997) *Yeasts in Natural and Artificial Habitats*. Springer, Berlin Heidelberg.
- Sriamornsak P (2003) Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A review. *Silpakorn U Int J* **3**, 206-228.
- St. John FJ, González JM, Pozharski E (2010) Consolidation of glycosyl hydrolase family 30: A dual domain 4/7 hydrolase family consisting of two structurally distinct groups. *FEBS Lett* **584**, 4435-4441.
- Stamatakis A (2014) RaxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **130**, 1312-1313.
- Striegel AM, Yau WW, Kirkland JJ, Bly DD (2009) *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography*. 2te Auflage. John Wiley & Sons, Hoboken.
- Sudakaran S, Salem H, Kost C, Kaltenpoth M (2012) Geographical and ecological stability of the symbiotic midgut microbiota in European firebugs, *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Mol Ecol* **21**, 6134-6151.

- Sugita T, Nishikawa A, Ichikawa T, Ikeda R, Shinoda T (2000) Isolation of *Trichosporon asahii* from environmental materials. *Med Mycol* **38**, 27-30.
- Suh S-O, Houseknecht JL, Gujjari P, Zhou JJ (2013) *Scheffersomyces parashehatae* f.a., sp. nov., *Scheffersomyces xylofermentans* f.a., sp. nov., *Candida broadrunensis* sp. nov. and *Candida manassasensis* sp. nov., novel yeasts associated with wood-ingesting insects, and their ecological and biofuel implications. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 4330-4339.
- Suh S-O, Nhu H, Nguyen NH, Blackwell M (2005) Nine new *Candida* species near *C. membranifaciens* isolated from insects. *Mycol Res* **109**, 1045-1056.
- Sulman S, Rehman A (2013) Isolation and characterization of cellulose degrading *Candida tropicalis* W2 from environmental samples. *Pakistan J Zool* **45**, 809-816.
- Sun R, Tomkinson J, Mao FC, Sun XF (2000) Physicochemical characterization of lignins from rice straw by hydrogen peroxide treatment. *J Appl Polym Sci* **79**, 719-732.
- Switzer RC III, Merrill CR, Shifrin S (1979) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **98**, 231-237.
- Tartar A, Wheeler MM, Zhou X, Coy MR, Boucias DG, Scharf ME (2009) Parallel metatranscriptome analyses of host and symbiont gene expression in the gut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Biotechnol Biofuels* **2**, 1-19.
- Tavaré S (1986) Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures Math Life Sci* **17**, 57-86.
- Teather RM, Wood PJ (1982) Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol* **43**, 777-780.
- Tenkanen M, Vršanská M, Siika-aho M, Wong DW, Puchart V, Penttilä M, Saloheimo M, Biely P (2012) Xylanase XYN IV from *Trichoderma reesei* showing exo- and endo-xylanase activity. *FEBS J* **280**, 285-301.
- Terrapon N, Li C, Robertson HM, Ji L, Meng X, Booth W, Chen Z, Childers CP, Glastad KM und 34 weitere Autoren (2014) Molecular traces of alternative social organization in a termite genome. *Nat Comm* **5**, 1-12.
- Thakur ML (1981) The identity, distribution and bioecology of *Odontotermes distans* Holmgren et Holmgren (Isoptera: Termitidae: Macrotermitinae). *Proc: An Sci* **90**, 187-193.
- Theorell H, McKee JS (1961) Mechanism of action of liver alcohol dehydrogenase. *Nature* **192**, 47-50.
- Tholen A, Brune A (2000) Impact of oxygen on metabolic fluxes and *in situ* rates of reductive acetogenesis in the hindgut of the wood-feeding termite *Reticulitermes flavipes*. *Environ Microbiol* **2**, 436-449.
- Tholen A, Schink B, Brune A (1997) The gut microflora of *Reticulitermes flavipes*, its relation to oxygen and evidence for oxygen-dependent acetogenesis by the most abundant *Enterococcus* sp. *FEMS Microbiol Ecol* **24**, 137-149.
- Thomas LH, Forsyth VT, Šturcová A, Kennedy CJ, May RP, Altaner CM, Apperley DC, Wess TJ, Jarvis MC (2013) Structure of cellulose microfibrils in primary cell walls from collenchyma. *Plant Physiol* **161**, 465-476.
- Thompson GJ, Kitade O, Lo N, Crozier RH (2000) Phylogenetic evidence for a single, ancestral origin of a 'true' worker caste in termites. *Journal of Evolutionary Biology* **13**, 869-881.
- Thorne HV (1966) Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA. *Virology* **29**, 234-239.
- Tischler W (1959) Zur Biologie der Feuerwanze (*Pyrrhocoris apterus* L.). *Zool Anz* **163**, 392-396.
- Timofeevski SL, Nie G, Reading S, Aust SD (2000) Substrate specificity of lignin peroxidase and a S168W variant of manganese peroxidase. *Arch Biochem Biophys* **373**, 147-153.
- Uhl AM, Daniel RM (1999) The first description of an archaeal hemicellulase: the xylanase from *Thermococcus zilligii* strain AN1. *Extremophiles* **3**, 263-267.
- Ulrich K (1994) *Comparative Animal Biochemistry*. Springer, Berlin Heidelberg.
- Urbina H, Blackwell M (2012) Multilocus phylogenetic study of the *Scheffersomyces* yeast clade and characterization of the N-terminal region of xylose reductase gene. *PLoS ONE* **7**, e39128.
- Urbina H, Frank R, Blackwell M (2013) *Scheffersomyces cryptocercus*: a new xylose-fermenting yeast associated with the gut of wood roaches and new combinations in the *Sugiyamaella* yeast clade. *Mycologia* **105**, 650-660.
- van der Walt JP, Nel EE (1968) *Candida edax* sp.n. *Antonie van Leeuw J Microb* **34**, 106-108.
- van Uden BN, do Carmo-Sousa L, Farinha M (1958) On the intestinal yeast flora of horses, sheep, goats and swine. *J Gen Microbiol* **16**, 385-395.
- Vandermarliere E, Bourgois TM, Rombouts S, van Campenhout S, Volckaert G, Strelkov SV, Delcour JA, Rabijns A, Courtin CM (2008) Crystallographic analysis shows substrate binding at the -3 to +1 active-site subsites and at the surface of glycoside hydrolase family 11 endo-1,4- β -xylanases. *Biochem J* **410**, 71-79.
- Vega FE, Blackwell M (Hrsg.) (2005) *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Vieau F (2001) Comparison of the spatial distribution and reproductive cycle of *Reticulitermes santonensis* Feytaud and *Reticulitermes lucifugus grassei* Clément (Isoptera, Rhinotermitidae) suggests that they represent introduced and native species, respectively. *Insect Soc* **48**, 57-62.
- Vogel HJ (1956) A convenient medium for *Neurospora* (medium N). *Microbial Genet Bull* **13**, 42-43.
- von Heijne G (1983) Patterns of amino acids near signal sequence cleavage sites. *Eur J Biochem* **133**, 17-21.
- Voragen F, Schols H, Visser R (2003) *Advances in Pectin and Pectinase Research*. Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht.

