

**Universität für Bodenkultur**

Department für Lebensmittelwissenschaften und –technologie

Abteilung Lebensmittelbiotechnologie

Univ. Prof. Dr. D. Haltrich

**Heterologe Expression, Reinigung und  
Charakterisierung von Pyranose-2-Oxidase  
aus *Trametes suaveolens* und *Trametes  
pubescens***

Diplomarbeit

zur Erlangung des Akademischen Grades

Diplomingenieur

vorgelegt von

Vanja Vasiljevic

Wien, Mai 2008

An dieser Stelle ist es mir ein Anliegen all jenen Personen Dank zu sagen ohne die die vorliegende Diplomarbeit wohl nicht entstehen hätte können.

Herzlich bedanken möchte ich mich in erster Linie bei O. Prof. Dr. Klaus Dieter Kulbe für die freundliche Aufnahme am Institut und die hervorragendem Arbeitsbedingungen

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Dietmar Haltrich für die Möglichkeit bedanken, in seiner Arbeitsgruppe diese Diplomarbeit anzufertigen und die freundliche und hilfreiche Unterstützung, die maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Leiti für die freundliche Unterstützung, wissenschaftliche Betreuung und seine kollegiale Art der Wissensvermittlung. Diese Arbeit hat mir viel Freude bereitet!

Für die gewissenhaften Überprüfungen der Rechtschreibung und kritischen Anregungen zum Ausdruck danke ich meiner Studienkolleginnen Iziar Amaia Ludwig und Clara Salaheddin-Nassr.

Für die freundliche Aufnahme als volles Mitglied von Anfang an, die tatkräftige Mitarbeit, das - durchaus nicht selbstverständliche- ausgesprochen angenehme Arbeitsklima und die lustigen Stunden danke ich allen meinen Kollegen und Kolleginnen der Abteilung Lebensmittelbiotechnologie.

Bei meinem lieben Freund Peter bedanke ich mich ebenfalls gerne. Danke, dass Du mich durch diese letzten Monate meines Studiums getragen und in all meinen Launen angenommen hast.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken: für ihre wunderbar unkomplizierte Art, wie sie ihr Leben leben und mich meines leben lassen/lassen. Für ihre bemerkenswerte Geduld, moralische Unterstützung, Kraft und Selbstverständlichkeit mit der sie mir das Studium ermöglichten.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>14</b>
1.1 Pyranose-2-Oxidase.....	14
1.2 Aufgabestellung.....	22
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.1 Wasser.....	24
2.2 Chemikalien .....	24
2.3 Medien und Puffer .....	28
2.4 Materialien.....	33
2.5 Geräte .....	34
2.6 Molekularbiologische Methoden .....	37
2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA.....	37
2.6.2 Restriktionsverdau.....	38
2.6.3 Agarose Gelelektrophorese .....	39
2.6.4 Transformation in <i>E. coli</i> .....	40
2.6.5 Anlegen von Dauerkulturen .....	41
2.7 Expression der rekombinanten Pyranose-2-Oxidase von <i>Trametes suaveolens</i> und <i>Trametes pubescens</i> in <i>Escherichia coli</i> .....	42
2.7.1 Kultivierung und Fermentation.....	42
2.7.2 Wachstumskinetik .....	44
2.8 Enzymreinigung.....	48
2.8.1 Gewinnung des Rohextraktes.....	48
2.8.2 Reinigung von rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen mittels Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC).....	50

---

2.8.3	Abschneiden von His <sub>6</sub> -Tag mit Thrombin und Reinigung der geschnittenen (ohne His <sub>6</sub> Tag) Pyranose-2-Oxidasen .....	53
2.8.4	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen .....	54
2.9	Charakterisierung den Pyranose-2-Oxidasen .....	55
2.9.1	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	55
2.9.2	Bestimmung der Substratspezifität .....	60
2.9.3	Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und anderer kinetischer Konstanten für ausgewählte Substrate .....	61
2.9.4	pH-Optimum .....	62
2.9.5	Temperaturoptimum .....	63
2.9.6	Temperaturstabilität.....	63
2.9.7	Bestimmung der kinetischen Daten für ausgewählte Elektronenakzeptoren.....	64
2.10	Umsetzung der Glucose mit Pyranose-2-Oxidasen im Batch Reaktor .....	64
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>68</b>
3.1	Kontrolle der Transformation .....	68
3.2	Kultivierung und Fermentation.....	69
3.2.1	Mediumoptimierung und Induktionsversuche.....	69
3.2.2	Kultivierung im Bioreaktor.....	71
3.3	Enzymreinigung.....	75
3.3.1	Gewinnung des Rohextraktes.....	75
3.3.2	Reinigung von rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen mittels Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC).....	75
3.3.3	Abschneiden von His <sub>6</sub> -Tag mit dem Thrombin und Reinigung geschnittenen (ohne His <sub>6</sub> -Tag) rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen.....	79
3.4	Charakterisierung den Pyranose-2-Oxidasen .....	80
3.4.1	Gelelektrophoretische Methoden.....	80
3.4.2	Bestimmung des isoelektrischen Punktes mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) .....	82
3.4.3	Substratspezifität.....	83
3.4.4	Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und anderen kinetischen Konstanten für ausgewählte Substrate .....	88
3.4.5	pH- Optimum .....	90

Inhaltsverzeichnis	VI
3.4.6 Temperaturoptimum .....	92
3.4.7 Temperaturstabilität.....	93
3.4.8 Bestimmung der kinetischen Daten für ausgewählte Elektronenakzeptoren .....	95
3.5 Umsetzung der Glucose mit Pyranose-2-Oxidasen im Batch Reaktor .....	96
<b>4 Zusammenfassung.....</b>	<b>99</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>104</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kristallstruktur der P2O aus <i>T. multicolor</i> (Hallberg <i>et al.</i> , 2004) .....	15
Abbildung 2: Reaktion von D-Glucose zu 2-Keto-D-Glucose .....	15
Abbildung 3 Reaktionsschema für die zweistufige enzymatische Transformation (Redoxisomerisierung) von Aldopyranosen zu den entsprechenden 2- Ketozuckern (Quelle: Kulbe 2006) .....	17
Abbildung 4: <i>Trametes suaveolens</i> (Quelle: René Müller, <a href="http://www.mykonet.ch">www.mykonet.ch</a> ) .....	19
Abbildung 5: <i>Trametes pubescens</i> (Quelle: Josef Hlasek, <a href="http://www.hlasek.com">www.hlasek.com</a> ) .....	19
Abbildung 6: Grundstruktur von Plasmiden pCL34 und pCL35 .....	22
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Plasmid-DNA Isolierung mittels MiniPrep (Quelle: MiniPrep Gen Elute Plasmid MiniPrep-Kit Sigma-Aldrich) .....	38
Abbildung 8: Verwendeter Massenstandard GenRuler DNA Ladder Mix. ....	40
Abbildung 9 : Fermenter 30 L Volumen mit Zubehör .....	43
Abbildung 10: Schematische Darstellung Reaktionen bei der Bestimmung der Enzymaktivität von Pyranose-2-Oxidase. ....	46
Abbildung 11 : French-Press Apparatur mit Zubehör .....	49
Abbildung 12: Struktur von Profinity IMAC Säulenmatrix. ....	51
Abbildung 13: Strukturformeln von Histidin und Imidazol .....	52
Abbildung 14 Reinigung geschnittenen (ohne His <sub>6</sub> -Tag) rekombinanten Pyranose-2- Oxidasen mit HiTrap Benzamidine FF-Säule und HisTrap HP-Säule (mit Ni <sup>2+</sup> beladen) .....	53
Abbildung 15: Strukturformeln von 1,4-Benzochinon und Ferrocenium-hexafluoro- phosphat. ....	64
Abbildung 16: Enzym-Batch-Reaktor (Volumen: 2 Liter) .....	65
Abbildung 17: Die Umsetzung von Glucose durch heterolog exprimierte P2O .....	65
Abbildung 18: Erfolgreiche Transformation in <i>E.coli</i> Stamm BL21(DE3) Star .....	68
Abbildung 19: Fermentationsverlauf von rekombinanten <i>E. coli</i> mit pCL35 .....	72
Abbildung 20: Fermentationsverlauf von rekombinanten <i>E. coli</i> mit pCL34 .....	73
Abbildung 21: Chromatogramm der Proteinreinigung an Profinity IMAC BIORAD (10 ml, Hercules, USA) beladen mit Ni <sup>2+</sup> -Ionen .....	76
Abbildung 22: Reinigung von heterolog exprimierten P2O (gelb) mit Ni <sup>2+</sup> beladene Chromatographiesäule Profinity IMAC BIORAD (10 ml) .....	77

---

Abbildung 23: SDS-PAGE von gereinigten rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen aus <i>T. suaveolens</i> und <i>T. pubescens</i> .....	78
Abbildung 24: Natives-PAGE von gereinigten rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen aus <i>T. suaveolens</i> und <i>T. pubescens</i> .....	81
Abbildung 25: IEF-Gel.....	82
Abbildung 26: pH-Optimum der rekombinanten P2O aus <i>T. suaveolens</i> .....	90
Abbildung 27: pH-Optimum der rekombinanten P2O aus <i>T. pubescens</i> .....	91
Abbildung 28: Temperaturoptimum der rekombinanten P2O aus <i>T. suaveolens</i> und der rekombinanten P2O aus <i>T. pubescens</i> .....	92
Abbildung 29: : Temperaturstabilität der rekombinanten P2O aus <i>T. suaveolens</i> .....	93
Abbildung 30: Temperaturstabilität der rekombinanten P2O aus <i>T. pubescens</i> .....	94
Abbildung 31: Umsetzung von D-Glucose zu 2-Keto-D-Glucose mit rekombinanter P2O aus <i>T. suaveolens</i> . Analyse mittels HPLC.....	96
Abbildung 32: Umsetzung von D-Glucose zu 2-Keto-D-Glucose mit rekombinanter P2O aus <i>T. pubescens</i> . Analyse mittels HPLC.....	97
Abbildung 33: Analyse der Umsetzungsprodukte von D-Glucose mit rekombinanter P2O aus <i>T. suaveolens</i> mittels DC.....	97
Abbildung 34: Analyse der Umsetzungsprodukte von D-Glucose mit rekombinanter P2O aus <i>T. suaveolens</i> mittels DC.....	98

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Laborchemikalien u.a. Substanzen .....	24
Tabelle 2: Parameter der IMAC-Reinigung.....	52
Tabelle 3: Parameter für Thrombin Behandlung und Reinigung von Pyranose-2-Oxidasen ohne His <sub>6</sub> -Tag .....	54
Tabelle 4: Pipettierschema für 2 SDS-Gele .....	56
Tabelle 5: Pipettierschema für 2 Nativ-Gele .....	58
Tabelle 6: Ergebnisse der Mediumoptimierung und Induktionsversuche .....	69
Tabelle 7: Zusammengefasste Ergebnisse der Fermentationen von rekombinanter <i>E. coli</i> mit pCL35 und rekombinanter <i>E. coli</i> mit pCL34 .....	74
Tabelle 8: Reinigung der heterolog exprimierte P2O aus <i>T. suaveolens</i> .....	77
Tabelle 9: Reinigung der heterolog exprimierte P2O aus <i>T. pubescens</i> .....	78
Tabelle 10: Ergebnisse des Schneidens His <sub>6</sub> -Tag rekombinanter Pyranose-2-Oxidase und die Reinigung geschnittenen Enzyms (ohne His <sub>6</sub> -Tag) aus <i>T. suaveolens</i> .....	79
Tabelle 11: Ergebnisse des Schneidens His <sub>6</sub> -Tag rekombinanter Pyranose-2-Oxidase und die Reinigung geschnittenen Enzyms (ohne His <sub>6</sub> -Tag) aus <i>T. pubescens</i> .....	80
Tabelle 12: Substratspezifität der rekombinanten P2O aus <i>T. suaveolens</i> mit His <sub>6</sub> -Tag ..	84
Tabelle 13: Substratspezifität der rekombinanten P2O aus <i>T. suaveolens</i> ohne His <sub>6</sub> -Tag.....	85
Tabelle 14: Substratspezifität der rekombinanten P2O aus <i>T. pubescens</i> mit His <sub>6</sub> -Tag...	86
Tabelle 15: Substratspezifität der rekombinanten P2O aus <i>T. pubescens</i> ohne His <sub>6</sub> -Tag.....	87
Tabelle 16: Michaelis-Menten-Konstanten der rekombinante P2O aus <i>T. suaveolens</i> für ausgewählte Substrate.....	88
Tabelle 17: Kinetische Konstanten der rekombinante P2O aus <i>T. suaveolens</i> für ausgewählte Substrate .....	89
Tabelle 18: Kinetische Daten von rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen für verschiedene Elektronenakzeptoren .....	95
Tabelle 19: Fermentation von <i>E. coli</i> mit pCL 35 .....	104
Tabelle 20: Fermentation von <i>E. coli</i> mit pCL 34 .....	104

---

Tabelle 21: Kalibrationsgerade zur Bestimmung des Molekulargewichts der nativen Enzyme .....	105
Tabelle 22: Kalibrationsgerade zur Bestimmung des Molekulargewichts der Unterheiten.....	105
Tabelle 23: Kalibrationsgerade zur Ermittlung der pI-Werte.....	106
Tabelle 24: Bestimmung der Substratspezifität (Rohdaten) .....	106
Tabelle 25: Kinetische Daten der rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen für Elektronenakzeptor Ferrocenium.....	107
Tabelle 26: Kinetische Daten der rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen für Elektronenakzeptor 1,4 Benzochinon .....	109
Tabelle 27: Bestimmung des Km-Wertes für D-Glucose .....	111
Tabelle 28: Bestimmung des Km-Wertes für D-Galactose .....	112
Tabelle 29: Bestimmung des Km-Wertes für L-Sorbose .....	113
Tabelle 30: Bestimmung des Km-Wertes für D-Xylose .....	114
Tabelle 31: Bestimmung des pH-Optimums mit D-Glucose .....	115
Tabelle 32: Temperaturstabilität der rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen bei 40 °C und 60 °C .....	117
Tabelle 33: Temperaturoptimum der rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen .....	119

## Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)diammoniumsalz
amp	Ampicilin
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BGBL	Bundesgesetzblatt
Bis-Tris	(2,2-Bis-hydroxymethyl)-2,2',2''-nitrilotriethanol
bp	Basenpaar
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	copy Desoxyribonucleinsäure
cfu	Koloniebildende Einheit (colony forming units)
CV	Column volumes (Säulenvolumen)
DLWT	Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Dnase	Desoxyribonuclease
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FAD	Flavinadenindinucleotid
g	Gramm
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
His <sub>6</sub> Tag	Sechs aufeinanderfolgende Histidinreste an das Protein angehängt
HPLC	High Pressure (Performance) Liquid Chromatography
HQ	High-Quality (hohe Qualität)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IMAC	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl β-D-thiogalactopyranosid

---

ISO	Internationale Organisation für Normung (International Organization for Standardization)
inkl.	Inklusive
Kan.	Kanamycin
kb	Kilo-Basenpaaren (1000 Basenpaaren)
kDa	Kilodalton
KPP	Kaliumphosphatpuffer
L	Liter
LB	Lauria Bertani
LF	Laminar Flow
min	Minute
mL	Milliliter
ms	Millisekunde
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
P2O	Pyranose 2-Oxidase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS-Puffer	Phosphat-gepufferte Salzlösung (abgekürzt von englischen Phosphate buffered saline,) ist eine Pufferlösung die Natriumchlorid, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumchlorid und Kaliumdihydrogenphosphat enthält.
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethansulfonyl fluoride
POD	Peroxidase Typ II (from horseradish)
psi	Pound per square inch (= 6.894,75729 Pascal)
RNase	Ribonuclease
RO	Umkehrosiose
rpm	Rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunden
SOC	Super Optimal Broth C

---

Spez. Akt.	Spezifische Enzymaktivität
T.	Trametes
T	Native/SDS Polyacrylamid-Gel; Gelkonzentration in % (% Acrylamid + % Bisacrylamid)
C	Native/SDS Polyacrylamid-Gel; Crosslinking in % (% Bisacrylamid x 100 / T)
TB	Terrific Broth
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethylpropandiol
TWVO	Trinkwasserverordnung
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität [ $\mu\text{mol}/\text{min}$ ])
u. a.	und anderes
U/mg	Spezifische Enzymaktivität
U/mL	Volumetrische Enzymaktivität
UV	Ultraviolett

# 1 Einleitung

## 1.1 Pyranose-2-Oxidase

Pyranose 2-Oxidase (P2O, Pyranose: Sauerstoff 2-Oxidoreduktase; EC 1.1.3.10) gehört zur Familie der Glucose-Methanol-Choline (GMC) Oxidasen und ist unter den ligninabbauenden Weißfäulepilzen weit verbreitet (Daneel *et al.*, 1992; Leitner 2001; Volc *et al.*, 1985). P2O befindet sich vorwiegend im hyphalen periplasmatischen Raum und ist nur während der Autolyse extrazellulär zu finden, wobei entweder an Zellwände oder extrazellulären Schleim adsorbiert wird (Daneel *et al.*, 1992). Die Aufgabe der P2O ist noch nicht vollständig geklärt (Takakura & Kuwata, 2003). Es wird vermutet, dass P2O eine Rolle bei dem Abbau von Lignocellulose, durch Bereitstellung von Wasserstoffperoxyd ( $H_2O_2$ ) für ligninabbauende Peroxidasen, wie Manganperoxidase und Ligninperoxidase spielt (Daniel *et al.*, 1994; Volc *et al.*, 1996). Andere mögliche biologische Funktionen sind Beteiligung an der Reduktion von beim Ligninabbau entstehenden Chinonen im periplasmatischen bzw. extrazellulären Milieu (Hallberg *et al.*, 2004) und Teilnahme an sekundären metabolischen Prozessen; Produktion 2-Keto-D-Glucose (D-Glucoson) aus D-Glucose, als Vorstufe von Cortalceron (ein  $\beta$ -Pyron-Antibiotikum) (Baute *et al.*, 1977).

### Strukturelle Eigenschaften von Pyranose 2-Oxidasen

P2O gehört zu den Flavoenzymen und ist ein 270 kDa großes Homotetramer (Abbildung 1), das an jeder Untereinheit ein Flavinadenindinukleotid (FAD) als Cofaktor kovalent gebunden hat (Halada *et al.*, 2003). Dieser Cofaktor ist für die typische Gelbfärbung des Enzyms verantwortlich. Die vier Untereinheiten mit einem Monomergewicht von 68 kDa (Leitner *et al.*, 2001) sind symmetrisch um eine Pore angeordnet, in welche das Substrat eindringen kann, um in das aktive Zentrum einer Untereinheit zu gelangen:

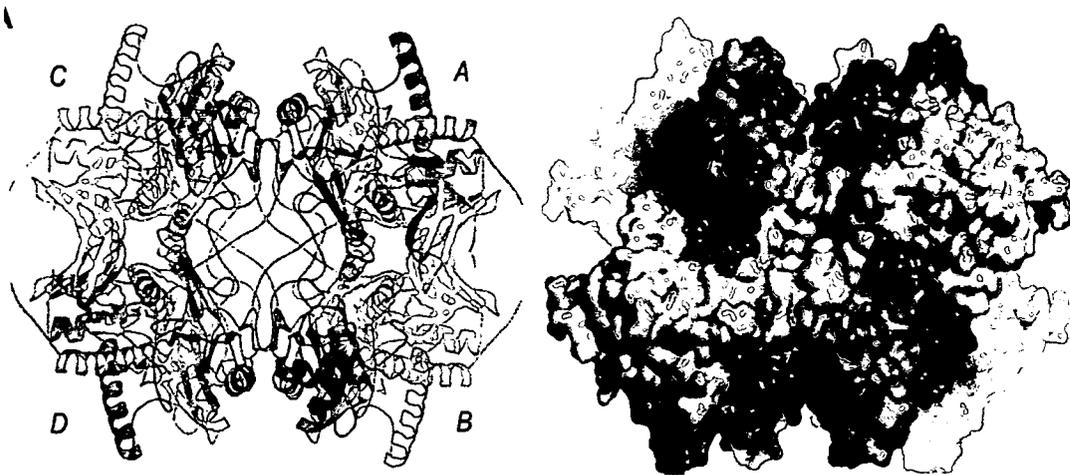


Abbildung 1: Kristallstruktur der P2O aus *T. multicolor* (Hallberg *et al.*, 2004)

### Reaktionen und Anwendung von Pyranose-2-Oxidasen

Pyranose 2-Oxidase katalysiert regioselektiv die Oxidation von einigen Aldopyranosen am C-2 Atom zur entsprechenden 2-Ketoaldosen. Bei der Oxidation des Substrates wird FAD reduziert und in einer zweiten Reaktion wird FAD wieder regeneriert, indem die Elektronen auf molekularen Sauerstoff unter Bildung von  $H_2O_2$  übertragen werden (Ruelius *et al.*, 1968). Für manche Substrate, zeigt das Enzym ebenfalls eine hohe Tendenz zur Oxidation an der Position C-3 (Hallberg *et al.*, 2004)

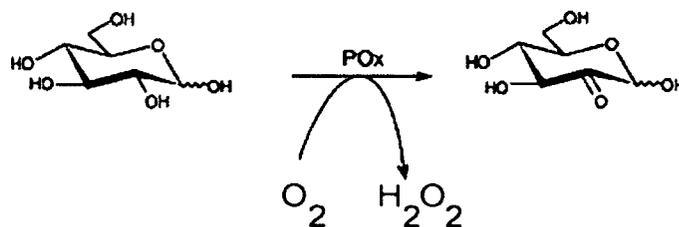


Abbildung 2: Reaktion von D-Glucose zu 2-Keto-D-Glucose

Hauptsubstrat ist D-Glucose, welche zu 2-Keto-D-Glucose oxidiert wird (Abbildung 2, Neidleman *et al.*, 1981; Giffhorn 2000), jedoch auch mit D-Xylose, L-Arabinose und anderen Zuckern, welche in Holzbestandteilen (Lignin und Cellulose bzw. Hemicellulose) vorkommen, zeigt P2O eine hohe Aktivität (Nishimura *et al.*, 1996; Leitner *et al.*, 2001; Giffhorn 2000). Es wurde ebenfalls von der Oxidation von einigen 1→6 Disacchariden (Gentiobiose, Melibiose und Isomaltose) am C-2 Atom durch Pyranose-2-Oxidase aus *Phanerochaete gigantea* und *Trametes multicolor* berichtet (Freimund *et al.*, 1998; Huwig 1997; Volc *et al.*, 1999).

Die Substrate für P2O weisen ein typisches Strukturmerkmal auf, nämlich die Ringform der Zucker und die Position der OH-Gruppe am C2 bzw. am C3 (Hofer 2006).

Chemischen Herstellungsprozesse in der Lebensmittelindustrie bringen viele Nachteile mit sich; Einsatz toxischer Katalysatoren, harsche Reaktionsbedingungen (hoher Sauerstoff- oder Wasserstoff-Druck und hohe Reaktionstemperatur), Bildung möglicherweise toxischer Nebenprodukte u.ä. Deswegen sind biotechnologische Verfahren, die unter milden und umweltfreundlichen Bedingungen verlaufen, prinzipiell besser dafür geeignet, die in der letzten Jahren immer strengeren Anforderungen an die Sicherheit von Lebensmitteln zu erfüllen. Viele Prozesse in der Biotechnologie von Lebensmitteln, wie auch in anderen Bereichen von „Life Sciences“ verlaufen biokatalytisch bzw. unter dem Einsatz von Enzym/Coenzym-Systemen.

Pyranose 2-Oxidase ist ein Enzym, das aufgrund seiner katalytischen Wirkung hohe Einsatzmöglichkeiten zur Biotransformation von Kohlenhydraten aufweist. In biotechnologischen Prozessen wird es eingesetzt zur Synthese zahlreicher traditioneller Lebensmittel-Zusatzstoffe wie z.B. Tagatose aus D-Galactose, über 2-Keto-D-Galactose (Haltrich *et al.*, 1998), oder auch in der medizinischen Analytik zur Bestimmung des Glucosegehalts in Blutserum (Kiba *et al.*, 1992). P2O kann auch für diagnostische Zwecke eingesetzt werden, da es mit 1,5-Anhydroglucitol reagiert. 1,5-Anhydroglucitol ist ein diagnostischer Marker für Diabetes mellitus. Gehalt an dieser Substanz weicht bei Stoffwechselstörungen stark vom normalen Wert ab (Kiba *et al.*, 1993). P2O hat gegenüber der bisher gut untersuchte Glucose-Oxidase den Vorteil, dass es sowohl mit dem  $\alpha$ -, als auch mit dem  $\beta$ -Anomeren der D-Glucose reagiert (Takakura & Kuwata, 2003).

Die Herstellung von Lebensmittelzusatzstoffen, vor allem Zuckeraustauschstoffen mit diätetisch vorteilhaften Eigenschaften (wie z.B. Fructose oder Tagatose) mittels P2O befasst sich mit dem Einsatz von kombinierten chemokatalytischen und biokatalytischen Reaktionsschritten, sowie Mehr-Enzym-Reaktionen (Abbildung 3). Beispielweise wurde durch Pyranose 2-Oxidase aus *Trametes multicolor* 2-Ketoglucose (D-Glucoson) aus Glucose synthetisiert und im nächsten Schritt durch klassische, chemische Hydrierung (z.B. Ni/H<sub>2</sub>-System) oder durch Reduktion mittels rekombinanter NADH-abhängiger Aldosereduktase aus *Candida tenuis* in Fructose überführt (Kulbe 2006). Die so produzierte D-Fructose ist frei von D-Glucose und muss somit nicht weiter gereinigt werden, sondern kann direkt als Süßungsmittel eingesetzt werden. Da 2-Keto-D-Glucose die Vorstufe des  $\beta$ -Pyron Antibiotikum Cortalceron ist, kann das Enzym Pyranose-2-Oxidase auch bei der Herstellung dieser antibakteriellen Verbindung eingesetzt werden (Baute *et al.*, 1977; Giffhorn 2000).

Giffhorn (2000) verfasste einen Review Artikel, der einen guten Überblick über die biotechnologische Anwendung von Pyranose 2-Oxidase bietet.

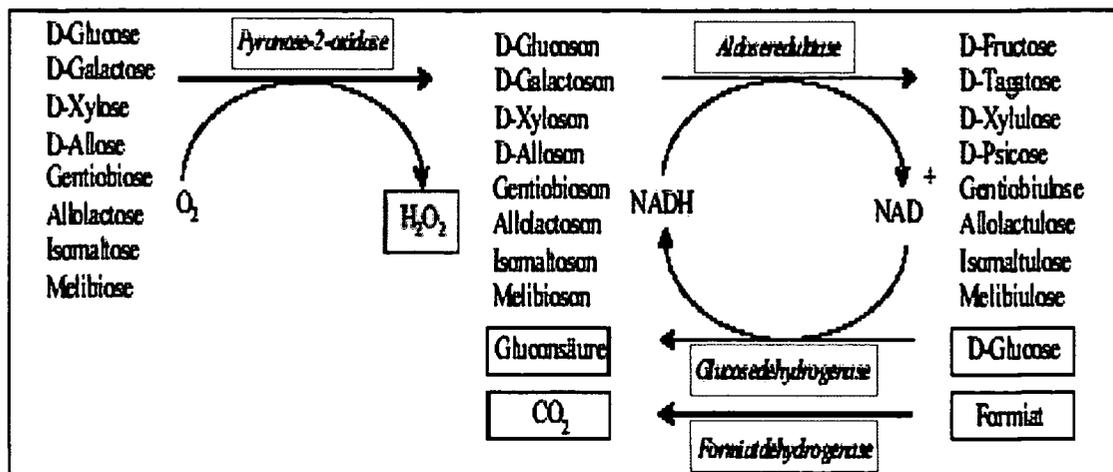


Abbildung 3 Reaktionsschema für die zweistufige enzymatische Transformation (Redoxisomerisierung) von Aldopyranosen zu den entsprechenden 2-Ketozuckern (Quelle: Kulbe 2006)

Trotz aller Vorteile, werden Mehr-Enzym-Systeme mit Pyranose 2-Oxidase für die industrielle Umwandlung von Kohlenhydraten (und ihren Bausteinen) kaum eingesetzt. Einige von vielen Gründen sind; die Verwendung ungeeigneten Expressionssystemen, der Aufwand der Enzymbereitstellung, die Abhängigkeit der Enzyme von Coenzym/Cofaktor-Reaktionsteilnehmer (wie NAD und FAD), die relativ teuer und instabil sind.

$H_2O_2$  welcher bei der Oxidation von Aldopyranosen entsteht, beeinflusst die Enzymaktivität und damit die Produktivität des Enzyms negativ. Aus diesem Grund wird üblicherweise zur Entfernung von  $H_2O_2$  ein mindestens 1000-facher Überschuss an Katalase zugesetzt. Das  $H_2O_2$  Problem konnte auch durch Kombination von geeigneten Redoxmediatoren (wie Dichlorindophenol, Benzochinon, Kalium-hexacyano-ferrat (III) oder Ferrocenium) mit geringen Mengen an Laccase aus *T. pubescens* als regenerierendes Enzymsystem gelöst werden (Kulbe 2006).

### Vorkommen von Pyranose-2-Oxidasen

Wie schon oben erwähnt sind Pyranose-2-Oxidasen unter den ligninabbauenden Basidiomyceten weit verbreitet. Die Basidiomyceten (Ständerpilze) werden als die am höchsten entwickelte Pilzgruppe angesehen und zählen zu den Eumycota (Echte Pilze) (Weber 1997).

Aus einigen Basidiomyceten wurden Gene, die für Pyranose-2-Oxidase codieren, kloniert und rekombinante P2O heterolog exprimiert (*Escherichia coli* wurde in allen Fällen als Expressionssystem gewählt). Gewonnen wurde P2O erstmals aus *Polyporus obtusus* (Ruelius *et al.*, 1968) und auch bereits aus folgenden Organismen: *Phanerochaete chrysosporium* (Artolozaga *et al.*, 1997; Volc und Eriksson 1988), *Trametes (Coriolus) versico-*

lor (Machida und Nakanishi 1984), *Trametes multicolor* (Leitner *et al.*, 2001; Halada *et al.*, 2003), *Trametes pubescens* (Marešová *et al.*, 2005), *Phlebiopsis gigantea* (Schäfer *et al.*, 1996), *Pleurotus ostreatus* (Shin *et al.*, 1993), Basidiomycete Nr. 52 (Izumi *et al.*, 1990). Nur für zwei Pyranose-2-Oxidasen wurden Kristall-Strukturen experimentell ermittelt; für P2O aus *T. multicolor* (Hallberg *et al.*, 2004, Abbildung 1) und P2O aus *Peniophora sp.* (Bannwarth *et al.*, 2004). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Eigenschaften zwischen den P2Os aus unterschiedlichen Pilzen ein wenig variieren.

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde mit Pyranose-2-Oxidasen aus *Trametes suaveolens* (Anistramete) und *Trametes pubescens* (Samtige Tramete) gearbeitet (Abbildung 4 und 5). Die Gattung *Trametes* ist eine von über 100 der Familie Polyporaceae. Die Vertreter dieser Familie sind so genannte Weißfäulepilze, d.h. sie besitzen die Fähigkeit zur Lignin-degradation. Durch Abbau von Lignocellulose stellen sie Nähr- und Mineralstoffe anderen Organismen zur Verfügung. Weißfäule tritt nur an totem bzw. nicht mehr wachsendem Laubholz auf. Ein gelegentliches Vorkommen der Schmetterlingstramete (*Trametes versicolor*) an Nadelholz ist nicht ausgeschlossen. Die meisten *Trametes* sind in Mitteleuropa weit verbreitet und wachsen ganzjährig.

Die Anistramete (*Trametes suaveolens*), die bevorzugt auf Weiden wächst, besitzt auf der Unterseite unregelmäßig runde, dickwandige, grobe Poren. Die Oberseite ist eher hell mit keiner oder nur schwacher Zonierung. Charakteristisch für sie ist der anis- oder fenchelartige Duft. *Trametes suaveolens* ist in Weidenkulturen in erster Linie als Parasit aber auch als Saprophyt (ernährt sich von toten organischen Substanzen) sehr häufig auf lebenden und seltener auf abgestorbenen Strünken anzutreffen, da diese *Tramete* von auf dem Substrat Totholz konkurrenzkräftigeren Arten verdrängt wird (Trinkaus *et al.*, 2005).

Die Samtige *Tramete* (*Trametes pubescens*) besitzt einen eher watteartigen, leichten Fruchtkörper mit relativ kleinen Poren (3-4 je mm). Auf der Oberfläche ist sie samtig behaart. *Trametes pubescens* lebt saprophytisch und kommt in den Weidenparzellen meist auf abgestorbenen Strünken und vor allen auf gelagertem, ehe feuchtem Holz vor. *Trametes pubescens* besiedelt neben einer Vielzahl an Laubhölzern wie Ahorn (*Acer*), Birken (*Betula*), Erlen (*Alnus*-Arten), Haselnüsse (*Corylus*), Zierkirschen/Zierpflaumen (*Prunus*) usw., auch Lärchen (Trinkaus *et al.*, 2005).



Abbildung 4: *Trametes suaveolens* (Quelle: René Müller, [www.mykonet.ch](http://www.mykonet.ch))

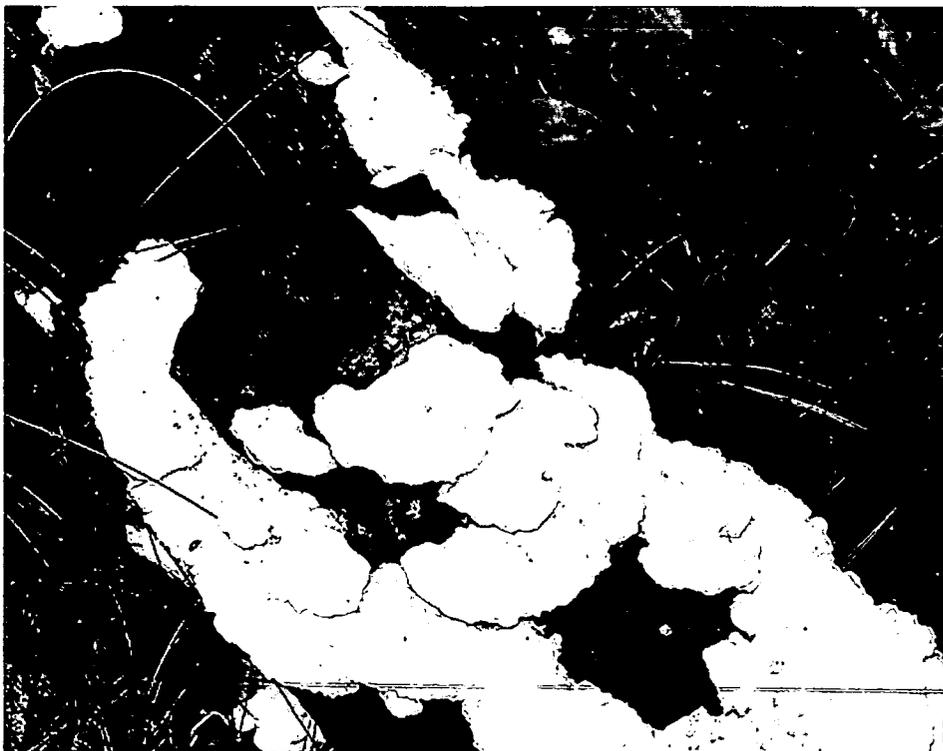


Abbildung 5: *Trametes pubescens* (Quelle: Josef Hlasek, [www.hlasek.com](http://www.hlasek.com))

## **Rekombinante Pyranose-2-Oxidasen aus *Trametes suaveolens* und *Trametes pubescens***

Der kritische Punkt bei den enzymatischen Prozessen ist die Erhaltung der biokatalytischen Aktivität und der Stabilität von Enzymen unter den Umsetzungsbedingungen, die im Enzymreaktor herrschen. Die Produktion von nativen Enzymen mittels Pilz-Kulturen ist oft - abhängig von Substrat - eine sehr langwierige und kostspielige Aufgabe, die auch geringere Produktausbeute mit sich bringt. Heterologe Expression in geeigneten Bakterienstämmen bietet sich oft als eine attraktive Alternative mit kurzer Fermentationsdauer, billigen Fermentationsmedien und hohe Aubeute.

Bei der heterologen Expression von Genen in *E. coli* nehmen verschiedene Faktoren Einfluss auf die Menge und Eigenschaften des gebildeten Proteins. Unter anderem lassen sich die Expressionsrate des Gens sowie die Löslichkeit und die Stabilität des Translationsproduktes über die Induktionszeit, die Anzuchttemperatur, die Konzentration des Induktionsmittels, die Wahl des Bakterienstammes und die Promotoren der Vektoren beeinflussen. Der Prokaryont *E. coli* ist einfach zum Kultivieren und leicht zugänglich. Er ist genetisch und physiologisch gut charakterisiert und eignet sich in der Regel gut für die Überproduktion kleinerer löslicher Proteine. Posttranslationale Modifikationen wie z.B. O- und N-Glycosylierung, Ausbildung von Cysteinbrücken, Phosphorylierung, Methylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung, werden nicht funktionell in *E. coli* exprimiert. Falls diese Modifikationen für die biologische Aktivität, Löslichkeit, Proteinstabilität oder die Sekretion rekombinanter Proteine in den Überstand notwendig sind, müssen andere Expressionssysteme angewendet werden. Ausschleusung von in *E. coli* exprimierten Proteinen in den periplasmatischen Raum sowie Ausbildung von Disulfidbrücken im Periplasma ist jedoch möglich. Außerdem kann das rekombinante Protein bis zu 20% des Gesamtproteingehalts der Zelle darstellen. Pyranose-2-Oxidase ist ein periplasmatisches Protein, welches für seine Funktion eine postrtranslationale Modifikation benötigt und zwar das Anhängen FAD-Gruppe kovalent an Proteingerüst. Diese Modifikation wird *E. coli* durchgeführt, wodurch dieses Bakterium für die Produktion von P2O eingesetzt werden kann.

