



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Heterologe Produktion rekombinanter Pyranose  
Dehydrogenase: Ein neuartiger Biokatalysator zur  
Synthese von Laktulose und Laktobionsäure

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin:	Gschnitzer Doris
Matrikelnummer:	0209372
Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 474
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Ernährungswissenschaften
Betreuer:	Univ. Prof. Dipl.- Ing. Dr. Dietmar Haltrich

Wien, 2010



## ***Danksagung***

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während meiner Studienzeit unterstützt und ermutigt haben.

Für die freundliche Aufnahme am Institut und die Bereitstellung des Themas danke ich Univ. Prof. Dipl.- Ing. Dr. Dietmar Haltrich.

Weiters möchte ich mich bei Univ. Ass. Mag. Dr. Clemens Peterbauer für die Anregungen zu neuen Versuchsansätzen bedanken.

Besonderer Dank gilt Magda für die herausragende Betreuung. Sie stand mir sowohl durch fachliche Beratung, als auch durch ihre geduldige und aufmunternde Zuwendung zur Seite.

Für die Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima möchte ich mich bei den Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Lebensmittelbiotechnologie bedanken.

Vor allem meiner Studienkollegin Barbara möchte ich für ihre freundschaftliche Unterstützung während meiner Studienzeit danken.

Der größte Dank gebührt meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und meiner Schwester, die mich im Laufe dieser Ausbildung immer bekräftigt hat.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Fragestellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht .....</b>	<b>3</b>
2.1 Laktose.....	3
2.2 Pyranose Dehydrogenase .....	5
2.3 <i>Aspergillus nidulans</i> .....	7
2.4 <i>Pichia pastoris</i> .....	7
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>9</b>
3.1 Chemikalien.....	9
3.2 Geräte .....	9
3.3 Organismen.....	10
3.4 Kultivierung.....	10
3.4.1 Kultivierung von <i>Aspergillus nidulans</i> .....	10
3.4.1.1 Bedingungen .....	10
3.4.1.2 Medien .....	10
3.4.2 Fermentation von <i>Pichia pastoris</i> .....	12
3.4.2.1 Bedingungen .....	12
3.4.2.2 Medien .....	13
3.5 Standard PDH- Aktivitätstest .....	14
3.6 Proteinbestimmung .....	14
3.7 Optische Dichte .....	15
3.8 Feuchte Biomasse.....	15
3.9 Reinigung .....	15
3.9.1 Reinigung der <i>AmPDH</i> aus <i>Aspergillus nidulans</i> .....	15
3.9.1.1 Ammonsulfatfällung.....	16
3.9.1.2 Dialyse .....	16
3.9.1.3 Anionenaustauscherchromatographie.....	17
3.9.1.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie .....	17
3.9.1.5 Gelfiltration .....	18
3.9.2 Reinigung der <i>AmPDH</i> aus <i>Pichia pastoris</i> .....	19

3.9.2.1 Anionenaustauscherchromatographie.....	19
3.9.2.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie .....	20
3.10 Charakterisierung.....	20
3.10.1 Bestimmung der kinetischen Daten .....	20
3.10.1.1 Elektronendonoren.....	20
3.10.1.2 Bestimmung des pH- Optimums .....	21
3.10.1.3 Elektronenakzeptoren .....	21
3.10.2 SDS- Gelelektrophorese.....	22
3.10.3 Deglykosylierung mit PNGase F .....	24
3.10.4 Isoelektrische Fokussierung .....	24
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
4.1 Kultivierung .....	27
4.1.1 Kultivierung von <i>Aspergillus nidulans</i> .....	27
4.1.2 Fermentation von <i>Pichia pastoris</i> .....	28
4.2 Reinigung .....	30
4.2.1 Reinigung der <i>AmPDH</i> aus <i>Aspergillus nidulans</i> .....	30
4.2.1.1 Reinigungsschema.....	30
4.2.1.2 SDS- PAGE.....	31
4.2.2 Reinigung der <i>AmPDH</i> aus <i>Pichia pastoris</i> .....	32
4.2.2.1 Reinigungsschema.....	32
4.2.2.2 SDS- PAGE.....	33
4.3 Charakterisierung.....	34
4.3.1 Elektronendonoren .....	34
4.3.2 Bestimmung des pH- Optimums .....	35
4.3.3 Elektronenakzeptoren.....	37
4.3.4 Deglykosylierung mit PNGase F .....	38
4.3.5 Isoelektrische Fokussierung .....	39
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>41</b>
5.1 Kultivierung .....	41
5.2 Reinigung .....	41
5.3 Charakterisierung.....	42

<b>6. Schlussbetrachtung .....</b>	<b>45</b>
<b>7. Zusammenfassung .....</b>	<b>47</b>
<b>8. Summary.....</b>	<b>49</b>
<b>9. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>51</b>





## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Konformationsformel Laktose .....	3
Abbildung 2: <i>Agaricus meleagris</i> .....	6
Abbildung 3: <i>Aspergillus nidulans</i> .....	7
Abbildung 4: <i>Pichia pastoris</i> .....	8
Abbildung 5: Verlauf der <i>AmPDH</i> - Aktivität während der Kultivierungsphase von <i>Aspergillus nidulans</i> .....	28
Abbildung 6: Veränderung der Biomasse bzw. Enzymaktivität der <i>AmPDH</i> während der Fermentation von <i>Pichia pastoris</i> .....	29
Abbildung 7: SDS- PAGE mit Silberfärbung: Reinigung der <i>AmPDH</i> aus <i>Aspergillus nidulans</i> .....	31
Abbildung 8: SDS- PAGE mit Silberfärbung: Reinigung der <i>AmPDH</i> aus <i>Pichia</i> <i>pastoris</i> .....	33
Abbildung 9: pH- Optimum der rekombinanten <i>AmPDH</i> aus <i>Aspergillus nidulans</i> .....	35
Abbildung 10: pH- Optimum der rekombinanten <i>AmPDH</i> aus <i>Pichia pastoris</i> ..	36
Abbildung 11: SDS- PAGE mit Silberfärbung: Deglykosylierung mit PNGase F .....	38
Abbildung 12: Isoelektrische Fokussierung mit Silberfärbung.....	39



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Medien für <i>Aspergillus nidulans</i> .....	11
Tabelle 2: Medien für <i>Pichia pastoris</i> .....	13
Tabelle 3: Pipettierschema Standard PDH- Aktivitätstest .....	14
Tabelle 4: Pipettierschema Bradford- Test.....	15
Tabelle 5: Anionenaustauscherchromatographie <i>AmPDH Aspergillus nidulans</i> .....	17
Tabelle 6: Hydrophobe Interaktionschromatographie <i>AmPDH Aspergillus nidulans</i> .....	18
Tabelle 7: Gelfiltration <i>AmPDH Aspergillus nidulans</i> .....	19
Tabelle 8: Anionenaustauscherchromatographie <i>AmPDH Pichia pastoris</i> .....	19
Tabelle 9: Hydrophobe Interaktionschromatographie <i>AmPDH Pichia pastoris</i> .	20
Tabelle 10: Herstellung der Elektronenakzeptoren .....	22
Tabelle 11: SDS- Gelelektrophorese: Methode mit dem Phastsystem .....	23
Tabelle 12: SDS- Gelelektrophorese: Methode mit dem Mighty Small II System .....	23
Tabelle13: Isoelektrische Fokussierung: Methode mit dem Multiphor II System .....	24
Tabelle 14: Verlauf der <i>AmPDH</i> - Produktion in <i>Aspergillus nidulans</i> .....	27
Tabelle 15: Reinigungsverlauf der <i>AmPDH</i> aus <i>Aspergillus nidulans</i> .....	30
Tabelle 16: Reinigungsverlauf der <i>AmPDH</i> aus <i>Pichia pastoris</i> .....	32
Tabelle 17: Ergebnisse der Elektronendonoren .....	34
Tabelle 18: Ergebnisse der Elektronenakzeptoren .....	37



## Abkürzungen

AIEX	Anionenaustauscherchromatographie
AOX	Alkoholoxidase
APS	Ammonium Persulfat
BIS- TRIS	Bis (2- hydroxyethyl) amino- tris (hydroxymethyl) methan
BSA	Bovine serum albumin
BQ	Benzochinon
DMSO	Dimethylsulfoxid
FcPF <sub>6</sub>	Ferrocenium- hexafluorophosphat
HIC	Hydrophobe Inteaktionschromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
kDa	Kilodalton
K <sub>M</sub>	Michaelis- Menten- Konstante [mM]
KPP	Kaliumphosphatpuffer
OD	Optische Dichte
PDH	Pyranose Dehydrogenase
P20	Pyranose- 2- Oxidase
PNGase F	Peptide- N4- (acetyl-β-glucosaminy)- asparagine amidase, EC 3.5.1.52
rpm	Rounds per minute
SDS- PAGE	Natrium- dodecyl- sulfat Polyacrylamid- Gelelektrophorese
TEMED	N N,N',N','-Tetramethylethan-1,2-diamin
U	Units
V <sub>max</sub>	Maximale Umsatzgeschwindigkeit [U/ ml] bzw. [U/ mg]
YPD	Yeast Peptone Dextrose



## 1. Einleitung und Fragestellung

Biotechnologie ist die integrierte Anwendung von Biochemie, Mikrobiologie und Verfahrenstechnik mit dem Ziel, eine technische Anwendung des Potentials von Mikroorganismen, Zell- und Gewebekulturen zu erreichen.