- Wakiyama M, Yoshihara K, Hayashi S, Ohta K (2009) An extracellular endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus japonicus*: Purification, properties, and characterization of the encoding gene. *J Biosci Bioeng* **109**, 227-229.
- Wan Q, Parks JM, Hanson BL, Fisher SZ, Ostermann A, Schrader TE, Graham DE, Coates L, Langan P, Kovalevsky A (2015) Direct determination of protonation states and visualization of hydrogen bonding in a glycoside hydrolase with neutron crystallography. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 12384-12389.
- Wang N, Shi H, Yao Q, Zhou Y, Kang L, Chen H, Chen K (2011) Cloning, expression and characterization of alcohol dehydrogenases in the silkworm *Bombyx mori*. *Genet Mol Biol* **34**, 240-243.
- Wang S-A, Bai F-Y (2008) *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 510-514.
- Wang S-A, Li F-L, Bai F-Y (2010) *Candida laoshanensis* sp. nov. and *Candida qingdaonensis* sp. nov., anamorphic, ascomycetous yeast species isolated from decayed wood. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 1697-1701.
- Wang T (2015) Einzelzell-Isolierung von Flagellaten und Hefen aus Termiten mittels Mikromanipulation und Charakterisierung der Isolate. Diplomarbeit. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Wang W, Yang S, Hunsinger GB, Pienkos PT, Johnson DK (2014) Connecting lignin-degradation pathway with pre-treatment inhibitor sensitivity of *Cupriavidus necator*. *Front Microbiol* **5**, 1-10.
- Warburg O, Christian W (1941) Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase. *Biochem Z* **310**, 384-421.
- Watanabe H, Tokuda G (2010) Cellulolytic systems in insects. *Annu Rev Entomol* **55**, 609-632.
- Wertz JT, Breznak JA (2007) Physiological ecology of *Stenoxybacter acetivorans*, an obligate microaerophile in termite guts. *Appl Environ Microbiol* **73**, 6829-6841.
- Wertz JT, Kim E, Breznak JA, Schmidt TM, Rodrigues JLM (2012) Genomic and physiological characterization of the *Verrucomicrobiota* isolate *Diplosphaera colitermitum* gen. nov., sp. nov., reveals microaerophily and nitrogen fixation genes. *Appl Environ Microbiol* **78**, 1544-1555.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, S. 315-322. Innis M, White T, Sninsky JJ (Hrsg.). Academic Press Inc., San Diego.
- Whitsitt ML (1933) Vitamin B(B₁) and G(B₂) content of cotton-seed products. *Ind Eng Chem* **25**, 1169-1171.
- Wickerham LJ (1951) Taxonomy of yeasts. *Tech Bull US Dep Agric* **1029**, 1-56.
- Williams MJ, Douglas J (2011) Planting and managing giant miscanthus as a biomass energy crop. Technical note no. 4. *USDA NRCS*. Report.
- Xu Y, Fan L, Wang X, Yong Q, Yu S-Y (2013) Simultaneous separation and quantification of linear xylo- and cello-oligosaccharides mixtures in lignocellulosics processing products on high-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection. *BioResources* **8**, 3247-3259.
- Yang B, Wyman CE (2008) Pretreatment: the key to unlock low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioprod Biorefin* **2**, 26-40.
- Yang J, Zhang X, Yong Q, Yu S (2011) Three-stage enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover at high substrate concentration. *Biores Biotechnol* **102**, 4905-4908.
- Yang S-T, El Enshasy HA, Thongchul N (Hrsg.) (2013) *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*. John Wiley & Sons, Hoboken.
- Yoro DT, N'guessan KF, Dabonne S, Kouassi NK, Kofi-Nebry R, Kouamé LP (2014) Yeast diversity in the intestinal tract of the fungus-growing termite *Macrotermes subhyalinus*. *Int J Adv Res* **2**, 139-150.
- Yurkov AM, Guerreiro MA, Sharma L, Carvahlo C, Fonseca Á (2015) Multigene assessment of the species boundaries and sexual status of the basidiomycetous yeasts *Cryptococcus flavescens* and *C. terrestris* (Tremellales). *PLoS ONE* **10**, e0126996.
- Zaky AS, Tucker GA, Daw ZY, Du C (2014) Marine yeast isolation and industrial application. *FEMS Yeast Res* **14**, 813-825.
- Zha D (2012) Glycoengineered yeast as an alternative monoclonal antibody discovery and production platform. In: *Glycosylation*, S. 419-436. Petrescu S (Hrsg.). InTech, Rijeka.
- Zhang J, Moilanen U, Tang M, Viikari L (2013) The carbohydrate-binding module of xylanase from *Nonomuraea flexuosa* decreases its non-productive adsorption on lignin. *Biotechnol Biofuels* **6**, 1-8.
- Zhou J, Gao Y, Dong Y, Tang X, Li J, Xu B, Mu Y, Huang Z (2012) A novel xylanase with tolerance to ethanol, salt, protease, SDS, heat, and alkali from actinomycete *Lechevalieria* sp. HJ3. *J Ind Microbiol Biotechnol* (2012) **39**, 965-975.
- Zykwinska AW, Ralet M CJ, Garnier CD, Thibault JFJ (2003) Evidence for *in vitro* binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiol* **139**, 397-407.

7. – Anhang

7.1 – Thermodruckhydrolysestroh

Die Thermodruckhydrolyse und Strohanalyse wurde nach Ballmann *et al.* (2013) durch das PFI durchgeführt. Nachfolgend sind die variierenden Parameter der TDH und die gelösten Zucker nach dem Aufschluss von Stroh durch TDH gezeigt (Tab. 7.1, siehe auch Kapitel 3.2.3 und 4.4.3).

Tabelle 7.1: Thermodruckhydrolyse-Parameter und Zuckergehalte in der TDH-Flüssigphase. Sechs Strohproben (S1-S6) wurden bei unterschiedlichen Parametern mit der TDH-Methode vorbehandelt. Strohprobe Nummer 6 (S6) wurde nicht mit Salpetersäure versetzt. Der prozentuale Anteil von Substanzen (z. B. Cellulose) ist relativ zur organischen Gesamtmasse. Die Analyse erfolgte durch das PFI nach Angaben des Zulieferers: NREL Biomasse Methode und Analysen nach DIN EN 12879-12880 und 15104 (Ballmann *et al.* 2013; Dr. Stefan Dröge, PFI (2014, 2015) persönliche Kommunikation. Mainz, Pirmasens).

Strohprobe (S)	S1	S2	S3	S4	S5	S6	
TDH-Parameter	Temperatur [°C]	120	160	150	150	160	160
	Salpetersäure [% (v/v)]	0,33	0,00	0,32	0,32	0,33	0,50
	Zeit [min]	60	90	60	90	90	60
	Wasser vor TDH [l]	6,66	6,66	13,30	10,00	6,66	10,00
	Wasserdampf während TDH [l]	1,98	10,40	13,10	9,47	9,60	9,19
	Flüssigkeit nach TDH (Hydrolysat) [l]	8,64	13,30	20,90	19,47	16,30	19,19
	Strohmasse vor TDH [kg]	1,00	1,00	2,00	1,50	1,00	1,50
	Strohmasse nach TDH [kg]	4,24	4,40	7,51	13,60	4,10	13,50
Hydrolysat	Glucose [g/l]	0,20	0,85	1,97	2,42	2,09	3,65
	Xylose [g/l]	2,30	1,42	10,95	11,50	7,50	7,47
	Arabinose [g/l]	0,84	0,95	1,98	3,56	1,22	0,62
	Essigsäure [g/l]	0,24	0,77	1,06	1,25	0,91	1,71
	5-HMF [g/l]	0,10	0,01	0,65	1,02	0,13	3,47
	Furfural [g/l]	0,10	0,38	0,02	0,14	1,61	0,19
	Trockensubstanz [%]	1,65	1,70	1,94	1,95	1,51	1,72
	Organische Trockensubstanz [%]	1,52	1,58	1,81	1,83	1,41	1,58
Trockensubstanz vor TDH [%]	Stickstoff [%]	0,03	0,03	0,03	0,05	0,06	0,05
	Gesamt (organisch und anorganisch)	94,50	92,30	92,80	92,83	94,00	92,83
	Gesamt (nur organisch)	89,30	87,30	88,40	88,48	88,60	88,48
	Cellulose	33,00	35,70	39,60	39,60	34,50	39,60
	Xylan	24,30	25,20	28,90	28,90	25,50	28,90
	Lignin	27,10	22,40	18,10	18,10	21,60	18,10
	Extraktstoffe	11,30	9,70	8,80	8,80	10,20	8,80
	Asche	5,50	5,40	2,91	2,90	5,70	2,90
Trockensubstanz nach TDH [%]	Unidentifiziert	-1,20	1,60	1,69	1,70	2,50	1,70
	Gesamt (organisch und anorganisch)	19,10	16,40	19,10	17,52	15,00	17,14
	Gesamt (nur organisch)	17,90	15,30	18,20	16,47	14,00	15,98
	Cellulose	41,10	42,30	51,20	43,10	40,40	39,60
	Xylan	13,40	12,90	13,70	8,40	6,44	4,70
	Lignin	29,10	25,20	27,60	27,90	28,90	32,20
	Glucose	0,02	0,01	0,21	0,52	0,03	0,52
	Xylose	0,47	0,02	1,38	1,61	1,14	1,40
Arabinose	0,13	0,01	0,15	0,25	0,15	0,16	
Trockensubstanz nach TDH [%]	Extraktstoffe	0	0,30	0	0	0	0
	Asche	6,50	6,50	1,42	5,60	6,40	6,30
	Stickstoff	0,67	0,60	0,17	0,13	0,60	0,12
	Unidentifiziert	8,61	12,15	4,18	12,49	15,93	15,00

7.2 – Größe von ITS-RFLP-Fragmenten

Die ITS-RFLP-Muster je eines Vertreters der lignocellulolytischen Hefestämme aus Insekten und von *Candida tropicalis* MD1M sind in Abb. 7.1 dargestellt. Die Muster unterschieden sich signifikant, sodass eine Bestimmung der Hefestämme auf das Artniveau möglich war.