Den Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelbiotechnologie an der Universität für Bodenkultur in Wien ist es gelungen die DNA-Sequenzen der zwei Pyranose 2-Oxidasen aus *Trametes suaveolens* und *Trametes pubescens* zu ermitteln (Paukner 2008). Dazu wurden zunächst die zwei *Trametes* Pilze (*Trametes suaveolens* und *Trametes pubescens*) 7 Tage bei 25 °C und 120 rpm in einem Medium das Hefeextrakt (1 g/L), Pepton aus Casein (10 g/L), Lactose (25 g/L) und KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g/L) enthält, kultiviert. Danach wurde ihre vollständigen mRNAs mit Hilfe von Invisorb Spin Plant RNA Mini Kit (Invitex) isoliert und mittels Reverse Transcription PCR cDNAs hergestellt (First Standard cDNA Synthesis with RevertAid™ H Minus Kit, Fermentas). Nach dem Design entsprechender Oligonucleotid-Primer (Quelle; GenBank) wurden die Gene von zwei P2Os durch die Anwendung von *Pfu* DNA-Polymerase (Fermentas) amplifiziert, von restlichen PCR-Produkten abgetrennt und nach ihre Vermehrung in *E. coli* DH5α-Zellen (Klonierungsvektor pCR®-BluntII-TOPO® aus Zero Blunt®TOPO®PCR Cloning Kit, Invitrogen) diese durch Sequenzvergleich identifiziert.

Für die heterologe Expression wurde weiter P2O-Gen in den Expressionsvektor pET-28a(+) (Novagen) kloniert (Paukner 2008). Dazu wurden an den Enden des Pyranose-2-Oxidase Gens geeignete Schnittstellen, die ebenfalls im Vektor pET-28a(+) vorhanden sind, eingefügt. Am Beginn der P2O-Sequenz wurde das Erkennungsmuster des Restriktionsenzym *NdeI* und am Ende jenes von *BamHI* mit Hilfe einer PCR eingeführt. Diese spezifische Erkennungssequenzen wurden verwendet, um die Gene erfolgreich in den Expressionsvektor pET-28a(+) einzufügen bzw. Expressionsplasmide pCL35 (pET-28a(+) mit dem P2O Gen aus *T. suaveolens*) und pCL34 (pET-28a(+) mit P2O Gen aus *T. pubescens*) zu gewinnen (Abbildung 6). Die aus diesen DNA-Konstrukten exprimierten, rekombinanten P2O-Proteine trugen am N-terminalen Ende ein His<sub>6</sub>-Tag und eine Thrombin-Schnittstelle zwischen P2O-Sequenz und His<sub>6</sub>-Tag. Der N-terminal His<sub>6</sub>-Tag diente zur einstufigen Reinigung rekombinanter Proteine mittels immobilisierter Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC). Neben der His<sub>6</sub>-Tag enthält pET-28a(+) (Novagen) ein Kanamycin-Resistenzgen als Selektionsmarker und ein T7-Promotor, der mit IPTG bzw. Lactose induziert werden kann. Expressionskonstrukte pCL35 und pCL34 wurden in *E. coli* (Produktionsstamm BL21 Star<sup>TM</sup> DE3, Novagen, USA) transformiert. Der Vorteil des verwendeten *E. coli* Stammes ist die weitaus kürzere Fermentationsdauer von 24 Stunden im Vergleich zur Pilz-Fermentationen, doch im Hinblick auf den Einsatz der rekombinanten P2Os in der Lebensmittelindustrie kommt die Verwendung von *E. coli* als Expressionssystem nicht in der Frage. Um möglichst bald Pyranose 2-Oxidasen auf die industriellen enzymatischen Prozesse zu übertragen, sollte in der weitere Folge P2O in anderen Organismen, die aus lebensmitteltechnologischer Sicht unbedenklich sind, exprimiert werden (z.B. in *Lactobacillen*).

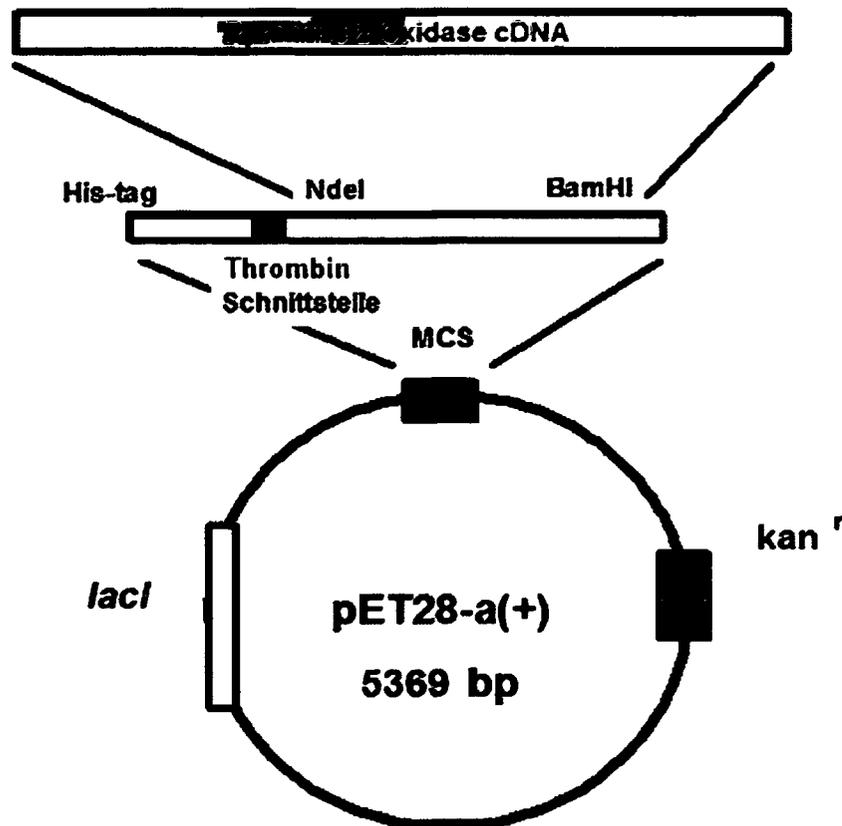


Abbildung 6: Grundstruktur von Plasmiden pCL34 und pCL35

## 1.2 Aufgabestellung

Das Ziel dieser Diplomarbeit war die heterologe Expression, Reinigung und Charakterisierung zweier rekombinanter Pyranose-2-Oxidasen aus den Pilzen *Trametes suaveolens* und *Trametes pubescens*.

Die von Ines Pisanelli und Regina Paukner hergestellte Expressionsplasmide pCL35 (pET-28a(+)) mit eingefügtem P2O-Gen aus *T. suaveolens* und pCL34 (pET-28a(+)) mit eingefügtem P2O-Gen aus *T. pubescens* sollten anhand molekularbiologischer Methoden in einen geeigneten *Escherichia coli* Stamm transformiert werden. Bevor die rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen im großen Maßstab hergestellt werden konnten, sollte eine Medium- und Induktionsoptimierung von transformierten *E. coli* durchgeführt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte, nach der Kultivierung im Bioreaktor und dem Aufschluß der Zellen, eine Ein-Schritt Reinigung von zwei heterolog exprimierten Pyranose-2-Oxidasen, mit His<sub>6</sub>-Tag an N-terminalem Ende, folgen. Weiters sollten nach dem Abschneiden von His<sub>6</sub>-Tag mit Thrombin, die Reinigung von geschnittenen (ohne His<sub>6</sub>-Tag) Pyranose-2-Oxidasen durchgeführt werden.

Die gereinigten Enzyme, sowohl mit als auch ohne His<sub>6</sub>-Tag sollten danach hinsichtlich einiger kinetischer Parameter untersucht werden. Von vorwiegendem Interesse waren die Spezifitäten für ein weites Substratspektrum, kinetische Daten für ausgewählte Substrate

und ausgewählte Elektronenakzeptoren, sowie pH-Optimum, Temperaturoptimum und Temperaturstabilität. Mittels gelelektrophoretischer Methoden sollten von den gereinigten Enzymen das Molekulargewicht der tetrameren Form, das Molekulargewicht der Untereinheiten und der isoelektrische Punkt bestimmt werden.

Als letzter Schritt sollten Umsetzungsreaktionen der beiden Enzyme mit His<sub>6</sub>-Tag mit D-Glucose durchgeführt werden. Dabei sollte untersucht werden, ob bei den Umsetzungsreaktionen Nebenprodukte gebildet werden bzw. ob Überoxidationen auftreten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Wasser

Für die meisten Zwecke wurde hochreines Wasser oder auch RO-Wasser genannt, verwendet. Zur Herstellung von RO-Wasser wurde als Ausgangsstoff Trinkwasser, das die Anforderungen der Trinkwasserverordnung (TWVO, BGBL. 304/2001.) erfüllt verwendet und mittels Umkehrosmose aufbereitet bzw. deionisiert. Für besondere Zwecke, wie DNA-Verdau wurde steriles bzw. autoklaviertes RO Wasser (bei 121 °C, 2 bar) verwendet. Auch HQ-Wasser (High-Quality Wasser) kam zum Einsatz bei Methoden, wo hohe Ansprüche an Reinheit der Materialien und Lösungen gestellt wurden. Dazu wurde RO-Wasser einer Behandlung mittels HQ 5 (REWA-Gruppe, Gladbeck, Deutschland) unterzogen ( $>10 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$  Widerstand, laut ISO 3696 „Wasser für analytische Laborzwecke; Spezifikation und Prüfverfahren“).

### 2.2 Chemikalien

Bei den für diese Arbeit verwendeten Laborchemikalien wie Salze, Alkohole, Säuren, Laugen, Kohlenhydrate, Medienbestandteile, Enzyme und andere handelte es sich um kommerziell erhältliche Produkte. Alle verwendeten Reagenzien waren von höchstmöglicher Qualität und Reinheit und wurden von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Graz, Österreich) und Sigma- Aldrich (St. Louis, USA) bezogen. Zur Durchführung der verschiedenen Experimente während dieser Diplomarbeit wurden die in der Tabelle 1 aufgelisteten Substanzen verwendet. Um die Übersichtlichkeit zu verschaffen erfolgt die Aufführung der Substanzen nach dem Einsatzgebiet bzw. Stoffklasse.

Tabelle 1: Verwendete Laborchemikalien u.a. Substanzen

#### Primäre Medienbestandteile

Pepton aus Fleisch (enzymatisch verdaut)	Fluka
Pepton aus Casein (enzymatisch verdaut)	Fluka
Hefeextrakt	Fluka
Glycerin	Roth
Agar	Roth

## Salze

NaCl	Sigma- Aldrich
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fluka
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fluka
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fluka
NH <sub>4</sub> Cl	Fluka
MgSO <sub>4</sub>	Fluka
MgCl <sub>2</sub>	Roth
CaCl <sub>2</sub>	Fluka
KCl	Fluka
NaOH	Fluka
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Roth
AgNO <sub>3</sub>	Fluka

## Antibiotika

Kanamycin	Sigma
-----------	-------

## Zucker und Zuckeralkohole

α-D(+)-Glucose	Roth
D(+)-Fucose	Fluka
D(-)-Arabinose	Sigma- Aldrich
D-(+)-Cellobiose	Fluka
L(-)-Arabitol	Sigma- Aldrich
L(+)-Arabinose	Sigma- Aldrich
2-Deoxy-D-Glucose	Sigma- Aldrich
D(-)-Ribose	Sigma- Aldrich
L(-)-Sorbose	Fluka
D(-)-Fructose	Fluka
D-(+)-Galactose	Fluka
D(+)-Xylose	Fluka
D(+)-Sucrose	Fluka
D(+)-Mannose	Fluka

D(+)-Melibiose Monohydrat	Fluka
Maltotriose	Sigma- Aldrich
D-Mannoheptose	Sigma- Aldrich
Methyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	Fluka
Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside	Sigma- Aldrich
Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside	Fluka
D-Leucrose	Fluka
D(+)-Glucosamin hydrochlorid	Sigma- Aldrich
Dulcitol	Sigma- Aldrich
D-Sorbitol	Fluka
L(+)-Galactonsäure $\gamma$ -Lactone	Sigma- Aldrich
D-Glucuronsäure Natrium Salz	Sigma- Aldrich
D-Galacturonsäure Monohydrat	Sigma- Aldrich
D(+)-Glucuronsäure $\gamma$ -Lacton	Fluka
D(+)-Glucuronsäure $\delta$ -Lacton	Fluka
L-Galacton 1,4-Lacton	A.R.D.
L-(+)-Gulonsäure- $\gamma$ -Lacton	Fluka
Lactitol	Sigma- Aldrich
D(+)-Lactose Monohydrat	Fluka
IPTG (Isopropyl $\beta$ -D thiogalactopyranosid)	Roth
<b>Alkohole</b>	
Methanol	Roth
Ethanol	Riedel
Isopropanol	Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma- Aldrich
<b>Ester</b>	
Ethylacetat	Riedel
<b>Aromatische Verbindungen</b>	
Anilin	Sigma
Diphenylamin	Fluka

## Säuren

Salzsäure	Roth
Essigsäure 99%	Fluka
Essigsäure 60%	Riedel
Trichloressigsäure	Fluka
5-Sulfosalicylsäure	Sigma- Aldrich
Borsäure (99 %)	Fluka
Phosphorsäure (85%)	Fluka

## Enzyme/Restriktionsenzyme

Peroxidase Typ II (from horseradish )	Sigma- Aldrich
Lysozym	Novo
Desoxyribonuclease II	Roth
Ribonuclease A	Roth
SalI	Fermentas
Thrombin	Sigma- Aldrich
Katalase	Sigma- Aldrich

## Spezielle Reagenzien zur Enzymcharakterisierung

2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)	Amresco
1,4-Benzochinon	Fluka
Ferrocenium-hexafluoro-phosphat	Sigma- Aldrich
Bradfordreagenz (Bio-Quant Protein)	BioRad
Bovines Serumalbumin (BSA, Rinderserumalbumin); 1mg/ml	BioRad

Spezielle Reagenzien für Aufschluss von *E. coli* Zellen

Imidazol	Fluka
PMSF	Fluka
EDTA-Na <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Riedel

Spezielle Reagenzien für Agarose Gelelektrophorese, SDS- bzw. Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page, Native-Page)

Agarose (neeo ultra rein für Elektrophorese)	Roth
Loading dye (Probenpuffer Agarose Gelelektrophorese)	Fermentas
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas
Acrylamid/Bisacrylamid	Serva
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad
Ammonium persulfat (APS)	BioRad
N,N,N',N'-Tetrametylendiamin (TEMED)	Sigma- Aldrich
2 x Laemmli Puffer (Probenpuffer SDS PAGE)	Sigma- Aldrich
Precision Plus Protein™ Standard (SDS-PAGE Molekulargewicht-Standard)	Biorad
High Molecular Weight Calibration Kit for native electrophoresis (Native-PAGE Molekulargewicht-Standard)	GE Healthcare
Isoelectric Focusing Marker IEF MIX 3,6-6,6	Sigma-Aldrich
<b>Farbstoffe</b>	
Ethidiumbromid	Roth
Coomassie (Brilliant) Blue R 250	Sigma- Aldrich
<b>Anderes</b>	
Antischaum 204	Sigma- Aldrich
flüssiger Stickstoff (N <sub>2</sub> )	Cryolab 35

### 2.3 Medien und Puffer

Die Medienkomponenten wurden abgewogen, in entsprechender Menge an RO-Wasser gelöst und anschließend 20 min autoklaviert (bei 121 °C, 1 bar Überdruck). Die hitzelabile Kanamycin-Lösung wurde nach dem Abkühlen der Medien steril zugefügt so, dass diese 0,03 g/L an Antibiotikum enthielten. Die agarhaltige Medien wurden nach dem Autoklavieren zum Temperieren auf 55 °C ins Wasserbad für ca. 20 min gestellt und gut gemischt. Die Medien wurden in einer Laminar-Flow Werkbank unter aseptischen Bedingungen in Plastik-Petrischalen gegossen und schließlich in der Lamina mit gekipptem Deckel zum

Abkühlen gelassen. Die fertigen Platten wurden bis zur Verwendung im Kühlraum (4°C) gelagert.

### **Luria-Bertani Medium mit Antibiotikum (LB Medium)**

Pepton aus Casein	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	5 g/L

Bei Agarhaltigen Medien wurde 15 g/L Agar zugefügt.

- Kanamycin -Konzentration 0,03 g/L

### **2x- Luria Bertani Medium mit Antibiotikum (2x- LB Medium)**

Pepton aus Casein	20 g/L
Hefeextrakt	10 g/L
NaCl	10 g/L

- Kanamycin -Konzentration 0,03 g/L

### **Terrific Broth Medium mit Antibiotikum (TB Medium)**

Pepton aus Casein	12 g/L
Hefeextrakt	24 g/L
Glycerin	4 mL/L
1 M KPP, pH 7,5	100 mL/L

- Kanamycin -Konzentration 0,03 g/L

Die angeführte Menge an Pepton, Hefeextrakt und Glycerin wurde abgewogen, zusammengemischt, in RO-Wasser (0,9-faches Volumen des hergestellten Mediums) gelöst und autoklaviert. Danach wurde sterile (autoklavierte), abgekühlte 1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung mit pH-Wert von 7,5 dem Rest dazugegeben und gut vermischt. Vor dem Gebrauch erfolgte die Zugabe von entsprechender Menge an sterilem Antibiotikum (Kanamycin-Lösung 0,03 g/L).

### **M9-Caseinhydrolysat-Glycerin Medium mit Antibiotikum (MCHGly Medium)**

Glycerin	10 g/L
----------	--------

Pepton aus Casein	10 g/L
5x-M9 Salze:	200 ml/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	64,0 g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	15,0 g/L
NaCl	2,5 g/L
$\text{NH}_4\text{Cl}$	5,0 g/L
1M $\text{MgSO}_4$	2 ml/L
1M $\text{CaCl}_2$	0,1 ml/L

Die Lösung von Glycerin und Caseinhydrolysat, Salzkonzentrat,  $\text{MgSO}_4$ - und  $\text{CaCl}_2$ -Lösung wurden separat hergestellt, autoklaviert und abgekühlt steril vermischt. Danach erfolgte die Zugabe von 0,03g/L Kanamycin (in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und sterilfiltriert).

### **Super Optimal Broth C Medium (SOC Medium)**

Material für 1 L Medium:

Pepton aus Casein	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
0,25 M KCl	10 ml
2 M $\text{MgCl}_2$	5 ml
1M Glucose	20 ml

Die Bestandteile des SOC-Mediums wurden nach der oben angegebenen Reihenfolge abgewogen, zusammen vermischt und in etwa RO-Wasser gut gelöst. Nach dem Einstellen von pH 7,0 wurde das fertige Medium bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

### **50 mM KPP Puffer, pH 6,5, für Enzymaktivität Bestimmung von Pyranose-2-Oxidase**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4,6 g/L
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2,8 g/L

### **Aufschlusspuffer für Gewinnung von Rohextrakt aus *E. coli* Zellen mit dem Ultraschall (Biomasse Aufschluss)**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1M
NaCl	1M
Imidazol	0,01M
Lysozym	1 mg/mL
Desoxyribonuclease II (DNase II)	5 µg/mL
Ribonuclease A (RNase A)	5 µg/mL
pH 7	

### **Aufschlusspuffer für Gewinnung von Rohextrakt aus *E. coli* Zellen mit der FrenchPress (Biomasse Aufschluss)**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM; pH 6,5
NaCl	1M
Imidazol	10 mM
PMSF	50 mg/L

Da PMSF nur in Isopropanol löslich und sehr instabil ist, wurde eine Stocklösung (PMSF im Isopropanol) kurz vor dem Aufschluss extra hergestellt und dem Aufschlusspuffer entsprechende Aliquot dazugegeben.

### **Aufschlusspuffer für Gewinnung von Rohextrakt aus *E. coli* Zellen mit dem Homogenisator (Biomasse Aufschluss)**

Die Zusammensetzung des Puffers für den Homogenisator-Aufschluss war gleich wie der des FrenchPress-Verfahrens, jedoch ohne NaCl, um die Bildung von zähflüssigem Zellextrakt zu hindern.

### **10 x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer, 10fach konzentrierte wässrige Lösung)**

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	108 g
Borsäure	55 g/L (0,89 M)
EDTA-Na <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	8 g/L (0,5 M) pH 8,0

**1 x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer, Laufpuffer für Agarose Gelelektrophorese)**

Mit RO-Wasser 1:10 verdünnte 10 x TBE-Puffer.

**1,5 M Tris-Cl pH 8,8 Native/SDS PAGE Trenngelpuffer (Separating Gel Buffer)**

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 36,3 g

In ca. 170 ml RO-Wasser lösen, pH 8,8 mit HCl einstellen und mit RO-Wasser auf 200 ml auffüllen.

**1 M Tris-Cl, pH 6,8 Native/SDS PAGE Sammelgelpuffer (Stackig Gel Buffer)**

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 6,0 g

In ca. 30-40 ml RO-Wasser lösen, pH 6,8 mit HCl einstellen und mit RO-Wasser auf 50 ml auffüllen

**10x SDS PAGE Elektrophorese Laufpuffer (Elektrophoresis Tank Buffer)**

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 30,25 g

Glycerin 144,0 g

SDS 0,1% (1,0 g)

Mit RO-Wasser auf 1L Endvolumen auffüllen

Vor dem Gebrauch 1:10 Verdünnen

**10x Native PAGE Elektrophorese Laufpuffer (Elektrophoresis Tank Buffer)**

Dieser wird wie oben beschriebene 10x SDS PAGE Elektrophorese Laufpuffer hergestellt, jedoch statt SDS Reagenz wird äquivalente Menge an RO-Wasser dazu gegeben.

## 2.4 Materialien

### Chromatographiesäulen

Chelating Sepharose Fast Flow	Amersham Biosciences Corp (SE)
HisTrap HP 1 mL	Amersham Biosciences Corp (SE)
HiTrap Benzamide FF 1 mL	Amersham Biosciences Corp (SE)
Profinity IMAC	BIORAD (Hercules, USA)

### Corning-Röhrchen (50 ml)

Dünnschichtchromatographie-Fertigplatte (HPTLC- Platten LiChrospher ® Si 60 F <sub>254s</sub> )	Merck/Novagen (Darmstadt, D)
--	------------------------------

### Cryoröhrchen

Elektroporationsküvetten (0,1 cm)	BIORAD (Hercules, USA)
-----------------------------------	------------------------

### Expressionsstämme

<i>E. coli</i> BL21 DE3 RipI	Invitrogen (Paisley, UK)
<i>E. coli</i> BL21 DE3 Star	Novagen (Madison, USA)
<i>E. coli</i> TOP10	Invitrogen (Paisley, UK)

### Kits

GenElute Plasmid Miniprep-Kit	Sigma-Aldrich (Wien, A)
Isoelectric Focusing Calibration Kit Broad Range pI; pH 4-6,5	GE Healthcare (USA)
Membranfilter RC 55 Ø 47 mm (0,45 µm)	Schleicher & Schuell (Dassel, D)

### Elektrophoresegele

PhastGel Gradient 8-25 Gel	GE Healthcare (USA)
PhastGel Native Page Buffer Strips	GE Healthcare (USA)
PhastGel SDS Buffer Strips	GE Healthcare (USA)

## Plasmide

pET28a(+) Merck/Novagen (Darmstadt, D)

Reaktionsgefäße (0,5 mL; 1 mL; 2 mL)

Spitzenfilter Rotilabo (0,22 µm) Roth (Karlsruhe, D)

**2.5 Geräte**

## Autoklaven

Kelomat Certoklav EL 18 L Certoclav Sterilizer GmbH (Traun, AUT)  
 Varioklav 500 135 L H + P Labortechnik GmbH (München, D)

## Chromatographie-Anlagen

ÄKTA Prime, ÄKTA Purifier Amersham Biosciences (Uppsala, SE)  
 Software Unicorn 3.10, 4.11

## Elektrophorese

PhastSystem GE Healthcare (USA)  
 BIORAD PowerPac 300 BIORAD (Hercules, USA)  
 Hoefer Mighty Small II Hoefer (San Francisco, USA)  
 Multiphor II Electrophoresis System GE Healthcare (USA)

## Fermentation

Sonicator-Ultraschall  
 French Press American Instrument Company (Maryland, USA)  
 Homogenisator APV System Mod 2000 Invensys APV Products (Alberslund, D)  
 Fermenter Applikon® Applikon Dependable Instruments (Schiedam, NL)  
 Control unit Bio Controller, Lime Software ADI 1030 (Schiedam, NL)  
 pH Electrode Hamilton Easyferm 120 Hamilton Company (Bonaduz, CH)  
 pO<sub>2</sub> Electrode Hamilton Oxyferm 120 Hamilton Company (Bonaduz, CH)

## HPLC System

Dionex-Summit	Dionex Corporation (Sunnyvale, USA)
Pumpe P680 HPLC Pump	Dionex Corporation (Sunnyvale, USA)
Autosampler (ASI100)	Dionex Corporation (Sunnyvale, USA)
Säulenofen (STH-5885)	Dionex Corporation (Sunnyvale, USA)
RI-Detektor (Shodex RI-101)	Dionex Corporation (Sunnyvale, USA)
Photodiodenarray-Detektor (PDA)	Dionex Corporation (Sunnyvale, USA)
Software Chromeleon 6.4	Dionex Corporation (Sunnyvale, USA)

## Laborwaagen

Sartorius analytic A 200 S	Sartorius (Göttingen, D)
Sartorius MC1 Laboratory LC 2200 SU	Sartorius (Göttingen, D)

## pH Meter

Inula 744	Metrohm (Herisau, CH)
-----------	-----------------------

## Photometer

Diode Array Photometer Agilent 8453	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Spectrophotometer DU-650	Beckman (München, D)
Spectrophotometer DU-800 Coulter	Beckman (München, D)

## Pipetten

Eppendorf & Gilson	Eppendorf AG (Hamburg, D)
--------------------	---------------------------

## Rotationsschüttler Unitron

Infor AG (Basel, CH)

## Sterilbank HS-P 18/2 (LF-Werkbank)

Heraeus (Hanau, D)

## Thermozykler

Biometra T3 Thermocycler	Whatman Biometra (Göttingen, D)
--------------------------	---------------------------------

## Thermomixer

Eppendorf Thermostat Plus	Eppendorf (Hamburg, D)
---------------------------	------------------------

## Transformation

---

BIORAD Mini-Sub Cell GT	BIORAD (Hercules, USA)
BIORAD Micropulser	BIORAD (Hercules, USA)
Trockenschrank	Memmer (Schwabach, D)
Ultrafiltration	
Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Device	Millipore (Billerica, USA)
UV-Transilluminator	
Gel Doc 2000, Software Quantity One	BIORAD (Hercules, USA)
Zentrifugen	
Eppendorf Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Megafuge 1.0 R	Heræus (Hanau, D)
Ultrazentrifuge Beckman L-70, Rotor 45 Ti	Beckman (München, D)
Zentrifuge Sorvall Evolution RC, Rotor SLC-6000	Du Pont (Wilmington, USA)
Zentrifuge Sorvall RC 26 Plus, Rotor SLA-3000	Du Pont (Wilmington, USA)
Vakuumpumpe	
Membran Vakuumpumpe MZ 2C	Vacuubrand (Wertheim, D)
Wasseraufbereitungsanlage	
HQ 5	REWA-Gruppe (Gladbeck, D)

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Unter anderen spielen die Plasmide (kleine, in vielen Bakterien vorkommende extrachromosomale, ringförmige, sich autonom vermehrende DNA Moleküle) als Vektoren eine wichtige Rolle für die Klonierung und Expression von Genen. Für die Untersuchung rekombinanter Klone ist die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen essentiell. Da die Größe von Plasmiden viel kleiner ist als die chromosomale DNA und diese in einer superhelikalen Form vorkommen, lassen sie sich leicht abtrennen und in mehr oder weniger reiner Form gewinnen.

In unserem Fall wurde zur Isolierung von Plasmid-DNA ein GenElute Plasmid MiniPrep-Kit der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Als Ausgangsmaterial wurden Bakterien Zellen einer flüssigen Kultur verwendet. Dazu wurden die Bakterien von den jeweiligen *E. coli* Transformanten auf dem festen Nährmedium unter Selektionsdruck (LB/Kanamycin Agarplatten) über Nacht kultiviert und die entstandene einzelne Bakterienkolonien dreifach in je 3 mL LB/Kanamycin flüssigen Medium überführt, wo sie weiter für mindestens 6 Stunden bei 37°C und 140 rpm inkubiert wurden. Die Ansätze wurden schließlich für 1 min bei 13.500 rpm abzentrifugiert und so erhaltene Zellpellet wurde nach Angaben des Herstellers dieses MiniPrep-Kits aufgearbeitet. Das Prinzip dieses Verfahrens (Abbildung 7) ist, dass nach einer alkalisch-SDS Lyse der Zellen und anschließende Neutralisation des alkalischen Lysats (Ausfallen von Zellbruchstücken, Proteine, Lipiden, SDS und chromosomalen DNA), Plasmid-DNA in Anwesenheit der Salze auf die DNA-bindenden Silikon-Matrix bindet und nach der Entfernung von den Verunreinigungen (Waschschritt) von der Säule eluiert wird. Schließlich erfolgt die Analyse der gewonnenen Plasmid-DNA im Agarosegel (siehe 2.6.3).

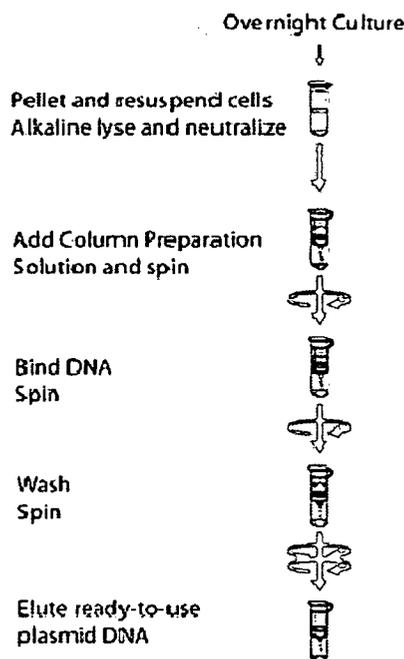


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Plasmid-DNA Isolierung mittels (Quelle: MiniPrep Gen Elute Plasmid MiniPrep-Kit Sigma-Aldrich)

### 2.6.2 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme, auch als Restriktionsendonucleasen bezeichnet, binden an eine spezifische Erkennungssequenz der DNA (recognition site) und können sie dort schneiden. Dieser Vorgang wird Restriktionsverdau genannt. Die meisten DNA-Erkennungssequenzen bestehen aus vier, sechs oder acht Basenpaaren (4-bp, 6-bp bzw. 8-bp cutter), etwas seltener 5-bp und sind symmetrisch bzw. diese spezifische DNA Sequenzen sind in beiden Strängen gleich. Dieses Phänomen wird Palindrom genannt. Die nach dem Restriktionsverdau entstandenen Enden sind entweder glatt (blunt ends), d.h. in beiden Strängen wird an der gleichen Stelle geschnitten, oder sie stehen über (sticky ends); ist das 5'-Ende länger, spricht man von 5'-Überhang, ansonsten von 3'-Überhang. Durch das Anwenden unterschiedlicher Restriktionsenzyme ist es möglich charakteristische Spaltkarten für eine bestimmte DNA-Spezies, z.B. ein ringförmiges Plasmid, aufzustellen. Man kann ebenfalls mit Hilfe von Ligasen an klebrigen Enden DNA-Fragmente wieder zusammenfügen, wenn diese komplementäre Enden haben.

Die produzierten Expressionsplasmide pCL35 und pCL34 (Paukner 2008) wurden nach dem Isolieren aus transformierten *E. coli* Zellen jeweils mit spezifischem Restriktionsenzym Sal1 geschnitten.

Das Gesamtvolumen des Restriktionsansatzes betrug 30 µl. Die Restriktionsenzyme wurden während des Herstellens der Ansätze in einem Kühlblock (-20 °C) aufbewahrt. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden in der folgenden Reihenfolge die Komponenten des Restriktionsverdauansatzes zusammenpipettiert:

- 23,5 µl steriles HQ Wasser
- 3 µl entsprechende Puffer
- 0,5 µl Enzym (10000 U/ml)
- 3 µl Plasmid

Es wurden daher pro µL zu spaltender Plasmid-DNA 1,67 Units Enzym eingesetzt und die Reaktion in dem spezifischen Reaktionspuffer bei der für das Enzym optimalen Reaktionstemperatur (meist 37°C) durchgeführt. Die Reaktionszeit für den Verdau betrug 3 Stunden.

### 2.6.3 Agarose Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode um DNA-Moleküle nach ihrer Größe zu trennen, zu visualisieren und somit (ebenfalls) ihre Größe durch Vergleich mit DNA-Molekülen bekannter Größe zu bestimmen. Der Transport eines Teilchens durch ein elektrisches Feld wird Elektrophorese genannt. DNA-Moleküle sind aufgrund der in ihrem Rückgrat enthaltenen Phosphatgruppen negativ geladen (gewährleistet durch ein Puffersystem) und wandern somit im elektrischen Feld in Richtung Anode. Die eingesetzte Gelmatrix (poröses Material aus Agarose), nimmt die aufzutrennenden Moleküle auf wobei der Widerstand, den die Matrix den geladenen Molekülen entgegensetzt die Wanderungsgeschwindigkeit beeinflusst. Dieser Widerstand wird von der Porengröße der Gelmatrix bestimmt; bei gegebener Matrix ist die Länge der DNA Fragmente für ihre Wanderungsgeschwindigkeit maßgebend. Durch unterschiedliche Zusammensetzung des Gels kann man genau definierte Trenneigenschaften des Systems erreichen (z.B. 1% Gel für 500 bp – 10000 bp Fragmente). Auch die Gegenionen des Puffers werden in Bewegung gesetzt und beeinflussen zusätzlich zur physikalischen Reibung die Bewegung der DNA-Moleküle. DNA-Moleküle werden durch die Färbung mit Ethidiumbromid (EtBr) sichtbar gemacht. EtBr bindet sich an DNA indem es sich zwischen zwei benachbarte Basenpaare einschleibt (Interkalation). Bei Beleuchtung mit UV-Licht fluoresziert EtBr und die DNA-Bande im Gel wird sichtbar.

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,8%igem Agarosegelen mit 1xTBE als Puffer bei einer Spannung von 4-10 V/cm. Dafür wurde eine entsprechende Menge an Agarose (Roth, A) in Elektrophoresepuffer (1xTBE) suspendiert und durch Aufkochen in der Mikrowelle vollständig gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 55°C erfolgte die Zugabe der Ethidiumbromid-Lösung (0,1% (v/v)). Das aufgeschmolzene Agarosegel wurde in die durch Halterung befestigte Gelkassette gegossen und noch vor Erstarren des Gels wurde der Kamm zur Formung der Geltaschen vorsichtig eingesetzt. Das erstarrte Agarosegel wurde in eine Elektrophoresekammer eingelegt und mit Elektrophoresepuffer bedeckt. Vor der Elektrophorese wurden die Proben-Ansätze (20 bzw. 30 µL) mit 5-fach konzentriertem Loading Dye (MBI Fermentas) versetzt und in die Geltaschen eingetragen. Als Größenstandard wurden 5 µL der GeneRuler DNA Ladder Mix (MBI Fermentas, Abbildung 8)

aufgetragen. Um eine erfolgreiche Trennung von DNA-Molekülen durchzuführen, wurde eine Spannung von 70-90 Volt für ca. 30-45 min angelegt. Nach dem Lauf wurden die Gele unter UV-Licht am Transilluminator betrachtet und fotografiert.

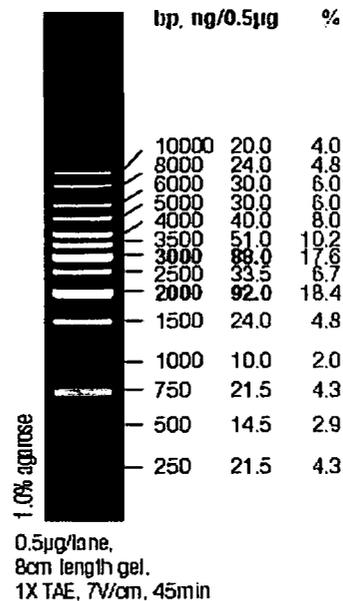


Abbildung 8: Verwendeter Massenstandard GenRuler DNA Ladder Mix (MBI Fermentas).

#### 2.6.4 Transformation in *E. coli*

Die Einbringung von gereinigter, rekombinanter, exogener DNA in einer Zelle und dadurch die gezielte Konversion eines Genotyps wird als Transformation bezeichnet. Dazu müssen die Bakterienzellen in einen Zustand überführt werden, in dem es ihnen ermöglicht ist, von außen zugeführte DNA (hier: Plasmid-DNA) in die Zelle aufzunehmen. Solche *E. coli*-Zellen werden kompetente *E. coli*-Zellen genannt.

Die zwei, unten genau beschriebenen Methoden wurden verwendet um Plasmid-DNA in *E. coli* zu transformieren.

#### Elektroporation

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Tatsache, dass mit Strompulsen hoher Spannung exogene DNA-Fragmente aus der Umgebungslösung von den Zellen aufgenommen und Fusion von zellulären Plasmamembranen induziert werden können. Vorteile der Elektroporation gegenüber der Transformation in chemisch-kompetenten Zellen ist die höhere Transformationseffizienz (bis zu  $10^9$  Transformanten bzw. cfu: colony forming units pro µg DNA) und die Möglichkeit der Einschleusung von sehr großen DNA-Fragmenten in die Zellen (das Größenlimit bei chemisch kompetenten Zellen liegt bei 50 kb).

Zur Transformation von Bakterien wurden *E.coli* Stämme TOP10, BL21 (DE3) Star und BL21 (DE3) RIPL verwendet. Die Zellen wurden bis zu ihrem Einsatz bei -80 °C aufbewahrt und kurz vor der Transformation auf Eis zum Auftauen gestellt. In einem sterilen 1,5 mL Reaktionsgefäß wurde 1 µg Plasmid-DNA mit 50 µl kompetenten Zellsuspension gemischt, mit der Pipettenspitze leicht umgerührt und für ca. 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde nun in eine sterile (im Ethanol aufbewahrte und mit UV bestrahlte) vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,1 cm) luftblasenfrei überführt, die Küvette außen gut abgetrocknet und in die Elektroporationsapparatur gestellt. Die Elektroporation erfolgte bei 1,8 kV, 25 µF und 200 Ω. Der Wert der erreichten Zeitkonstante sollte über 2,5 ms liegen. Nach Zugabe von 250 µL SOC Medium (37°C) wurde die Zellsuspension für eine Stunde bei 37°C und 180 rpm im Schüttler zur Zellregeneration inkubiert. Der Transformationsansatz wurde nun in zwei Aliquots (A: 25 µl, B: restl. Volumen) auf LB-Platten mit für die Selektion geeignetem Antibiotikum ausgestrichen. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C.

### **Transformation in chemisch kompetente *E. coli***

Bei dieser Art von Transformation werden die Membranen von Bakterienzellen durch einen Wechsel der Hitze- und Kälte- Behandlung vorübergehend für DNA durchlässig gemacht. Zum Abschluss werden die Zellen auf dem geeigneten Selektivmedium ausplattiert.

Dazu wurden, wie bei der Elektroporation angeführt, chemisch kompetente Stämme verwendet.

Ein Aliquot von 50 µL der auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli*-Zellen wurde mit 1µl mittels MiniPrep isolierter Plasmid-DNA versetzt und ca. 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde dieser Ansatz exakt 2 min im vorgeheizten Heizblock (Schüttler Thermomixer Compact Eppendorf, Hamburg, D) bei 42°C inkubiert und dann wieder für 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen in 250 µl SOC Medium aufgenommen und vor dem Ausplattieren auf entsprechendem Selektivmedium (LB/Kanamycin) 1h bei 37°C unter Schütteln bei 180 rpm inkubiert. Während dieser Inkubation wurden neue phänotypische, vom Plasmid in die Zelle eingebrachte Eigenschaften, wie z.B. eine Antibiotikaresistenz exprimiert. Die Inkubation von den Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C wobei es zur Ausbildung von Plasmid-tragenden Kolonien kam.

### **2.6.5 Anlegen von Dauerkulturen**

Zur Herstellung von Dauerstammkulturen wurden 3 ml einer Übernacht-Kultur von transformierten Bakterien einer Einzelkolonie mit 1 ml sterilem 50%igen Glycerin gründlich durchmischt. 1 ml von der Kultur-Glycerin-Mischung wurde ins Cryoröhrchen überführt, dieses beschriftet (Name von Zellstamm und Name vom Plasmid) und durch Eintauchen in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren. Diese Dauerkultur wurde bei -80°C gelagert. Von dieser Stammkultur konnten Aliquots z.B. mit einer sterilen Impföse zur Kultivierung in flüssigen Nährmedien entnommen werden.

## 2.7 Expression der rekombinanten Pyranose-2-Oxidase von *Trametes suaveolens* und *Trametes pubescens* in *Escherichia coli*

Die Expression der rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen von *Trametes suaveolens* und *Trametes pubescens* erfolgte in BL21 (DE3) Star Stamm von *Escherichia coli*. Die monatliche Überimpfung von den transformierten *E. coli* Stämmen auf LB/Kanamycin Platten und Anlegen von Stammdauerkulturen, gewährleistete die Stammhaltung während dieser Arbeit.

### 2.7.1 Kultivierung und Fermentation

#### 2.7.1.1 Mediumoptimierung und Induktionsversuche in Schüttelkolben

Zur Wahl des für die Fermentation optimalen Kultivierungssystems aus Nährmedium und Induktionsmittel wurden Schüttelkolbenversuche durchgeführt. Die Kultivierungsexperimente von transformierter *E. coli* Zellen wurden mit 2xLB-, MCHGly- und TB-Medium in kleinem Maßstab durchgeführt. Als Induktionsmöglichkeit wurden Lactose (im Ansatz 0,5%) und IPTG in der Konzentrationen 0,01, 0,1 und 1,0 mM verglichen. Die Anzucht der Transformanten erfolgte zunächst in einer Vorkultur. Dazu wurden einzelne Kolonien *E. coli* Zellen mit einem sterilen Zahnstocher von LB-Platten herausgepickt, in jeweils 10 ml der oben erwähnten Medien mit entsprechender Menge an Antibiotiklösung (Kanamycin-Lösung 0,03 g/L) überführt und für 6 Stunden bei 37°C und 140 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Für die Vorkulturen wurden 100 mL Schikanenkolben verwendet. Danach erfolgte eine Überimpfung von 5 ml Vorkultur in 100 mL Medium mit Antibiotikum (gleich wie bei der Vorkultur), dass zusätzlich Induktionsmittel und 1 Tropfen Antischaum 204 (Sigma) enthielt. Die Kulturen wurden nun bei 25°C und 140 rpm über Nacht geschüttelt. Für die Hauptkulturen wurden 1000 mL Schikanenkolben verwendet.

Nach der Bestimmung der optische Dichte bei 600 nm (siehe 2.7.2.1), wurden die Zellen aus 2 ml Zellsuspension bei 13200 rpm 15 min in einer Zentrifuge (Sorvall Evolution RC) von dem Medienüberstand getrennt. Der Überstand wurde verworfen und die Feuchtbio-masse der Zellpellets bestimmt (siehe 2.7.2.2). Schließlich erfolgte der Aufschluss von abgewogenen Zellpellets mittels Ultraschall (siehe 2.8.1) und die Bestimmung von Enzymaktivität (siehe 2.7.2.4) und Proteinkonzentration (siehe 2.7.2.5) im Überstand der aufgeschlossenen Biomasse.

#### 2.7.1.2 Kultivierung im Bioreaktor (30 Liter Kulturvolumen)

Die Produktion großer Menge an rekombinanter Pyranose-2-Oxidase aus *T. suaveolens* bzw. *T. pubescens* wurde im 30 L Maßstab mit Hilfe von Herr Dr. Roland Ludwig durchgeführt. Die Fermentationen der zwei rekombinanten *E. coli* erfolgten im Batch-Verfahren.

Für Fermentation von *E. coli* Zellen (Stamm BL21 DE3 Star), die das Plasmid pCL35 enthielten wurde MCHGly-Medium gewählt, während *E. coli* (Stamm BL21 DE3 Star) mit pCL34 Plasmid in TB-Medium fermentiert wurde. Als Induktionsmittel kam Lactose (0,5% im Endvolumen) zum Einsatz.

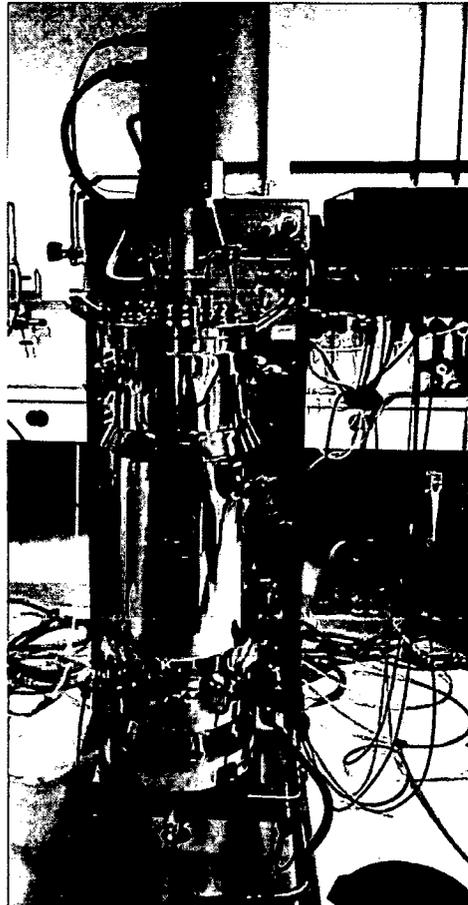


Abbildung 9 : Fermenter 30 L Volumen mit Zubehör

Zunächst wurden alle vom Fermenter (Abbildung 9) ausgehenden Leitungen und Verbindungsstellen auf Dichtheit überprüft und die eingesetzten Elektroden (Sauerstoff- und pH-Elektrode) kalibriert.

Für die Durchführung der Fermentation mit MCHGly-Medium (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.3) wurde der Fermenter mit Nährbodenbestandteilen (300 g Pepton und Glycerin) und 0,5 mL/L Antischaum befüllt und diese Komponenten dann mit Hilfe des Rührens in 26,5 L RO-Wasser gelöst. Danach erfolgte das Autoklavieren mit Heißdampf bei 121 °C. Nach dem Abkühlen auf ca. 30 °C wurden separat autoklavierte 20fach konzentrierte M9-Salzlösung (1,5 L) über Push-Valve und MgSO<sub>4</sub>- und CaCl<sub>2</sub>-Lösungen über Septen im Bioreaktordeckel zugesetzt. Schließlich wurde sterilfiltriertes Kanamycin-Konzentrat (0,9 g Kanamycin in 5 ml RO-Wasser gelöst) ebenfalls über ein Septum zugegeben. Die Vorbereitungsschritte für die Fermentation mit TB-Medium

(Zusammensetzung siehe 2.3) erfolgten wie oben beschrieben, außer dass der zugegebene Puffer (1 M KPP, pH 7,5, 100 mL/L) extra autoklaviert und über Push-Valve zugegeben wurde. Auch für diese Fermentation wurde die gleiche Menge an Kanamycin-Antibiotikum verwendet.

In beiden Fermentationen wurde die Kultivierung durch Animpfung des Reaktors mit einem 2 L Inokulum in der stationären Phase gestartet. Zur Anzucht wurden Zellen auf LB/Kanamycin-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer Kolonie wurden dann 10 ml steriles Selektionsmedium angeimpft und bei 37°C und 140 rpm über Nacht geschüttelt. Es wurden jeweils vier Vorkulturen hergestellt. Für die Anzucht der Hauptkultur wurden 4 x 200 mL Medium in einem 1-Liter-Schüttelkolben vorgelegt und mit der ganzen Übernachts-Vorkultur (10 ml) angeimpft. Bei einem OD<sub>600</sub>-Wert von ca. 1,5, etwa vier bis sechs Stunden nach der Fermenter-inokulation bei 30°C, wurde die Expression der Pyranose-2-Oxidase durch Zugabe steriler Lactose-Lösung (1,5 L mit 150 g Lactose) induziert. Durch Titration mit 4 M NaOH über Push-Valves und mit Hilfe einer Zulaufpumpe wurde der pH-Wert während der Kultivierung konstant bei 6,5-7,0 gehalten. Um eine Sauerstofflimitierung zu verhindern wurde auch die Luftsättigung des Mediums während des Betriebs reguliert, indem man sie durch Erhöhung bzw. Verringerung der Rührerdrehzahl (max. 500 rpm) und Einbringen von Luft (max. 50 L/min) konstant auf 30 % gehalten hat. Der Reaktorinnendruck betrug maximal 0,2 bar. Die in regelmäßigen Abständen durchgeführte Probenentnahme erfolgte manuell, mit Hilfe eines dampfsterilisierbaren in den Reaktorboden eingebauten Ventils. Nach der Probennahme wurde OD<sub>600</sub>-Wert bestimmt, die Zellen aufgeschlossen (French-Press, siehe 2.8.1) und schließlich die Enzymaktivität und die Proteinkonzentration gemessen.

Nach 30-stündiger Fermentation von *E. coli* Transformanten mit P2O aus *T. suaveolens* bzw. 26 Stunden Transformanten mit P2O aus *T. pubescens* wurde die Zelleernte mit Hilfe einer SORVALL Evolution RC Zentrifuge mit einem Sorvall SLC-6000 Rotor bei 6000 rpm (10 min) durchgeführt und die gewonnene Biomasse gewogen. Die geernteten Zellen wurden danach im vierfachen Volumen Homogenisator-Auflösungspuffer resuspendiert und, wenn nicht sofort mittels Homogenisators aufgeschlossen (siehe 2.8.1), auf -20°C gelagert.

## 2.7.2 Wachstumskinetik

### 2.7.2.1 Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm

Extinktion oder optische Dichte (OD), auch Absorbanz genannt, ist ein Maß für die Abschwächung einer Strahlung (zum Beispiel Licht) in einem Medium.

Mit  $I_0$  als einfallender Strahlung und  $I$  als, austretender Strahlung nach dem Durchqueren des Mediums, definiert sich die Extinktion  $E$  wie folgt:

$$E = -\lg \frac{I}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I}$$

Der Anteil der durchgelassenen Strahlung ( $I/I_0$ ) wird als Transmissionsgrad bezeichnet.

Suspendierte Bakterienzellen, Feststoffpartikel und Luftblasen in flüssigem Medium streuen das eingestrahlte Licht. Aus der Intensität des Streulichtes können Rückschlüsse auf Anzahl und Größe der Partikel gezogen werden. Das Streulicht wird als "scheinbare Extinktion" bezeichnet und die Streulichtmessung bei  $\lambda = 600 \text{ nm}$  ist wie die Absorptionsmessung zu betrachten.

Zur Durchführung der OD-Messungen wurde 1 ml Probelösung (Zellsuspension) in eine genormte Halbmikro-Plastikküvette überführt und diese sodann in die zylindrische Messzelle der Spektrophotometer-Apparatur eingebracht. Die Messung erfolgte bei 600 nm. Ab einer  $OD_{600}$  von ca. 1 wurden die Proben verdünnt. Als Blindwert wurde das gleiche Volumen an entsprechendem Medium verwendet.

#### 2.7.2.2 Bestimmung des Feuchtgewichts der Biomasse

Zur Bestimmung des Feuchtgewichts der Biomasse wurden nach entsprechender Inkubationszeit, 50 ml der Zellsuspension in ein mit dem Deckel abgewogenes Corning-röhrchen, oder in ein anderes abgewogenes Zentrifugen-Gefäß überführt und die Suspension schließlich abzentrifugiert (30 min, 4.000 rpm). Nachdem der Mediumüberstand möglichst quantitativ abgehoben wurde, erfolgte das Abwiegen der übrig gebliebene Biomasse. Die Differenz zwischen gemessener Biomasse im Corning-röhrchen und leeren Corning-röhrchen (am Anfang festgestellt) entspricht dem Feuchtgewicht der Biomasse.

#### 2.7.2.3 Bestimmung der Trockensubstanz der Biomasse

Für die Bestimmung der Trockensubstanz wurde wie unter 2.7.2.2 die Feuchtbio-masse gewonnen, bis zur Gewichtskonstanz bei  $110^\circ\text{C}$  im Trockenschrank getrocknet und schließlich abgewogen.

#### 2.7.2.4 Bestimmung der Aktivität von Pyranose-2-Oxidase

Die Aktivität von Pyranose-2-Oxidase wurde spektrophotometrisch bei  $420 \text{ nm}$  und  $30^\circ\text{C}$  durch Messung der Umsetzung von bei der katalytischen Reaktion der Pyranose-2-Oxidase mit der Glucose entstandenen  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Peroxidase (POD) unter Verwendung von ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolinesulfonic acid)] als Elektronendonator (Leitner *et al.*, 2001). Die Abbildung 10 stellt die enzymatischen Reaktionen im Test schematisch dar. Aufgrund des Ein-Elektron-Transfers, werden 2 mol ABTS von 1 mol  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidiert und daraus resultiert ein tiefgrünes ABTS Radikal-Kation, das bei  $420 \text{ nm}$  ein Extinktionsmaximum mit dem Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{420} = 43,2 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  besitzt.

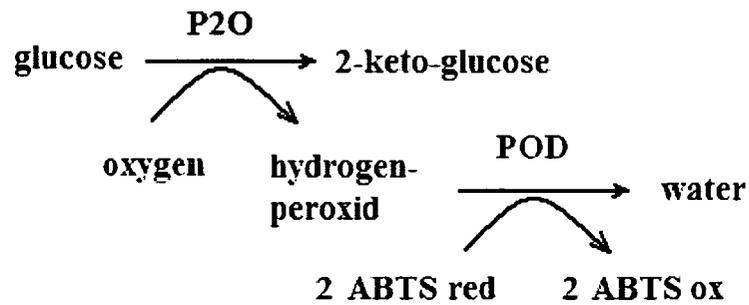


Abbildung 10: Schematische Darstellung Reaktionen bei der Bestimmung der Enzymaktivität von Pyranose-2-Oxidase.

Der Ansatzmix mit einem Gesamtvolumen von 1 ml bestand aus 1  $\mu\text{mol}$  ABTS, gelöst in Kaliumphosphat- Puffer (50 mM, pH 6,5), ca. 5 U horseradish Peroxidase und 20  $\mu\text{mol}$  D-Glucose.

Die benötigten Lösungen wurden, wie unten veranschaulicht, hergestellt und wie im Pipetierschema dargestellt, miteinander vermischt.

Peroxidaselösung (POD-Lösung) 1428 U/ml:

7,9 mg Peroxidase (181 U/mg) in 1 ml 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (gelöst in 50 mM KPP pH 6,5) lösen. Die Lösung in Eppis zu je 100  $\mu\text{l}$  aliquotieren und einfrieren ( $-30^\circ\text{C}$ ).

ABTS Reagenz (frisch zubereitet):

13,5 mg ABTS mit 100  $\mu\text{l}$  Peroxidaselösung versetzen, gut durchmischen und auf 25 ml mit 50 mM KPP pH 6,5 auffüllen.

D-Glucose 1M

1 Mol D-Glucose in 1 Liter 50 mM KPP pH 6,5 lösen und bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahren

Probe

Überstand der aufgeschlossenen Biomasse, bei Bedarf im 50 mM KPP pH 6,5 verdünnt.

Pipetierschema:

- ABTS Reagens 970  $\mu\text{L}$
- 1 M D-Glucose 20  $\mu\text{L}$

Der Ansatz im Wasserbad auf  $30^\circ\text{C}$  temperiert.

Durch Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  entsprechend verdünnter Probe (Enzymlösung; 5-20 mU/ml) mit Hilfe eines Plumper wurde die Reaktion gestartet. Sofort danach erfolgte die photometrische Messung der Absorptionzunahme im Ansatz bei 420 nm (Extinktionsmaximum) über 2 Minuten. Als Blindwert wurde ABTS-Reagenz mit 1M D-

Glucose Lösung, wie im Pipettierschema angegebenen Volumenverhältniss verwendet. Zur Auswertung wurde nur der linearen Bereich einbezogen.

Die Enzymaktivität wurde in Units (U) dargestellt und ist für P2O definiert als die Enzymmenge, die benötigt wird um 2  $\mu\text{mol}$  ABTS pro Minute unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen zu oxidieren.

Um heterolog exprimierte Pyranose-2-Oxidasen besser zu charakterisieren wurde die Enzymaktivität zusätzlich zu Sauerstoff mit anderen Elektronenakzeptoren (1,4-Benzochinon und Ferrocenium-hexafluoro-phosphat) gemessen (siehe Kapitel Charakterisierung 2.9.7)

#### 2.7.2.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Methode nach Bradford (Bradford 1976) eignet sich, um den Proteingehalt zu bestimmen. Diese Analysenmethode wurde eingesetzt, um die Proteinkonzentration im Überstand von aufgeschlossener Zellsuspension nach Expressionsexperimenten, bzw. vor und nach jeder Enzymreinigung zu bestimmen. Das Prinzip der Methode basiert auf der Tatsache, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue durch Bindung an hydrophobe Aminosäuren eines Proteins in einer sauren Lösung sein Absorptionmaximum von 465 zu 595 nm ändert. Der Extinktionswert (Absorption) bei 595 nm ist umso höher, je höher die Konzentration an Protein in einer Lösung ist. Diese Beziehung ist durch das Lambert-Beerschen Gesetz beschrieben.

$$A_{595} = \epsilon_{595} \times c \times d$$

$A_{595}$  Absorption der Proteinlösung bei 595 nm

$\epsilon_{595}$  molarer dekadischer Extinktionskoeffizient des Komplexes bei 595 nm  
in  $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

c Konzentration in M

d Schichtdicke der Küvette in cm

20  $\mu\text{l}$  Enzymlösung wurden in einer Halbmikro- Plastikkuvette mit 1 ml Bradfordreagens (Proteinassay-Reagenz der Firma BioRad) versetzt und mit einem Plastikspatel gut durchgemischt. Nach 15 Minuten wurde die Absorbanz an einem UV/VIS Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Blindwert (Puffer anstelle von Enzymlösung) gemessen.

Die Ermittlung der Proteinkonzentration der Proben erfolgte mit einer BSA-Standardkurve. Dafür wurde eine BSA-Lösung mit Konzentrationen von 1 mg/ml verwendet (Firma BioRad). Von dieser Stammlösung wurden dann 10 Verdünnungen hergestellt in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1,0 mg/mL. Je 20  $\mu\text{l}$  einer solchen Lösung wurden anstelle der Probe (Enzymlösung) für eine Analyse verwendet. Schließlich wurde eine lineare Beziehung zwischen Signal und Proteinkonzentration mit Hilfe des Programms *Beckman cooler DU 800 Spektrophotometer* ermittelt und diese gespeichert. Die Auswertung der Proteinkonzentration der Proben erfolgte ebenfalls automatisch mit diesem Programm.

## 2.8 Enzymreinigung

### 2.8.1 Gewinnung des Rohextraktes

Um das produzierte intrazelluläre Protein nach der Expression freizusetzen, müssen die Zellen aufgeschlossen werden. Dazu wurden, je nach Kulturvolumen, verschiedene Zellaufschlussmethoden eingesetzt.

#### **Zellaufschluss von Schüttelkolbenkulturen mittels Ultraschall**

Zur Lyse der Zellen wurden, die nach Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C (20 min) gewonnene Sedimente in je dreifache Menge an Aufschlusspuffer (siehe 2.3) aufgenommen, resuspendiert und gut homogenisiert. Bei kleinen Mengen an Suspension (2 ml) wurden die Zellen bei 4°C, 13.200 rpm für 10 min abzentrifugiert (Eppendorf AG Hamburg, D) und das Pellet (bis 0,1 g) in 1 mL Aufschlusspuffer ohne Desoxyribonuclease II (DNase II) und Ribonuclease A (RNase A) resuspendiert. Um den Zellwandabbau der suspendierten Zellen zu fördern, wurden die Reaktionsansätze für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Suspensionen wurden auf Eis abgekühlt und schließlich mittels Ultraschall je fünfmal für 15 sec mit einer konische Ultraschallsonde bis zur Erwärmung auf 30°C konstant beschallt und somit aufgeschlossen. Auf dem Gerät wurden folgende Parameter eingestellt:

*Energie:* 80%

*Cycl:* 90% Kontinuität

In den Pausen zwischen jeder Behandlung (ca. 1 Minute) wurden die Proben auf Eis gekühlt. Die Ultraschallsonde wurde sowohl vor und nach der Arbeit, als auch zwischen zwei verschiedenen Proben zunächst mit Ethanol und dann mit dem RO-Wasser gereinigt. Schließlich wurden Zelldebris und nicht aufgeschlossene Zellen im Ansatz durch Zentrifugation mit einer Ultrazentrifuge (Beckman L-70) unter Vakuum 30 min bei 30.000 rpm und 4°C vom Rohextrakt (Überstand) abgetrennt. Bei kleineren Mengen kam wie oben schon erwähnt die Eppifuge (4°C, 13.200 rpm) für 10 min, zum Einsatz. In den erhaltenen Rohextrakten wurden Enzymaktivität und Proteinkonzentration gemessen.

#### **Zellaufschluss mit French-Press-Verfahren**

French-Press ist eine mechanische Aufschlussmethode, welche den Einsatz relativ großer Zellmengen erlaubt und eine schonende Gewinnung von Gesamtzelllysaten ermöglicht. Die French-Press (Abbildung 11) besteht aus einer hydraulischen Presse und einer French-Press-Apparatur. Das Zubehör der French-Press besteht aus einer French-Press-Zelle (Stahlzylinder) an der ein Boden, Ventil, Auslass und Stempel aufgesetzt werden.

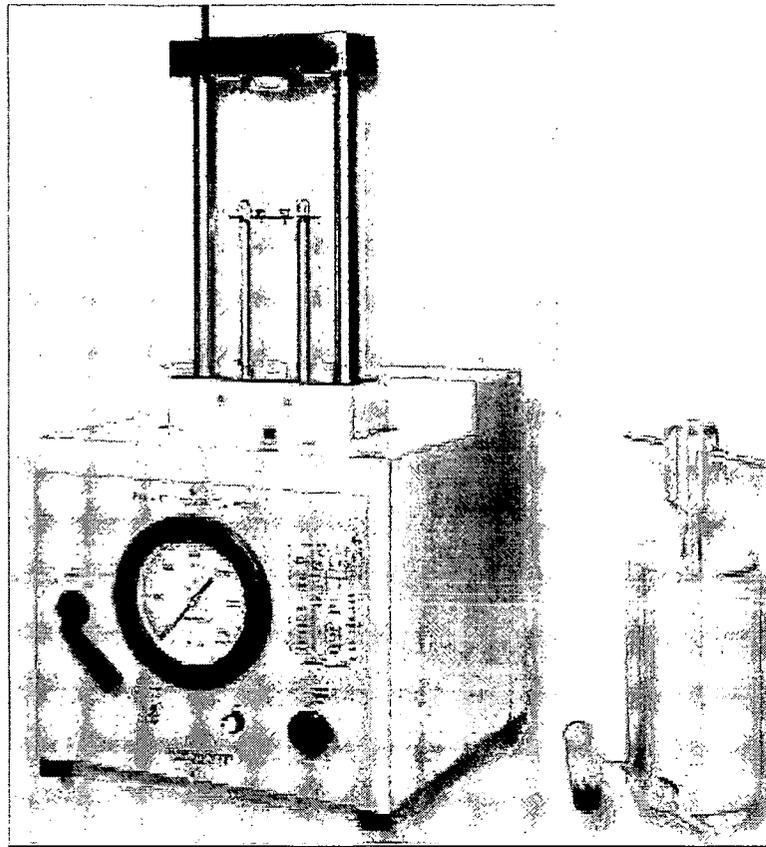


Abbildung 11 : French-Press Apparatur mit Zubehör

Das French-Press Verfahren wurde für den Aufschluss von Zellen eingesetzt, die während der Fermentation gezogen wurden. Zunächst wurde die feuchte Biomasse (15 min bei 6000 rpm zentrifugiert) in 3-4 fache Menge kaltem Anschlusspuffer (siehe 2.3) resuspendiert. Nach dem Zusammensetzen der French-Press wurde die Suspension in die auf 4°C vorgekühlte Stahlzylinder-Zelle der French-Press überführt, der Stempel aufgesetzt und die vorhandene Luft in der Zelle vorsichtig durch manuelles Drücken am Stempel entfernt. Schließlich wurde das Ventil geschlossen und die Zellen aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte in drei Durchgängen wobei zwischen den Pressvorgängen die Proben zur Abkühlung auf Eis gestellt wurden. Beim Pressen wurde auf die Suspension mit der hydraulischen Presse ein Druck von 1000 psi ausgeübt und die Bakterien wurden durch langsames Ventil-Öffnen aus der French-Press-Zelle durch eine extrem kleine Öffnung herausgedrückt. Aufgrund der plötzlichen Entspannung der Zellsuspension und den dadurch auftretenden starken Scherkräften wurden die Zellen dabei lysiert. Danach wurde der Zellabfall (Zellbruchstücke und nicht aufgeschlossene Zellen) aus dem resultierenden Zelllysaten abzentrifugiert, (Ultrazentrifuge Beckman L-70, 30.000 rpm bei 4°C und Vakuum, 30 min). Der Rohextrakt wurde in ein neues Gefäß überführt und Untersuchungen wie Enzymaktivität und Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt.

## **Zellaufschluss mittels Homogenisator**

Der Hochdruckhomogenisator besteht aus einem Trichter, einer Hochdruckpumpe mit Kühlung und einem nachgeschalteten Ventil. Hochdruckhomogenisatoren wurden ursprünglich zur Feinverteilung von Fetttröpfchen der Milch in der Milchindustrie eingesetzt und gehören zur Gruppe der Strömungsdispergiermaschinen, die nach dem Druckentspannungsprinzip arbeiten. Beim Homogenisatoraufschluss prallt, die auf einen hohen Druck (mehrere hundert bar) gebrachte Zellsuspension der Zellen nach dem Durchtritt durch den Homogenisierspalt eines Ventils auf den Prallring und verlässt anschließend das Ventil über einen Auslass. Dabei werden die Zellen von vielen Kräften beansprucht und somit lysiert. Dazu zählen die Scherkräfte der Flüssigkeit an den Ventilwänden, die Prallbeanspruchung am Prallring, die Geschwindigkeits-änderung der Suspension beim Verlassen des Ventils, die Turbulenz und die Kavitation (Blasenbildung inkl. Wachstum und Kollaps der Blase). Beim Verlassen des Ventils wird die Zellsuspension entspannt und der statische Druck schnell unter den Dampfdruck der Suspension gebracht. Dabei entstehen die Dampfblasen die sich in der weiteren Erweiterung der Strömungsquerschnittsfläche mit der Suspension vermischen und zur höheren Effektivität des Zellaufschlusses führen.

Der Zellaufschluss von mehreren Liter Bakteriensuspension, die bei der Fermentation gewonnen wurden, erfolgte in einem Homogenisator (APV System Mod 200) bei 800-1000 bar in zwei Durchläufen. Um das Erwärmen der Probe beim Aufschließen zu vermeiden wurde vor dem Aufschluss (ca. 30 min) die Kühlung des Homogenisators eingeschaltet und das Gerät zweimal mit kaltem Wasser durchgespült. Die Zellen wurden mit 3-4 fachen Volumen an Aufschlusspuffer (Zusammensetzung siehe 2.3) versetzt, gut resuspendiert, die Suspension zügig in den Trichter geleert und die Zellen in zwei Durchgängen aufgeschlossen. Um Enzymabbau durch Hitze zu vermeiden, wurde die Probe stets auf Eis gelagert und zwischen den Durchgängen für ca. 15 min stehen gelassen. Das resultierende Zelllysat wurde bei  $-30^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **2.8.2 Reinigung von rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen mittels Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)**

Die Affinitätschromatographie ist eine der leistungsfähigsten Trennmethode zur Isolation bzw. Anreicherung eines Analyten (z.B. Protein oder Nucleinsäure) aus einer komplexen Lösung verschiedener Stoffe. Ihr Prinzip beruht auf biospezifischen Wechselwirkungen zwischen zwei zueinandergehörigen Reaktionspartnern, wie sie gegeben sind für Protein und Ligand, Antikörper und Antigen, Enzym und Substrat. Die Voraussetzung ist, dass ein geeigneter, an der Säulenmatrix kovalent gebundener Ligand (Bindungspartner), der spezifisch den zu reinigenden Analyten bindet, zur Verfügung steht. Die Elution des Analytes vom Liganden erfolgt ebenfalls spezifisch.

Das Prinzip der immobilisierten Metallion Affinitätschromatographie basiert auf einer reversiblen Interaktion zwischen immobilisierten Metallionen und verschiedenen Aminosäu-

renseitenketten, vor allem von Histidin und Cystein (Porath *et al.*, 1975). Somit lassen sich die rekombinanten Proteine mit einem His<sub>6</sub>-Tag, bestehend aus 6 aufeinander folgenden Histidinresten mittels IMAC aufreinigen. Mit nur wenigen Proteinen aus der Natur würde diese Reinigung gelingen. Aufgrund der hohen Affinität der Bindung zwischen den Histidinresten und Metallionen, die über Liganden an eine Chromatographiematrix angebracht sind, werden hier ungebundene Proteine unter sehr schonenden Bedingungen, d.h. ohne die spezifische Bindung zwischen dem Fusionsprotein und der Affinitätsmatrix zu beeinträchtigen, ausgewaschen. Der pH-Wert der eingesetzten Puffer sollte gleich sein wie der pK-Wert der Histidengruppen, die für die Bindung des Proteins an die Säule mitverantwortlich sind (ca. pH 7,0). Ebenfalls muss eine hohe Ionenkonzentration der Puffer gewährleistet sein, um unspezifische ionische Wechselwirkungen zwischen Proteinen und der Säulenmatrix zu vermeiden.

Für diese Arbeit wurden heterolog exprimierte Pyranose-2-Oxidasen aus *T. suaveolens* und *T. pubescens* als lösliche Proteine, ausgestattet mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag, gewonnen. Dieser His<sub>6</sub>-Tag zeigte keinen Einfluss auf die Proteinfaltung und/oder die Aktivität des Proteins.

Die Optimierung der Reinigung wurde mit Pyranose-2-Oxidasen aus *T. suaveolens*, die in *E.coli* BL21DE3 Star exprimiert wurde, in kleinem Maßstab durchgeführt. Für die Affinitätsreinigungsexperimente wurden eine His Trap HP Säule (1 mL, Amersham Biosciences Corp (USA)), eine Chelating Sepharose Säule (40 ml, Amersham Biosciences Corp (USA)) und eine Chromatographiesäule Profinity IMAC BIORAD (10 ml, Hercules, USA) verwendet. Die Matrix der His Trap HP und Chelating Sepharose Säule besteht aus quervernetzten Agarosekügelchen an denen mit Nickelionen beladenen Chelatgruppen gebunden sind. Matrix der Chromatographiesäule Profinity IMAC besteht aus von BIORAD entwickelten Profinity IMAC UNOsphere Kügelchen (Abbildung 12). Übergangsmetalle wie Nickel und Zink wurden für die Interaktionsexperimente mit Enzym an Liganden Chromatographiematrix immobilisiert.

Die optimalste Reinigung wurde mit der Ni<sup>2+</sup> beladene Chromatographiesäule Profinity IMAC BIORAD (10 ml) durchgeführt. Diese wurde eingesetzt zur Trennung rekombinanter Pyranose-2-Oxidasen von anderen Rohextraktproteinen.

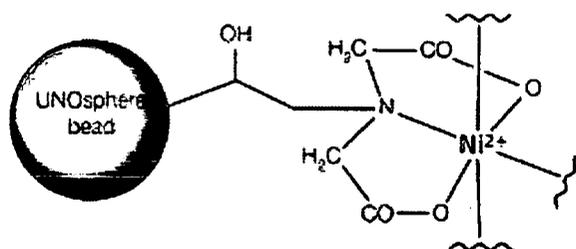


Abbildung 12: Struktur von Profinity IMAC Säulenmatrix.

Die Reinigungsschritte wurden mit der ÄKTA Purifier Chromatographieanlage durchgeführt und die Auswertung erfolgte mit dem Software Programm UNICORN 4.11. Das nach dem Zellaufschluss gewonnene Rohlysate wurde aufgetaut und die Zelltrümmer durch 30 min Zentrifugation (Ultrazentrifuge Beckman L-70) in einem Rotor Ti45 bei 30.000 rpm und 4°C entfernt. Der resultierende Rohextrakt wurde bis zum Auftrag auf der Säule, jedoch nicht länger als 24 h, bei 4°C gelagert. Alle Puffer wurden vor ihrer Anwendung durch einen 0,45 µm Membranfilter filtriert und anschließend 15 min mittels Vakuumpumpe MZ 2C Vacuubrand (Wertheim, D) entgast. Die Anbindung des Proteins an das mit Puffer A (siehe Tabelle 2) äquilibrierte Chromatographiematerial Profinity IMAC erfolgte bei 1,5 mL/min. Das gebundene Enzym wurde mit einem linearen Gradienten steigender Konzentration an Imidazol durch Zuführung von Puffer B (siehe Tabelle 2) mit einer Flussrate von 1,5 ml/min in neun Säulenvolumen (60 min) eluiert. Durch die steigende Konzentration an Imidazol (Abbildung 13) wurden die Histidinreste von His<sub>6</sub>-Tag verdrängt und so die rekombinanten Proteine von der Säule gelöst.

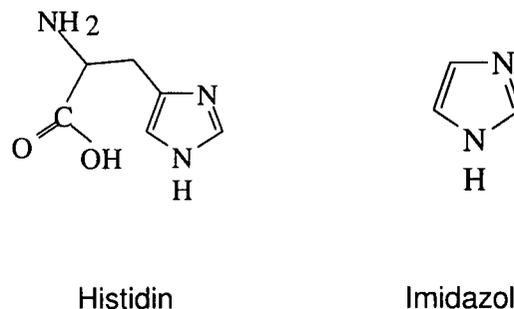


Abbildung 13: Strukturformeln von Histidin und Imidazol

Anhand der Absorption bei 280 nm (aromatische Aminosäuren absorbieren Licht bei dieser Wellenlänge), 456 nm (Absorptionsmaximum von P2O, da es Flavinadenindinukleotid, farbige prosthetische Gruppe enthält) und der Leitfähigkeit wurde der Verlauf der Chromatographie verfolgt. Enzymaktivität und Proteinkonzentration der einzelnen gesammelten Fraktionen wurden bestimmt und die mit der höchsten spezifischen Aktivität zusammengepoolt. Die Pools wurden wieder einer Enzymaktivitäts- und Proteinkonzentrations-Bestimmung (siehe 2.7.2.4. und 2.7.2.5) unterzogen und zusätzlich wurde ihre Zusammensetzung mittels denaturierender Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) festgestellt.

Die Parameter der IMAC-Reinigung sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Parameter der IMAC-Reinigung

Säule	Chromatographiesäule Profinity IMAC BIORAD
Säulenvolumen	10 mL

Puffer A	0,1 M KPP; 1 M NaCl; 0,01 M Imidazol; pH 7,0
Puffer B	0,1 M KPP; 1 M NaCl; 0,5 M Imidazol; pH 7,0
Flussrate	1,5 mL/min
Gradient	0 – 100% Puffer B in 60 min (9 CV)
Fraktionsvolumen	5 mL

### 2.8.3 Abschneiden von His<sub>6</sub>-Tag mit Thrombin und Reinigung der geschnittenen (ohne His<sub>6</sub>Tag) Pyranose-2-Oxidasen

Wie schon erwähnt ist es mit Hilfe molekularbiologischen Methoden dieser Arbeitsgruppe gelungen einen His<sub>6</sub>-Tag inklusive einer Thrombin-Schnittstelle an den N-Terminus von Protein Pyranose-2-Oxidase aus *T. suaveolens* bzw. *T. pubescens* anzuhängen. Durch das Schneiden mit Thrombin an der Thrombin-Schnittstelle wurde der His<sub>6</sub>-Tag vom in *E.coli* exprimierten, aufgereinigten Pyranose-2-Oxidase-Enzym entfernt. Die HiTrap Benzamidine FF-Chromatographiesäule und die HisTrap HP-Säule (mit Ni<sup>2+</sup> beladen) wurden eingesetzt, um das geschnittene Enzym (ohne His<sub>6</sub>-Tag) getrennt von ungeschnittenen Enzym, von His<sub>6</sub>-Tag und von Thrombin in reiner Form zu erhalten.