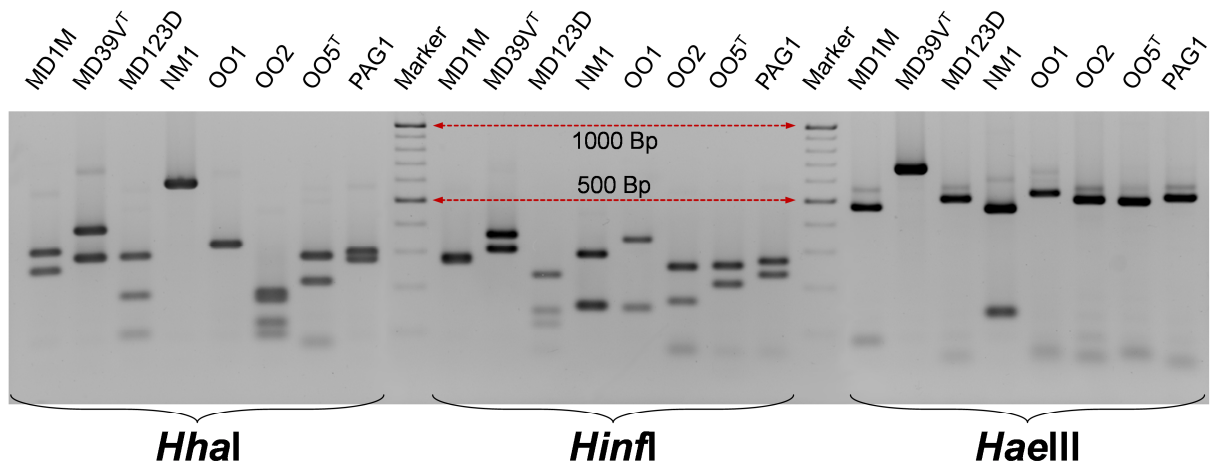


Abbildung 7.1: ITS-RFLP-Muster lignocellulolytischer Hefen und von Stamm MD1M. Marker: Gene Ruler Mix (Thermo Scientific). Die Markerbanden liegen in 100 Bp Intervallen vor. Die Stammnamen sind an der Oberseite der Abbildung angegeben: MD1M: *Candida tropicalis*. MD39V^T: *Sugiyamaella mastotermitis*. MD123D: *Apiotrichum mycotoxinivorans*. NM1: *Sugiyamaella smithiae*. OO1: *Naganishia albida*. OO2: *Saitozyma flava*. OO5^T: *Papiliotrema odontotermitis*. PAG1: *Trichosporon asahii*.

Die ITS-RFLP-Muster von nicht lignocellulolytischen Hefen sind in Abb. 7.2 dargestellt. Der *HhaI*- und *HaeIII*-Verdau der ITS-Amplifikate von den Stämmen *Rhodotorula mucilaginosa*

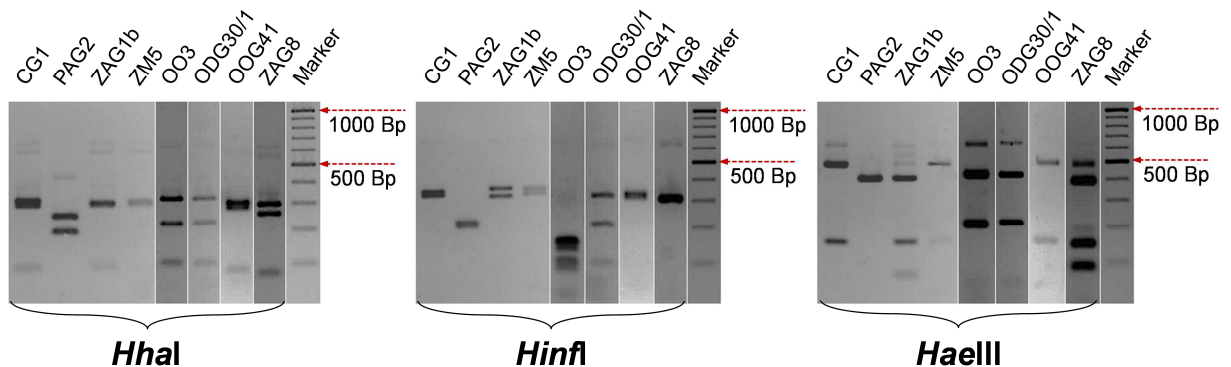


Abbildung 7.2: ITS-RFLP-Muster nicht lignocellulolytischer Hefen. Die Darstellung stammt aus verschiedenen Gelen. Marker: Gene Ruler Mix (Thermo Scientific). Die Markerbanden liegen in 100 Bp Intervallen vor. Die Stammnamen sind an der Oberseite der Abbildung angegeben: CG1: *Scheffersomyces coipomoensis*. PAG2: *Candida duobushaemulonii*. ZAG1b: *Candida membranifaciens*. ZM5: *Scheffersomyces shehatae*. OO3: *Rhodotorula mucilaginosa*. ODG30/1: *Rhodotorula toruloides*. OOG41: *Scheffersomyces stipitis*. ZAG8: *Meyerozyma guilliermondii*.

OO3 und *Rhodotorula toruloides* ODG30/1 ergab ein gleiches Muster. Dies galt auch für den *HhaI*-Verdau der ITS-Amplifikate der Stämme *Scheffersomyces coipomoensis* CG1, *Candida membranifaciens* ZAG1b, *Scheffersomyces shehatae* ZM5 und *Scheffersomyces stipitis* OOG41. Die Unterschiede im *HinfI* und *HaeIII*-Verdau der ITS-Amplifikate von den Stämmen *Scheffersomyces* sp. CG1, ZM5 und OOG41 waren wenig signifikant. Die drei Arten der

Gattung *Scheffersomyces* konnten demnach nicht mit der RFLP-Methode unterschieden werden (siehe Tab. 4.3). Das ITS-RFLP-Muster von *Eremothecium coryli* wurde nicht ermittelt.

7.3 – Stammsammlungshinterlegungen und GenBank-Einträge

Hefestämme wurden bei einer ITS-Sequenzabweichung von $\geq 2\%$ oder bei lignocellulolytischer Aktivität in der DSMZ-Stammsammlung hinterlegt (Tab. 7.2). Die Typstämme der neuen Arten *Sugiyamaella mastotermitis* und *Papiliotrema odontotermitis* wurden zudem in die Stammsammlung des CBS aufgenommen. Vertreter der *Su. mastotermitis*-Kreuzungstypen a und α wurden in der DSMZ-Stammsammlung hinterlegt (siehe Kapitel 4.2.3).

Tabelle 7.2: Hinterlegungen in der Stammsammlung der DSMZ und des CBS. –: keine Hinterlegung. Lignocellulolytische Hefearten, die aus Stammsammlungen bezogen wurden oder in die biologische Sicherheitsstufe S2 eingestuft waren, wurden nicht hinterlegt (*Trichosporon asahii* PAG1) (BMAS 2002). Stämme, die im Rahmen dieser Arbeit isoliert wurden tragen die Stammbezeichnung MD. ^T: Typstamm.

Hefespezies	IMW-Stammname	DSMZ-Stammname	CBS-Stammname
<i>Apiotrichum mycotoxinivorans</i>	MD123D	DSM 100794	–
	MYG6	DSM 100792	–
<i>Naganishia albida</i>	OO1	DSM 100789	–
<i>Papiliotrema odontotermitis</i>	OO5 ^T	DSM 100791 ^T	CBS 14181 ^T
<i>Rhodotorula toruloides</i>	OAG36	DSM 103599	–
	ODG30/1	DSM 103600	–
<i>Saitozyma flava</i>	OO2	DSM 100790	–
<i>Sugiyamaella mastotermitis</i>	MD17S	DSM 103598	–
	MD18G	DSM 103597	–
	MD39V ^T	DSM 100793 ^T	CBS 14182 ^T
	MD75V	DSM 103596	–
<i>Sugiyamaella smithiae</i>	NM1	DSM 100795	–

7.4 – Erweitertes lignocellulolytisches Abbauspektrum ausgewählter Hefestämme

Alle xylanasepositive Hefestämme besaßen die Fähigkeit 4-MUF- β -Xylobiosid und 4-MUF- β -Xylotriosid abzubauen (Tab. 7.3). Manche der xylanasepositiven und -negativen Stämme konnten zudem typische Hemicellulose-Substituenten abspalten. Dies äußerte sich durch die Spaltung von 4-MUF- α -L-Arabinofuranosid (Stämme MD123D, OO2, OO5^T, PAG1), 4-MUF- α -D-Glucopyranosid (Stämme MD1M, MD39V^T, MD123D, NM1, OO2, OO5^T, PAG1) oder 4-MUF- α -D-Mannopyranosid (Stämme MD1M, MD39V^T, MD123D, NM1, OO2, OO5^T, PAG1). Die in Tab. 4.3 beschriebenen Cellulaseaktivitäten konnte durch den Abbau von 4-MUF- β -Cellooligosacchariden der Stämme OO2 und PAG1 bestätigt werden (Ausnahme: 4-MUF- β -Cellotriosid bei Stamm OO2). Für den Stamm MD123D konnte keine Spaltung von Cellooligosacchariden gemessen werden.

Tabelle 7.3: Abbau von 4-MUF-Substraten durch ausgewählte Hefestämme. Die Stämme *Candida tropicalis* MD1M, *Cryptococcus albidus* OO1, *Papiliotrema odontotermitis* OO5^T, *Saitozyma flava* OO2, *Sugiyamaella mastotermitis* MD39V^T, *Sugiyamaella smithiae* NM1, *Trichosporon asahii* PAG1 und *Apiotrichum mycotoxinivorans* MD123D sind aufgelistet. +: signifikanter Abbau. -: keine Aktivität nachweisbar. w: schwach positiv. K: Kulturüberstand. Z: Zellextrakt.

Substrat	Stamm	MD1M		MD39V ^T		MD123D		NM1		OO1		OO2		OO5 ^T		PAG1	
		K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z
4-MUF- α -L-Arabinofuranosid		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	s	-	+
4-MUF- α -D-Glucopyranosid		s	+	s	-	-	+	-	s	-	-	-	+	-	+	-	+
4-MUF- α -D-Mannopyranosid		s	+	s	-	-	+	-	s	-	-	-	s	-	-	-	+
4-MUF- β -D-Cellobiosid		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
4-MUF- β -D-Cellotriosid		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	s	-
4-MUF- β -D-Cellotetraosid		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
4-MUF- β -D-Cellopentaosid		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
4-MUF- β -D-(1,3;1,4)- Glucotriosid		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-MUF- β -D-Xylobiosid		-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
4-MUF- β -D-Xylotriosid		-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-

7.5 – Phylogenetische Analyse von *Sugiyamaella mastotermitis* und *Papiliotrema odontotermitis*

Die für die Stammbaumanalysen verwendeten Sequenzen aus der GenBank-Datenbank sind in Tab. 7.4 und 7.5 gezeigt. Weitere *Sugiyamaella mastotermitis*-Sequenzen wurden ermittelt und nicht für die Stammbaumanalyse verwendet. Diese sind nachfolgend mit dem Stammnamen, der Nukleotidregion und dem GenBank-Eintrag angegeben: MM1-ITS-KU883294, MYG5-ITS-KU883295, MD17G-ITS-KU883296, MD17G-SSU-KU883281, MD39V^T-RPA1-KU883291, MD39V^T-RPA2-KU883291, MD39V^T-RPB1-KU883292, MD39V^T-RPC1-KU883289, MD39V^T-RPC2-KU883285, MD39V^T-TEF1-KU883284. Die Gennamen stehen für RNA-Polymerase-Untereinheiten (*RPx*) und den Translationselongationsfaktor α (*TEF*).

Tabelle 7.4: GenBank-Nummern der ITS, LSU, MtSSU und COX2-Sequenzen zur phylogenetischen Analyse von *Sugiyamaella mastotermitis*. Fett: im Rahmen dieser Arbeit ermittelt (verändert nach Handel *et al.* 2016).

Hefespezies	Stamm	ITS	LSU	MtSSU	COX2
<i>Candida</i> sp.	BG02-3-7-5-1-1	–	AY390773	–	–
	BG02-3-7-5-1-2	–	AY520368	–	–
	CBS 10848	–	EU570112	–	–
	CBS 10851	–	EU570114	–	–
	CBS 10852	–	EU570106	–	–
	CBS 10853	–	EU570116	–	–
	CECT 10348	–	FN565483	–	–
	GA3M12	–	FJ873524	–	–
	GY43S04	–	FJ527154	–	–
	NCAIM Y.01893	–	GQ258822	–	–
	SD4S01	–	EF653948	–	–
<i>Diddensiella santjacobensis</i>	Y-17667 ^T	CBS 8183 (03/03/2006)	DQ442701	DQ442780	DQ443108
<i>Middelhovenomyces tepae</i>	Y-17670 ^T	AY569004	DQ442704	DQ442782	DQ443111
<i>Spencermartinsiella europaea</i>	CBS 11730 ^T	GU733454	GU597325	JX136868	JX136866
<i>Sugiyamaella americana</i>	YB-2067 ^T	–	DQ438193	DQ442723	DQ443051
<i>Sugiyamaella boreocaroliniensis</i>	YB-1835 ^T	DQ911448	DQ438221	DQ442737	DQ443065
<i>Sugiyamaella bullrunensis</i>	ATCC MYA-4660 ^T	–	HM208601	–	–
<i>Sugiyamaella castrensis</i>	Y-17329 ^T	DQ911441	DQ438195	DQ442725	DQ443053
<i>Sugiyamaella chiloensis</i>	Y-17643	DQ911454	DQ438217	DQ442733	DQ443061
<i>Sugiyamaella floridensis</i>	YB-3827 ^T	DQ911442	DQ438222	DQ442738	DQ443066
<i>Sugiyamaella grinsbergii</i>	Y-27117 ^T	DQ911443	DQ438199	DQ442729	DQ443057
<i>Sugiyamaella japonica</i>	YB-2798 ^T	DQ911456	DQ438202	DQ442732	DQ443060
<i>Sugiyamaella lignohabitans</i>	YB-1473 ^T	DQ911444	DQ438198	DQ442728	DQ443056
<i>Sugiyamaella marilandica</i>	YB-1847 ^T	DQ911445	DQ438219	DQ442735	DQ443063
<i>Sugiyamaella marionensis</i>	YB-1336 ^T	DQ911452	DQ438197	DQ442727	DQ443055
<i>Sugiyamaella mastotermitis</i>	MD15M	–	KU883287	–	–
	MD17G	–	KU883288	–	–
	MD39V ^T	KU883293	KU883286	KU883282	KU883279
	MM1	–	AF272394	–	–
<i>Sugiyamaella neomexicana</i>	YB-2450 ^T	DQ911447	DQ438201	DQ442731	DQ443059
<i>Sugiyamaella novakii</i>	Y-27346 ^T	DQ911449	DQ438196	DQ442726	DQ443054
<i>Sugiyamaella paludigena</i>	Y-12697 ^T	DQ911451	DQ438194	DQ442724	DQ443052
<i>Sugiyamaella pinicola</i>	YB-2263 ^T	DQ911453	DQ438200	DQ442730	DQ443058
<i>Sugiyamaella qingdaonensis</i>	AS2.4031 ^T	–	FJ613527	–	–
<i>Sugiyamaella smithiae</i>	Y-17850 ^I	DQ911455	DQ438218	DQ442734	DQ443062
<i>Sugiyamaella</i> sp.	UFMG-CO-31.1	–	KC959939	–	–
	UFMG-CO-50.1	–	KC959940	–	–
	UFMG-IA-2.1	–	KC959941	–	–
<i>Sugiyamaella valdiviana</i>	Y-7791 ^T	NR_111544	DQ438220	DQ442736	DQ443064
<i>Sugiyamaella xylanicola</i>	CBS 12683 ^T	–	KC493642	–	–
<i>Zygoascus hellenicus</i>	Y-7136 ^T	DQ911464	DQ438216	DQ442719	DQ443047

Tabelle 7.5: GenBank-Nummern der ITS und LSU-Sequenzen zur phylogenetischen Analyse von *Papiliotrema odontotermitis*. Fett: im Rahmen dieser Arbeit ermittelt (verändert nach Handel *et al.* 2016).