**HiTrap Benzamidine FF-Säule**  
(Bindet spezifisch Thrombin)

**HisTrap HP-Säule**  
(Mit Nickelionen  
beladen, bindet  
spezifisch  
Pyranose-2-Oxidase  
mit His<sub>6</sub>-Tag)

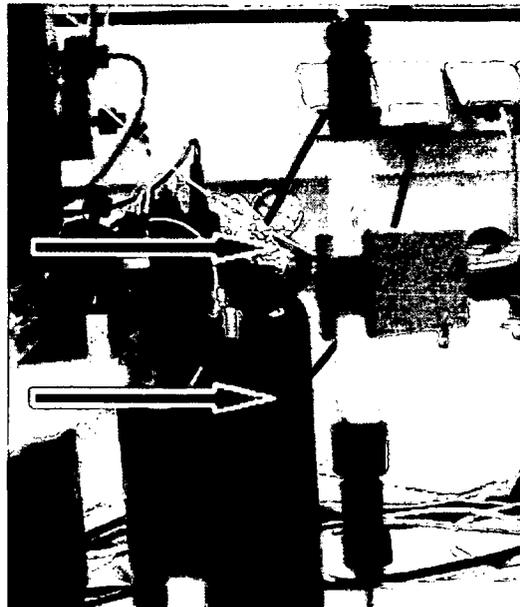


Abbildung 14 Reinigung geschnittenen (ohne His<sub>6</sub>-Tag) rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen mit HiTrap Benzamidine FF-Säule und HisTrap HP-Säule (mit Ni<sup>2+</sup> beladen)

Es wurden 5 U Thrombin (Sigma) in 5 µl PBS-Puffer (siehe Tabelle 3) mit 1 mg affinitäts-gereinigtem His<sub>6</sub>Tag-Fusionsprotein gemischt und der Ansatz auf 750 µL mit PBS-Puffer

aufgefüllt. Nach dem Thrombinverdau bei 25°C (24 h) wurde die Probe mit NaCl versetzt, um die gleiche molare Konzentration (1 M) wie im Puffer A zu erhalten. Die zwei Säulen (HiTrap Benzamidine FF-Säule und HisTrap HP-Säule) wurden an Chromatographieanlage hintereinander angeschlossen (Abbildung 14), mit entgastem RO-Wasser gewaschen und schließlich mit ebenfalls entgastem Puffer A equilibriert. Die nach dem Verdau vorbereitete Probe wurde bei 0,5 mL/min aufgetragen und während die geschnittene Pyranose-2-Oxidase beide Chromatographiesäulen passierte, band Thrombin an die HiTrap Benzamidine FF-Säule. Ungeschnittene (mit His<sub>6</sub>-Tag) rekombinante Pyranose-2-Oxidase wurde an der mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen beladene HisTrap HP-Säule zurückgehalten. Um möglichst wenige Verluste zu haben, wurden die Säulen eine zeitlang weiter mit Puffer A gespült und das geschnittene Enzym weiter gesammelt. Durch Spülen mit Puffer B, wurde sowohl Thrombin von der HiTrap Benzamidine FF-Säule als auch ungeschnittene (mit His<sub>6</sub>-Tag) rekombinante Pyranose-2-Oxidase von der HisTrap HP-Säule gelöst. Um die Verdauausbeute abzuschätzen, wurde die Enzymaktivität in allen Fraktionen gemessen, jedoch nur die vom geschnittenen Enzym gepoolt und charakterisiert.

Die Parameter für die Thrombin-Behandlung und Reinigung von Pyranose-2-Oxidasen ohne His<sub>6</sub>-Tag sind in der Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Parameter für Thrombin Behandlung und Reinigung von Pyranose-2-Oxidasen ohne His<sub>6</sub>-Tag

Thrombin	Sigma, 5 U pro 1 mg affinitätsgereinigtem His <sub>6</sub> Tag Fusionsprotein
PBS-Puffer	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,3
Säulen	HiTrap Benzamidine FF-Säule und HisTrap HP-Säule, jeweils 1 ml Volumen
Puffer A	0,1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1 M NaCl; 0,01 M Imidazol; pH 7,0
Puffer B	0,1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1 M NaCl; 0,5 M Imidazol; pH 7,0
Flussrate	1,5 mL/min
Gradient	Kein
Fraktionsvolumen	1 mL

#### 2.8.4 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Verdünnte Proteinlösungen wurden zur Aufkonzentrierung und Entsalzung, einer Zentrifugation in einer Konzentratoreinheit mit Cellulose-Regenerat-Ultrafiltrationsmembran, Ausschlussgröße 10 kDa (Amicon Ultra 15 Centrifugal Filter Devices, Fa. Millipore), unterzogen. Vorbehandlung der Konzentratoren und Zentrifugation erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Die Proteinlösungen wurden auf eine gewünschte Konzentration einge-

engt und gegebenenfalls aggregierte Proteine durch Zentrifugation (4.000 rpm, 4°C, 10 min) abgetrennt.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe wurde auch hier die Methode nach Bradford (siehe 2.7.2.5) verwendet.

## 2.9 Charakterisierung den Pyranose-2-Oxidasen

### 2.9.1 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Gewöhnlich tragen Proteine eine positive oder negative Nettoladung, je nachdem welche Mischung an geladenen Aminosäuren sie enthalten. Wie oben für DNA-Moleküle erwähnt (2.6.3, Agarose Gelelektrophorese), wandern auch Proteine mit einer Geschwindigkeit, die von ihrer Nettoladung, ihrer Größe und Form abhängt in einem elektrischen Feld. Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wandert eine komplexe Proteinmischung durch ein stark vernetztes Gel aus Polyacrylamid und wird unter Einfluss eines elektrischen Feldes gemäß der molaren Massen enthaltener Proteine in eine Reihe diskreter Banden aufgetrennt.

In dieser Arbeit wurden Native- und SDS-PAGE zur Überprüfung der Reinheit der Proben nach dem Chromatographie-Reinigungsschritt und Bestimmung von Molekülmasse eingesetzt. Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes der gereinigten Proteine wurde die isoelektrische Fokussierung angewendet. Trennung und anschließende Färbung der Proteine wurde auf selbstgegossenen Gelen mit dem Hoefer System, als auch auf fertig gegossenen Gelen mit Phast System durchgeführt.

#### 2.9.1.1 SDS PAGE

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970) befinden sich Proteine in Lösung mit dem starken, negativ geladenen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS, im Laemmli Puffer), das an die hydrophoben Bereiche der Proteinmoleküle bindet. Unter Einwirkung von Hitze werden die einzelnen Proteine dabei löslich und aus ihren Assoziaten mit anderen Protein- oder Lipidmolekülen befreit. Man setzt noch ein Reduktionsmittel zu, z.B.  $\beta$ -Mercaptoethanol (im Laemmli Puffer), das Disulfid-Bindungen in Proteinen löst, sodass die Polypeptide eines aus mehreren Untereinheiten bestehenden Moleküls getrennt analysiert werden können. An die freien, entfalteten Polypeptidketten ist eine relativ große Zahl von SDS Molekülen gebunden, dessen Gesamtzahl proportional zur Länge der Polypeptidkette und damit zur molekular Masse ist. Proteine derselben Größe wandern im Netz des Polyacrylamidgels, das wie ein Molekularsieb wirkt, mit etwa derselben Geschwindigkeit, da ihre völlig entfaltete native Struktur dieselbe Menge an SDS- Molekülen und somit dieselbe negative Ladungsmenge trägt. Große Proteine werden jedoch viel stärker verlangsamt als kleine.

Die SDS-Gele wurden selbst gegossen, indem das hergestellte Trenngel (siehe Tabelle 4) in einer Gießvorrichtung zwischen zwei Glasplatten mit 1,5 mm Spacern bis ca. 1-1,5 cm unter der oberen Kante eingefüllt wurde. Damit der obere Rand des Gels gerade auspolymerisiert wurde dieses mit Isopropanol überschichtet und das Gel zum Polymerisieren 1 ½ bis 2 Stunden stehen gelassen. Danach wurde der Isopropanol weggeleert, mit RO Wasser nachgespült und verbleibende Reste mit Filterpapier abgetupft. Schließlich erfolgte das Gießen eines 2 cm hohen Sammelgels (Zusammensetzung siehe Tabelle 4) und Einsatz eines Probenkamms für 10 bzw. 20 Taschen. Das Sammelgel wurde wieder für 1 ½ bis 2 Stunden zum Polymerisieren stehengelassen.

Tabelle 4: Pipettierschema für 2 SDS-Gele

10%iges Trenngel (Mengen für 2 Platten; 12 ml)	
RO-Wasser	4,8 ml
30% T, 2,7% C Acrylamid/Bisacrylamid	3,96 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl; pH 8,8)	3,0 ml
10 % SDS	120 µl
TEMED (N,N,N',N'-Tetrametylendiamin)	4,8 µl
10% APS (Ammoniumpersulfat)	120 µl
5%iges Sammelgel (Mengen für 2 Platten; 5 ml):	
RO-Wasser	3,4 ml
30% T, 2,7% C Acrylamid/Bisacrylamid	830 µl
Sammelgelpuffer (1M Tris/HCl; pH 6,8)	630 µl
10% SDS	50 µl
TEMED (N,N,N',N'-Tetrametylendiamin)	5 µl
10 % APS (Ammoniumpersulfat)	50 µl

Zur Vorbereitung der Proben nach Laemmli, wurden diese 1:1 mit zweifach konzentrierten Laemmli Puffer (Sigma) versetzt, zur vollständigen Denaturation für 2 min im Thermo- schüttler bei 95 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und schließlich bei 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert. Danach wurden die Proben in den Taschen eines in der Elektrophorese- kammer gestellten SDS-Gels aufgetragen, und die Proteine in einem 1x Laufpuffer (E- lektrophoresis Tank Buffer, Zusammensetzung siehe 2.3) bei einer Stromstärke von 50 mA ca. 2,5 bis 4 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Bestimmung des Molekular- gewichtes der Proben wurde ein Marker mitgeführt (Precision Plus Protein™ Standard, Biorad).

Zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen, wurde die Coomassie-Färbung durchgeführt. Dazu benötigte Reagenzien sind unten aufgelistet. Nach der Elektrophorese wurde das SDS-Gel in eine Wanne mit einer Fixierlösung eingelegt und diese dann 30 min unter ständigen Schwenken einwirken gelassen. Danach wurden die Proteine durch eine Inkubation von 1 h in Coomassie Blau R250-Färbelösung und einer anschließenden Entfärbung des Geles in Coomassie-Entfärbelösung bei 60°C sichtbar gemacht. Schließlich wurden die Banden fixiert, indem das Gel in einer Konservierungslösung für 15-20 Minuten inkubiert wurde. Das fertige Gel wurde in einer Folie luftdicht eingeschweißt.

#### Fixierlösung (bis zu 3 Mal verwendbar)

Methanol	150 ml
RO-Wasser	350 ml
Trichloressigsäure	57,0 g
Sulfosalicylsäure	17,0 g
Mit RO-Wasser auf 1 L auffüllen	

#### Coomassie Blue R-250 Färbelösung (bis zu 3 Mal verwendbar)

Coomassie Blue R-250	0,25 g
Methanol	400 ml
Essigsäure	70 ml
Mit RO-Wasser auf 1 L auffüllen	

#### Entfärbelösung

Essigsäure	500 ml
Ethanol (95 %ig)	1500 ml
Mit RO-Wasser auf 5 L auffüllen	

#### Konservierungslösung

Glycerin	5% (50 g)
Essigsäure	10% (100 g)
Mit RO-Wasser auf 1 L auffüllen	

## 2.9.1.2 Native PAGE

Allgemein wird die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Bedingungen durchgeführt, unter denen das Protein seine natürliche Konformation behält. Da bei pH-Werten von 8 bis 9 (übliche pH-Werte im verwendeten Laufpuffer) die meisten Proteine leicht negativ geladen sind, bewegen sie sich zur Anode hin, während stark negative Proteine unter diesen Bedingungen in den Laufpuffer migrieren und nicht im Gel aufgetrennt werden. Bei dieser Methode ist die Proteintrennung von ihrer Molekülmasse und Ladung abhängig. Der Unterschied in der Durchführung von Nativ-PAGE und SDS-PAGE liegt hauptsächlich in der Probenvorbereitung.

Die Nativ-Gele (Zusammensetzung siehe unten) wurden wie im SDS-PAGE beschrieben gegossen. Die Proben wurden auf 2-3 mg/mL mit RO-Wasser verdünnt und in 1:1 Verhältnis mit Probenpuffer Loading dye versetzt. Danach wurden die vorgebereiteten Proben auf das 10%ige native Gel aufgetragen und die Trennung wie bei SDS-PAGE durchgeführt, jedoch mit einem Laufpuffer ohne SDS (Elektrophoresis Tank Buffer, siehe 2.3). Ebenfalls hier wurde zur Färbung die Coomassie-Färbemethode (siehe SDS PAGE) und zur Größenbestimmung Proteingrößen-standard (High Molecular Weight Calibration Kit for native electrophoresis der Firma GE Healthcare) verwendet.

Tabelle 5: Pipettierschema für 2 Nativ-Gele

10%iges Trenngel (Mengen für 2 Platten; 12 ml)	
RO-Wasser	4,92 ml
30% T, 2,7% C Acrylamid/Bisacrylamid	3,96 ml
Trenngelpuffer (1,5M Tris/HCl; pH 8,8)	3,0 ml
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylendiamin)	4,8 µl
10% APS (Ammoniumpersulfat)	120 µl
5%iges Sammelgel (Mengen für 2 Platten; 5 ml):	
RO-Wasser	3,45 ml
30% T, 2,7% C Acrylamid/Bisacrylamid	830 µl
Sammelgelpuffer (1M Tris/HCl; pH 6,8)	630 µl
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylendiamin)	5 µl
10 % APS (Ammoniumpersulfat)	50 µl

### 2.9.1.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Jedes Protein ist durch einen isoelektrischen Punkt (pI-Wert, definiert als der pH-Wert, bei dem die elektrische Nettoladung Null ist) charakterisiert. Bei der IEF-Methode werden die Proteine gemäß ihrer Ladung in einem ampholyt-haltigen Polyacrylamidgel durch den während der Elektrophorese aufgebauten pH-Gradienten aufgetrennt. Wenn ein Proteingemisch durch einen pH-Gradient bewegt wird, ändert sich die Ladung der Proteine je nach dem pH-Wert der Umgebung und sie wandern in eine Position im Gel, die ihrem pI-Wert entspricht. Nach Anfärbung der Proteine wird der pI-Wert durch Vergleich der Positionen der Probe mit einem Proteinstandard mit bekanntem pI-Wert ermittelt.

Für die vorliegende Arbeit wurden fertige PhastGele (Isoelectric Focusing Calibration Kit Broad Range pI; pH 4-6,5) verwendet. Diese bestehen aus einer homogenen, 5%igen Polyacrylamid-Gelschicht (5%T, 3%C) mit einem Ampholytegemisch (Pharmalyte®). Vor dem Eintrag wurden die Proben von der Chromatographiereinigung mit einem Amicon Ultra Centrifugal Filter Device entsalzt und mit HQ-Wasser auf einer Proteinkonzentration von ca. 0,2 mg/mL verdünnt. Als Referenzprobe diente POX (Pyranose oxidase aus *Phanerochaete chrysosporium*) und als Standard der Isoelectric Focusing Marker IEF MIX 3,6-6,6 (Sigma). Es wurden jeweils 2 µL der verdünnten Probe bzw. des Standards auf das Gel aufgetragen. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte mit einem PhastSystem-Gerät (GE Healthcare, USA) 30 min bzw. 500 Vh (Separation File Programm „IEF 4,5-6“). Um die Proben und IEF-Marker zu visualisieren wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Dazu wurden, außer den letzten zwei, alle Färbeschritte im PhastSystem-Gerät mit dem entsprechenden Programm durchgeführt. Als Vorschrift für die Trennung und Färbung dienten die Angaben der Hersteller. Für die Färbung benötigte Lösungen wurden wie unten angegeben mit reinstem HQ-Wasser selber hergestellt.

Fixierlösung:

20%ige Trichloressigsäure

Waschlösung 1:

50% Ethanol

10% Essigsäure

in HQ-Wasser

Waschlösung 2:

10% Ethanol

5% Essigsäure

in HQ-Wasser

„Senziting-solution“ (Um die Proteine zu „sensibilisieren“)

8,3%ige Glutaraldehyd-Lösung

**Silbernitrat-Lösung**

0,5%ige (w/v) Lösung Ag(NO<sub>3</sub>)

**Entwicklungslösung:**

100 µl 37%ige Formaldehyd Lösung

50 ml 12,5%ige Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Lösung

200 ml HQ-Wasser

**Stop-Lösung:**

5%ige Essigsäure

**2.9.2 Bestimmung der Substratspezifität**

Mit dieser Bestimmung wurde festgestellt welche Substrate von heterolog exprimierten Pyranose-2-Oxidasen aus *T. suaveolens* bzw. *T. pubescens* unter gegebenen Bedingungen neben Glucose am besten umgesetzt werden. Ebenfalls wurde dadurch ein genaueres Bild über das Substratspektrum von Pyranose-2-Oxidase geschaffen bzw. wurden einige Elektronendonoren gefunden die durch dieses Enzym oxidiert werden können. Die Substrate wurden in 200 mM Stammlösung frisch zubereitet.

Folgende Substrate wurden spezifiziert:

- α-D(+)-Glucose
- D(+)-Fucose
- D(-)-Arabinose
- D-(+)-Cellobiose
- L(-)-Arabitol
- L(+)-Arabinose
- 2-Deoxy-D-Glucose
- D(-)-Ribose
- L(-)-Sorbose
- D(-)-Fructose
- D-(+)-Galactose
- D-Xylose
- D(+)-Sucrose
- D(+)-Mannose
- D(+)-Melibiose Monohydrat
- Maltotriose
- D-Mannoheptose
- Methyl-β-D-glucopyranoside
- Methyl-α-D-glucopyranoside

Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid  
 D-Leucrose  
 D(+)-Glucosamin hydrochlorid  
 Dulcitol  
 D-Sorbitol  
 L(+)-Galactonsäure  $\gamma$ -Lacton  
 D-Glucuronsäure Natrium Salz  
 D-Galacturonsäure Monohydrat  
 D(+)-Glucuronsäure  $\gamma$ -Lacton  
 D(+)-Glucuronsäure  $\delta$ -Lacton  
 L-Galacton 1,4-Lacton  
 L-(+)-Gulonsäure- $\gamma$ -Lacton  
 Lactitol  
 D(+)-Lactose Monohydrat

Der Enzymtest:

- ABTS Reagens (Zubereitung siehe 2.7.2.4) 890  $\mu$ L
- 200 mM Substratlösung 100  $\mu$ L

Nachdem die Lösung aus ABTS Reagens und Substrat auf 30°C temperiert wurde, erfolgte der Start der Reaktion mit 10  $\mu$ L der entsprechend verdünnten Enzymlösung. Die Messung wurde, wie im 2.7.2.4 beschrieben durchgeführt.

Im Ansatz (1 mL) betrug die Konzentration an Substrat, wie im Standardtest (2.7.2.4) 20 mM.

### 2.9.3 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und anderer kinetischer Konstanten für ausgewählte Substrate

$K_m$ -Konstante nennt man die Michaelis-Menten-Konstante und ist definiert als die Substratkonzentration [mol/L] die notwendig ist um die Hälfte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen. Dieser Wert bestimmt also die katalytischen Fähigkeiten eines Enzyms bzw. ist für ein bestimmtes Enzym ein konstanter Wert und daher unabhängig von Substrat- und Enzymkonzentration.

Der  $K_m$ -Wert für das definierte Substrat wird durch Messung der Umsatzgeschwindigkeit (Enzymaktivität) bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen bestimmt. Durch die Michaelis-Menten-Gleichung (1913) wird der Zusammenhang zwischen Substratkonzentration und Umsatzgeschwindigkeit wie folgend beschrieben:

$$v = \frac{v_{\max} [\text{Substrat}]}{K_m + [\text{Substrat}]}$$

$k_{cat}$  (Wechselzahl, turnover number) beschreibt die katalytische Aktivität eines Enzyms und steht im Zusammenhang mit  $v_{max}$ . Diese Zahl gibt an wie viele Substratmoleküle / Zeit (sec) in das entsprechende Produkt umgesetzt werden. Die Wechselzahl wurde wie folgt berechnet:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[Enzym]}$$

Von den vier angeführten Substraten wurden  $K_m$ -Werte und andere kinetische Daten bestimmt:

- α-D(+)-Glucose
- D-(+)-Galactose
- L(-)-Sorbitose
- D-Xylose

Die Substratkonzentration im Ansatz (1 mL) wurde im Fall der D-Glucose von 0,1 mM bis 10 mM, von D-Galactose von 1 mM bis 50 mM und von L-Sorbitose und D-Xylose im Bereich von 5 mM bis 200 mM variiert.

Für den Enzymtest wurden 100 µL 10 fach konzentriertes ABTS Reagens (13,5 mg und 100 µL POD-Lösung in 2,5 mL 50 mM KPP 6,5 gelöst) in einer Halbmikropipettierküvette vorgelegt, mit entsprechende Menge an Substratlösung versetzt und der Ansatz auf 990 µL mit 50 mM KPP pH 6,5 aufgefüllt. Die Reaktion wurde ebenfalls hier mit 10 µL entsprechend verdünnter Enzymlösung gestartet. Die Absorbtionszunahme wurde bei 30 °C, wie unter 2.7.2.4 beschrieben gemessen. Die Berechnung der  $K_m$ -Werte gemäß Michaelis-Menten Kinetik erfolgte mit Hilfe des Programms Sigma Plot 2000 Version 6.10,.

### 2.9.4 pH-Optimum

Wie alle Proteine sind auch die Enzyme gegen pH-Wert-Änderungen empfindlich. Aufgrund extremer pH-Wert-Änderungen denaturieren diese, was zu dem vollständigen (oftmals irreversiblen) Ausfall ihrer Funktion führt. Bei pH-Wert-Änderungen in physiologischen Bereichen, kommt es zu keiner Denaturierung der Proteine, sondern man beobachtet lediglich eine reversible Aktivitätsänderung. Man spricht von einem pH-Optimum in jenem Bereich, wo die höchsten Aktivitäten des Enzyms gemessen werden.

Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der gereinigten Enzyme vom pH-Wert wurde mit Citrat-Puffer 100 mM (pH Bereich zwischen 2,5 und 6,0) mit Phosphatpuffer 100 mM (pH 6,0 – 8,0) und schließlich mit Boratpuffer 100 mM (pH 8,0 – 10,0) getestet. Der Enzymtest wurde unter Standardbedingungen (siehe 2.7.2.4), jedoch mit geänderter Ansatzzusammensetzung durchgeführt:

Ansatz (1 mL):

Puffer 500 µL

ABTS-Reagenz 380  $\mu\text{L}$

(14,5 mg ABTS, 100  $\mu\text{L}$  POD-Lösung mit RO-Wasser auf 10,8 mL aufgefüllt)

D-Glucose (1M) 20  $\mu\text{L}$

Start mit 100  $\mu\text{L}$  Probe (Enzymlösung verdünnt in entsprechenden Puffer)

### 2.9.5 Temperaturoptimum

Diese Bestimmung erfolgte wie unter 2.7.2.4 beschrieben, mit dem Unterschied, dass die Temperaturen zwischen 20 °C und 70 °C variiert wurden.

### 2.9.6 Temperaturstabilität

Ein weiterer Parameter zur Enzymcharakterisierung ist die Temperaturstabilität bzw. die Halbwertszeit eines Enzyms. Als Halbwertszeit bezeichnet man hier den Zeitraum, in dem die Konzentration des aktiven Enzyms um die Hälfte abnimmt. Diese lässt sich über die Inaktivierungskonstante bestimmen, die sich aus folgender Gleichung ergibt:

$$A = A_0 \cdot e^{-kt}$$

A = Aktivität zum Zeitpunkt t

$A_0$  = Aktivität zu Beginn der Messung

k = Inaktivierungskonstante

t = Zeit

Durch Auftragen des natürlichen Logarithmus der Aktivität gegen die Zeit erhält man die Inaktivierungskonstante als Steigung.

Die Halbwertszeit  $\tau$  lässt sich über folgenden Zusammenhang berechnen:

$$\tau = \frac{\ln 2}{k}$$

Experimente zur Bestimmung der Stabilität erfolgten bei Temperaturen von 40 °C und 60 °C über einen Zeitraum von 5 Stunden. Dazu wurde gereinigte, aufkonzentrierte Enzym-Lösung entsprechend verdünnt (ca. 1 U mL<sup>-1</sup>), portioniert und die Aliquote bei den angegebenen Temperaturen im Thermoschüttler inkubiert. Zu definierten Zeiten (während der erste Stunde alle 10 Minuten, dann alle 60 Minuten) wurde eine Aliquot aus dem Thermoschüttler entnommen, für einige Minuten auf Eis gekühlt und anschließend die Restaktivität unter Standardbedingungen bestimmt (siehe 2.7.2.4).

Hier wurde zur Berechnung der Halbwertszeit der Enzyme ebenfalls das Programm Sigma Plot 2000 Version 6.10 verwendet.

### 2.9.7 Bestimmung der kinetischen Daten für ausgewählte Elektronenakzeptoren

Um die heterolog exprimierten Pyranoseoxidase-2-Oxidasen aus *T. suaveolens* und *T. pubescens* besser zu charakterisieren wurden auch  $K_m$  - und  $v_{max}$  -Werte für 1,4-Benzochinon und Ferrocenium-hexafluoro-phosphat bestimmt.

Abbildung 15 zeigt die Strukturformeln von 1,4-Benzochinon und Ferrocenium-hexafluoro-phosphat.

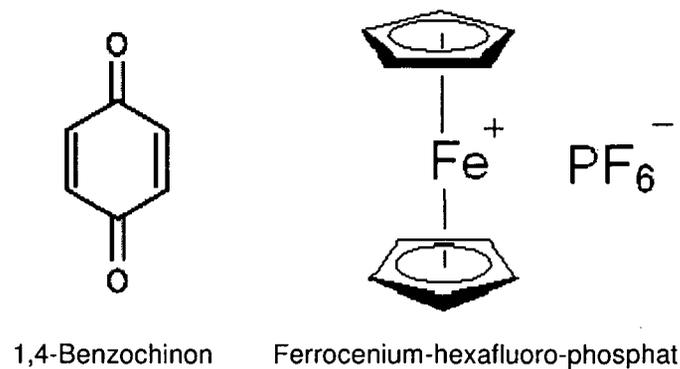


Abbildung 15: Strukturformeln von 1,4-Benzochinon und Ferrocenium-hexafluoro-phosphat.

Zur Ermittlung der kinetischen Daten dieser zwei Elektronenakzeptoren wurden auch hier die Aktivitätsmessungen bei unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Die Konzentration von 1,4-Benzochinon wurde zwischen 0,01 mM und 1,5 mM und die von Ferrocenium-hexafluoro-phosphat zwischen 0,005 und 0,5 mM variiert. Dazu wurde von 1,4-Benzochinon eine 10 mM Stammlösung im RO-Wasser bzw. von Ferrocenium-hexafluoro-phosphat eine 5 mM Stammlösung im 5 mM HCl zubereitet und die eine entsprechende Menge an Lösung zu den Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 1 mL) dazugegeben. Als Puffer wurde 50 mM KPP pH 6,5 und als Substrat (Elektronendonator) 100  $\mu$ L 1 M Glucose verwendet. Die Reaktion wurde mit 10  $\mu$ L Enzymlösung gestartet.

### 2.10 Umsetzung der Glucose mit Pyranose-2-Oxidasen im Batch Reaktor

Zur Durchführung der Umsetzungsversuche von Glucose zu 2-Ketoglucose mit Pyranose-2-Oxidase, wurde ein 2 L Enzym-Batch-Reaktor (Abbildung 16) verwendet.

Da das gebildete  $H_2O_2$ , Pyranose-2-Oxidase irreversibel schädigen kann, musste die Umsetzungsreaktion in Gegenwart von Katalase (Sigma) verlaufen (Abbildung 17).



### Aerob

Eine Regelung des pH-Wertes war nicht erforderlich.

Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben vom Reaktor gezogen (550  $\mu\text{L}$ ). Davon wurden 50  $\mu\text{L}$  zur qualitativen Analyse mittels DC herangezogen und der Rest (500  $\mu\text{L}$ ) 2 Minuten bei 99 °C erhitzt, um die Umsetzungsreaktion zu stoppen. Die gekochten Proben wurden 10 min bei 13200 rpm abzentrifugiert, der Überstand mit HQ-Wasser 1:4 verdünnt und bei -20°C bis zur quantitative Analyse mit HPLC aufbewahrt.

### Analyse der Reaktionsprodukte mittels Dünnschichtchromatographie (DC)

Hier wurde DC eingesetzt, um den Fortschritt der Reaktion qualitativ zu verfolgen.

Direkt aus den Reaktor gezogene Proben (0,5  $\mu\text{L}$ ) und ein Standard (Glucoselösung 0,018 g/mL) wurden auf eine vorbeschichtete Dünnschichtchromatographie-Fertigplatte (HPTLC- Platten LiChrospher® Si 60 F<sub>254S</sub> Merck, 10 cm x 10 cm, 0,2 mm Schichtdicke 180  $\mu\text{m}$ ) in einem Abstand von 1 cm nebeneinander aufgetragen. Nach dem Trocknen der Platte wurde diese senkrecht in eine DC-Kammer mit Laufmittel (siehe unten) gestellt. Die Probeauftrennung betrug ca. 45 min, bis die Laufmittelfront ca. 1 cm vom oberen Rand entfernt war. Nach dem Trocknen der Platte im Trockenschrank (120°C) wurde diese in ein Färbereagenz (siehe unten) für 3 sek. eingetaucht, kurz an der Luft getrocknet und in den Trockenschrank bei 105°C für 15 min gestellt (Spots Entwicklung).

Die Identifizierung der Zucker in der Probe erfolgte zuerst rein optisch, dann durch das Vergleichen der R<sub>F</sub>-Werte der Probe mit Standards.

Die R<sub>F</sub>-Werte ergeben sich aus dem Quotient der Laufstrecke der Probezucker und der Laufstrecke des Laufmittels.

#### Laufmittel:

Ethylacetat	50 mL
Ethanol	20 mL
Essigsäure (60%)	10 mL
B(OH) <sub>3</sub> , gesättigt	10 mL

#### Färbereagenz:

Anilin	1 mL
Diphenylamin	1 g
Isopropanol	100 mL
Phosphorsäure (85%)	10 mL

## Analyse der Reaktionsprodukte mittels HPLC

HPLC steht für High Pressure (Performance) Liquid Chromatography, bzw. Hochdruckchromatographie. Die Bezeichnung bezieht sich auf die Drücke, die diese Methode von der Niederdruck- oder anderen Chromatographiearten unterscheidet. Immerhin werden hier bis zu 400 bar und bei einer Flussrate der mobilen Phase bis zu 5 ml/min erzeugt. Diese Trennmethode ist heute in der Analytik am weitesten verbreitet.

Polymer-Säulen mit stark saueren Kationenaustauscher-Gruppen, die beispielsweise mit Na<sup>+</sup> Ionen beladen sind eignen sich für die Analytik von Monosacchariden, Disacchariden, Zuckealkoholen bzw. Zuckersäuren.

Durch die verfügbare Hochleistungs-Trennsäule Aminex HPX-87P 300 mm x 7,8 mm (ohne Vorsäule), bei einem Druck von 55 bar und einer Temperatur von 60°C konnte D-Glucose und 2-Keto-D-Glucose Gemisch schnell und mit hoher Auflösung analysiert werden. Die Proben wurden mit einer Dionex Summit HPLC-Anlage (inkl. Zubehör) analysiert. Als Eluent (Laufmittel) diente HQ Wasser. Es wurde eine Flussrate von 0,5 ml/min eingestellt. Das Probenvolumen (durch Volumen der Probenschleife bestimmt) betrug 20 µl.

Die erhaltenen Signale wurden mittels eines RI Detektors aufgefangen.

Verwendete Standards:

Gemisch D-Glucose, 2-Keto-D-Glucose mit jeweils 5 g/L, 1 g/L und 0,5 g/L.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Kontrolle der Transformation

Wie bereits erwähnt (siehe 2.6.4) wurden für die Transformation drei *E. coli* Stämme herangezogen; TOP10, BL21 (DE3) Star und BL21 (DE3) Ripl. Ziel der Reihe von Transformationsexperimenten mit den Stämmen BL21 (DE3) Star und BL21 (DE3) Ripl war den geeigneten *E. coli* Produktionsstamm herauszufinden und diesen für weitere Untersuchungen einzusetzen. Um sicher zu stellen, dass die Transformation erfolgreich war, bzw. dass die transformierte Zellen tatsächlich das Plasmid- Konstrukt (pCL35 bzw. pCL34) mit dem gewünschten Gen, welches für Pyranose-2-Oxidase aus *T. suaveolens* bzw. *T. pubescens* kodiert, enthalten, musste Plasmid-DNA isoliert werden (siehe 2.6.1). Die erhaltene DNA wurde mittels Enzym Sal1 enzymatisch verdaut (siehe 2.6.2) und die so gewonnene, geschnittene Plasmid-DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (siehe 2.6.3).

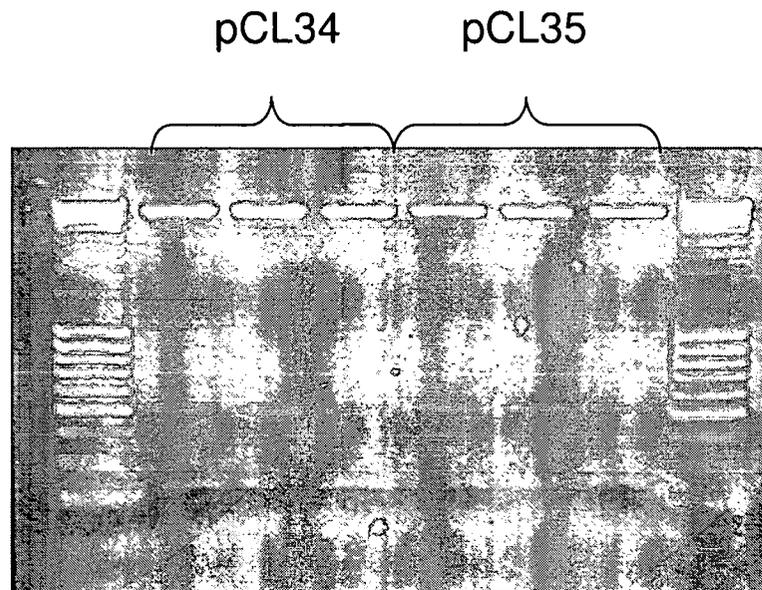


Abbildung 18: Erfolgreiche Transformation in *E.coli* Stamm BL21(DE3) Star

Aus dem Schema des Plasmids PET28a(+), der für die Klonierung des PCR-Fragments verwendet wurde (Template Pyranose-2-Oxidase) und der Pyranose-2-Oxidase-Gensequenz (Paukner 2008) ist zu sehen, dass zwei Sal1-Schnittstelle vorhanden sind (eine im Plasmid PET28a(+)) und eine im Pyranose-2-Oxidase-Gen). Aus diesen Grund wurden nach dem Verdau zwei DNA-Fragmente im Gel erwartet. Da BL21 (DE3) Ripl Stamm zusätzlich eigenes Plasmid enthält, wurde *E.coli* Stamm BL21 (DE3) Star für die Expression von Pyranose-2-Oxidase gewählt. Die Ergebnisse der positiven Transformati-

on in diesem Stamm sind in der Abbildung 18 dargestellt. Der Stamm TOP 10 ist kein Produktionsstamm und wurde deswegen nur für Transformationsversuche verwendet.

## 3.2 Kultivierung und Fermentation

### 3.2.1 Mediumoptimierung und Induktionsversuche

Die Versuche zur Wahl der optimalen Bedingungen für die Fermentation von transformierten *E. coli* wurden wie im Kapitel 2.7.1 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden nur transformierte *E. coli* Zellen (Stamm BL21(DE3) Star) mit pCL35 herangezogen. In Tabelle 6 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 6: Ergebnisse der Mediumoptimierung und Induktionsversuche

<i>E. coli</i> Zellen (Stamm BL21(DE3) Star) mit pCL35 (enthält P2O cDNA aus <i>T. suaveolens</i> ); OD-Werte			
Induktionsmittel	TB-Medium	MCHGly-Medium	2x-LB-Medium
Lactose 0,5 %	18,18	10,01	13,39
0,01 mM IPTG	18,54	11,58	11,63
0,1 mM IPTG	17,93	9,03	13,94
1 mM IPTG	11,05	13,69	12,73

<i>E. coli</i> Zellen (Stamm BL21(DE3) Star) mit pCL35 (enthält P2O cDNA aus <i>T. suaveolens</i> ); Feuchte Biomasse [g] pro 1 ml Zellsuspension			
Induktionsmittel	TB-Medium	MCHGly-Medium	2x-LB-Medium
Lactose 0,5 %	0,0357	0,0271	0,0265
0,01 mM IPTG	0,0402	0,0276	0,0252
0,1 mM IPTG	0,0285	0,0235	0,0255
1 mM IPTG	0,0224	0,0409	0,0212

<i>E. coli</i> Zellen (Stamm BL21(DE3) Star) mit pCL35 (enthält P2O cDNA aus <i>T. suaveolens</i> ); volumetrische Aktivität [U/ml Medium]			
Induktionsmittel	TB-Medium	MCHGly-Medium	2x-LB-Medium

Lactose 0,5 %	3,36	1,0	1,05
0,01 mM IPTG	2,48	0,51	0,50
0,1 mM IPTG	1,28	0,67	0,35
1 mM IPTG	0,10	0,18	0,13

*E. coli* Zellen (Stamm BL21(DE3) Star) mit pCl35 (enthält P2O cDNA aus *T. suaveolens*);  
spezifische Aktivität [U/mg Protein]

Induktionsmittel	TB-Medium	MCHGly-Medium	2x-LB-Medium
Lactose 0,5 %	1,27	0,48	0,50
0,01 mM IPTG	1,07	0,17	0,29
0,1 mM IPTG	0,84	0,27	0,15
1 mM IPTG	0,04	0,07	0,07

Nach 20 Stunden Inkubationszeit wurde die höchste spezifische Enzymaktivität (1,27 U/mg) von der rekombinanten Pyranose-2-Oxidase aus *T. suaveolens* (pCL35) im TB-Medium mit Lactose als Induktionsmittel festgestellt. Auch die höchste Ausbeute an Biomasse ergab sich unter selektiven Bedingungen im TB-Medium mit der Lactose. Mit IPTG als Induktionsmittel wurde im Fall aller drei Konzentrationen niedrigere Enzymaktivität, als mit Lactose gemessen. Dies liegt wahrscheinlich an der Tatsache, dass der IPTG ein starker Induktor ist und zur Bildung von großer Menge mRNA führt. Das verursacht Stress in den prokaryotischen Zellen und somit enthalten diese viele Proteine, die nicht korrekt gefaltet sind bzw. eine falsche Tertiärstruktur besitzen. Die Aggregate von "inaktivem" Protein werden in der englischsprachigen Literatur als inclusion bodies bezeichnet. Beim Einsatz von schwächeren Induktoren wie z.B. Lactose, werden zwar weniger Proteinen gebildet, dafür aber korrekt gefaltet. Lactose dient außerdem als zusätzlicher Nährstoff.