Hefespezies	Stamm	ITS	LSU
<i>Papiliotrema anemochoreius</i>	CBS 10258 ^T	DQ830986	DQ384929
<i>Papiliotrema aspenensis</i>	CBS 13867 ^T	KC485500	KC469778
<i>Papiliotrema aureus</i>	CBS 318 ^T	LK023832	LK023771
<i>Papiliotrema baii</i>	PYCC 6523 ^T	LK023827	LK023766
<i>Papiliotrema bandonii</i>	CBS 9107 ^T	NR_121465	AF416642
<i>Papiliotrema flavescens</i>	CBS 942 ^T	LK023787	LK023726
<i>Papiliotrema fonsecae</i>	CBS 12692 ^T	LK023835	LK023835
<i>Papiliotrema frias</i>	DSM 26993 ^T	LK023834	LK023834
<i>Papiliotrema fuscus</i>	CBS 9647 ^T	NR_111084	AF444762
<i>Papiliotrema hoabinhensis</i>	JCM 10835 ^T	AB110695	AB193347
<i>Papiliotrema japonica</i>	CBS 2013 ^T	AF444666	AF444760
<i>Papiliotrema laurentii</i>	CBS 139 ^T	LK023833	LK023772
<i>Papiliotrema leoncinii</i>	CBS 13918 ^T	KP203864	KJ608554
<i>Papiliotrema mangalienesis</i>	CBS 10870 ^T	FJ008052	FJ008046
<i>Papiliotrema miconiae</i>	CBS 8358 ^T	AF444387	AF444698
<i>Papiliotrema nemorosus</i>	CBS 9606 ^T	AF472628	AF472625
<i>Papiliotrema odontotermitis</i>	OO5 ^T	KU883277	KU883278
<i>Papiliotrema perniciosus</i>	CBS 9605 ^T	AF472627	AF472624
<i>Papiliotrema pseudoalba</i>	CBS 7227 ^T	NR_073231	AF075504
<i>Papiliotrema rajasthanensis</i>	CBS 10406 ^T	AM262325	AM262324
<i>Papiliotrema ruineiae</i>	PYCC 6170 ^T	LK023825	LK023764
<i>Papiliotrema siamense</i>	CBS 13330 ^T	AB915387	AB909023
	CBS 8363	LK023831	LK023770
	PYCC 6306	LK023830	LK023769
<i>Papiliotrema</i> sp.	NRRL Y-30213	EF056298	EF056309
	NRRL Y-30215	EF056299	EF056310
	PYCC 6306	LK023830	LK023769
<i>Papiliotrema taeanensis</i>	CBS 9742 ^T	AY686645	AY422719
<i>Papiliotrema terrestris</i>	CBS 10810 ^T	LK023817	LK023756
<i>Papiliotrema wisconsinensis</i>	CBS 13895 ^T	KM384105	KM408131
<i>Rhynchogastrea aquatica</i>	CBS 12527 ^T	NR_120001	JN979992
<i>Rhynchogastrea complexa</i>	CBS 11570 ^T	NR_111476	GU321090
<i>Rhynchogastrea coronatum</i>	DSM 28188	LN870267	LN870267
<i>Rhynchogastrea fermentans</i>	CBS 12398 ^T	HQ623541	HM461720
<i>Rhynchogastrea glucofermentans</i>	CBS 10381 ^T	NR_119978	AY520334
<i>Rhynchogastrea nanyangensis</i>	CBS 12474 ^T	JN564591	JN564592
<i>Rhynchogastrea noutii</i>	CBS 8364 ^T	NR_111072	AF444700
<i>Rhynchogastrea tunnelae</i>	CBS 8024 ^T	NR_111074	AF444715
<i>Rhynchogastrea visegradiensis</i>	CBS 12505 ^T	NR_111591	GU195658

Abb. 7.3 zeigt den LSU-Stammbaum der Gattung *Sugiyamaella* mit *Su. mastotermitis*. Dieser Baum ist vollständiger, aber ungenauer als die Multilokusanalyse (siehe Abb. 4.1).

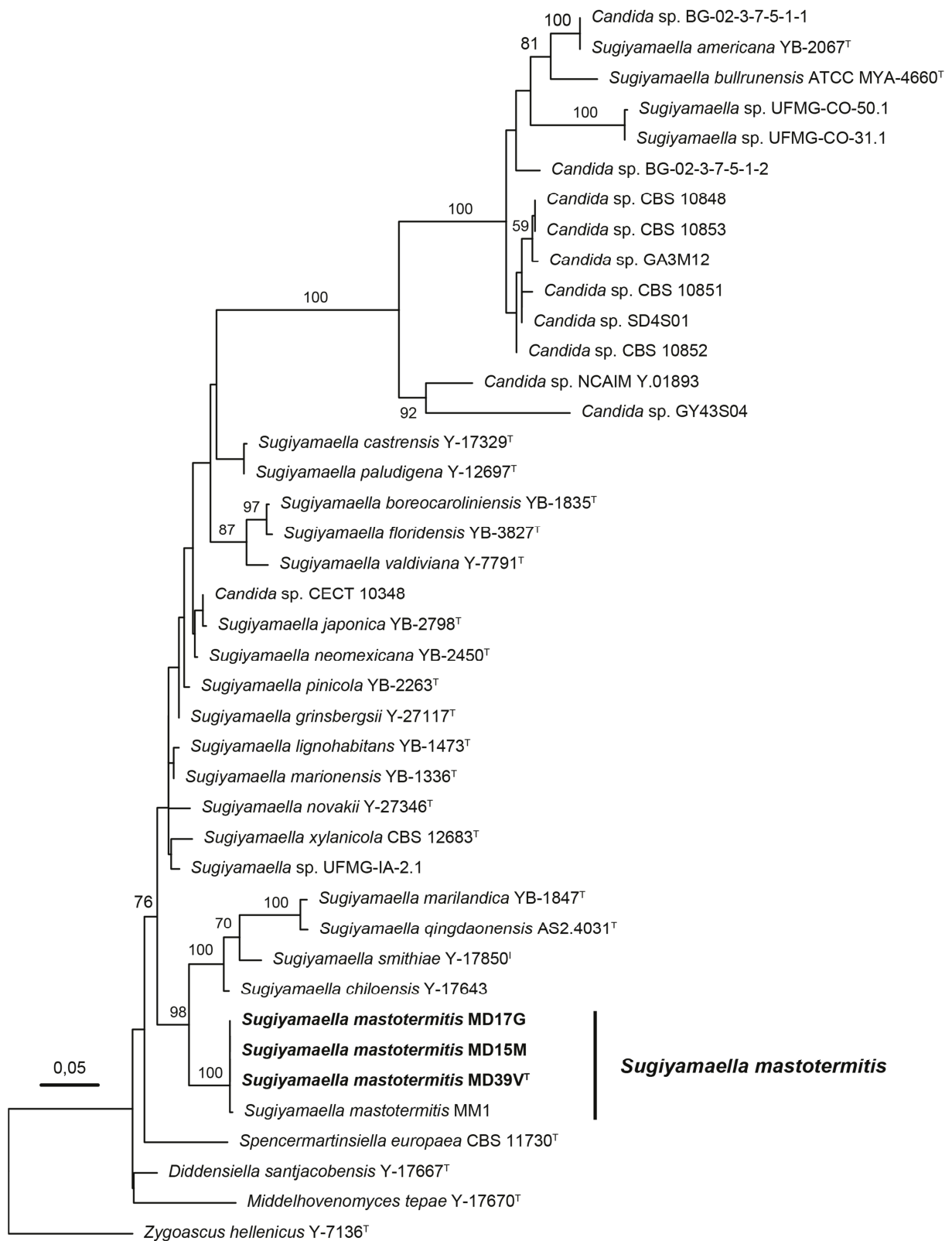


Abbildung 7.3: Phylogenetische Zuordnung von *Sugiyamaella mastotermitis* mittels Einzellokus-Analyse der LSU-Region. ML-Analyse. Die Nummern an den Verzweigungspunkten sind die prozentualen Frequenzen, mit denen ein bestimmter Verzweigungspunkt bei 1.000 Bootstrap-Wiederholungen auftrat (nur > 50 % dargestellt). Die Skala gibt die Anzahl der erwarteten Nukleotidaustausche pro Stelle an. ^T: Typstamm (Handel *et al.* 2016).

7.6 – 3D-Homologiemodell der Xylanase Xyl1

Die wahrscheinlich katalytischen Reste E76 und E169 von Xyl1 wurden per Sequenzvergleich mit der *Aspergillus niger*-Xylanase XYNA identifiziert (siehe Kapitel 4.4.2; PDB-Einträge: 1UKR, 2QZ2) (Krengel und Dijkstra 1996, Vandermarliere *et al.* 2008). Die E76- und E169-stabilisierenden Aminosäuren waren vollständig konserviert und sind in Abb. 7.4 mit den potenziellen Wasserstoffbrücken dargestellt.