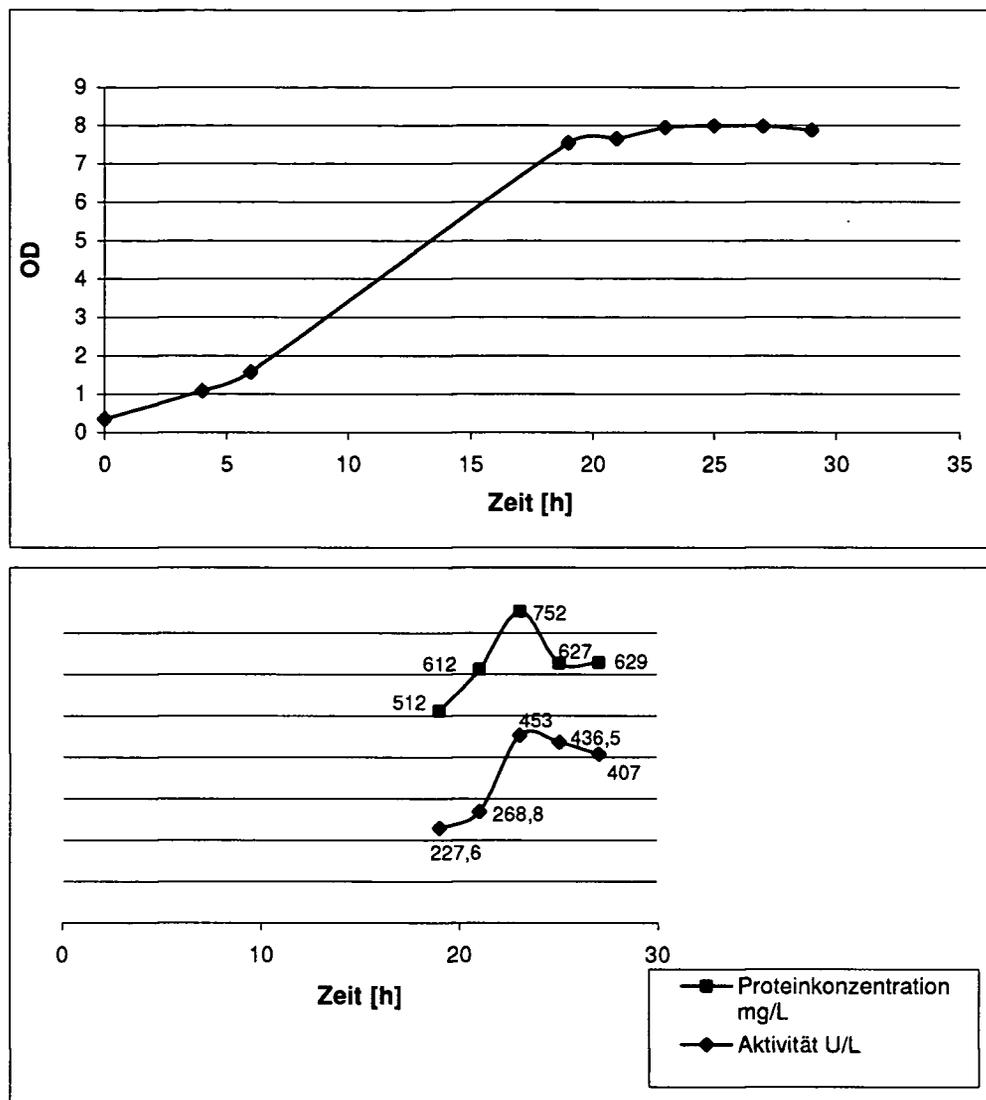
In *E. coli* BL21/DE3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) heterolog exprimierte P2O aus *Trametes pubescens* (Verwendung von Expressionsvektor pSE420, Invitrogen) zeigte nach 24 Stunden Kultivierung in MCHGly-Medium ohne Induktionsmittel eine maximale Enzymaktivität von 0,61 U/mg (Marešová *et al.*, 2005). Im Rahmen einer andere Diplomarbeit, durchgeführt von Sabine Henikl (Henikl 2004) wurde die höchste volumetrische Aktivität (0,57 U/mL) von in *E. coli* heterolog exprimierte Pyranose-2-Oxidase aus *Trametes multicolor*, ebenfalls in MCHGly-Medium mit Lactose als Induktionsmittel (0,5%) nach 20 Stunden Kultivierung bei 25°C festgestellt. Zur Expression dieser P2O wurde der *E. coli* Stamm BL21(DE3) (Firma Stratagene, Heidelberg, Deutschland) eingesetzt der das Expressionsplasmid pHL2 enthielt. Dieses Plasmid beruht auf dem Expressionsvektor

pET21d+ (Firma Invitrogen, Carlsbad, USA), dem das P2O-Gen bzw. cDNA aus *T. multicolor* eingefügt wurde.

Um die oben angeführte Kultivierungssysteme (Medium mit entsprechender Induktionsmittel) in großen Maßstab miteinander zu vergleichen, wurde für die Fermentation von *E. coli* (Stamm BL21 DE3 Star) mit Plasmid pCL35 wurde mit MCHGly-Medium durchgeführt. Die Fermentation von *E. coli* (Stamm BL21 DE3 Star) mit Plasmid pCL34 TB-Medium gewählt. In beiden Fällen wurde 0,5% Lactose als Induktionsmittel eingesetzt.

### 3.2.2 Kultivierung im Bioreaktor

Um genügend Biomasse und somit ausreichende Menge an Enzym für nachfolgende Versuche zu erhalten, wurde jeweils eine Fermentation (30 L) mit zwei *E. coli* Transformanten (Stamm BL21 DE3 Star, mit pCL35 bzw. mit pCL34 transformiert) wie in 2.7.1 durchgeführt. Sofort nach der Inokulumzugabe wurde in Fall der beiden Fermentationen die erste Probe gezogen. Danach erfolgte Probeentnahme in regelmäßigen Abständen (ca. jede 2 Stunden, Ausnahme in der Nacht). Gemessen wurden: optische Dichte, feuchte Biomasse, Trockengewicht und nach dem Zellaufschluss (French-Press) Enzymaktivität und Proteinkonzentration. Die Ergebnisse der Glycerinkonzentrations-Messung wurden aufgrund eines technischen Defekts des HPLC-Gerätes und der entstandenen hohen Ungenauigkeit der Daten nicht in die Auswertung miteinbezogen. Bei einem OD<sub>600</sub> von ca. 1,5 betrug (bei Fermentation von *E. coli* mit pCL35 nach 6 Stunden, bei Fermentation von *E. coli* mit pCL34 nach 4 Stunden), wurde die Produktion von rekombinanter P2O mit 1,5 L sterile Lactoselösung (150 g/L) induziert. Einige Stunden nach dem die Kultur in die stationäre Phase trat, wurde der Versuch abgebrochen (nach 30 Stunden bei rekombinanten *E. coli* mit pCL35 bzw. nach 26 Stunden bei rekombinanter *E. coli* mit pCL34). In Abbildungen 19 und 20 sind die Verläufe der Fermentationen dargestellt.

Abbildung 19: Fermentationsverlauf von rekombinanten *E. coli* mit pCL35

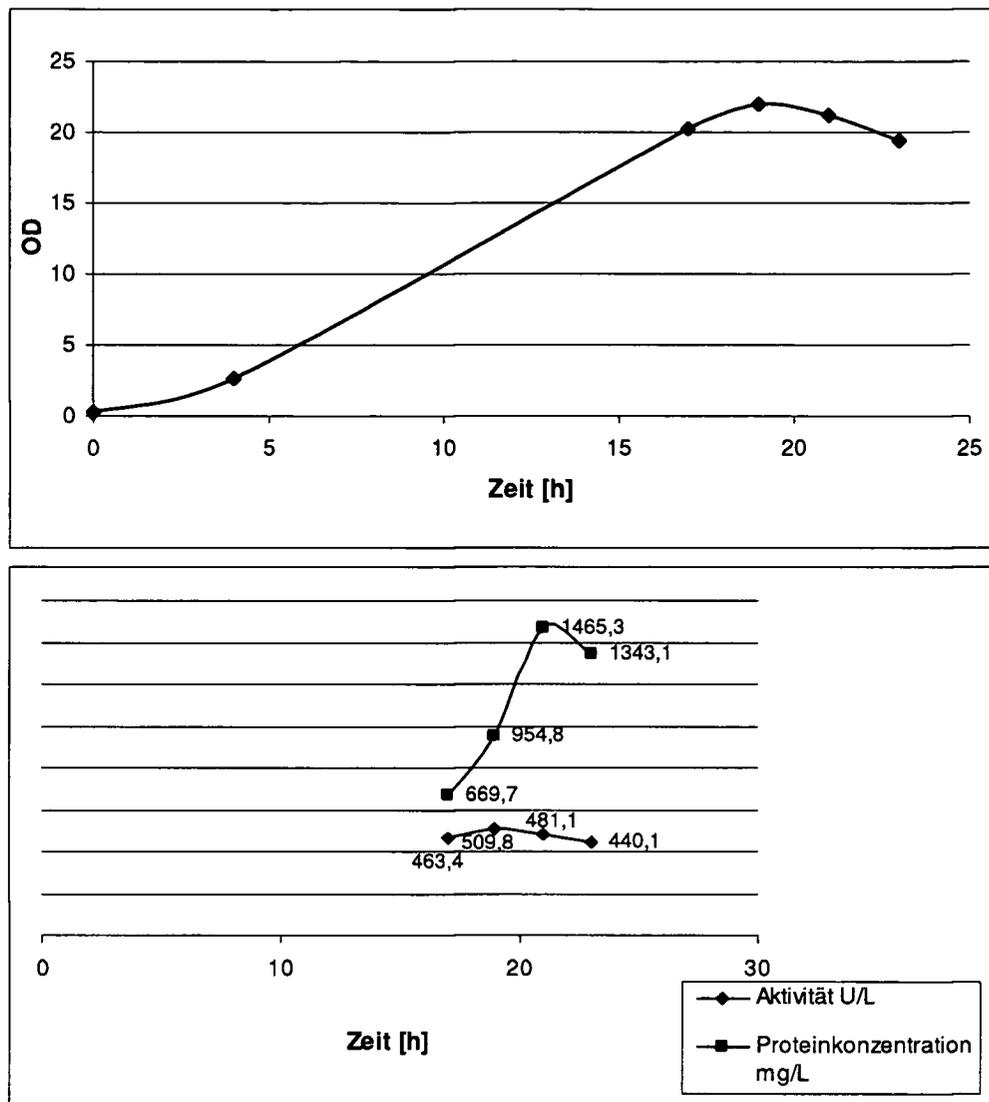


Abbildung 20: Fermentationsverlauf von rekombinanten *E. coli* mit pCL34

Zweck der beiden Fermentationen war möglichst viel von den heterolog exprimierten Enzymen zu gewinnen. Zu Fermentationsende betrug die volumetrische Aktivität der Pyranose-2-Oxidase von *T. pubescens* 440 U/L und von *T. suaveolens* 407 U/L Medium.

Aus den zusammengefassten Ergebnissen der zwei Fermentationen (Tabelle 7) ist zu sehen, dass die Zellernte nach 26 Stunden Fermentation in TB-Medium viel reicher war (791,24 g Feuchtzellgewicht) als nach 30 Stunden im MCHGly-Medium (266,6 g Feuchtzellgewicht). Dieser Unterschied an gewonnener Biomasse lässt sich auch anhand der gemessenen OD-Werte feststellen. Es wurde ebenfalls eine um Faktor 1,5 höhere Produktivität (U/h\*L) bei rekombinanter P2O aus *T. pubescens* (Fermentation in TB-Medium), als bei rekombinanter P2O aus *T. suaveolens* (Fermentation im MCHGly-Medium) erreicht. Doch in beiden Fällen betrug die maximale, gemessene spez. Aktivität ca. 0,7 U/mg. Hier muss betont werden, dass im Fall der Fermentation zur Gewinnung von rekombinanter

P2O aus *T. pubescens* zwischen der 4. und der 17. Stunde der Fermentation möglicherweise eine nicht registrierte, höhere spez. Aktivität erzielt wurde.

Die Fermentation von rekombinanten *E. coli* in MCHGly Medium mit Lactose als Induktionsmittel hat sich als erfolgreich bewährt (Henikl 2004). Die in der vorliegenden Arbeit gemessene Werte an spezifische Aktivität von 0,7 U/mg liegen etwas unter denen, die in der vorher erwähnten Arbeit (Henikl 2004) für in *E. coli* heterolog exprimierte P2O aus *T. multicolor* erhalten wurden (0,87 U/mg).

Beide eingesetzten Medien zur Herstellung heterolog exprimierter P2O liegen in der gleichen Preisklasse (TB-Medium kostet 2,2 €/L, MCHGly-Medium kostet 2,13 €/L) doch die Herstellung rekombinanter P2O im TB-Medium weist einen wichtigen Vorteil auf; höhere Produktivität und somit kürzere Fermentationsdauer bei gleicher Ausbeute. Durch Optimierung der Fermentation im TB-Medium könnten bei weiterer Absenkung der Fermentationsdauer Kosten im Energie- und Personalbereich eingespart werden, oder durch das Anwenden kleinerer Anlagen Investitionskosten gesenkt werden. Die Ausbeute kann durch Optimierung des Fermentationsverfahrens selbst weiter erhöht werden, z.B. durch eine Fed-Batch Fermentation.

Tabelle 7: Zusammengefasste Ergebnisse der Fermentationen von rekombinanter *E. coli* mit pCL35 und rekombinanter *E. coli* mit pCL34

	<i>E. coli</i> mit pCL35	<i>E. coli</i> mit pCL34
Fermentationsmedium	MCHGly-Medium	TB-Medium
Fermentationsdauer	30,5 Stunden	26 Stunden
Feuchtzellgewicht	266,6 g	791,24 g
Optische Dichte	7,88	19,38
Aktivität	407 U/L Medium	440 U/L Medium
Max. beobachtete Aktivität	453 U/L Medium	510 U/L Medium
spez. Aktivität	0,65 U/mg	0,33 U/mg
Max. beobachtete spez. Aktivität	0,7 U/mg	0,7 U/mg
Produktivität	18,2 U/h*L	26,8 U/h*L

### 3.3 Enzymreinigung

#### 3.3.1 Gewinnung des Rohextraktes

Die bei der Fermentation produzierte Biomasse, diente als Ausgangsmaterial für die Gewinnung des Rohextraktes bzw. Rohlysats. Nach der Fermentation von *E.coli* (Stamm BL21 Star™ DE3) mit pCL35 bzw. mit pCL34 wurde das Feuchtgewicht der abzentrifugierten Zellen festgestellt und diese in 3-4 fache Menge an entsprechenden Aufschlusspuffer suspendiert. Danach erfolgte, aufgrund des großen Volumens an suspendierten Zellen, ein Aufschluss mit Hilfe des Homogenisators wie unter 2.8.1. beschrieben. Während dieser Arbeit haben sich kleine Unterschiede in der Aktivitätsausbeute zwischen French-Press- und Homogenizator-Aufschlussverfahren herausgestellt (Homogenizatoraufschluss um bis zu max. 10% besser).

Ein Aliquot von der ganze gewonnene Rohextraktmenge wurde in das Reinigungsverfahren herangezogen. Der restliche Rohextrakt wurde in 30 mL bzw. 50 mL Aliquoten bei  $-30^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### 3.3.2 Reinigung von rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen mittels Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Da die rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen am N-Terminus ein His<sub>6</sub>-Tag besitzen, war möglich diese mit IMAC zu reinigen. Um eine möglichst hohe Ausbeute der Trennung zu erzielen wurden Reinigungsversuche mit mehreren Affinitätssäulen durchgeführt (siehe 2.8.2). Als optimalste Reinigung der beiden rekombinanten Enzymen hat sich die Chromatographiesäule Profinity IMAC BIORAD (10 ml, Hercules, USA), beladen mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen, herausgestellt. Die Packung der Säule und Immobilisierung von Metallionen erfolgte nach Herstellerangaben.

Nach dem Aufschluss mit dem Homogenisator und der anschließenden Ultrazentrifugation wurde für die darauf folgender Reinigung ein Aliquot des klaren Überstandes entnommen. Bei Pyranose 2-Oxidase aus *T. suaveolens* betrug dieser 45 ml und bei P2O aus *T. pubescens* 100 ml. Die Reinigungen wurden wie unter 2.8.2 beschrieben durchgeführt.

Abbildung 21 zeigt ein Chromatogramm, das bei den Reinigungen rekombinante Pyranose 2-Oxidase aus *T. suaveolens* mit IMAC enthalten wurde.

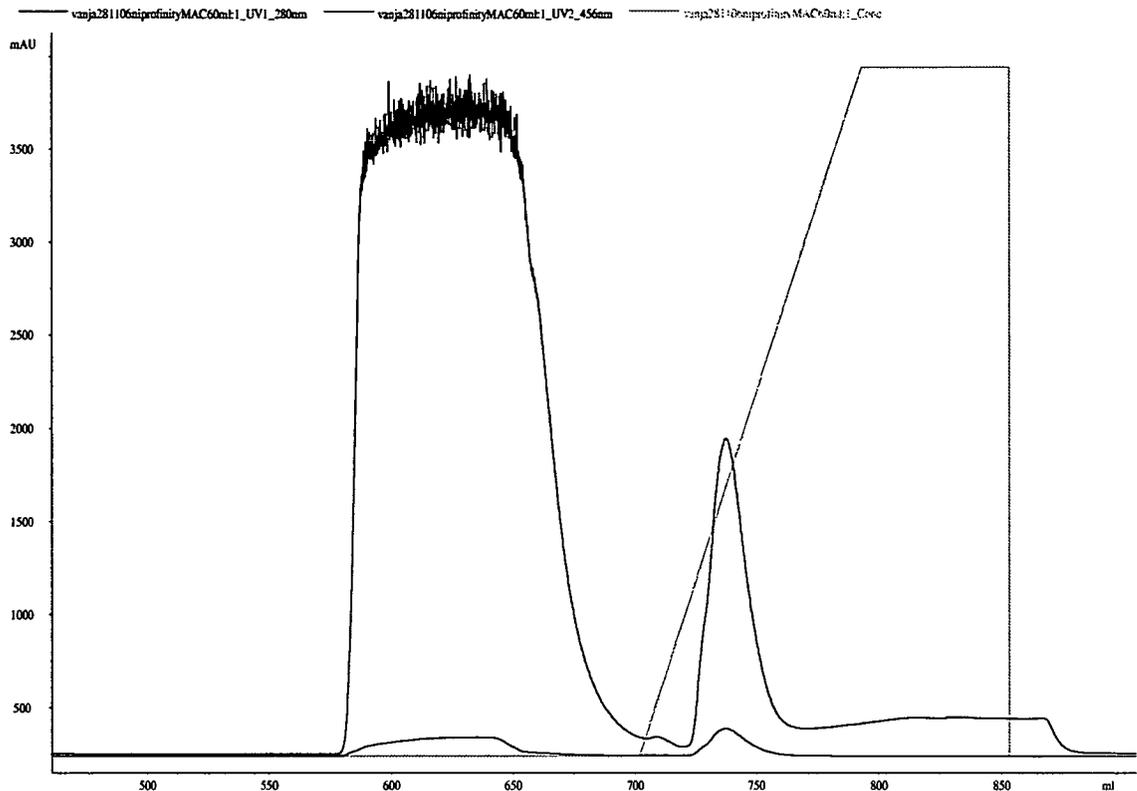


Abbildung 21: Chromatogramm der Proteinreinigung an Profinity IMAC BIORAD (10 ml, Hercules, USA) beladen mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen; Die blaue Linie markiert die Absorption bei 280 nm (Protein), die rote Linie die Absorption bei 456 nm (FAD). Die grüne Linie gibt das Elutionsgradient wieder (0-100% Elutionspuffer B).

Wie oben erwähnt (siehe 2.8.2), wurde His<sub>6</sub>-Tag Protein mit einem linearen Gradienten steigender Konzentration an Imidazol von der Säule eluiert. Die Elution des Fusionsproteins aus *T. suaveolens* wurde bei einer Konzentration von etwa 32 % Puffer B (Zusammensetzung siehe Tabelle 2) beobachtet. Die auf die Aktivität bezogene Wiederfindungsrate bzw. die Ausbeute der Trennung betrug 81 %. Rekombinante Pyranose-2-Oxidase aus *T. pubescens* eluierte im Bereich um 29 % Puffer B und die Reinigungsausbeute betrug 67%.

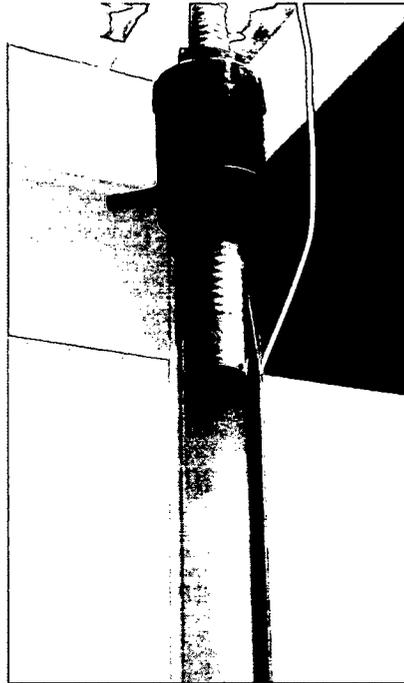


Abbildung 22: Reinigung von heterolog exprimierten P2O (gelb) mit  $\text{Ni}^{2+}$  beladene Chromatographiesäule Profinity IMAC BIORAD (10 ml)

Vor dem Elutionsschritt war durch die gebundene Pyranose-2-Oxidase eine schöne Gelbfärbung auf der Säule zu beobachten (Abbildung 22). Nach der Elution wurden die aktivierten Fraktionen gepoolt und für die Aufbewahrung bis zur Durchführung der Charakterisierung der gereinigten, rekombinanten Enzymen mit einem Amicon Ultra Centrifugal Filter Device eingeeengt (siehe 2.8.4) und auf KPP Puffer für Enzymaktivitätsbestimmung von Pyranose-2-Oxidase (Zusammensetzung siehe 2.3.) umgepuffert.

Die Zusammenfassung der Reinigungen befindet sich in der Tabelle 8 und 9.

Tabelle 8: Reinigung der heterolog exprimierte P2O aus *T. suaveolens*

Reinigung	Gesamtaktivität [U]	Spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Aufreinigungsfaktor
Rohextrakt	990	0,80	100	1,0
IMAC	804	6,5	81,2	8,1
Konzentrat	800	9,0	80,8	11,2

Tabelle 9: Reinigung der heterolog exprimierte P2O aus *T. pubescens*

Reinigung	Gesamtaktivität [U]	Spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Aufreinigungsfaktor
Rohextrakt	3181	1,15	100	1,0
IMAC	2607	13,3	82	11,6
Konzentrat	2119	15,5	66,6	13,5

Bei der Aufkonzentrierung der gereinigten Proteinlösung rekombinanter Pyranose-2-Oxidase aus *T. pubescens* kam es zu höheren Verlusten der Enzymaktivität. Zum Vergleich seien hier Literaturwerte der vierstufige Reinigung heterolog exprimierte Pyranose 2-Oxidase aus *T. pubescens* (Marešová *et al.*, 2005) genannt: Ausbeute der Trennung 15 %, Aufreinigungsfaktor 18,6, spezifische Aktivität 9,3 U/mg.

Um die Reinheit der Enzymproben zu überprüfen, wurde SDS-PAGE- Methode durchgeführt (siehe 2.9.1.1). Dabei konnte man feststellen, dass die gepoolte Fraktionen keine weiteren Proteine, beinhalten (Abbildung 23).

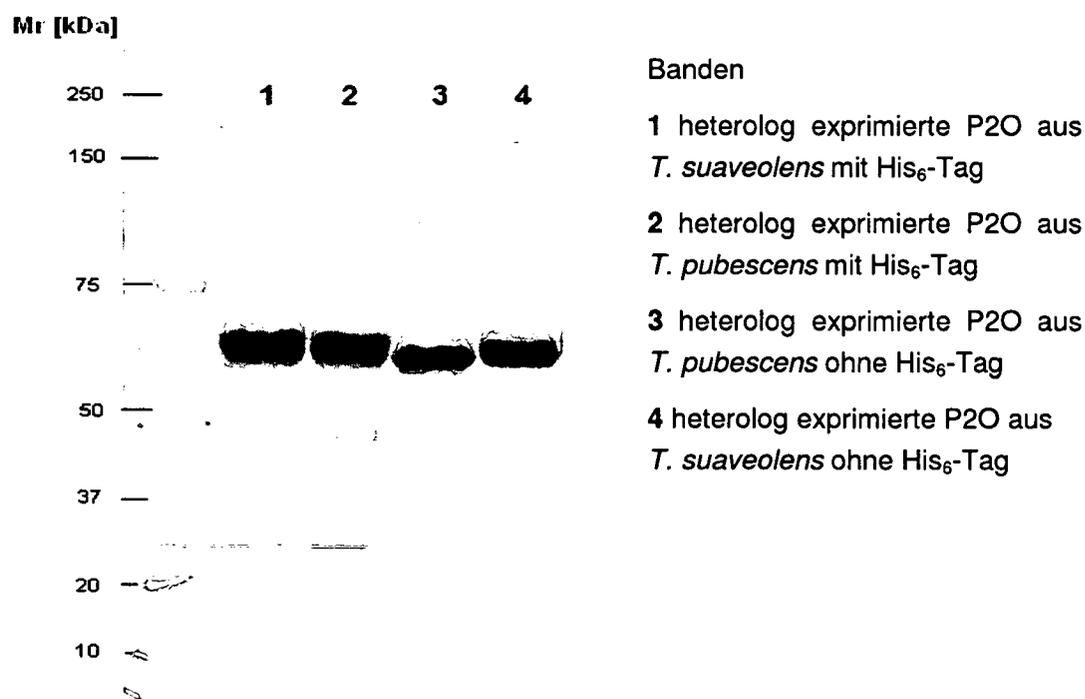


Abbildung 23: SDS-PAGE von gereinigten rekombinanten Pyranose-2-Oxidase aus *T. suaveolens* und *T. pubescens*.

Die bisher durchgeführte Reinigung von Wildtyp-P2O, wie z.B. aus *T. multicolor* (Leitner *et al.*, 2001) besteht aus drei konventionellen Verfahrensschritten (Ammoniumsulfatfällung, hydrophobe Interaktionschromatographie und Anionenaustauschchromatographie) und führt zu ähnlichen Reinigungserfolgen wie hier geschildert: Ausbeute 80 %, Aufreinigungsfaktor 16, spezifische Aktivität 12 U/mg. Das Reinigungsverfahren bei rekombinanter P2O hat allerdings den Vorteil, dass bereits nach einem Schritt ausreichende Reinheit gegeben ist. Durch weitere Optimierung dieses Verfahrens könnten die Ausbeuten noch mehr verbessert werden.

### 3.3.3 Abschneiden von His<sub>6</sub>-Tag mit dem Thrombin und Reinigung geschnittenen (ohne His<sub>6</sub>-Tag) rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen

Das Schneiden der N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag an der Thrombin-Schnittstelle von im *E.coli* (Stamm BL21/DE3) exprimierten, aufgereinigten Pyranose-2-Oxidase-Enzymen mit Thrombin-Protease, als auch die Reinigung von geschnittenen Enzymen wurden wie im Kapitel 2.8.3 durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 10 bzw. Tabelle 11 zusammengefasst.

Auch hier wurde gereinigte Enzyme ohne His<sub>6</sub>-Tag für die Aufbewahrung bis zur Durchführung der Charakterisierung mit Amicon Ultra Centrifugal Filter Device eingeeengt (siehe 2.8.4) und auf KPP Puffer für die Enzymaktivitätsbestimmung von Pyranose-2-Oxidase (Zusammensetzung siehe 2.3.) umgepuffert.

Tabelle 10: Ergebnisse des Schneidens His<sub>6</sub>-Tag rekombinanter Pyranose-2-Oxidase und die Reinigung geschnittenen Enzyms (ohne His<sub>6</sub>-Tag) aus *T. suaveolens*

Schneiden von His <sub>6</sub> -Tag und Reinigung	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute des Schneidens und Reinigung [%]
Ungeschnittene P2O	595	100
Gereinigte P2O ohne His <sub>6</sub> -Tag	455	76,6
Konzentrat gereinigte P2O ohne His <sub>6</sub> -Tag	429	72,1

Tabelle 11: Ergebnisse des Schneidens His<sub>6</sub>-Tag rekombinanter Pyranose-2-Oxidase und die Reinigung geschnittenen Enzyms (ohne His<sub>6</sub>-Tag) aus *T. pubescens*

Schneiden von His <sub>6</sub> -Tag und Reinigung	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute des Schneidens und Reinigung [%]
Ungeschnittene P2O	770	100
Gereinigte P2O ohne His <sub>6</sub> -Tag	592	77
Konzentrat gereinigte P2O ohne His <sub>6</sub> -Tag	527	68,5

### 3.4 Charakterisierung den Pyranose-2-Oxidasen

Alle vier erhaltene gereinigte Enzymformen wurden charakterisiert: rekombinante Pyranose-2-Oxidase aus *T. suaveolens* mit His<sub>6</sub>-Tag, ohne His<sub>6</sub>-Tag, rekombinante Pyranose-2-Oxidase aus *T. pubescens* mit His<sub>6</sub>-Tag und ohne His<sub>6</sub>-Tag.

#### 3.4.1 Gelelektrophoretische Methoden

Um den Reinigungserfolg zu überprüfen und erste Anhaltspunkte über die Molekülgröße der Enzymen zu gewinnen, wurde Native PAGE mit Coomassie-Färbemethode eingesetzt (siehe 2.9.1.2). Als Molekulargewichtstandard wurde High Molecular Weight Calibration Kit der Firma GE Healthcare verwendet. Ebenfalls wurde mit SDS-PAGE die Reinheit der untersuchten Pyranose-2-Oxidasen überprüft (siehe 3.3.2).

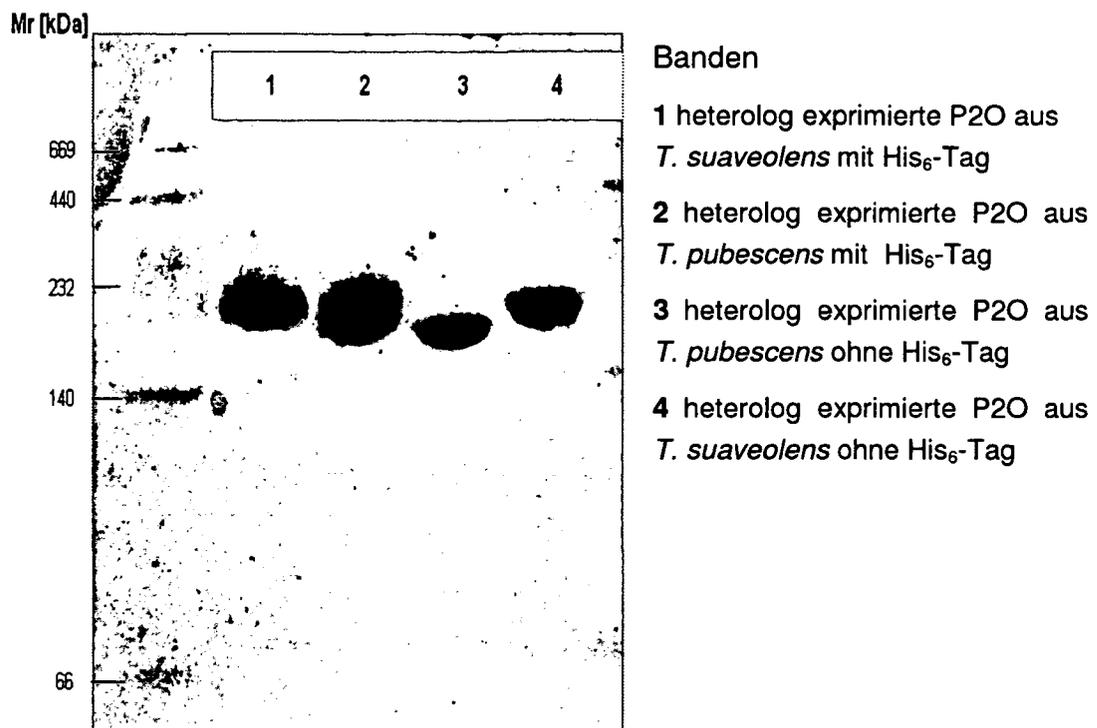


Abbildung 24: Natives-PAGE von gereinigten rekombinanten Pyranose-2-Oxidase aus *T. suaveolens* und *T. pubescens*

Wie in den Abbildungen 23 und 24 dargestellt, war die IMAC Trennung der gewünschten Enzyme sehr erfolgreich. Die gewonnenen Proteine lagen nach der Trennung in sehr reiner Form vor. Das Molekulargewicht für rekombinante Pyranose-2-Oxidase ohne His<sub>6</sub>-Tag betrug bei *T. suaveolens* 246 kDa und bei *T. pubescens* 232 kDa. Aus der Literatur (Leitner *et al.*, 2001) ist bekannt, dass Pyranose-2-Oxidase aus *T. multicolor* als Tetramer mit einem Molekulargewicht von 270 kDa vorliegt. Anders als hier wurde dieser Wert mittels analytischer Ultrazentrifugation bestimmt, einer viel genaueren Methode. Dieser Methode eignet sich besonders gut um die native Molmassen und den Assoziationsstatus von Proteinen und anderen Makromolekülen zu ermitteln (Curth *et al.*, 2007; Lebowitz *et al.*, 2002).

SDS-PAGE ergab ein Molekulargewicht der Unterheiten der beiden heterolog exprimierten Pyranose 2-Oxidase ohne His<sub>6</sub>-Tag aus *T. suaveolens* und aus *T. pubescens* von 60 kDa. Aus der Aminosäuresequenz dieser zwei Pyranose-2-Oxidase (Paukner 2008) errechnet sich ein Monomergewicht von 66 kDa.

Aus den zwei gelektrophoretischen Methoden, Natives-PAGE und SDS-PAGE kann geschlossen werden, dass die hier untersuchten heterolog exprimierte Pyranose-2-Oxidase ebenfalls homotetramere Proteine sind und um ein genaues Molekulargewicht der Tetramer-Form bzw. der Unterheiten zu bestimmen, präzisere Methoden zum Einsatz kommen müssen.

### 3.4.2 Bestimmung des isoelektrischen Punktes mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF)

Die Ergebnisse der Methode IEF, die zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI) den Enzymen diente (Durchführung siehe Kapitel 2.9.1.3), sind in der Abbildung 25 dargestellt

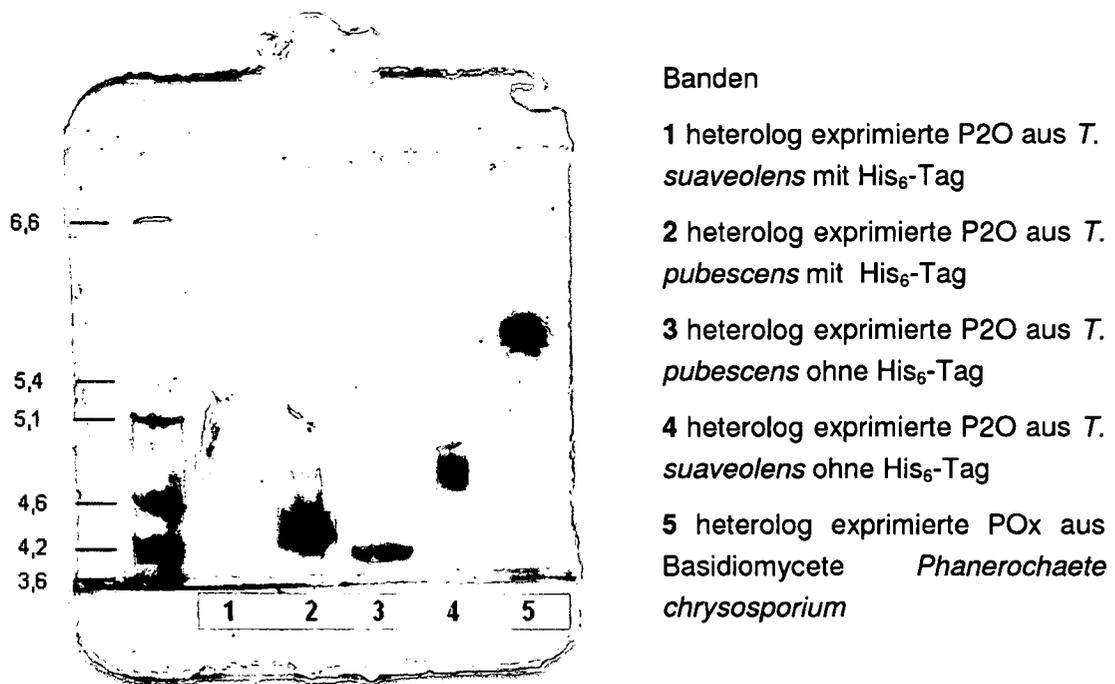


Abbildung 25: IEF-Gel

Die rekombinanten Pyranose 2-Oxidasen mit His<sub>6</sub>-Tag wurden mit diesen Verfahren in mehreren Banden aufgetrennt. Die Banden für rekombinante P2O aus *T. suaveolens* liegen im Bereich von 4,8 bis 5,2 und die für rekombinante P2O aus *T. pubescens* im Bereich von 4,1 bis 4,5. Ein möglicher Grund dafür ist, dass Histidin mit Metallionen unterschiedliche komplexe Verbindungen eingeht. Da diese Komplexe unterschiedliche Ladungen aufweisen, unterscheiden sich auch ihre pI-Werte. Für die rekombinante P2O aus *T. suaveolens* ohne His<sub>6</sub>-Tag wurde ein pI-Bereich von 4,5 bis 4,8 ermittelt, für die rekombinante P2O aus *T. pubescens* ebenfalls ohne His<sub>6</sub>-Tag ein isoelektrischer Punkt bei 4,0. Für Wildtyp P2O aus *T. multicolor* wurde ein pI von 4,2 ermittelt (Leitner *et al.*, 2001). Leitner stellte bei diesem Enzym keine Isoformen fest.

Als Referenz wurde in *E. coli* BL21(DE3) heterolog exprimierte POx aus dem Basidiomycet *Phanerochaete chrysosporium* verwendet. Der Isoelektrische Punkt für dieses Enzym liegt im Bereich von 5,1 bis 5,3 je nachdem um welche der drei möglichen Isoformen es sich handelt (Arbeit im Rahmen der Dissertation von Ines Pisanelli durchgeführt am Universität für Bodenkultur Wien, Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie, 2007). Hier streckt sich der pI-Bereich für heterolog exprimierte POx zwischen 5,5 und

5,7. Ein möglicher Grund für diese Abweichung liegt in der Qualität des verwendeten Standards.

### **3.4.3 Substratspezifität**

Die Substratspezifitätbestimmungen wurden wie unter 2.9.3 beschrieben durchgeführt. In den unten angeführten Tabellen, sind die Aktivitäten der Enzyme mit 33 getesteten Substraten aufgelistet. Eine Aktivität von 100% entspricht dem Ergebnis der Enzymaktivitätsbestimmung mit 20 mM D(+)-Glucose (Konzentration in der Küvette). Die Substrateignung der restlichen analysierten Verbindungen wurde in Relation zu diesem gesetzt. Die Bedingungen entsprechen dem Standard-Aktivitätstest.

Tabelle 12: Substratspezifität der rekombinanten P2O aus *T. suaveolens* mit His<sub>6</sub>-Tag

<b>Substrat (Zucker)</b>	<b>Aktivität %</b>
α-D(+)-Glucose	100,00
L(-)-Sorbose	45,42
D-Xylose	27,68
D(+)-Glucuronsäure δ-lacton	16,30
D-(+)-Cellobiose	12,69
L-(+)-Gulonsäure-γ-lacton	6,24
2-Deoxy-D-glucose	5,69
D(+)-Mannose	4,42
D-(+)-Galactose	4,20
D-Leucose	3,92
D-Galacturonsäure Monohydrat	3,82
Methyl-β-D-glucopyranosid	3,72
D-Mannoheptose	1,90
Methyl-α-D-glucopyranosid	1,29
D(+)-Melibiose Monohydrat	0,98
Maltotriose	0,55
D-Sorbitol	0,36
D(+)-Sucrose	0,32
D(-)-Ribose	0,25
L-Galactone 1,4-lacton	0,22
D(+)-Lactose Monohydrat	0,15
D(-)-Arabinose	0,13
D(+)-Fucose	0,12
L(-)-Arabitol	0,12
D-Glucuronsäure Natrium Salz	0,12
D(-)-Fructose	0,11
L-Galactonsäure γ-lacton	0,10
Lactitol	0,08
L(+)-Arabinose	0,06
D(+)-Glucosamin	0,03
D(+)-Glucuronsäure γ-lacton	0,02
Methyl-α-D-manno-pyranoside	0,01
Dulcitol	0,01

Tabelle 13: Substratspezifität der rekombinanten P2O aus *T. suaveolens* ohne His<sub>6</sub>-Tag

<b>Substrat (Zucker)</b>	<b>Aktivität %</b>
α-D(+)-Glucose	100,00
L(-)-Sorbitose	48,60
D-Xylose	28,39
D-(+)-Cellobiose	14,32
2-Deoxy-D-glucose	6,65
L-(+)-Gulonsäure-γ-lacton	5,99
D-Galacturonsäure Monohydrat	5,52
D-Leucrose	4,42
D(+)-Glucuronsäure δ-lacton	4,30
D-(+)-Galactose	4,27
Methyl-β-D-glucopyranosid	4,05
D-Mannoheptose	1,84
Methyl-α-D-glucopyranosid	1,27
D(+)-Melibiose Monohydrat	0,94
D(+)-Mannose	0,45
D-Sorbitol	0,32
Maltotriose	0,32
L(-)-Arabitol	0,28
D(-)-Fructose	0,24
D-Glucuronsäure Natrium Salz	0,23
L-Galactone 1,4-lacton	0,22
L-Galactonsäure γ-lacton	0,21
L(+)-Arabinose	0,20
D(-)-Ribose	0,18
D(-)-Arabinose	0,12
Methyl-α-D-manno-pyranosid	0,12
D(+)-Lactose Monohydrat	0,12
D(+)-Glucosamine	0,10
D(+)-Sucrose	0,09
D(+)-Glucuronsäure γ-lacton	0,08
D(+)-Fucose	0,07
Lactitol	0,07
Dulcitol	0,01

Tabelle 14: Substratspezifität der rekombinanten P2O aus *T. pubescens* mit His<sub>6</sub>-Tag

Substrat (Zucker)	Aktivität %
α-D(+)-Glucose	100,00
L(-)-Sorbitose	45,14
D-Xylose	27,75
D-(+)-Cellobiose	15,87
L-(+)-Gulonsäure-γ-lacton	7,93
2-Deoxy-D-glucose	6,84
D-Galacturonsäure Monohydrat	6,24
D-Leucrose	5,00
D(+)-Mannose	4,90
Methyl-β-D-glucopyranosid	4,62
D(+)-Glucuronsäure δ-lacton	4,28
D-(+)-Galactose	4,13
D-Mannoheptose	2,11
Methyl-α-D-glucopyranosid	1,53
D(+)-Melibiose Monohydrat	1,04
Maltotriose	0,67
D-(-)-Arabinose	0,57
D-Sorbitol	0,43
D-Glucuronsäure Natrium Salz	0,39
L-Galactone 1,4-Lactone	0,30
L-Galactonsäure γ-lacton	0,27
L(+)-Arabinose	0,22
D(+)-Glucuronsäure γ-lacton	0,21
L(-)-Arabitol	0,16
D(-)-Fructose	0,14
D(+)-Sucrose	0,09
D(+)-Lactose Monohydrat	0,09
D(-)-Ribose	0,06
Lactitol	0,06
D(+)-Glucosamine	0,05
D(+)-Fucose	0,04
Methyl-α-D-manno-pyranosid	0,04
Dulcitol	0,03

Tabelle 15: Substratspezifität der rekombinanten P2O aus *T. pubescens* ohne His<sub>6</sub>-Tag

Substrat (Zucker)	Aktivität %
α-D(+)-Glucose	100,00
L(-)-Sorbose	48,55
D-Xylose	27,10
D-(+)-Cellobiose	14,86
L-(+)-Gulonsäure-γ-lacton	6,99
2-Deoxy-D-glucose	6,43
D(+)-Mannose	5,06
D-Leucrose	4,36
D(+)-Glucuronsäure δ-lacton	4,09
Methyl-β-D-glucopyranosid	3,97
D-(+)-Galactose	3,14
D-Mannoheptose	2,17
D(-)-Arabinose	1,36
Methyl-α-D-glucopyranosid	1,32
D(+)-Melibiose Monohydrat	1,17
Maltotriose	0,64
D-Galacturonsäure Monohydrat	0,52
Methyl-α-D-manno-pyranosid	0,47
D(+)-Fucose	0,43
D-Sorbitol	0,39
D(+)-Sucrose	0,36
L-Galactone 1,4-lacton	0,33
D-Glucuronsäure Natrium Salz	0,29
L(+)-Arabinose	0,21
L-Galactonsäure γ-lacton	0,21
D(+)-Glucosamine	0,19
Lactitol	0,17
D(+)-Lactose Monohydrat	0,16
D(-)-Fructose	0,15
D(+)-Glucuronsäure γ-lacton	0,06
D(-)-Ribose	0,05
L(-)-Arabitol	0,02
Dulcitol	0,02

Man kann feststellen, dass die Glucose und ihr strukturell ähnliche Verbindungen (mit pyranoidem Ringsystem) die bevorzugten Substrate von rekombinanter P2O sind, egal ob mit oder ohne His<sub>6</sub>-Tag. Natürlich bestehen geringen Unterschiede in der Affinität der Substrate, da die Enzyme aus unterschiedlichen Pilzstämmen stammen. Eine Ausnahme stellt L-(+)-Gulonsäure- $\gamma$ -Lacton dar, das ebenfalls zu den bevorzugten Substraten gezählt werden kann, obwohl es als Furanose vorliegt und somit kein pyranoides Ringsystem aufweist. Da die untersuchte Disacchariden Glucosespuren enthielten, sollten ihre Umsetzungsdaten (siehe Tabellen 12-15) mit Vorsicht betrachtet werden.

### 3.4.4 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und anderen kinetischen Konstanten für ausgewählte Substrate

Die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ -Wert) wurde wie im Kapitel 2.9.3 beschrieben für  $\alpha$ -D-(+)-Glucose, L(-)-Sorbose, D-Xylose und D-(+)-Galactose bestimmt. Bei den Substratspezifitätsexperimenten (siehe 3.4.3) wurden bei allen vier Enzymen  $\alpha$ -D-(+)-Glucose, L(-)-Sorbose und D-Xylose als bestumgesetzte Substrate beobachtet. Aufgrund des wachsenden Interesses an der Umsetzung von Galactose mit P2O (siehe Kapitel 1), wurde auch dieses Kohlenhydrat genauer untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabellen 16 und 17 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 16: Michaelis-Menten-Konstanten der rekombinante P2O aus *T. suaveolens* für ausgewählte Substrate

<b>rekombinante P2O aus <i>T. suaveolens</i> mit His<sub>6</sub>-Tag</b>				
	$K_m$ -Wert [mM]	$v_{max}$ [U/mg]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_m$ [mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
D(+)-Glucose	0,65	5,76	6,43	9,90
L(-)-Sorbose	49,94	9,6	10,71	0,21
D-Xylose	20,92	3,43	3,83	0,18
D-(+)-Galactose	6,73	0,35	0,42	0,06
<b>rekombinante P2O aus <i>T. suaveolens</i> ohne His<sub>6</sub>-Tag (geschnitten mit Thrombin)</b>				
	$K_m$ -Wert [mM]	$v_{max}$ [U/mg]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_m$ [mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
D(+)-Glucose	0,8	6,56	7,32	9,15
L(-)-Sorbose	41,89	9,19	10,26	0,24
D-Xylose	20,92	2,84	3,17	0,15
D-(+)-Galactose	5,79	0,31	0,35	0,06

Tabelle 17: Kinetische Konstanten der rekombinante P2O aus *T. suaveolens* für ausgewählte Substrate

<b>rekombinante P2O aus <i>T. pubescens</i> mit His<sub>6</sub>-Tag</b>				
	K <sub>m</sub> -Wert [mM]	v <sub>max</sub> [U/mg]	k <sub>cat</sub> [s <sup>-1</sup> ]	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> [mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
D(+)-Glucose	0,63	8,08	9,02	14,3
L(-)-Sorbitose	31,94	10,00	11,16	0,35
D-Xylose	21,61	4,49	5,01	0,23
D-(+)-Galactose	8,42	0,48	0,54	0,06
<b>rekombinante P2O aus <i>T. pubescens</i> ohne His<sub>6</sub>-Tag (geschnitten mit Thrombin)</b>				
	K <sub>m</sub> -Wert [mM]	v <sub>max</sub> [U/mg]	k <sub>cat</sub> [s <sup>-1</sup> ]	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> [mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
D(+)-Glucose	0,71	8,38	9,35	13,17
L(-)-Sorbitose	38,69	10,35	11,55	0,30
D-Xylose	16,51	3,07	3,42	0,21
D-(+)-Galactose	5,57	0,36	0,4	0,07

Für alle vier Enzyme ist Glucose das bevorzugte Substrat. Beide ungeschnittenen also Enzyme mit N- terminalen His<sub>6</sub>-Tag haben für D-Glucose etwas niedrigere K<sub>m</sub>-Werte und somit eine höhere Affinität als die mit Thrombin geschnittenen (ohne His<sub>6</sub>-Tag). Anders als bei der bisher sehr gut untersuchte Pyranose-2-Oxidase aus *T. multicolor* (Leitner *et al.*, 2001) ist der in dieser Arbeit ermittelte v<sub>max</sub>-Wert für Glucose, bei den hier untersuchten Enzymen nur etwas halb so hoch. k<sub>cat</sub>-Werte für alle Substrate sind ebenfalls viel kleiner als bei P2O aus *T. multicolor* (Leitner *et al.*, 2001).

Im Bezug auf D-Xylose zeigen die ermittelten K<sub>m</sub>-Konstanten, dass im Vergleich zu D-Glucose die ungeschnittene Enzyme erst bei mehr als 30-facher Substrat-Konzentration und die geschnittenen Enzymen (ohne His<sub>6</sub>-Tag) bei mehr als 20-facher Konzentration dieselbe Umsatzgeschwindigkeit erreichen. L-Sorbitose, mit der die Enzyme etwa die Hälfte der Glucose-Aktivität aufweisen (siehe Tabellen 12-15), hat einen viel höheren K<sub>m</sub>-Wert. Dieser ist in etwa um den Faktor 53 höher als der K<sub>m</sub>-Wert für Glucose, außer bei der Pyranose-2-Oxidase aus *T. suaveolens* mit His<sub>6</sub>-Tag, wo dieser sogar um den Faktor 77 größer ist.

Die Versuche zur Bestimmung der Substratspezifität haben gezeigt, dass die Aktivitäten der untersuchten Enzymen mit Galactose viel kleiner sind, als mit den anderen drei untersuchten Zuckersubstraten (siehe 3.4.3). Die Affinität von diesem Substrat zu allen vier Enzymen ist aber höher als die von L(-)-Sorbitose und D-Xylose. Umgekehrt als bei Glucose, weisen hier die geschnittenen Enzyme (ohne His<sub>6</sub>-Tag) höhere Affinität zur Galactose auf als die ungeschnittenen.

Zum Vergleich sind hier Literaturwerte (Leitner et al., 2001) der ermittelten kinetischen Konstanten von P2O aus *T. multicolor* für D-Glucose angeführt:  $K_m$ -Wert [mM] = 0,74;  $v_{max}$  [U/mg] = 12;  $k_{cat}$  [s<sup>-1</sup>] = 54

### 3.4.5 pH-Optimum

Da bis zu diesem Zeitpunkt untersuchten Pyranose-2-Oxidase aus der Gattung *Trametes* ein pH-Optimum im neutralen Bereich zeigten, war zu erwarten, dass ebenfalls die hier untersuchten Vertreter die höchste katalytische Aktivität in diesem pH-Bereich aufweisen. Die Bestimmungen wurden wie unter 2.9.4 beschrieben durchgeführt.

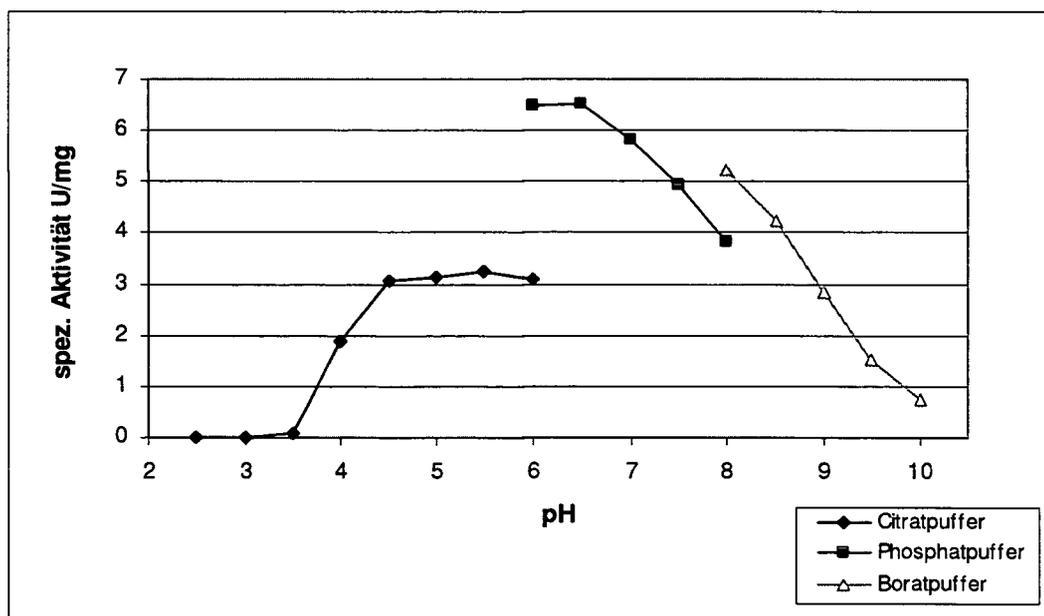
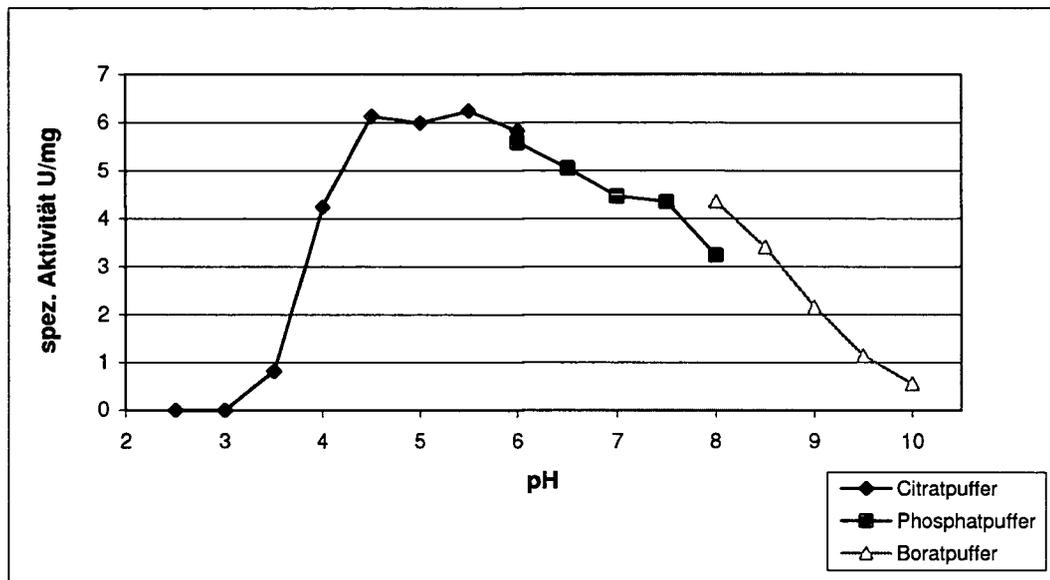


Abbildung 26: pH-Optimum der rekombinanten P2O aus *T. suaveolens*

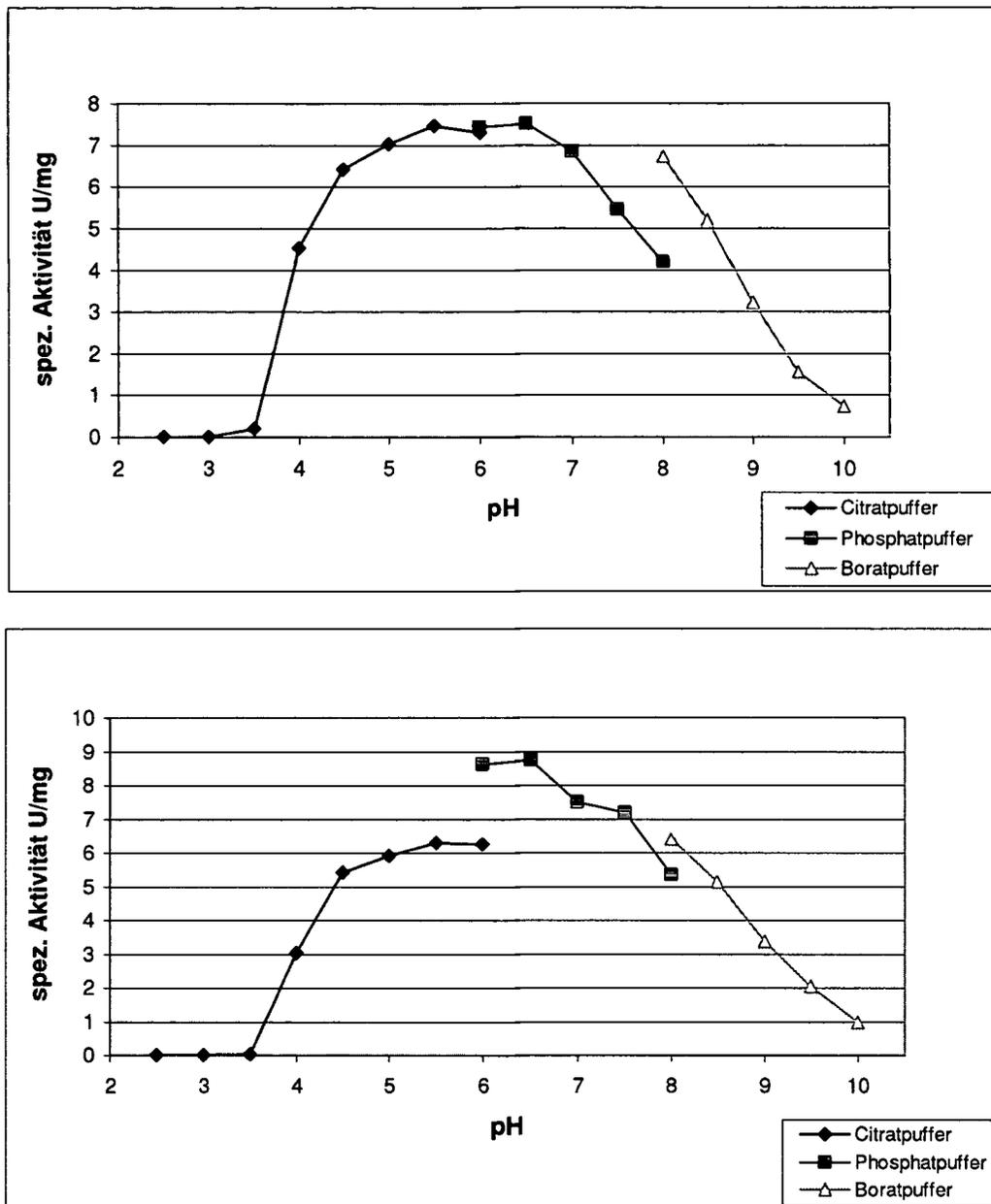


Abbildung 27: pH-Optimum der rekombinanten P2O aus *T. pubescens*

Die Ergebnisse befinden sich in den oben dargestellten Abbildungen (26 und 27). Wie diese zeigen, liegt bei rekombinanten Enzymen mit His<sub>6</sub>-Tag ein weites pH-Optimum (zwischen 4,5 und 7) vor, wobei die maximale Aktivität zwischen pH 5,5 und 6,5 gemessen wurde. Ein pH-Optimum in diesem Bereich für D-Glucose als Elektronendonator und Sauerstoff als Elektronenakzeptor wurde auch bei vielen anderen Pyranose 2-Oxidasen in Phosphatpuffer festgestellt; z.B. bei P2O aus *T. multicolor* (Leitner *et al.*, 2001) und bei heterolog exprimierte P2O aus *T. pubescens* (Marešová *et al.*, 2005).

Bei den geschnittenen Enzymen (ohne His<sub>6</sub>-Tag) konnte die höchste Aktivität in Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 6-6,5 gemessen werden. Bei Messungen in Citrat-Puffer waren in der Nähe des neutralen pH- Bereichs (pH 6) wesentlich geringere Aktivitäten zu messen, als im Phosphatpuffer, was bestätigt, dass die Enzymaktivität nicht nur vom pH-Wert, sondern auch vom eingesetzten Puffer abhängig ist. Außerhalb dieses Bereiches fällt bei allen vier Enzymen die Aktivität ab.

### 3.4.6 Temperaturoptimum

Die Bestimmungen des Temperaturoptimums der rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen wurden wie unter 2.9.5 beschrieben durchgeführt, die Ergebnisse sind in der Abbildung 28 dargestellt.

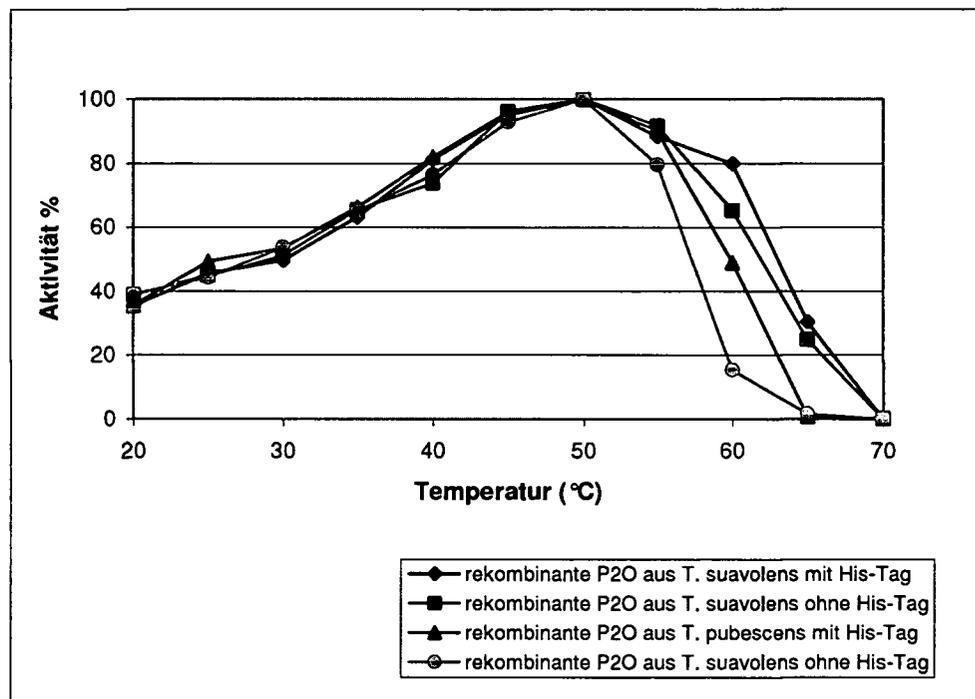


Abbildung 28: Temperaturoptimum der rekombinanten P2O aus *T. suavoensis* und der rekombinanten P2O aus *T. pubescens*

Die Messungen erfolgten wie bei der Standard-Enzymaktivitätsbestimmung (siehe 2.7.2.4), nur dass in diesem Fall bei verschiedenen Temperaturen gemessen wurde. Alle vier Enzyme weisen im Temperatur-Profil ein Optimum bei 50°C auf. Trotz dieser Tatsache, wurde bei anderen Charakterisierungsmethoden der Standard-Enzymaktivitätstest bei 30°C durchgeführt, um die charakterisierten Eigenschaften, mit den publizierten Daten von anderen Pyranose-2-Oxidasen vergleichen zu können.

### 3.4.7 Temperaturstabilität

Die gereinigten Pyranose-2-Oxidase zeigen eine relativ hohe Stabilität nach Aufbewahrung bei 4 °C. Es war zusätzlich von großem Interesse ein gutes Bild über die Stabilität der Enzyme bei Temperaturen nahe dem Temperaturoptimum bzw. und etwas darüber zu bekommen. Dazu wurden zwei Temperaturen gewählt; 40 °C und 60 °C und die Versuche wie unter 2.9.6 beschrieben, durchgeführt. Abbildung 29 bzw. 30 zeigen den Verlauf der Aktivität bei den zwei unterschiedlichen Temperaturen über einen Zeitraum von 5 Stunden.

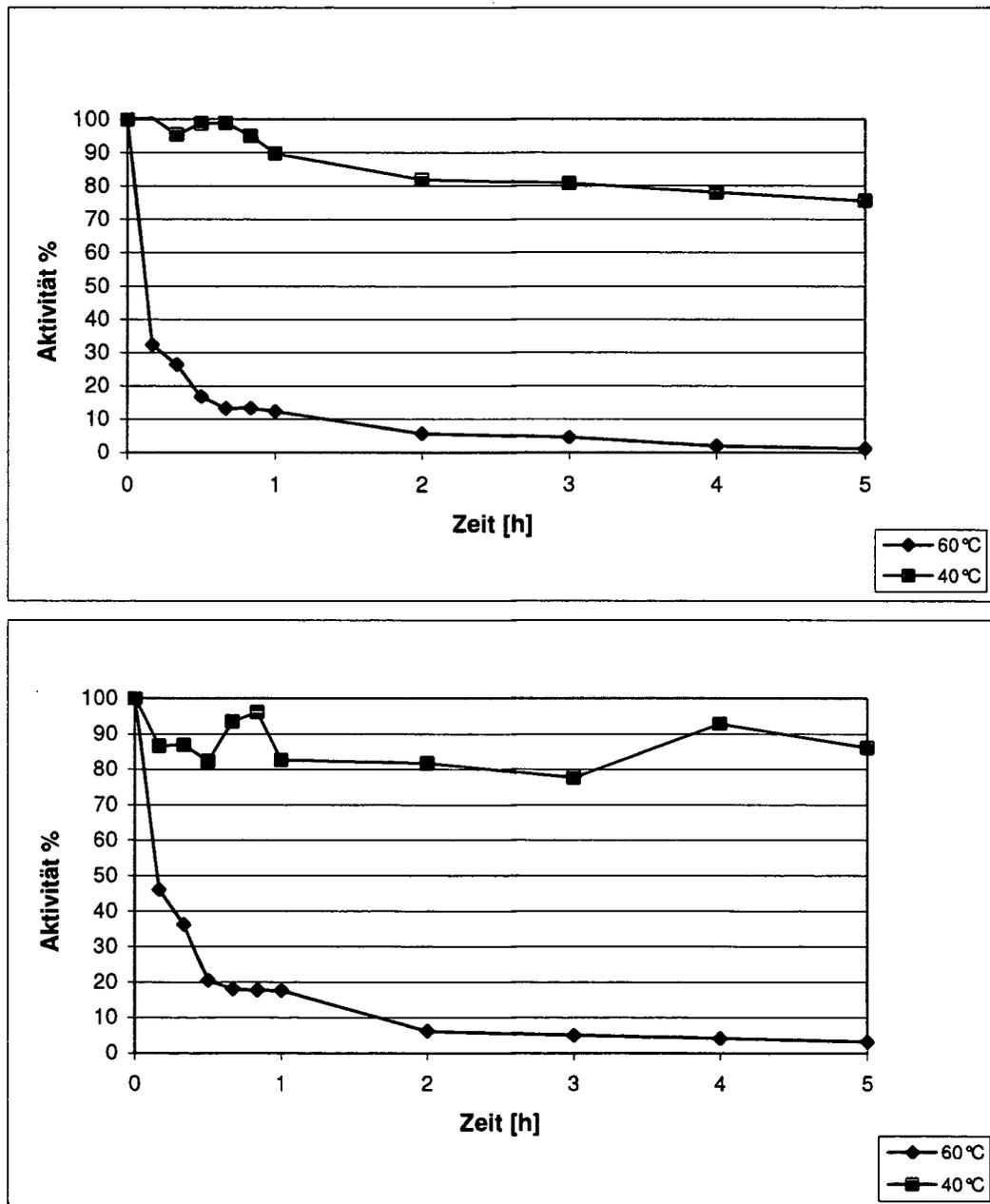


Abbildung 29: : Temperaturstabilität der rekombinanten P2O aus *T. suaveolens*

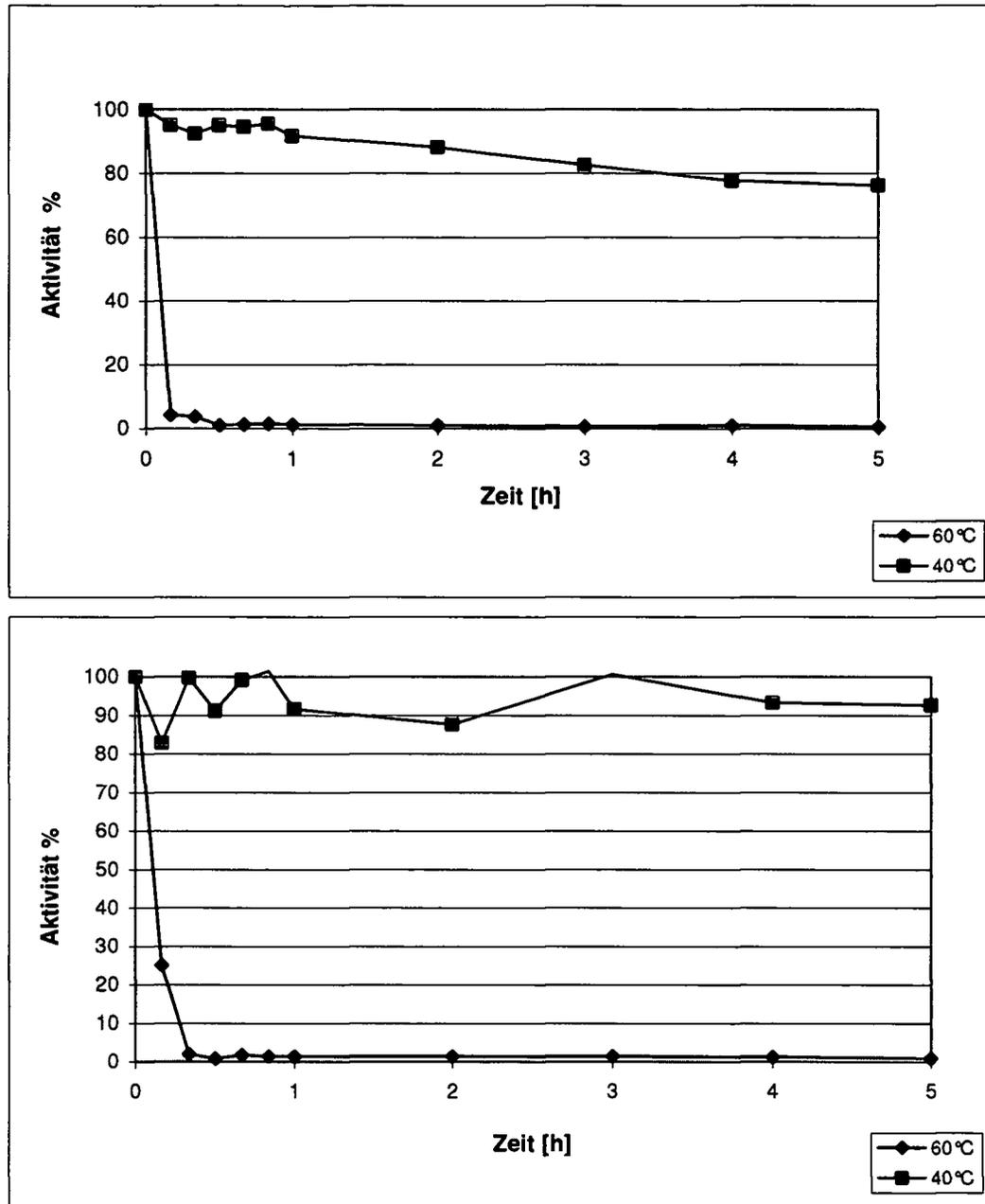


Abbildung 30: Temperaturstabilität der rekombinanten P2O aus *T. pubescens*

Wie aus den Abbildungen für die Temperaturstabilitätsbestimmung ersichtlich (Abbildungen 29 und 30), waren bei 40°C alle untersuchten Enzyme relativ stabil. Bei 60°C kam es zum Abfall der Aktivität von beider rekombinanten Pyranose-2-Oxidase aus *T. suaveolens* (mit und ohne His<sub>6</sub>-Tag) innerhalb einer Stunde um etwa über 80%. Die Halbwertszeit für das rekombinante Enzym aus *T. suaveolens* mit His<sub>6</sub>-Tag betrug 10,0 und für das gleiche Enzym ohne His<sub>6</sub>-Tag 15,1 Minuten. Die Rekombinanten aus *T. pubescens* denaturierten somit schneller, und zeigten nach 30 Minuten nur noch ca. 1% der anfänglichen

Aktivität. Bei der P2O aus *T. pubescens* handelt sich um ein sehr temperaturinstabiles Enzym mit Halbwertszeiten von 2,2 Minuten für das Enzym mit His<sub>6</sub>-Tag und 4,8 Minuten für das ohne His<sub>6</sub>-Tag. Nach 5 Stunden bei 60°C wurde keine Enzymaktivität mehr gemessen. Aus diesen Daten kann festgestellt werden, dass die beiden heterolog exprimierten Pyranose-2-Oxidasen über ihren Temperaturoptimum rasch denaturieren, die Enzyme ohne His<sub>6</sub>-Tag jedoch um eine Spur stabiler sind.

Die Temperaturstabilität ist ein Maß für die korrekte Faltung. Da die beiden hier untersuchten Pyranose 2-Oxidasen gleiche Merkmale im Bezug auf Temperaturstabilität aufweisen, kann man davon ausgehen, dass diese rekombinanten Enzyme korrekt gebildet und gefaltet wurden.

Die Lagerungsversuche bei 40°C haben gezeigt, dass auch P2O aus *T. multicolor* (sowohl Wildtyp als auch heterolog exprimiert) über einem Zeitraum von fünf Stunden ohne Aktivitätsverluste haltbar ist (Henikl 2004).

### 3.4.8 Bestimmung der kinetischen Daten für ausgewählte Elektronenakzeptoren

Die Bestimmungen wurden wie unter 2.9.7 beschrieben durchgeführt. In der Tabelle 18 befinden sich die Kinetik-Ergebnisse der untersuchten Pyranose-2-Oxidasen. In allen Fällen wurde D-Glucose wurde als Substrat eingesetzt.

Tabelle 18: Kinetische Daten von rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen für verschiedene Elektronenakzeptoren

Elektronenakzeptoren	P2O aus <i>T. suaveolens</i> mit His <sub>6</sub> -Tag		P2O aus <i>T. suaveolens</i> ohne His <sub>6</sub> -Tag		P2O aus <i>T. pubescens</i> mit His <sub>6</sub> -Tag		P2O aus <i>T. pubescens</i> ohne His <sub>6</sub> -Tag	
	K <sub>m</sub> [mM]	v <sub>max</sub> [U/mg]	K <sub>m</sub> [mM]	v <sub>max</sub> [U/mg]	K <sub>m</sub> [mM]	v <sub>max</sub> [U/mg]	K <sub>m</sub> [mM]	v <sub>max</sub> [U/mg]
O <sub>2</sub>	0,65	5,76	0,8	6,56	0,63	8,08	0,71	8,38
1,4 Benzochinon	0,31	31,78	0,31	31,12	0,26	32,68	0,24	44,6
Ferrocenium	0,54	33,89	0,51	33,45	0,61	43,99	0,48	43,61

Zusätzlich zur Sauerstoff, sind Pyranose 2-Oxidasen aus *T. suaveolens* und *T. pubescens* in der Lage 1,4 Benzochinon und Ferrocenium zu reduzieren. Aus den Werten in Tabelle 18 lässt sich ablesen, dass die Affinität des Substrates D-Glucose zu allen hier untersuchten Pyranose-2-Oxidasen mit 1,4 Benzochinon als Elektronakzeptor am höchsten ist.