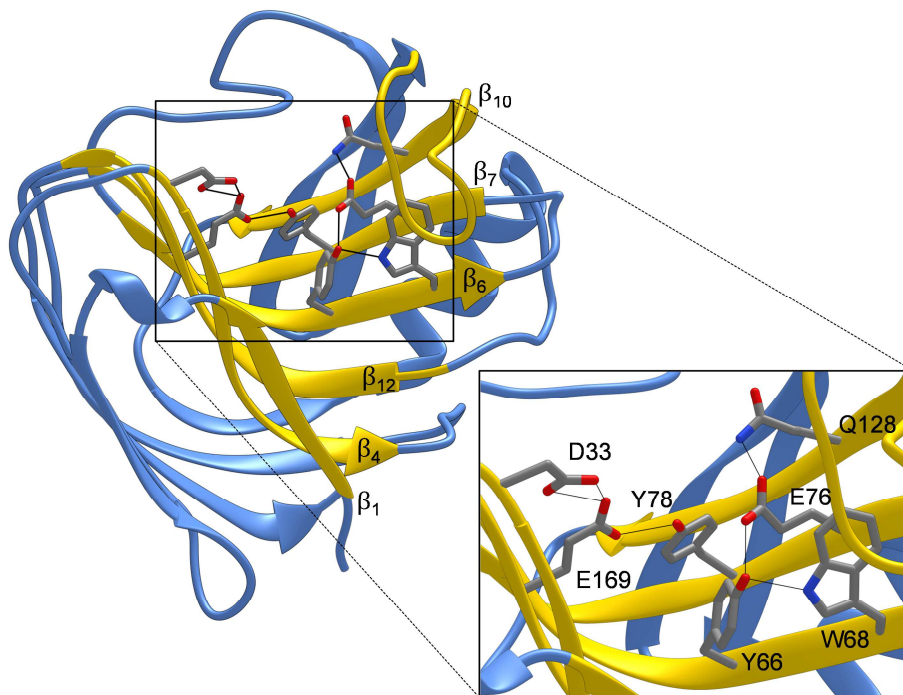


Abbildung 7.4: Stabilisation von katalytisch aktiven Resten im Xyl1 3D-Homologiemodell. Gelb: Aktives ungebundenes Zentrum mit den katalytisch aktiven Resten E76 und E169. Rot/dunkelblau/grau: O-/N-/C-Atome. Schwarze Linien: wahrscheinliche, stabilisierende Wasserstoffbrückenbindungen. Hellblau: restliches Protein. Das Modell basiert auf der substratfreien GHF 11-Xylanase von *Aspergillus niger* (PDB-Eintrag 1UKR).

Wasserstoffbrückenentfernungen von 2,5-3,2 Å werden als moderat und 3,2-4,0 Å als schwach elektrostatisch bindend angegeben. Energiewerte liegen bei 4-15 und respektive < 4 kcal/mol (Jeffrey 1997). Die Distanzen aller Wasserstoffbrückenbindungen sind in Abb. 7.5 dargestellt. Die Wasserstoffbrücken einiger Aminosäuren zu den Sauerstoffatomen der Xylose (Gln6N_ε-O3_X, Asp33O_{δ2}-O5_X und Tyr78OH-O1_X) waren laut Modell unwahrscheinlich für Xyl1, da die Distanzen mehr als 4 Å betragen (Abb. 7.5a). Die Wasserstoffbrücken zwischen Asp33 und E169 hatten eine Länge von 3,36 und 3,41 Å, was eine schwache Bindungsstärke darstellen würde, falls das Modell korrekt war. Diese Distanz vergrößerte sich mit der Bindung von Xylobiose. Dies könnte ein Indikator dafür sein, dass diese Wasserstoffbrücken bei Xylobiosebindung aufgehoben werden (Abb. 7.5b; siehe auch Kapitel 4.4.2).

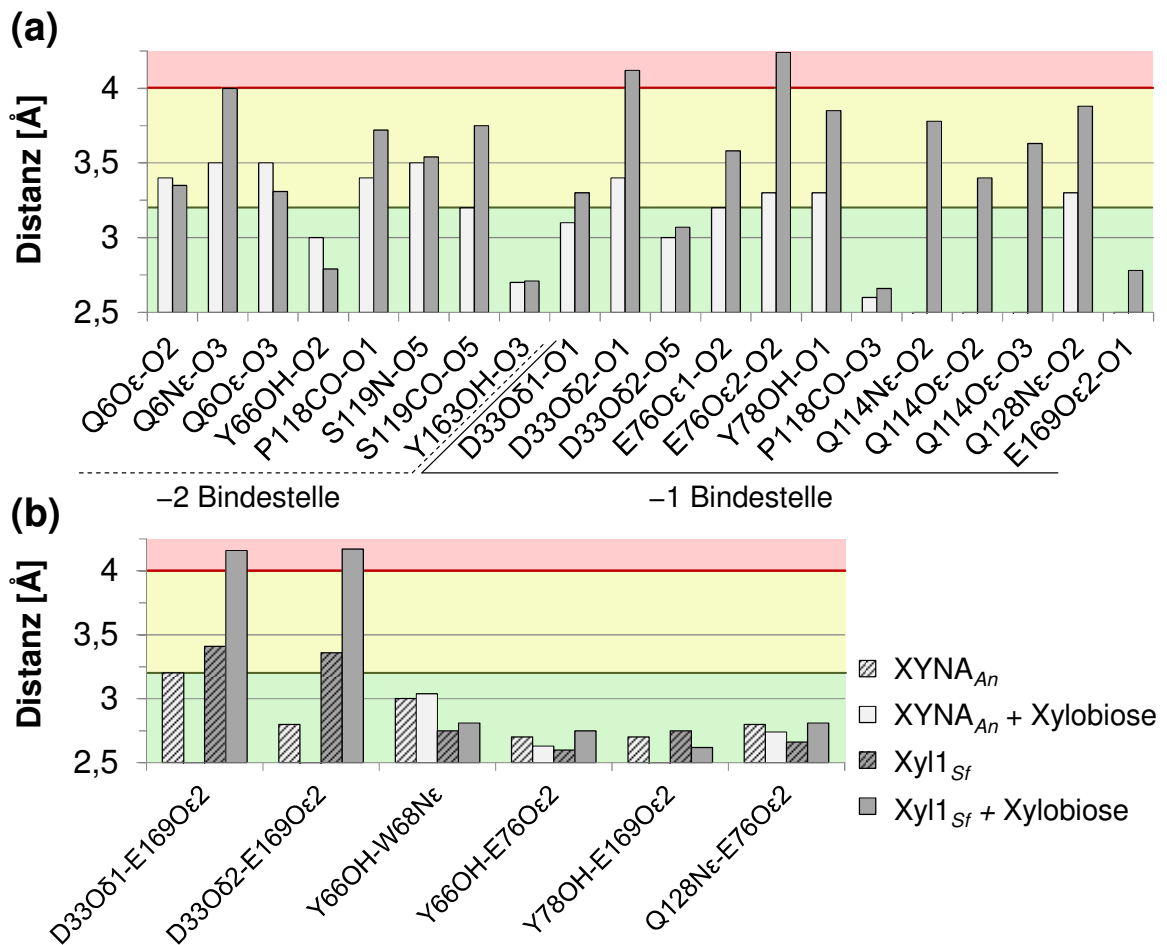


Abbildung 7.5: Wasserstoffbrückendistanz im aktiven Zentrum von Xyl1 und der ähnlichen *Aspergillus niger* Xylanase XYNA. Hellgrau: *Aspergillus niger* Xylanase XYNA. Dunkelgrau: *Saitozyma flava* Xylanase Xyl1. Schraffiert/nicht schraffiert: ohne/mit Xylobiose. Grün/gelb: moderate/schwache Bindungsstärke der H-Brückenbindung (4-15 und < 4 kcal/mol). Rot: unwahrscheinliche Bindung (Jeffrey 1997). (a) Distanzen von potentiellen Wasserstoffbrücken zu den Xylose-Atomen O1-5. Q114 kam nur bei Xyl1 vor. (b) Einfluss der Xylobiosebindung auf die Wasserstoffbrücken des aktiven Zentrums. Die xylobiosehaltige *Aspergillus niger*-Xylanase XYNA hatte die Mutation E169A.

Die xylosebindenden Reste des aktiven Zentrums waren vollständig konserviert (Tab. 7.6). Q114 war in XYNA nicht vorhanden und könnte an der Xylosebindung beteiligt sein (siehe Kapitel 4.4.2). In der Peripherie des aktiven Zentrums befand sich der nicht konservierte Aromat H112 und der schlecht konservierte Aromat F171. Die XYNA-Xylotriosebindestelle bestand in Xyl1 aus wenigen schlecht konservierten polaren Aminosäuren.

Tabelle 7.6: Konservierung von potentiell xylosebindenden Xyl1-Aminosäuren. Aminosäureaustausche in den Xylooligosaccharid-Bindestellen sind dargestellt. Δ = Keine Aminosäure. XYNA: substratfreie *Aspergillus niger*-Xylanase und Referenzkristall (PDB-Eintrag: 1UKR).

Ort	Aminosäure Xyl1 / XYNA
-1 Bindestelle (aktives Zentrum)	Q114 / Δ
Peripherie des aktiven Zentrums	H112 / D113
	F171 / W172
Bindestelle I (Xylotriose-Bindestelle)	A13 / G15
Bindestelle II (Xylotriose-Bindestelle)	Δ / E31
	N31 / D32
Bindestelle III (Xylotriose-Bindestelle)	N14 / D16
	N27 / Y29
	Δ / E31

7.7 – Laborutensilien, Chemikalien und bioinformatische Programme

Die verwendeten Geräte und Materialien sind in den Tab. 7.7, 7.8 und 7.9 aufgelistet. Eine Übersicht über die verwendeten Programme und Datenbanken sowie deren Internetadressen befindet sich in Tab. 7.10.

Tabelle 7.7: Liste ausgewählter Laborgeräte und Utensilien. Die verwendeten Laborutensilien sind nachfolgend aufgeführt. Der Hersteller und der Typ sind angegeben (wenn bekannt).

Gerät / Utensil	Hersteller	Modell/Typ oder Artikelnummer
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Biorad	Sub-Cell Model 96
Analysewaage	Sartorius Analytic	–
Biophotometer	Eppendorf	–
CarboPac PA200 + Guard-Säule	Dionex / Thermo Fisher	062896, 062895
Dialyseschlauch	Roth	Zellutrans 3,5 kDa
Elektrochemischer Detektor	Dionex	ED40
Entionierungsanlage	Merck Millipore	RiOs 30
FastPrep-24 Zelmühle	MP Biomedicals	FastPrep-24
FPLC-Anlage	Pharmacia	GP-250, P-500, Single Path Monitor UV-1, FRAC-100, Schreiber 19-8004-01
Geldokumentationsanlage	LVA	Vilber Loormat
Glaskugeln (0,25-0,5 mm)	Roth	A553
Heizblock (für 2 ml-Gefäße)	Eppendorf	Thermomixer comfort
HPLC-Anlage A (für Zucker)	Shimadzu	SIL-10Ai, DGU-20A _{5R} , LC-10Ai, CTO-20AC, CBM-20A
HPLC-Anlage B (für kurzketttige Fettsäuren und Alkohole)		SIL-10A, LC-10AT, CTO-10A, SCL-10, RID-10A
HPX-87H-Säule	Biorad	1250140
Lichtmikroskop	Keyence	BZ-8000K
Massenspektrometer	Waters	Synapt G2-S
Mikroplattenphotometer	BMG Labtech	FLUOstar Omega Photometer
Millipore-Anlage	Merck Millipore	Milli-Q _{Plus} 185
MiniMAHFIA	CTSV	83010
PCR-Cycler A	Biorad	S1000 Thermal Cycler
PCR-Cycler B	Eppendorf	Mastercycler gradient
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss	Axioskop 40
pH-Meter	Schott	CG 840
pH-Meter Mikroelektrode	Mettler-Toledo	InLab Micro
Rotoforsystem	Biorad	170-2906
Schlagmühle	Ciatronic	KSW 3306
SDS-Page Utensilien	Biorad	Mini-PROTEAN Tetra Handcast System
Spritzenfilter Chromafil Xtra RC-20/25	Macherey-Nagel	729230
Superose 12 10/300 GL	GE Healthcare	17-5173-01
Tischphotometer	Fisher Scientific	Colorimeter Model 45
UPLC-Anlage	Waters	NanoAcquity
UV-Vis Spektrophotometer	Shimadzu	UV-2450
Vakuumfilter	Pall Life Sciences	AcroVac Filter Units
Vakuumfilter (HPLC, Cellulose-Acetatfilter)	Sartorius Stedim	11107
Vivaspin 20, 5 kDa		VS2012
Wasserbad	GFK	1003
Zählkammer	Thoma	0,1 mm × 0,0025 mm ² / Quadrat

Tabelle 7.8 – Zentrifugen und Rotoren. Die Tabelle zeigt die verwendeten Zentrifugen und die zugehörigen Rotoren.

Hersteller / Typ	Rotor	Volumina
Eppendorf Centrifuge 5403	16 F12-17	≤ 15 ml
Heraeus Biofuge Pico	3325	1,5-2 ml
Beckmann Coulter / Avanti J-E	JA-10	≤ 500 ml
Sigma 2-16 K	12148-H	1,5-2ml
	12151	15-50 ml

Tabelle 7.9: Liste ausgewählter Chemikalien. Zu den aufgelisteten Chemikalien sind der Hersteller und die Artikelnummer angegeben (wenn bekannt).

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer	
2-NP-β-D-Galactopyranosid	Sigma-Aldrich	N1127	
4-Hydroxybenzaldehyd (4-HB)	Fluka	54589	
4-Methylumbelliferon		M1381	
4-MUF-α-D-Glucopyranosid	Sigma-Aldrich	M9766	
4-MUF-α-D-Mannopyranosid		M3657	
4-MUF-α-L-Arabinofuranosid		M9519	
4-MUF-β-(1,3:1,4)-Glucotriosid		O-4MUBG3	
4-MUF-β-Cellobiosid	Megazyme	O-4MUG2	
4-MUF-β-Cellopentaosid		O-4MUG5	
4-MUF-β-Cellotetraosid		O-4MUG4	
4-MUF-β-Cellotriosid		O-4MUG3	
4-MUF-β-Xylobiosid		O-4MUX2	
4-MUF-β-Xylotriosid		O-4MUX3	
4-NP-Caprylat			21742
4-NP-α-D-Galactopyranosid		Sigma-Aldrich	N0877
4-NP-α-D-Glucopyranosid	N1377		
4-NP-α-D-Mannopyranosid	N2127		
4-NP-α-L-Arabinofuranosid	N3641		
4-NP-α-L-Rhamnopyranosid	N7763		
4-NP-β-D-Cellobiosid	N5759		
4-NP-β-D-Fucopyranosid	N3378		
4-NP-β-D-Glucopyranosid	N7006		
4-NP-β-D-Glucuronidpyranosid	73677		
4-NP-β-D-Xylosid	73750		
5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF)			W501808
5x Gel Pilot DNA-Ladepuffer	Qiagen		239901
ABTS	Sigma-Aldrich		A1888
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth	T844	
Alkoholdehydrogenase (<i>S. cerevisiae</i>)	Sigma-Aldrich	A7011	
Ampicillin Natriumsalz	Roth	K029	
API-Tests 32C, 50CH, Candida	bioMérieux	32 200, 50 300, 10 500	
Azocasein	Sigma-Aldrich	A2765	
Azurin-Substrate: Amylose, Arabinan, Arabinoxylan, Cellulose, Chitosan, Galactan, Galactomannan, β-Glucan (Gerste), Xylan (Haferspelzen, Birke)	Megazyme	I-AZWAX, I-AZXBW, I-AZGMA, I-AZGLP, I-AZCEL, I-AZBGL, I-AZDAR, I-AZAMY, I-AZCHAN	
Benzoessäure	Roth	P738	
Carboxymethylcellulose	Sigma-Aldrich	C4888	
Caseinpepton (tryptisch verdaut)	Hartge Ingredients	1030	
Citronensäure	Roth	7624	
Coniferylalkohol	Sigma-Aldrich	223735	
D(+)-Cellobiose		5840	
D(+)-Galactose	Roth	4987	
D(+)-Maltose × H ₂ O		8951	

Die Tabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt.

Fortsetzung von Tabelle 7.9.