Lignindabbau ist mit der Reduktion von Benzochinonen eng verbunden (Brock *et al.*, 1995). Wie schon oben erwähnt (siehe Kapitel 1), es wird vermutet, dass zusätzlich zur Bereitstellung von Wasserstoffperoxyd (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) an ligninabbauenden Peroxidasen (Daniel

*et al.*, 1994; Ander und Marzullo 1997; Volc *et al.*, 1996) P20, als weitere biologische Funktion, auch an der Reduktion von Quinonen im peroplasmatischen bzw. extrazellulären Milieu beteiligt ist (Hallberg *et al.*, 2004; Leitner *et al.*, 2001). Diese Hypothese steht im Einklang mit der hier festgestellten höheren Aktivität von P20 mit Benzochinon im Vergleich zu Sauerstoff.

### 3.5 Umsetzung der Glucose mit Pyranose-2-Oxidasen im Batch Reaktor

Die Umsetzungsversuche von D-Glucose wurden mit rekombinanten Enzymen (Pyranose-2-Oxidasen aus *T. suaveolens* und *T. pubescens*), die ein His<sub>6</sub>-Tag enthalten durchgeführt, wie unter 2.10 beschrieben. Um den Verlauf zu verfolgen wurden die Proben aus dem Reaktor in regelmäßigen Abständen entnommen. Die ersten zwei Probeentnahmen erfolgten nach 15 bzw. 30 Minuten nach dem Reaktionsstart, alle weiteren wurden stündlich gezogen. Die letzte Probe wurde nach 24 Stunden gezogen. Diese wurden zur Beendigung der Reaktion sofort abgekocht. Der ausgefallene Proteinpellet entfernt (Zentrifugation) und mittels DC und HPLC analysiert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 31 – 34 dargestellt.

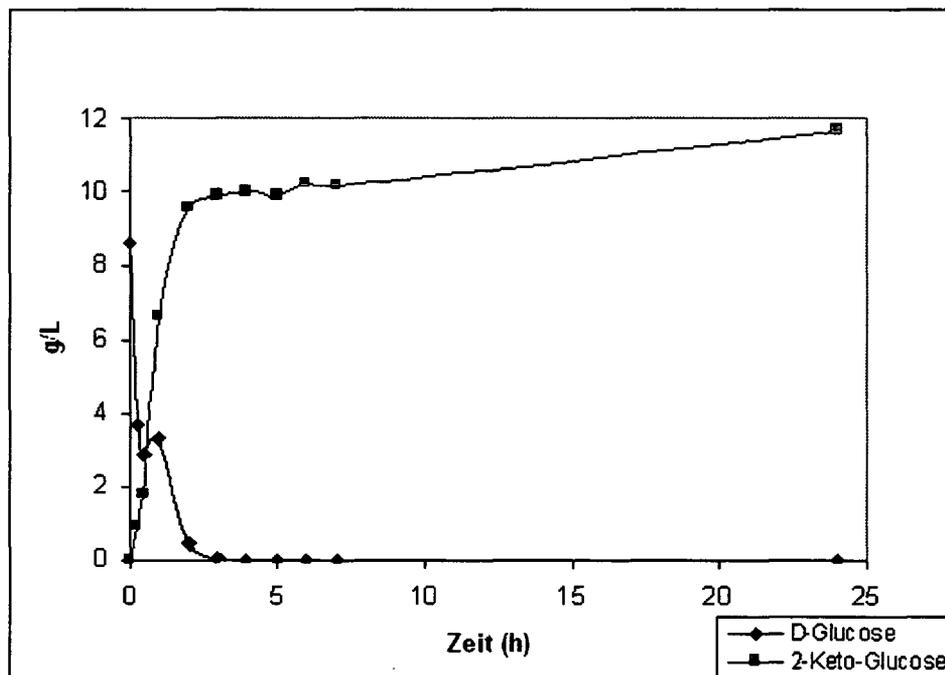


Abbildung 31: Umsetzung von D-Glucose zu 2-Keto-D-Glucose mit rekombinanter P20 aus *T. suaveolens*. Analyse mittels HPLC

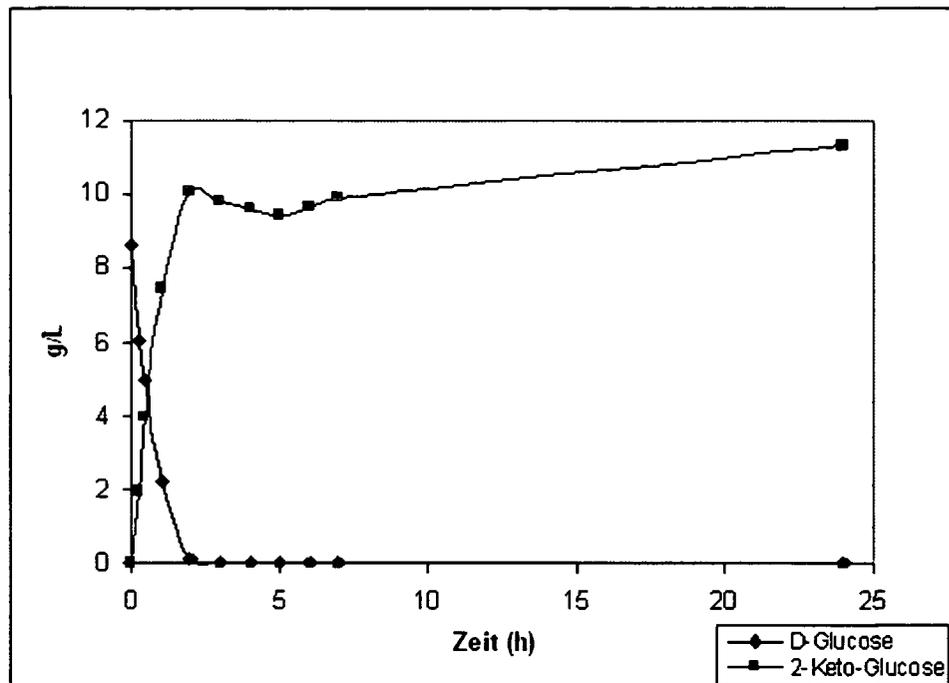


Abbildung 32: Umsetzung von D-Glucose zu 2-Keto-D-Glucose mit rekombinanter P2O aus *T. pubescens*. Analyse mittels HPLC

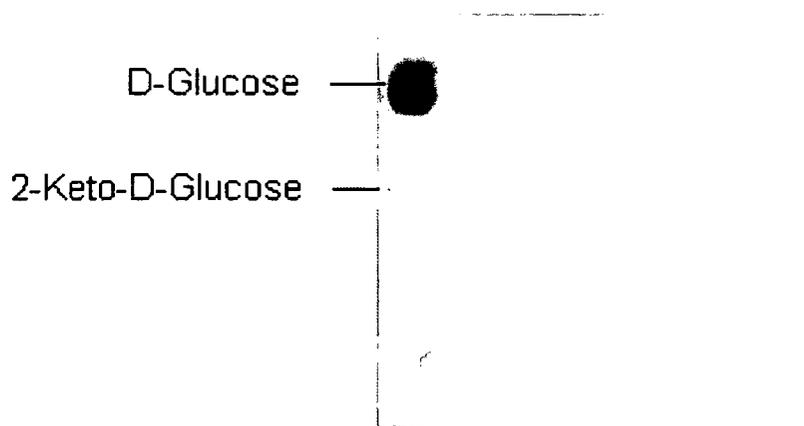


Abbildung 33: Analyse der Umsetzungsprodukte von D-Glucose mit rekombinanter P2O aus *T. suaveolens* mittels DC

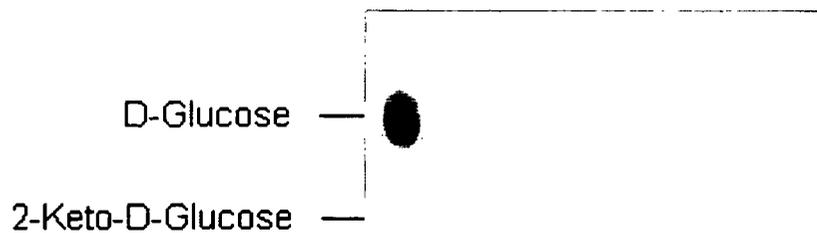


Abbildung 34: Analyse der Umsetzungsprodukte von D-Glucose mit rekombinanter P2O aus *T. suaveolens* mittels DC

Sowohl mit P2O aus *T. suaveolens* als auch aus *T. pubescens* war die vollständige Umsetzung von D-Glucose zu 2-Keto-D-Glucose nach ca. 150 Minuten abgeschlossen. Der Gehalt an D-Glucose nahm in dieser Zeit kontinuierlich ab, während die Konzentration an 2-Keto-D-Glucose kontinuierlich zunahm. Es wurden keine weiteren Reaktionsprodukte, wie z.B. 2,3-Diketo-D-Glucose gebildet (siehe Abbildung 33 und 34).

Im Hinblick auf die biotechnologische Herstellung von Fructose aus D-Glucose ist die Erkenntnis, dass bei der Umsetzung mit P2O ausschließlich 2-Keto-D-Glucose gebildet wird, von großer Bedeutung. Die Entfernung von störenden Nebenprodukten fällt somit weg, wodurch sowohl Kosten und auch Zeit gespart werden können.

## 4 Zusammenfassung

Ziel dieser Diplomarbeit war es Pyranose-2-Oxidasen (P2O) aus den Basidiomyceten *Trametes suaveolens* und *Trametes pubescens* in *E. coli* heterolog zu exprimieren, zu reinigen und zu charakterisieren. Von Interesse war auch, die Entfernung der His<sub>6</sub>-Tags der zwei gewonnenen Enzymen, um diese in reiner Form zu gewinnen und ebenfalls zu charakterisieren. Von diesen vier Enzymen (rekombinante Pyranose-2-Oxidase aus *T. suaveolens* mit His<sub>6</sub>-Tag und ohne His<sub>6</sub>-Tag, rekombinante Pyranose-2-Oxidase aus *T. pubescens* mit einem His<sub>6</sub>-Tag und ohne His<sub>6</sub>-Tag) sollten folgende Parameter bestimmt werden: pH-Optimum, Temperaturoptimum und Temperaturstabilität. Auch die Spezifitäten für ein weites Substratspektrum und kinetische Daten für ausgewählte Substrate bzw. Elektronenakzeptoren sollten untersucht werden. Weiters sollte das Molekulargewicht der tetrameren Formen der Enzyme, das Molekulargewicht der Untereinheiten sowie der isoelektrische Punkt untersucht werden.

Zur Erfüllung dieser Vorgaben mussten die beiden Pyranose-2-Oxidasen zunächst in großer Menge gewonnen werden. Dazu wurden nach der Transformation mit Plasmid-Konstrukten (Paukner 2008) in *E. coli* BL21 (DE3) Star, das optimale Kultivierungssystem aus Nährmedium und Induktionsmittel für die Fermentation der Transformanten bestimmt. Die Fermentation von rekombinanten *E. coli* mit pCL35 (enthält P2O-cDNA aus *T. suaveolens*) wurde im MCHGly-Medium und die von rekombinanten *E. coli* mit pCL34 (enthält P2O-cDNA aus *T. pubescens*) in TB-Medium durchgeführt. In beiden Fällen wurde Lactose (0,5%) als Induktionsmittel eingesetzt. Die Fermentation von rekombinanten *E. coli* mit pCL35 (27,5 Stunden) in TB-Medium war viel reicher (791,24 g Feuchtzellgewicht) als die von rekombinanten *E. coli* mit pCL34 nach 30 Stunden in MCHGly-Medium (266,6 g Feuchtzellgewicht). Die Produktivität bezogen auf das Fermentationsvolumen von heterolog exprimierter P2O aus *T. suaveolens* betrug 18,2 U/h\*L und von P2O aus *T. pubescens* 26,8 U/h\*L.

Da die heterolog exprimierten Pyranose-2-Oxidasen aus *T. suaveolens* und *T. pubescens* mit N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag gewonnen wurden, erfolgte die Reinigung über eine Nickelaffinitätschromatographiesäule und war mit Profinity IMAC BIORAD (10 ml, Hercules, USA) am erfolgreichsten. Mit einer Ausbeute von 80,8% wurde P2O aus *T. suaveolens* um den Faktor 11,2 aufgereinigt. Die spezifische Aktivität betrug 9,0 U/mg. Bei der Reinigung von P2O aus *T. pubescens* wurde eine Ausbeute von 66,6% erreicht. Der Aufreinigungsfaktor betrug 13,5 und die spezifische Aktivität 15,5 U/mg.

Die Entfernung des N-terminalen His<sub>6</sub>-Tags erfolgte durch Schneiden an der Thrombin-Schnittstelle mit Thrombin-Protease. Die Reinigung der geschnittenen Enzyme wurde mit einer HiTrap Benzamidine FF-Säule und einer HisTrap HP-Säule (mit Ni<sup>2+</sup> beladen) durchgeführt. Die Ausbeute nach dem Schneiden und Reinigung war in beiden Fällen 77%.

Mittels gelelektrophoretischer Methoden wurden von den gereinigten Enzymen das Molekulargewicht der tetrameren Form, das Molekulargewicht der Untereinheiten und der isoe-

lektrische Punkt bestimmt. Für rekombinante Pyranose-2-Oxidase ohne His<sub>6</sub>-Tag aus *T. suaveolens* wurde ein Molekulargewicht von 246 kDa und für Pyranose-2-Oxidase ebenfalls ohne His<sub>6</sub>-Tag aus *T. pubescens* von 232 kDa ermittelt. Die SDS-PAGE ergab ein Molekulargewicht der Untereinheiten der beiden heterolog exprimierten Pyranose 2-Oxidasen ohne His<sub>6</sub>-Tag von 60 kDa.

Bei den hier untersuchten Pyranose 2-Oxidasen lag die höchste Aktivität zwischen pH 5,5 und 6,5, wie es auch bei den bisher untersuchten P2O-Enzymen der Fall ist. Alle Enzyme blieben bei einer Temperatur von 40 °C über längere Zeit stabil, bei 60 °C kam es jedoch innerhalb einer Stunde zu einem schnellen Abfall der Aktivität (über 80%). Bei der Suche nach geeigneten Elektronenakzeptoren, die reduziert werden, konnte anhand kinetischer Konstanten festgestellt werden, dass mit 1,4-Benzochinon die Affinität von D-Glucose (Elektronendonator) zu allen hier untersuchten Pyranose-2-Oxidasen am höchsten ist. Als bevorzugte Substrate für alle vier charakterisierte Enzyme erwiesen sich α-D(+)-Glucose (100% Aktivität), L(-)-Sorbitose (Aktivität zwischen ca. 45 % und 48 %) und D-Xylose (Aktivität ca. 28 %). Von den folgenden Substraten wurden die kinetische Daten bestimmt: α-D(+)-Glucose, L(-)-Sorbitose, D-Xylose und D-(+)-Galactose.

Die abschließenden Umsetzungsversuche von D-Glucose wurden mit den Enzymen durchgeführt, die ein His<sub>6</sub>-Tag enthalten. Bei den Umsetzungen wurde reine 2-Keto-L-D-Glucose gebildet. Es konnten keine Nebenproduktenachgewiesen werden.

## Literaturverzeichnis

- Artolozaga M. J., Kubátová E., Volc J., Kalisz H. M. (1997): Pyranose-2-Oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* – further biochemical characterisation; Appl. Microbiol. Biotechnol. 47: 508-514
- Bannwarth M., Bastian S., Heckmann-Pohl D., Giffhorn F., Schulz G. E. (2004): Crystal structure of pyranose 2-oxidase from the white-rot fungus *Peniophora sp.*; G.E.; Biochemistry 43: 11683-11690
- Baute M. A., Baute R., Deffieux Filleau M. J. (1977): Conversion of glucose to cortalcerone via glucosone by *Corticium caeruleum*; Phytochemistry 16: 1895-1897
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; Anal. Biochem. 72:248-254
- Brock B. J., Rieble S., Gold M.H. (1995): Purification and characterization of a 1,4-benzoquinone reductase from basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3076-3081
- Curth U., Urbanke C. (2007): Analytische Ultrazentrifugation, Quantitative Charakterisierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen; BIOSpektrum | 06.07 | 13. Jahrgang: 643-645
- Daneel H.-J., Ullrich M., Giffhorn F. (1992): Goal-oriented screening method for carbohydrate oxidases produced by filamentous fungi; Enzyme Microb. Technol. 14: 898-903
- Daniel G., Volc J., Kubatova E. (1994): Pyranose oxidase, a major source of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes vesicolor*, and *Oudemansiella mucida*; Appl. Environ. Microbiol. 60: 2524-2532
- Mehrstufige enzymkatalysierte Prozesse in der Lebensmittel-Biotechnologie; Lebensmittel & Biotechnologie 2006/3
- Freimund S., Giffhorn F., Huwig A., Köpper S. (1998): Rare keto-aldoses from enzymatic oxidation: substrates and oxidation products of pyranose oxidase; Chem. Eur. J 4: 2442-2455
- Giffhorn F. (2000): Fungal pyranose oxidases: occurrence, properties, and biotechnical applications in carbohydrate chemistry; Appl. Microbiol. Biochem. 54(6): 727-740
- Halada P., Leitner C., Sedmera P., Haltrich D., Volc J. (2003): Identification of the covalent flavine adenine dinucleotide-binding region in pyranose 2-oxidase from *Trametes multicolour*; Anal. Biochem. 314: 235-242
- Hallberg M., Leitner C., Haltrich D., Divne C. (2004): Crystallization und preliminary X-ray diffraction analysis of pyranose 2-oxidase from the white-rot fungus *Trametes multicolour*; Acty Cryst. (2004) D60, 197-199

- Hallberg M., Leitner C., Haltrich D., Divne C. (2004): Crystal Structure of the 270 kDa Homotetrameric Lignin-degrading Enzyme Pyranose 2-Oxidase; *J Mol Biol.* (2004) 341: 781-796
- Haltrich D., Leitner C., Neuhauser W., Nidetzky B., Kulbe D. K., Volc J. (1998): A Convenient Enzymatic Procedure for the Production of Aldose-Free D-Tagatose; *Ann NY Acad Sci* 864: 295-299
- Henikl S. (2004): Vergleich von rekombinanter Pyranose 2-Oxidase mit dem Wildtypenzym aus *Trametes multicolor*; Diploma thesis. University of natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna.
- Hofer T. (2006): Gezielte Mutation von Pyranose-2-Oxidase aus *Trametes multicolor* zur Steigerung der Galactoseverwertung; Diploma thesis. University of natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna.
- Huwig A. (1997): Untersuchungen zur enzymatischen Synthese von Carbonalzuckern mit Pyranose-2-Oxidase aus *Phanerochaete chrysosporium*; PhD thesis, University of the Saarland
- Izumi Y., Furuya Y., Yamada H. (1990): Purification and properties of pyranose oxidase from Basidiomycetous fungus No. 52; *Agric. Biol. Chem.* 54: 1393-1399
- Kiba N., Ueda F., Furusawa M. (1992): Flow-Injection determination of glucose in serum with an immobilized pyranose oxidase reactor; *Anal. Chim. Acta* 269: 187-191
- Kiba N., Ueda F., Saegusa K., Goto Y., Furusawa M. (1993): Flow-Injection determination of 1,5-anhydroglucitol in serum with immobilized pyranose oxidase reactor and chemiluminescence detection; *Anal. Chim. Acta* 271: 47-51
- Kulbe D. K. (2006): Mehrstufige enzymkatalysierte Prozesse in der Lebensmittel-Biotechnologie; *L&B* 2006/3: 80-82
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature* 227: 680-685
- Lebowitz J., Lewis M. S., Schuck P. (2002): Modern analytical ultracentrifugation in protein science; a tutorial review. *Protein Sci.* 11: 2067–2079
- Leitner C. (2001): Use of pyranose-2-oxidase for the transformation of carbohydrates in the food industry; Doctoral thesis. University of natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna.
- Leitner C., Volc J., Haltrich D. (2001): Purification and Characterization of Pyranose Oxidase from the White Rot Fungus *Trametes multicolor*; *Appl. and Environ. Microbiol.* (2001) Vol.67, No.8, p. 3636-3644
- Machida Y., Nakanishi T. (1984): Purification and properties of pyranose oxidase from *Coriolus versicolor*; *Agric. Biol. Chem.* 48: 2463-2470

- Marešová H., Večerek B., Hradská M., Libessart N., Bečká S., Saniez M.-H., Kyslík P. (2005): Expression of pyranose 2-oxidase from *Trametes pubescens* in *Escherichia coli* and characterisation of the recombinant enzyme; *J. Biotechnol.* 120: 387-395
- Neidlman S. L., Amon W. F. Jr., Geigert J., (1981): Process for the production of fructose; US Patent 4246347
- Nishimura I., Okada K., Koyama Y., (1996): Cloning and expression of pyranose oxidase cDNA from *Coriolus versicolor* in *Escherichia coli*; *J. Biotechnol.* 52: 11-20
- Paukner R. (2008): Klonierung und Kristallisation von Pyranose 2-Oxidase aus Basidiomyceten; Diploma thesis. University of natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna.
- Ruelius H. W., Kerwin R. M., Janssen F. W. (1968): Carbohydrate oxidase, a novel enzyme from *Polyporus obtusus*. *Biochem. Biophys. Acta* 167: 493-500
- Schäfer A., Bieg S., Huwig A., Kohring G. W., Giffhorn F. (1996): Purification by immunoaffinity chromatography, characterisation, and structural analysis of a thermostable pyranose oxidase from the white rot fungus *Phlebiopsis gigantea*; *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2586-2592
- Shin K. S., Youn H. D., Han Y. H., Kang S. O., Hah Y. C. (1993): Purification and characterisation of D-glucose-oxidase from white rot fungus *Pleurotus ostreatus*; *Eur. J. Biochem.* 215: 747-752
- Takakura Y., Kuwata S. (2003): Purification, characterization, and molecular cloning of a pyranose oxidase from the fruit body of the basidiomycete, *Tricoloma matsutake*; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 2598-2607
- Trinkaus P., Reinhofer M. (2005): Parasitische und saprophytische Pilze auf Weiden in Energieholzkulturen; *Joannea Bot.* 4: 19-33
- Volc J., Denisova N. P., Nerud F., Musílek V. (1985): Glucose-2-oxidaseactivity in mycelia cultures of basidiomycetes; *Folia Microbiol.* 30:141-147
- Volc J., Eriksson K. E. (1988): Pyranose-2-Oxidase from *Phanerochaete chrysosporium*; *Methods Enzymol.* 161: 316-322
- Volc J., Kubátová E., Daniel G., Prkrylová V. (1996): Only C-2 specific glucose oxidase activity is expressed in lignolytic cultures of white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*; *Arch Microbiol.* 165: 421-424
- Volc J., Leitner C., Sedmera P., Haltrich D. (1999): Enzymatic formation of dicarbonyl sugars: C-2 oxidation of 1→6 disaccharides gentobiose, isomaltose and melibiose by pyranose 2-oxidase from *Trametes multicolor*; *J. Carbohydr. Chem.* 18: 999-1007
- Weber H. (1997): Wörterbuch der Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag Jena: 74-45

## Anhang

Tabelle 19: Fermentation von *E. coli* mit pCL 35

Fermentation <i>E. coli</i> mit pCL35								
pCL 35 in <i>E. coli</i> star: 30 L in MCHGly Medium mit 30 mg/L Kanamycin								
Dauer der Fermentation ca. 30,5 Stunden								
Start (Inokulumzugabe): 21.11.06 um 14 Uhr								
Induktionsstart mit 0,5% 21.11.06 um 20 Uhr								
Ernte: 22.11.06 um 20:15 Uhr 266,6 g Zellen in dreifache Menge an Aufschlusspuffer (50 mM KPP pH 8,5 + 10 mM Imidazol + PMSF 50 mg/L) gelöst und mittels Homogenizator aufgeschlossen								
Probe	Stundenzahl	OD	AKTIVITÄT U/L	PROTEIN mg/L	spez. Aktivität U/mg	Glycerinkonz.	feuchte Zellmasse in 30 ml Zellsuspension	trockene Zellmasse in 30 ml Zellsuspension
1	0	0,353	0	-		-		
2	4	1,087	0	-		-		
3	6	1,572	0	-		-		
4	19	7,54	227,6	512	0,44	n.a	0,31 g	0,06 g
5	21	7,65	268,8	612	0,44	n.a	0,35 g	0,07 g
6	23	7,94	-	-	-	n.a	0,36 g	0,08 g
7	25	7,99	453	752	0,60	n.a	0,39 g	0,08 g
8	27	7,98	436,5	627	0,70	n.a	0,39 g	0,08 g
9	29	7,88	407	629	0,65	n.a	0,39 g	0,08 g
n.a nicht auswertbar								

Tabelle 20: Fermentation von *E. coli* mit pCL 34

Fermentation <i>E. coli</i> mit pCL34								
pCL 34 in <i>E. coli</i> star: 30 L in TB Medium mit 30 mg/L Kanamycin								
Dauer der Fermentation ca. 27,5 Stunden								
Start (Inokulumzugabe): 05.12.06. um 11 Uhr								
Induktionsstart mit 0,5% 05.12.06. um 15 Uhr								
Ernte: 06.12.06. um 15 Uhr 791,24 g Zellen in dreifache Menge an Aufschlusspuffer (50 mM KPP pH 8,5 + 10 mM Imidazol + PMSF 50 mg/L) gelöst und mittels Homogenizator aufgeschlossen								
Probe	Stundenzahl	OD	AKTIVITÄT U/L	PROTEIN mg/L	spez. Aktivität U/mg	Glycerinkonz.	feuchte Zellmasse in 30 ml	trockene Zellmasse in 30 ml
1	0	0,2525	0	-	-	-		
2	4	2,63	0	-	-	-		
3	17	20,2	463,4	669,7	0,69	n.a	0,9 g	0,18 g
4	19	21,95	509,8	954,8	0,53	n.a	1,1 g	0,19 g
5	21	21,15	481,1	1465,3	0,33	n.a	1,2 g	0,22 g
6	23	19,38	440,1	1343,1	0,33	n.a	1,2 g	0,22 g
n.a nicht auswertbar								

Tabelle 21: Kalibrationsgerade zur Bestimmung des Molekulargewichts der nativen Enzyme

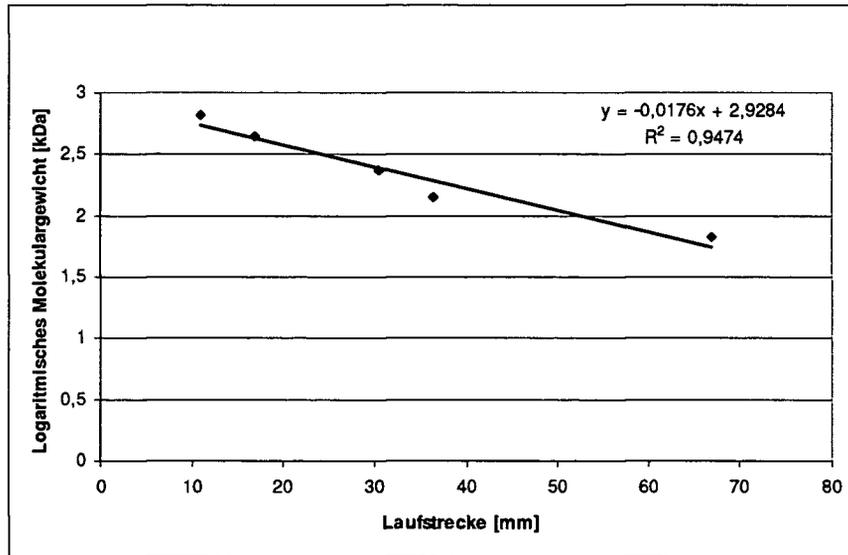


Tabelle 22: Kalibrationsgerade zur Bestimmung des Molekulargewichts der Unterheiten

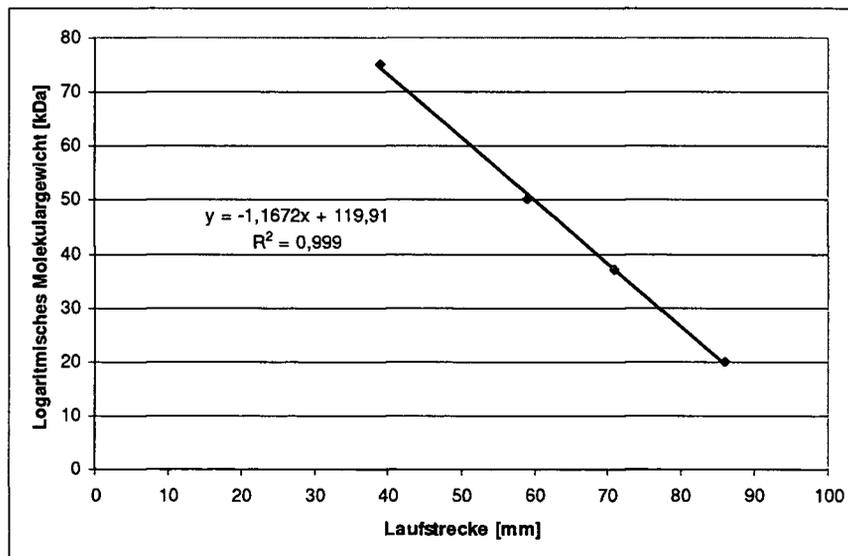


Tabelle 23: Kalibrationsgerade zur Ermittlung der pI-Werte

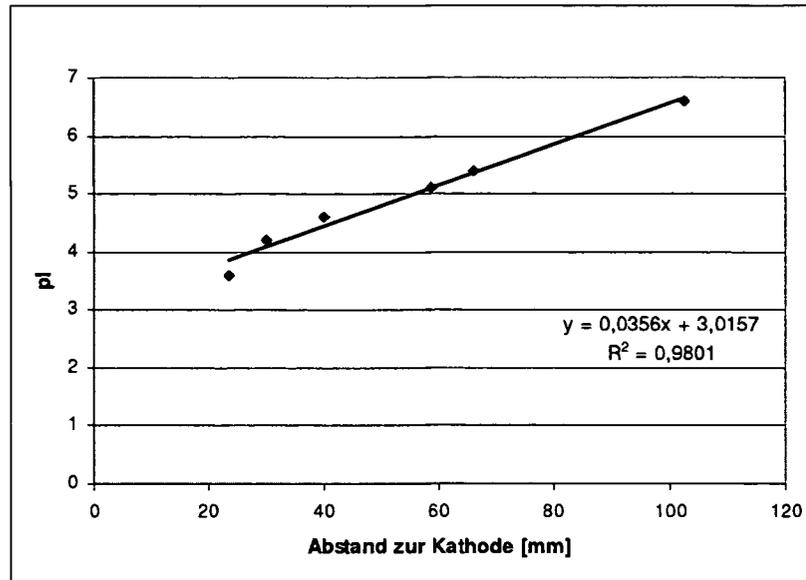
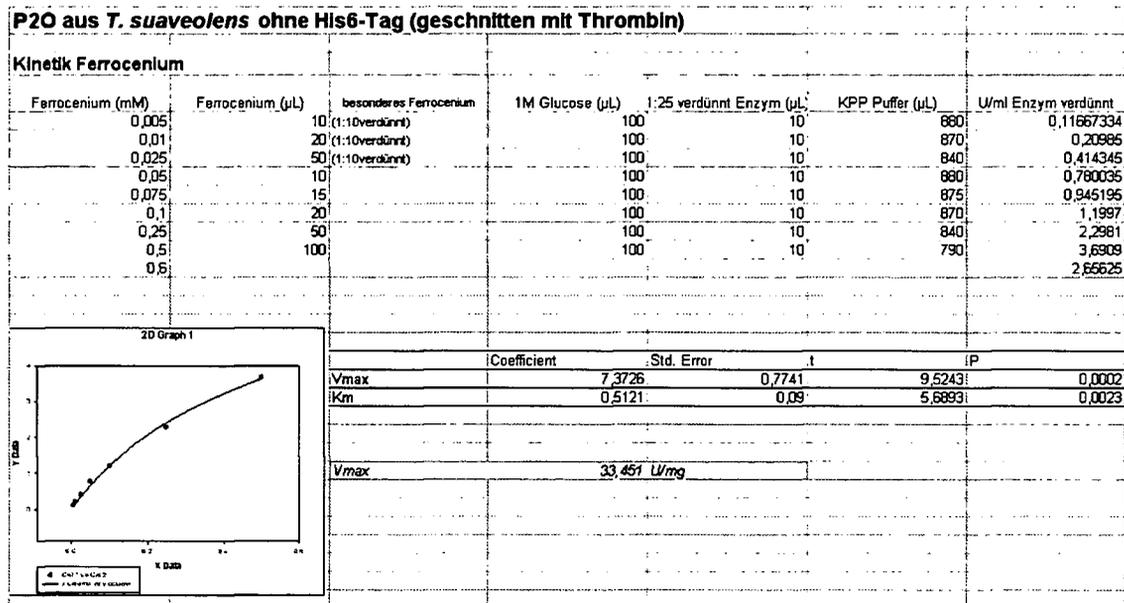
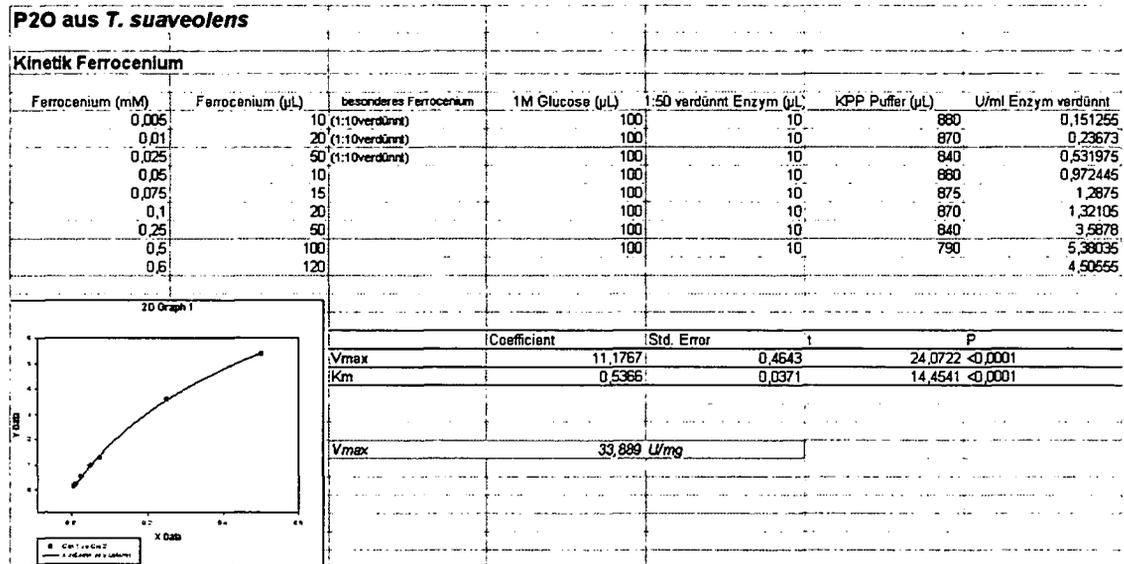


Tabelle 24: Bestimmung der Substratspezifität (Rohdaten)

Nr.	Zucker Name	P20 aus <i>T. suaveolens</i>		P20 aus <i>T. pubescens</i>		P20 aus <i>T. pubescens</i> (ohne His6-Tag)		P20 aus <i>T. suaveolens</i> (ohne His6-Tag)	
		1:100 Verdünnung		1:100 verdünnt		1:50 verdünnung		1:50 verdünnt	
		Aktivität U/ml	Aktivität(%)	Aktivität U/ml	Aktivität(%)	Aktivität U/ml	Aktivität(%)	Aktivität U/ml	Aktivität(%)
0	α-D-(+)-Glucose	1,1101	100,00	1,3170	100,00	0,6303	100,00	0,6934	100,00
1	D-(+)-Fructose	0,0013	0,12	0,0005	0,04	0,0027	0,43	0,0005	0,07
2	D-(-)-Arabinose	0,0014	0,13	0,0075	0,57	0,0086	1,36	0,0008	0,12
3	D-(+)-Cellobiose	0,1409	12,89	0,2090	15,87	0,0937	14,86	0,0993	14,32
4	L(-)-Arabitol	0,0013	0,12	0,0021	0,16	0,0001	0,02	0,0020	0,28
5	L(+)-Arabinose	0,0007	0,06	0,0030	0,22	0,0014	0,21	0,0014	0,20
6	2-Deoxy-D-Glucose	0,0532	5,69	0,0901	6,84	0,0405	6,43	0,0461	6,65
7	D(-)-Ribose	0,0028	0,25	0,0009	0,06	0,0003	0,05	0,0013	0,18
8	L(-)-Sorbitose	0,5043	45,42	0,6945	45,14	0,3060	48,55	0,3370	48,60
9	D(-)-Fructose	0,0012	0,11	0,0019	0,14	0,0010	0,15	0,0017	0,24
10	D-(+)-Galactose	0,0467	4,20	0,0543	4,13	0,0198	3,14	0,0296	4,27
11	D-Xylose	0,3073	27,98	0,3655	27,75	0,1708	27,10	0,1969	28,39
12	D(+)-Sucrose	0,0036	0,32	0,0012	0,09	0,0023	0,36	0,0006	0,09
13	D(+)-Mannose	0,0490	4,42	0,0646	4,90	0,0319	5,06	0,0031	0,45
14	D(+)-Melibiose Monohydrat	0,0109	0,98	0,0137	1,04	0,0074	1,17	0,0065	0,94
15	Maltotriose	0,0061	0,55	0,0089	0,67	0,0041	0,64	0,0022	0,32
16	D-Mannohexose	0,0211	1,90	0,0278	2,11	0,0137	2,17	0,0128	1,84
17	Methyl-β-D-glucopyranoside	0,0413	3,72	0,0508	4,62	0,0251	3,97	0,0281	4,05
18	Methyl-α-D-glucopyranoside	0,0144	1,29	0,0202	1,53	0,0083	1,32	0,0088	1,27
19	Methyl-α-D-Manno-Pyranoside	0,0002	0,01	0,0005	0,04	0,0030	0,47	0,0008	0,12
20	D-Leucrose	0,0435	3,92	0,0558	5,00	0,0275	4,36	0,0307	4,42
21	D(+)-Glucosamine	0,0004	0,03	0,0006	0,05	0,0012	0,19	0,0007	0,10
22	Dulcitol	0,0002	0,01	0,0005	0,03	0,0001	0,02	0,0001	0,01
23	D-Sorbitol	0,0041	0,36	0,0057	0,43	0,0025	0,39	0,0023	0,32
24	L-Galactonic acid γ-Lactone	0,0012	0,10	0,0035	0,27	0,0014	0,21	0,0015	0,21
25	D-Glucuronic acid Sodium Salt	0,0013	0,12	0,0051	0,39	0,0019	0,29	0,0016	0,23
26	D-Galacturonic acid Monohydrat	0,0424	3,82	0,0822	6,24	0,0033	0,52	0,0383	5,52
27	D(+)-Glucuronic acid γ-Lactone	0,0003	0,02	0,0028	0,21	0,0004	0,06	0,0006	0,08
28	D(+)-Glucuronic acid δ-Lactone	0,1810	16,30	0,0564	4,28	0,0258	4,09	0,0298	4,30
29	L-Galactone 1,4-Lactone	0,0024	0,22	0,0039	0,30	0,0021	0,33	0,0016	0,22
30	L-(+)-Glucosäure-γ-Lacton	0,0693	6,24	0,1044	7,93	0,0441	6,99	0,0415	5,99
31	Lactitol	0,0009	0,08	0,0007	0,05	0,0011	0,17	0,0005	0,07
32	D(+)-Lactose Monohydrat	0,0017	0,15	0,0012	0,09	0,0010	0,16	0,0008	0,12