D(+)-Arabinose		5118
D(+)-Glucose × H ₂ O	Roth	6887
D(+)-Raffinose × 5 H ₂ O	Sigma-Aldrich	R0250
D(+)-Saccharose		4621
D(+)-Trehalose × 2 H ₂ O	Roth	5151
D(+)-Xylobiose		O-XBI
D(+)-Xylopentaose	Megazyme	O-XPE
D(+)-Xylose	Roth	5537
D(+)-Xylotetraose		O-XTE
D(+)-Xylotriose	Megazyme	O-XTR
Diazonium Blau B (Fast Blue B Salz)		D9805
DNSS	Sigma-Aldrich	D0550
Endonukleasen <i>Hha</i> I, <i>Hinf</i> I, <i>Hae</i> III	Thermo Scientific	1854, 0804, 0154
Ethanol	Sigma-Aldrich	32205
Ethanol (vergällt)	M & W Mundo OHG	Sorte 642
Ferulasäure	Fluka	46280
Fleischpepton (Typ C)	Hartge Ingredients	1226
Formiat-UV-Test	R-Biopharm	10979732035
Furfural	Sigma-Aldrich	185914
Gene Ruler Mix (DNA-Marker)	Thermo Scientific	SM0333
GenElute PCR Clean-Up Kit	Sigma-Aldrich	NA1020
Hefeextrakt	Oxoid	LP0021
Hefestickstoffbasis (mit Aminosäuren)	Fluka	51483
InstaGene-Matrix	Biorad	7326030
Kartoffelextrakt-Glucose-Bouillon		CP74
Lactose × H ₂ O	Roth	6868
Lytikase	Sigma-Aldrich	L4025
Magermilchpulver	Fluka	70166
Maismehl	Alnatura	4 104420 016767
Maleinsäure	Roth	K304
Malzextrakt	Sigma-Aldrich, Merck	70167, 1.05391
NAD ⁺	Roth	AE11
NaOH für die HPLC (50 %, flüssig)	Merck	1.58793
PageRuler Plus Massenstandard	Thermo Scientific	26619
p-Cumarsäure	Fluka	28200
Phenol	Roth	0040
Pierce Silver Stain Kit	Thermo Scientific	24612
Polymerase Sets (<i>Pfu</i> , <i>Taq</i>)	Thermo Scientific, Peqlab	EP0501, 01-1000
Protazym AK / OL	Megazyme	T-PRAK / T-PROL
Remazol-Brilliantblau R-250	Sigma-Aldrich	–
Roti-Aqua-Phenol (Hemmstofftests)		A980
Rotiphorese Gel 40 (37,5:1)		T802
Roti-Quant universal	Roth	0120
Sabouraud-2 %-Glucose-Medium		AE23
Sabouraud-4 %-Glucose-Medium	Merck	1.05438
Servalyt 2-9 Seed Mix		42935
Servalyt 7-9	Serva	42907
Sinapinsäure	Roth	5317
Sinapylalkohol (80 %)	Sigma-Aldrich	404586
Streptomycinsulfat		0236
Syringaldehyd	Roth	5359
Tanninsäure		16201
Vanillin	Sigma-Aldrich	V1104
Vanillinsäure	Roth	3685
Xylan (Buchenholz)	Sigma-Aldrich	X4252
Xylan (Haferspelzen)	Fluka	95590
Xylan (RBB gekoppelt)	Megazyme	S-AXBP

Tabelle 7.10 – Programme und Datenbanken. Die Tabelle zeigt die verwendeten bioinformatischen Programme und Datenbanken, deren Versionsnummer (V.) sowie den Zugang per Internetadresse. Falls keine Versionsnummer verfügbar war, ist das Jahr der Nutzung angegeben. Die letzte Prüfung der Internetadressen erfolgte am 23.11.2016. CAME: Center of Applied Molecular Engineering. CBRC: Computational Biology Research Consortium. EMBnet: European Molecular Biology network. ExPASy: Expert Protein Analysis System. NRBSC: National Resource for Biomedical Supercomputing. RCSB: Research Collaboratory for Structural Bioinformatics. SIB: Schweizer Institut für Bioinformatik. UCSF: University of California, San Francisco.

Programm/ Datenbank	Organisation	Version	Internetadresse
BLAST	NCBI	2013-2016	www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Chimera	UCSF	V.1.9	www.cgl.ucsf.edu/chimera
EMBOSS: getorf	EMBnet	V.6.6.0.0	www.emboss.sourceforge.net
Enzymkinetik- Iteration.xlsx	IMW, JGU	V.1.0	IMW-Datenbank. Zugangsbeschränkt. Kontakt: imw.sekretariat@uni-mainz.de
ExPASy: Compute pI/Mw	SIB	V.1.0	web.expasy.org/compute_pi
Finch TV	Geospiza	V.1.4.0	www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml
Gblocks	Castresana Lab	V.0.91b	www.molevol.cmima.csic.es/castresana/ Gblocks_server.html
GenBank- Nukleotiddatenbank	NCBI	V.216.0	www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank
GeneDoc	NRBSC	V.2.7.000	www.genedoc.software.informer.com/2.7/
MAFFT-Algorithmus	CBRC	V.7.0	www.mafft.cbrc.jp/alignment/software/
Modeller	Sali Lab	V.9.16	www.salilab.org/modeller
Proteindatenbank (PDB)	RCSB	2016	www.rcsb.org
ProteinLynx Global Server	Waters	V.3.02	www.waters.com
RAxML	Exelis Lab	V.7.4.2	www.sco.h-its.org/exelixis/web/software/raxml
raxmlGUI	Senckenberg Institut	V.1.3.1	www.sites.google.com/site/raxmlgui
Sequenzdatenbank des IMW	IMW, JGU	Standalone Blast Server V.05/2004	www.imw-1.zdv.uni-mainz.de . Zugangsbeschränkt. Kontakt: imw.sekretariat@uni-mainz.de
Signal-BLAST	CAME	V.1.0	www.sigpep.services.came.sbg.ac.at/signalblast.html

Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Steffen Handel
Ludwigshafener Straße 22
65929 Frankfurt am Main

geboren am 13. Oktober 1986
in Mainz

(01 76) 21 80 60 58
steffen.handel@hotmail.de



BERUFSERFAHRUNG

10/2013 – 10/2016 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand) am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung (Arbeitsgruppe König) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

- Mikrobiologie, Molekularbiologie, Proteinbiochemie, Regenerative Energie
- Systemadministration, Bibliotheksarchiv
- Lehre, Wissenschaftliches Schreiben

STUDIUM

seit 10/2013 Promotion am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung (Dr. *rer. nat.*, Arbeitsgruppe König) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

04/2008 – 10/2013 Biologiestudium an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

- Hauptfächer: Mikrobiologie, Biochemie, Genetik, Zoologie
- Anfertigung der Diplomarbeit von 01/2013 – 10/2013 am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung (Arbeitsgruppe Unden),
Thema: Das Dreikomponentensystem NreABC – Dimerisierungs- und Expressionsstudien an *Staphylococcus carnosus* NreA
- Abschlussnote: Sehr gut

NEBENBESCHÄFTIGUNG

- 04/2010 – 12/2012 Wissenschaftliche Hilfskraft, Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz
- Blutgruppenserologie
 - Lehre
 - Öffentlichkeitsarbeit, Akquise
- 07/2007 – 03/2010 Lagerhilfe, Toom Getränkemarkt, Mainz-Kostheim
- Logistik, Kundenberatung
- 03/2008 – 12/2009 Systemadministrator, Gemeinschaftspraxis Dr. Seemann / Müller Said-Sadah, Mainz-Kostheim
- Netzwerke
 - Hard- und Software-Wartung
- 10/2006– 06/2007 Grundwehrdienstleistender, 1./Gebirgsjägerbatallion 233, Mittenwald
- KfZ-Gruppe (Material- und Personentransport, KfZ-Wartung)
- 09/2004 – 08/2006 Lagerhilfe, Toom Getränkemarkt, Mainz-Kostheim

SCHULAUSBILDUNG

- 06/2006 Allgemeine Hochschulreife
- 1997 – 2006 Wilhelm-Leuschner-Schule (Integrierte Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe, Mainz-Kostheim)
- 1993 – 1997 Gustav-Stresemann-Schule (Grundschule, Mainz-Kastel)

INTERESSEN

- Kultur Lesen, Film
- Sport Wassersport (Rudern, Schwimmen, Segeln)

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst verfasst wurde und ich keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

A handwritten signature in blue ink that reads "Steffen Handel". The signature is written in a cursive style with a large initial 'S'.

Steffen Handel, Mainz