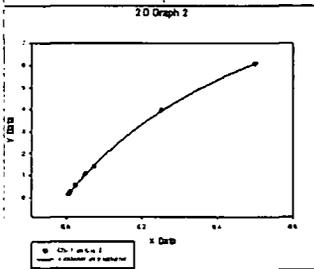
Tabelle 25: Kinetische Daten der rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen für Elektronenakzeptor Ferrocenium



**P2O aus *T. pubescens***

**Kinetik Ferrocenium**

Ferrocenium (mM)	Ferrocenium (µL)	besonderes Ferrocenium	1M Glucose (µL)	1:50 verdünnt Enzym (µL)	KPP Puffer (µL)	U/ml Enzym verdünnt
0,005	10	(1:10 verdünnt)	100	10	880	0,12845
0,01	20	(1:10 verdünnt)	100	10	870	0,2370967
0,025	50	(1:10 verdünnt)	100	10	840	0,54808
0,05	10		100	10	880	1,04885
0,075	15		100	10	875	1,39215
0,1	20		100	10	870	1,39415
0,25	50		100	10	840	3,95735
0,5	100		100	10	790	6,068
0,6						4,864

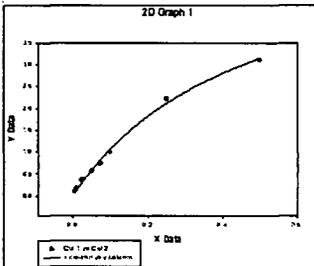


	Coefficient	Std. Error	t	P
Vmax	13,5498	0,4954	27,35381	<0,0001
Km	0,6143	0,0369	17,13481	<0,0001
Vmax	43,993 U/mg			

**P2O aus *T. pubescens* ohne His6-Tag (geschnitten mit Thrombin)**

**Kinetik Ferrocenium**

Ferrocenium (mM)	Ferrocenium (µL)	besonderes Ferrocenium	1M Glucose (µL)	1:25 verdünnt Enzym (µL)	KPP Puffer (µL)	U/ml Enzym verdünnt
0,005	10	(1:10 verdünnt)	100	10	880	0,11675
0,01	20	(1:10 verdünnt)	100	10	870	0,17735
0,025	50	(1:10 verdünnt)	100	10	840	0,371345
0,05	10		100	10	880	0,568355
0,075	15		100	10	875	0,745365
0,1	20		100	10	870	1,0085
0,25	50		100	10	840	2,2242
0,5	100		100	10	790	3,10905
0,6						2,6274



	Coefficient	Std. Error	t	P
Vmax	6,1402	0,5206	11,7939	<0,0001
Km	0,4759	0,0675	7,05291	0,0004
Vmax	43,609 U/mg			

Tabelle 26: Kinetische Daten der rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen für Elektronenakzeptor 1,4 Benzochinon

<b>P2O aus <i>T. suaveolens</i></b>						
<b>Kinetik Benzochinon</b>						
Benzochinon (mM)	Benzochinon (µL)	besonderes Benzochinon	1M Glucose (µL)	1:50 verdünnt Enzym (µL)	KPP Puffer (µL)	U/ml Enzym verdünnt
0,01	10	(1:10 verdünnt)	100	10	860	0,262145
0,025	25	(1:10 verdünnt)	100	10	865	0,570945
0,05	50	(1:10 verdünnt)	100	10	840	1,44765
0,075	75	(1:10 verdünnt)	100	10	815	1,97505
0,1	10		100	10	860	2,44505
0,25	25		100	10	865	4,8169
0,5	50		100	10	840	6,39775
1	100		100	10	790	8,14895
1,5	150		100	10	740	8,51675

	Coefficient	Std. Error	t	P
Vmax	10,4817	0,2044	51,2631	<0,0001
Km	0,3135	0,0172	18,2459	<0,0001
Vmax	31,782 U/mg			

<b>P2O aus <i>T. suaveolens</i> ohne His6-Tag (geschnitten mit Thrombin)</b>						
<b>Kinetik Benzochinon</b>						
Benzochinon (mM)	Benzochinon (µL)	besonderes Benzochinon	1M Glucose (µL)	1:25 verdünnt Enzym (µL)	KPP Puffer (µL)	U/ml Enzym verdünnt
0,01	10	(1:10 verdünnt)	100	10	860	0,19287
0,025	25	(1:10 verdünnt)	100	10	865	0,48015
0,05	50	(1:10 verdünnt)	100	10	840	0,966405
0,075	75	(1:10 verdünnt)	100	10	815	1,3769
0,1	10		100	10	860	1,6301
0,25	25		100	10	865	3,0953
0,5	50		100	10	840	4,31315
1	100		100	10	790	5,21485
1,5	150		100	10	740	5,1917

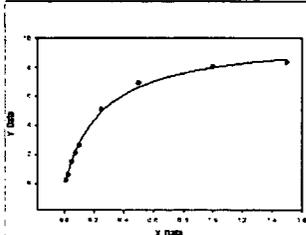
  

	Coefficient	Std. Error	t	P
Vmax	6,8696	0,0901	76,1748	<0,0001
Km	0,3061	0,0096	31,9712	<0,0001
Vmax	31,123 U/mg			

**P2O aus *T. pubescens***

**Kinetik Benzochinon**

Benzochinon (mM)	Benzochinon (µL)	besonderes Benzochinon	1M Glucose (µL)	1:50 verdünnt Enzym (µL)	KPP Puffer (µL)	U/ml Enzym verdünnt
0,01	10	(1:10 verdünnt)	100	10	880	0,25119
0,025	25	(1:10 verdünnt)	100	10	865	0,627265
0,05	50	(1:10 verdünnt)	100	10	840	1,53685
0,075	75	(1:10 verdünnt)	100	10	815	2,13185
0,1	10		100	10	880	2,66085
0,25	25		100	10	865	5,14595
0,5	50		100	10	840	6,9199
1	100		100	10	790	8,04705
1,5	150		100	10	740	8,33615

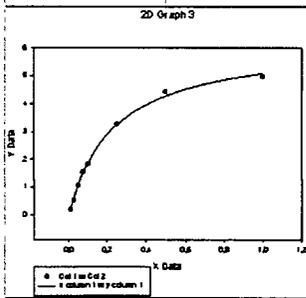


	Coefficient	Std. Error	t	P
Vmax	10,0641	0,2716	37,0604	<0,0001
Km	0,2585	0,0206	12,5613	<0,0001
Vmax	32,678 U/mg			

**P2O aus *T. pubescens* ohne His6-Tag (geschnitten mit Thrombin)**

**Kinetik Benzochinon**

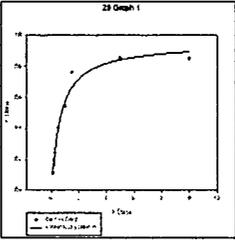
Benzochinon (mM)	Benzochinon (µL)	besonderes Benzochinon	1M Glucose (µL)	1:25 verdünnt Enzym (µL)	KPP Puffer (µL)	U/ml Enzym verdünnt
0,01	10	(1:10 verdünnt)	100	10	880	0,16995
0,025	25	(1:10 verdünnt)	100	10	865	0,51053
0,05	50	(1:10 verdünnt)	100	10	840	1,0669
0,075	75	(1:10 verdünnt)	100	10	815	1,5459
0,1	10		100	10	880	1,82705
0,25	25		100	10	865	3,2569
0,5	50		100	10	840	4,4321
1	100		100	10	790	4,9705
1,5	150		100	10	740	4,50885



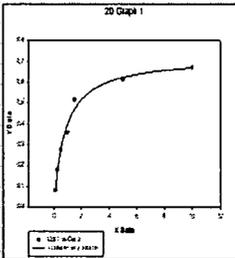
	Coefficient	Std. Error	t	P
Vmax	6,2784	0,1658	37,8692	<0,0001
Km	0,2349	0,0159	14,816	<0,0001
Vmax	44,591 U/mg			

Tabelle 27: Bestimmung des Km-Wertes für D-Glucose

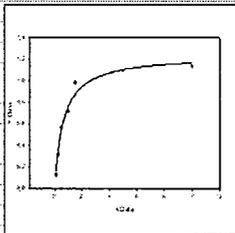
**Km-Wert Bestimmung: P2O aus *T. suaveolens***

Glucose Konzentration in der Küvette mM	Aktivität gemessen bei der Enzymverdünnung 1:100 U/ml		Coefficient Std. Error t P			
0,1	0,11225		Vmax	0,9496	0,0488	19,4721
0,25	0,2402	Km	0,645	0,1162	5,5626	0,0026
0,5	0,4009					
1	0,53965	Vmax	5,76			U/mg
1,5	0,76075	Km	0,65			U/ml
5	0,85345					
10	0,8487					

**Km-Wert Bestimmung: P2O aus *T. suaveolens* (ohne His6-Tag)**

Glucose Konzentration in der Küvette mM	Aktivität gemessen bei der Enzymverdünnung 1:50 U/ml		Coefficient Std. Error t P			
0,1	0,06115		Vmax	0,7225	0,0282	25,6069
0,25	0,16005	Km	0,8036	0,1045	7,6999	0,0006
0,5	0,2763					
1	0,36625	Vmax	6,56			U/mg
1,5	0,51505	Km	0,80			U/ml
5	0,61145					
10	0,6709					

**Km-Wert Bestimmung: P2O aus *T. pubescens***

Glucose Konzentration in der Küvette mM	Aktivität gemessen bei der Enzymverdünnung 1:100 U/ml		Coefficient Std. Error t P			
0,1	0,12645		Vmax	1,2444	0,0543	22,9033
0,25	0,31975	Km	0,6252	0,0964	6,4883	0,0013
0,5	0,5649					
1	0,72355	Vmax	8,08			U/mg
1,5	0,98495	Km	0,63			U/ml
5	1,0971					
10	1,13885					

**Km-Wert Bestimmung: P2O aus *T. pubescens* ohne His6-Tag**

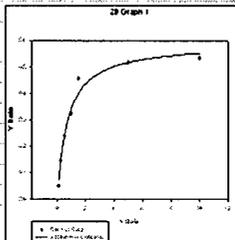
Glucose Konzentration in der Küvette mM	Aktivität gemessen bei der Enzymverdünnung 1:50 U/ml		Coefficient Std. Error t P			
0,1	0,0492		Vmax	0,9903	0,0285	20,7096
0,25	0,1448	Km	0,7069	0,1171	6,0388	0,0018
0,5	0,24015					
1	0,3242	Vmax	8,38			U/mg
1,5	0,45575	Km	0,71			U/ml
5	0,51664					
10	0,53335					

Tabelle 28: Bestimmung des Km-Wertes für D-Galactose

Km-Wert Bestimmung: P20 aus <i>T. suaveolens</i>		
Galactose Konzentration in der Küvette	Aktivität gemessen bei der Enzymverdünnung 1:50	
mM	U/ml	
1	0,0132	
2,5	0,033	
5	0,0473	
10	0,06765	
15	0,0844	
25	0,09425	
50	0,09945	

	Coefficient	Std. Error	t	P
Vmax	0,1164	0,0038	30,2787	<0,0001
Km	6,7293	0,698	9,6411	0,0002

Vmax	0,35	U/mg
Km	6,73	U/ml

Km-Wert Bestimmung: P20 aus <i>T. suaveolens</i> (ohne His6-Tag)		
Galactose Konzentration in der Küvette	Aktivität gemessen bei der Enzymverdünnung 1:5	
mM	U/ml	
1	0,04475	
2,5	0,1085	
5	0,1601	
10	0,2183	
15	0,2484	
25	0,28335	
50	0,3083	

	Coefficient	Std. Error	t	P
Vmax	0,3456	0,0042	82,2303	<0,0001
Km	5,787	0,2326	24,8749	<0,0001

Vmax	0,31	U/mg
Km	5,79	U/ml

Km-Wert Bestimmung: P20 aus <i>T. pubescens</i>		
Galactose Konzentration in der Küvette	Aktivität gemessen bei der Enzymverdünnung 1:50	
mM	U/ml	
1	0,01585	
2,5	0,0361	
5	0,0579	
10	0,0767	
15	0,09105	
25	0,11065	
50	0,1277	

	Coefficient	Std. Error	t	P
Vmax	0,1471	0,004	36,9435	<0,0001
Km	8,4183	0,6624	12,708	<0,0001

Vmax	0,48	U/mg
Km	8,42	U/ml

Km-Wert Bestimmung: P20 aus <i>T. pubescens</i> ohne His6-Tag		
Galactose Konzentration in der Küvette	Aktivität gemessen bei der Enzymverdünnung 1:5	
mM	U/ml	
1	0,0322	
2,5	0,07795	
5	0,12905	
10	0,1451	
15	0,188	
25	0,21595	
50	0,2198	

	Coefficient	Std. Error	t	P
Vmax	0,2512	0,0121	20,782	<0,0001
Km	5,5662	0,8959	6,2132	0,0016

Vmax	0,36	U/mg
Km	5,57	U/ml

Tabelle 29: Bestimmung des Km-Wertes für L-Sorbose

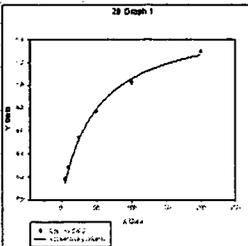
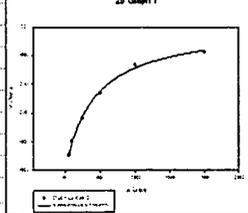
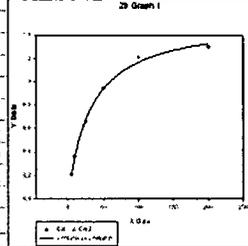
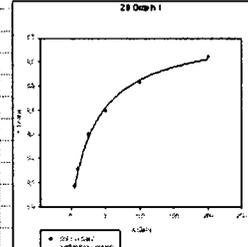
Km-Wert Bestimmung: P20 aus <i>T. suaveolens</i>																							
Sorbose Konzentration in der Küvette	Aktivität gemessen bei der Enzymverdünnung 1:100																						
mM	U/ml																						
5	0,18																						
10	0,26275																						
25	0,54435																						
50	0,76705																						
100	1,0229																						
200	1,2964																						
		<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Coefficient</th> <th>Std. Error</th> <th>t</th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Vmax</td> <td>1,5838</td> <td>0,0632</td> <td>25,0622</td> <td>&lt;0,0001</td> </tr> <tr> <td>Km</td> <td>49,9426</td> <td>5,2569</td> <td>9,5005</td> <td>0,0007</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Vmax</td> <td>9,60</td> <td>U/mg</td> </tr> <tr> <td>Km</td> <td>49,94</td> <td>U/ml</td> </tr> </tbody> </table>		Coefficient	Std. Error	t	P	Vmax	1,5838	0,0632	25,0622	<0,0001	Km	49,9426	5,2569	9,5005	0,0007	Vmax	9,60	U/mg	Km	49,94	U/ml
	Coefficient	Std. Error	t	P																			
Vmax	1,5838	0,0632	25,0622	<0,0001																			
Km	49,9426	5,2569	9,5005	0,0007																			
Vmax	9,60	U/mg																					
Km	49,94	U/ml																					
Km-Wert Bestimmung: P20 aus <i>T. suaveolens</i> (ohne His6-Tag)																							
Sorbose Konzentration in der Küvette	Aktivität gemessen bei der Enzymverdünnung 1:50																						
mM	U/ml																						
5	0,108																						
10	0,20425																						
25	0,36875																						
50	0,5417																						
100	0,7367																						
200	0,82615																						
		<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Coefficient</th> <th>Std. Error</th> <th>t</th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Vmax</td> <td>1,0127</td> <td>0,0252</td> <td>40,1177</td> <td>&lt;0,0001</td> </tr> <tr> <td>Km</td> <td>41,8869</td> <td>2,9164</td> <td>14,3625</td> <td>0,0001</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Vmax</td> <td>9,19</td> <td>U/mg</td> </tr> <tr> <td>Km</td> <td>41,89</td> <td>U/ml</td> </tr> </tbody> </table>		Coefficient	Std. Error	t	P	Vmax	1,0127	0,0252	40,1177	<0,0001	Km	41,8869	2,9164	14,3625	0,0001	Vmax	9,19	U/mg	Km	41,89	U/ml
	Coefficient	Std. Error	t	P																			
Vmax	1,0127	0,0252	40,1177	<0,0001																			
Km	41,8869	2,9164	14,3625	0,0001																			
Vmax	9,19	U/mg																					
Km	41,89	U/ml																					
Km-Wert Bestimmung: P20 aus <i>T. pubescens</i>																							
Sorbose Konzentration in der Küvette	Aktivität gemessen bei der Enzymverdünnung 1:100																						
mM	U/ml																						
5	0,2087																						
10	0,36005																						
25	0,6623																						
50	0,940367																						
100	1,21045																						
200	1,29775																						
		<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Coefficient</th> <th>Std. Error</th> <th>t</th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Vmax</td> <td>1,5397</td> <td>0,0385</td> <td>39,9429</td> <td>&lt;0,0001</td> </tr> <tr> <td>Km</td> <td>31,941</td> <td>2,4325</td> <td>13,131</td> <td>0,0002</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Vmax</td> <td>10,00</td> <td>U/mg</td> </tr> <tr> <td>Km</td> <td>31,94</td> <td>U/ml</td> </tr> </tbody> </table>		Coefficient	Std. Error	t	P	Vmax	1,5397	0,0385	39,9429	<0,0001	Km	31,941	2,4325	13,131	0,0002	Vmax	10,00	U/mg	Km	31,94	U/ml
	Coefficient	Std. Error	t	P																			
Vmax	1,5397	0,0385	39,9429	<0,0001																			
Km	31,941	2,4325	13,131	0,0002																			
Vmax	10,00	U/mg																					
Km	31,94	U/ml																					
Km-Wert Bestimmung: P20 aus <i>T. pubescens</i> ohne His6-Tag																							
Sorbose Konzentration in der Küvette	Aktivität gemessen bei der Enzymverdünnung 1:50																						
mM	U/ml																						
5	0,08625																						
10	0,15455																						
25	0,29815																						
50	0,39605																						
100	0,51685																						
200	0,62055																						
		<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Coefficient</th> <th>Std. Error</th> <th>t</th> <th>P</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Vmax</td> <td>0,7287</td> <td>0,0189</td> <td>38,6492</td> <td>&lt;0,0001</td> </tr> <tr> <td>Km</td> <td>38,6947</td> <td>2,8674</td> <td>13,4947</td> <td>0,0002</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Vmax</td> <td>10,35</td> <td>U/mg</td> </tr> <tr> <td>Km</td> <td>38,69</td> <td>U/ml</td> </tr> </tbody> </table>		Coefficient	Std. Error	t	P	Vmax	0,7287	0,0189	38,6492	<0,0001	Km	38,6947	2,8674	13,4947	0,0002	Vmax	10,35	U/mg	Km	38,69	U/ml
	Coefficient	Std. Error	t	P																			
Vmax	0,7287	0,0189	38,6492	<0,0001																			
Km	38,6947	2,8674	13,4947	0,0002																			
Vmax	10,35	U/mg																					
Km	38,69	U/ml																					

Tabelle 30: Bestimmung des Km-Wertes für D-Xylose

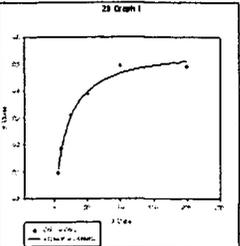
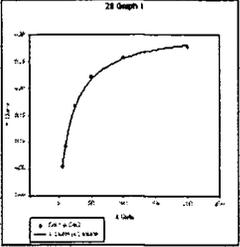
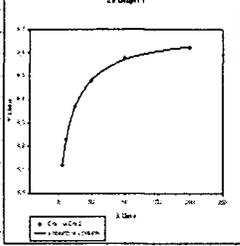
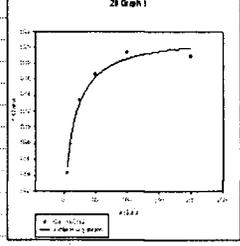
Km-Wert Bestimmung: P20 aus <i>T. suaveolens</i>												
Xylose Konzentration in der Küvette	Aktivität gemessen bei der Enzymverdünnung 1:100											
mM	U/ml											
5	0,0956				Coefficient Std. Error							
10	0,18636				Vmax	0,566	0,0212	t	26,639	P	<0,0001	
25	0,31086				Km	20,9161	2,711		7,7153		0,0015	
50	0,3905											
100	0,495467											
200	0,49175											
			<b>Vmax</b> <b>3,43</b> U/mg <b>Km</b> <b>20,92</b> U/ml									
Km-Wert Bestimmung: P20 aus <i>T. suaveolens</i> (ohne His6-Tag)												
Xylose Konzentration in der Küvette	Aktivität gemessen bei der Enzymverdünnung 1:50											
mM	U/ml											
5	0,0634				Coefficient Std. Error							
10	0,09136				Vmax	0,3133	0,0057	t	56,012	P	<0,0001	
25	0,1664				Km	22,5886	1,3864		16,2925		<0,0001	
50	0,22145											
100	0,25745											
200	0,27665											
			<b>Vmax</b> <b>2,84</b> U/mg <b>Km</b> <b>20,92</b> U/ml									
Km-Wert Bestimmung: P20 aus <i>T. pubescens</i>												
Xylose Konzentration in der Küvette	Aktivität gemessen bei der Enzymverdünnung 1:100											
mM	U/ml											
5	0,11586				Coefficient Std. Error							
10	0,2268				Vmax	0,692	0,0107	t	64,5616	P	<0,0001	
25	0,37056				Km	21,6068	1,1445		18,8806		<0,0001	
50	0,4818											
100	0,5751											
200	0,62											
			<b>Vmax</b> <b>4,49</b> U/mg <b>Km</b> <b>21,61</b> U/ml									
Km-Wert Bestimmung: P20 aus <i>T. pubescens</i> ohne His6-Tag												
Xylose Konzentration in der Küvette	Aktivität gemessen bei der Enzymverdünnung 1:50											
mM	U/ml											
5	0,043				Coefficient Std. Error							
10	0,0786				Vmax	0,2164	0,0084	t	25,6309	P	<0,0001	
25	0,1343				Km	16,5112	2,3807		6,9364		0,0023	
50	0,16705											
100	0,19415											
200	0,1891											
			<b>Vmax</b> <b>3,07</b> U/mg <b>Km</b> <b>16,51</b> U/ml									

Tabelle 31: Bestimmung des pH-Optimums mit D-Glucose

<b>P20 aus <i>T. suaveolens</i></b>			
<i>Citratpuffer</i>			
pH	verdünnung 1	U/ml	spez. Aktivität
2,5	0,0001	0,05	0,00303214
3	0,0001	0,05	0,00303214
3,5	0,02705	13,525	0,82019406
4	0,13953	69,765	4,23074591
4,5	0,20225	101,125	6,13250455
5	0,19773	98,865	5,99545179
5,5	0,2059	102,95	6,24317768
6	0,19225	96,125	5,82929048
<i>Phosphatpuffer</i>			
pH	verdünnung 1	U/ml	spez. Aktivität
6	0,18435	92,175	5,58975136
6,5	0,1666	83,3	5,05154639
7	0,14735	73,675	4,46785931
7,5	0,14355	71,775	4,35263796
8	0,1069	53,45	3,2413584
<i>Boratpuffer</i>			
pH	verdünnung 1	U/ml	spez. Aktivität
8	0,14395	71,975	4,36476653
8,5	0,11235	56,175	3,40661007
9	0,0713	35,65	2,16191631
9,5	0,0378	18,9	1,14614918
10	0,0184	9,2	0,55791389

<b>P20 aus <i>T. suaveolens</i> ohne His<sub>6</sub>-Tag</b>			
<i>Citratpuffer</i>			
pH	verdünnung 1	U/ml	spez. Aktivität
2,5	0	0	0
3	0	0	0
3,5	0,00185	0,4625	0,08393829
4	0,0411	10,275	1,86479129
4,5	0,06755	16,8875	3,06488203
5	0,0692	17,3	3,13974592
5,5	0,0716	17,9	3,24863884
6	0,06785	16,9625	3,07849365
<i>Phosphatpuffer</i>			
pH	verdünnung 1	U/ml	spez. Aktivität
6	0,143	35,75	6,48820327
6,5	0,1435	35,875	6,51088929
7	0,1284	32,1	5,82577132
7,5	0,1087	27,175	4,93194192
8	0,0841	21,025	3,81578947
<i>Boratpuffer</i>			
pH	verdünnung 1	U/ml	spez. Aktivität
8	0,11565	28,9125	5,24727768
8,5	0,0936	23,4	4,24682396
9	0,0628	15,7	2,84936479
9,5	0,03365	8,4125	1,52676951
10	0,0162	4,05	0,73502722

<b>P20 aus T. pubescens</b>			
<i>Citratpuffer</i>			
pH	verdünnung 1	U/ml	spez. Aktivität
2,5	0,0001	0,05	0,00324675
3	0,00005	0,025	0,00162338
3,5	0,00605	3,025	0,19642857
4	0,13935	69,675	4,52435065
4,5	0,19755	98,775	6,41396104
5	0,21625	108,125	7,0211039
5,5	0,22975	114,875	7,45941558
6	0,22415	112,075	7,2775974
<i>Phosphatpuffer</i>			
pH	verdünnung 1	U/ml	spez. Aktivität
6	0,2282	114,1	7,40909091
6,5	0,2307	115,35	7,49025974
7	0,21035	105,175	6,82954545
7,5	0,1678	83,9	5,44805195
8	0,1284	64,2	4,16883117
<i>Boratpuffer</i>			
pH	verdünnung 1	U/ml	spez. Aktivität
8	0,2067	103,35	6,71103896
8,5	0,1596	79,8	5,18181818
9	0,0987	49,35	3,20454545
9,5	0,0478	23,9	1,55194805
10	0,02235	11,175	0,72564935

<b>P20 aus T. pubescens ohne His<sub>6</sub>-Tag</b>			
<i>Citratpuffer</i>			
pH	verdünnung 1	U/ml	spez. Aktivität
2,5	0	0	0
3	0,00015	0,0375	0,01065341
3,5	0,00025	0,0625	0,01775568
4	0,04235	10,5875	3,0078125
4,5	0,0759	18,975	5,390625
5	0,0832	20,8	5,90909091
5,5	0,08835	22,0875	6,27485795
6	0,08785	21,9625	6,23934659
<i>Phosphatpuffer</i>			
pH	verdünnung 1	U/ml	spez. Aktivität
6	0,12115	30,2875	8,60440341
6,5	0,12305	30,7625	8,73934659
7	0,10525	26,3125	7,47514205
7,5	0,10105	25,2625	7,17684659
8	0,07495	18,7375	5,32315341
<i>Boratpuffer</i>			
pH	verdünnung 1	U/ml	spez. Aktivität
8	0,0899	22,475	6,38494318
8,5	0,0719	17,975	5,10653409
9	0,0471	11,775	3,34517045
9,5	0,02835	7,0875	2,01349432
10	0,0134	3,35	0,95170455

Tabelle 32: Temperaturstabilität der rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen bei 40 °C und 60 °C

<b>Temperaturstabilität P20 aus <i>T. suaveolens</i> bei 60°C</b>				
Zeit (Stunden)	U/ml bei der Verdünnung	Aktivität (U/ml)	spez. Aktivität (U/mg)	%
0	0,9739	97,39	5,906003639	100
0,16666667	0,3146	31,46	1,907822923	32,3031112
0,33333333	0,2566	25,66	1,556094603	26,3476743
0,5	0,162475	16,2475	0,985294118	16,68292432
0,66666667	0,128675	12,8675	0,780321407	13,21234213
0,83333333	0,1294	12,94	0,784718011	13,28678509
1	0,120075	12,0075	0,728168587	12,32929459
2	0,05425	5,425	0,328987265	5,570387103
3	0,04415	4,415	0,267738023	4,533319643
4	0,0184	1,84	0,111582777	1,889311018
5	0,0111	1,11	0,067313523	1,139747407

<b>Temperaturstabilität P20 aus <i>T. suaveolens</i> bei 40°C</b>				
Zeit (Stunden)	U/ml bei der Verdünnung	Aktivität (U/ml)	spez. Aktivität (U/mg)	%
0	0,9739	97,39	5,906003639	100
0,16666667	0,97805	97,805	5,931170406	100,4261218
0,33333333	0,92935	92,935	5,635839903	95,42560838
0,5	0,96245	96,245	5,836567617	98,82431461
0,66666667	0,9627	96,27	5,838083687	98,8499846
0,83333333	0,9249	92,49	5,608853851	94,96868262
1	0,8739	87,39	5,2995755	89,73200534
2	0,79815	79,815	4,840206186	81,95399938
3	0,7867	78,67	4,770770164	80,778314
4	0,7599	75,99	4,608247423	78,02649143
5	0,736	73,6	4,463311098	75,5724407

<b>Temperaturstabilität P20 aus <i>T. suaveolens</i> ohne His6-Tag bei 60°C</b>				
Zeit (Stunden)	U/ml bei der Verdünnung	Aktivität (U/ml)	spez. Aktivität (U/mg)	%
0	0,670833	33,54165	6,087413793	100
0,16666667	0,30945	15,4725	2,808076225	46,12921547
0,33333333	0,243075	12,15375	2,20576225	36,23480061
0,5	0,137533	6,87665	1,248030853	20,50182385
0,66666667	0,12088	6,044	1,096914701	18,01938784
0,83333333	0,1189	5,945	1,078947368	17,72423241
1	0,1183	5,915	1,073502722	17,63479137
2	0,04195	2,0975	0,380671506	6,253419256
3	0,034	1,7	0,308529946	5,0683255
4	0,0282	1,41	0,255898367	4,203728797
5	0,0222	1,11	0,201451906	3,309318415

<b>Temperaturstabilität P20 aus <i>T. suaveolens</i> ohne His6-Tag bei 40°C</b>				
Zeit (Stunden)	U/ml bei der Verdünnung	Aktivität (U/ml)	spez. Aktivität (U/mg)	%
0	0,670833	33,54165	6,087413793	100
0,16666667	0,58065	29,0325	5,269056261	86,55656475
0,33333333	0,583125	29,15625	5,291515426	86,92550903
0,5	0,55185	27,5925	5,007713249	82,26339491
0,66666667	0,6268667	31,343335	5,688445554	93,44601413
0,83333333	0,64475	32,2375	5,850725953	96,111849
1	0,554	27,7	5,02722323	82,58389197
2	0,54825	27,4125	4,975045372	81,72674868
3	0,52095	26,0475	4,727313975	77,65718144
4	0,62255	31,1275	5,649274047	92,80253059
5	0,57735	28,8675	5,239110708	86,06463904

Temperaturstabilität P20 aus <i>T. pubescens</i> bei 60°C				
Zeit (Stunden)	U/ml bei der Verdünnung	Aktivität (U/ml)	spez. Aktivität (U/mg)	%
0	0,9772	97,72	6,345454545	100
0,166666667	0,04195	4,195	0,254396604	4,292877609
0,333333333	0,0363	3,63	0,220133414	3,714695047
0,5	0,0096	0,96	0,058217101	0,98239869
0,666666667	0,0121	1,21	0,073377805	1,238231682
0,833333333	0,0138	1,38	0,083687083	1,412198117
1	0,0114	1,14	0,069132808	1,166598445
2	0,0086	0,86	0,05215282	0,880065493
3	0,0065	0,65	0,039417829	0,66516578
4	0,00835	0,835	0,05063675	0,854482194
5	0,004	0,4	0,024257126	0,409332788

Temperaturstabilität P20 aus <i>T. pubescens</i> bei 40°C				
Zeit (Stunden)	U/ml bei der Verdünnung	Aktivität (U/ml)	spez. Aktivität (U/mg)	%
0	0,9772	97,72	6,345454545	100
0,166666667	0,92945	92,945	5,636446331	95,11358985
0,333333333	0,9033	90,33	5,477865373	92,43757675
0,5	0,9288	92,88	5,632504548	95,04707327
0,666666667	0,9244	92,44	5,60582171	94,5968072
0,833333333	0,9325	93,25	5,654942389	95,4257061
1	0,8963	89,63	5,435415403	91,72124437
2	0,8619	86,19	5,226804124	88,2009824
3	0,8068	80,68	4,89266222	82,56242325
4	0,7592	75,92	4,604002426	77,69136308
5	0,7444	74,44	4,514251061	76,17683176

Temperaturstabilität P20 aus <i>T. pubescens</i> ohne His6-Tag bei 60°C				
Zeit (Stunden)	U/ml bei der Verdünnung	Aktivität (U/ml)	spez. Aktivität (U/mg)	%
0	1,0177	50,885	14,45596591	100
0,166666667	0,2555	12,775	3,629261364	25,10563034
0,333333333	0,019467	0,97335	0,276519886	1,912842684
0,5	0,007433	0,37165	0,105582386	0,730372408
0,666666667	0,0172	0,86	0,244318182	1,690085487
0,833333333	0,01385	0,6925	0,196732955	1,36091186
1	0,01375	0,6875	0,1953125	1,351085782
2	0,0137	0,685	0,194602273	1,346172742
3	0,01405	0,7025	0,199573864	1,380564017
4	0,0117	0,585	0,166193182	1,149651174
5	0,0085	0,425	0,120738636	0,835216665

Temperaturstabilität P20 aus <i>T. pubescens</i> ohne His6-Tag bei 40°C				
Zeit (Stunden)	U/ml bei der Verdünnung	Aktivität (U/ml)	spez. Aktivität (U/mg)	%
0	1,0177	50,885	14,45596591	100
0,166666667	0,8438	42,18875	11,98544034	82,90999312
0,333333333	1,0146	50,728335	14,41145881	99,69211949
0,5	0,9278	46,391	13,17926136	91,16832072
0,666666667	1,0088	50,4375	14,32883523	99,12056598
0,833333333	1,0316	51,58	14,65340909	101,3658249
1	0,9318	46,5875	13,23508523	91,5544856
2	0,8914	44,57	12,66193182	87,58966297
3	1,0234	51,1675	14,53622159	100,5551734
4	0,9483	47,415	13,47017045	93,18070158
5	0,9430	47,1475	13,39417614	92,65500639

Tabelle 33: Temperaturoptimum der rekombinanten Pyranose-2-Oxidasen

<b>P2O aus <i>T. suaveolens</i></b>				
Temperatur (°C)	U/ml verdünntes Enzym 1:100	Aktivität U/ml	Aktivität %	spez. Aktivität U/mg
20	0,6662833	66,62833	35,46852309	4,040529412
25	0,8564	85,64	45,58908077	5,193450576
30	0,932575	93,2575	49,64413474	5,65539721
35	1,18505	118,505	63,08423653	7,186476653
40	1,5258	152,58	81,22351639	9,252880534
45	1,7877	178,77	95,16534293	10,84111583
50	1,87852	187,852	100	11,39187386
55	1,66113	166,113	88,42759193	10,07355973
60	1,499875	149,9875	79,84344058	9,095664039
65	0,57275	57,275	30,48942785	3,473317162
70	0,0043	0,43	0,228903605	0,02607641

<b>P2O aus <i>T. suaveolens</i> geschnitten mit Thrombin</b>				
Temperatur (°C)	U/ml verdünntes Enzym 1:50	Aktivität U/ml	Aktivität %	spez. Aktivität U/mg
20	0,415225	20,76125	38,8478271	3,76792196
25	0,4796	23,98	44,87065538	4,352087114
30	0,54505	27,2525	50,99405904	4,94600726
35	0,7002	35,01	65,50965991	6,353901996
40	0,78855	39,4275	73,77555316	7,155626134
45	1,02785	51,3925	96,1641016	9,327132486
50	1,06885	53,4425	100	9,699183303
55	0,9794	48,97	91,6311924	8,887477314
60	0,697	34,85	65,21027272	6,324863884
65	0,2651	13,255	24,80235767	2,405626134
70	0,0032	0,16	0,299387192	0,029038113

<b>P2O aus <i>T. pubescens</i></b>				
Temperatur (°C)	U/ml verdünntes Enzym 1:100	Aktivität U/ml	Aktivität %	spez. Aktivität U/mg
20	0,58155	58,155	35,56467444	3,776298701
25	0,80665	80,665	49,33065882	5,237987013
30	0,8732	87,32	53,40052226	5,67012987
35	1,08205	108,205	66,17273834	7,026298701
40	1,33965	133,965	81,92625933	8,699025974
45	1,5671	156,71	95,8359579	10,17597403
50	1,63519	163,519	100	10,61811688
55	1,472775	147,2775	90,06751509	9,563474026
60	0,7998	79,98	48,91174726	5,193506494
65	0,0139	1,39	0,850054122	0,09025974
70	0,0031	0,31	0,189580416	0,02012987

<b>P2O aus <i>T. pubescens</i> geschnitten mit Thrombin</b>				
Temperatur (°C)	U/ml verdünntes Enzym 1:50	Aktivität U/ml	Aktivität %	spez. Aktivität U/mg
20	0,32745	16,3725	39,10084184	4,651278409
25	0,3717	18,585	44,38473939	5,279829545
30	0,4508	22,54	53,83007941	6,403409091
35	0,545375	27,26875	65,12329094	7,746803977
40	0,6402	32,01	76,44635501	9,09375
45	0,77875	38,9375	92,99062631	11,06178977
50	0,83745	41,8725	100	11,89559659
55	0,666125	33,30625	79,54206221	9,462002841
60	0,1295	6,475	15,46360977	1,839488636
65	0,0145	0,725	1,731446654	0,205965909
70	0	0	0	0