Durch die rasche Entwicklung der modernen Biotechnologie in den letzten 4 Dekaden wurde die industrielle Nutzung von Enzymen möglich.

In der Nahrungsmittelproduktion – Käse, Sauerteig, Bier, Wein, Essig – fanden natürliche Enzyme seit jeher ihren Einsatz. Die Entwicklung gezielter Fermentationsprozesse während der 2. Hälfte des letzten Jahrhunderts machte es möglich spezifische und reine Enzyme herzustellen. Weiters hat der Fortschritt in der rekombinanten Gentechnologie Herstellungsprozesse verbessert und die Kommerzialisierung von außerordentlich gut charakterisierten Enzymen erlaubt [KIRK, 2002].

Der weltweite Verkauf von Enzymen wurde 1999 auf 1,5 Milliarden US Dollar geschätzt, mit einer jährlichen Zuwachsrate von 5- 10 % [GAVRILESCU und CHISTI, 2005].

Biokatalysatoren zeigen Substratspezifität, Regioselektivität und Stereospezifität. Im Vergleich zur organischen Synthese erübrigen sich daher bei der angewandten Biokatalyse Reaktionsschritte, wodurch Produktionskosten eingespart werden können. Nicht nur aufgrund wirtschaftlicher Interessen, sondern auch angesichts der bedeutenden ökologischen Zweckmäßigkeit wird die Biotechnologie als Wissenschaft immer bedeutender. Sie zeigt neue Möglichkeiten nachhaltiger Produktionsprozesse, indem erneuerbare Rohstoffe ökologisch sinnvoll verwertet werden [BUCHHOLZ und SEIBEL, 2008].

Kohlenhydrate repräsentieren mit 75 % den Großteil der jährlich erneuerbaren Biomasse von 200 Millionen Tonnen. In etwa 4 % davon werden gegenwärtig genutzt, der Rest zerfällt aufgrund natürlicher Recyclingprozesse.

Kohlenhydrate sind ein vielversprechendes Rohmaterial für enzymtechnologische Prozesse.

Der Großteil der aktuell verwendeten erneuerbaren Kohlenhydrate sind Polysaccharide, wie Cellulose, Stärke, Chitin und Inulin. Ihre Monosaccharide – Glukose, Fruktose, Xylose, Galaktose – und Disaccharide eignen sich hervorragend als Ausgangsmaterial für Umwandlungsreaktionen. Sie sind billig, unbegrenzt zugänglich und in höchster Reinheit verfügbar. Ihre Anwendungsgebiete erstrecken sich von der Lebensmittelindustrie über die Waschmittel-, Pharma-, Textil- und Papierindustrie.

Die Biokonversion der Laktose, ein Hauptbestandteil der in der Milchindustrie anfallenden Molke, bietet nicht nur eine alternative Lösung deren Entsorgung sondern auch eine Steigerung deren Marktpotentials [LICHTENTHALER und PETERS, 2004].

Die herkömmlichsten Derivatisierungsprodukte der Laktose sind Laktulose, Laktikol, Laktobionsäure, aber auch Produkte wie Galakto- oligosaccharide und Tagatose [ZUNDERT und HOFFMANN, 1999].

Diese Diplomarbeit beschäftigt sich mit der Herstellung neuer Biokatalysatoren zur Synthese von Laktulose und Laktobionsäure.

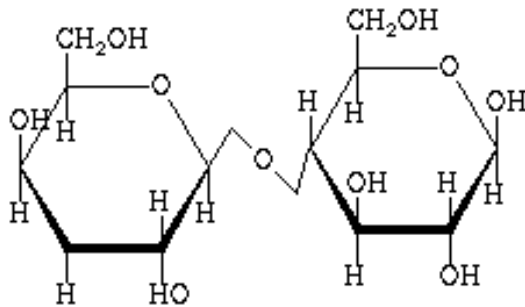
Ziel dieser Arbeit war die Kultivierung, Reinigung und Charakterisierung zweier rekombinanter Pyranose Dehydrogenasen aus dem Pilz *Aspergillus nidulans* und der Hefe *Pichia pastoris* und deren Vergleich mit der bereits charakterisierten Wildtyp PDH aus *Agaricus meleagris*.

Dazu mussten die rekombinanten Enzyme hergestellt und nach vorhandenen Protokollen gereinigt werden. Die reinen Enzyme wurden dann anhand verschiedener kinetischer Parameter ( $K_M$ ,  $V_{max}$ ) verglichen. Von Interesse waren auch die Deglykosylierung und der Isoelektrische Punkt.



## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Laktose



**Abbildung 1: Konformationsformel Laktose**

Die Laktose, auch Milchzucker genannt, ist ein reduzierendes Disaccharid. Sie besteht aus einem Molekül D- Galaktose und einem Molekül D- Glukose, die beta- 1,4- glykosidisch miteinander verbunden sind [9].

Laktose wird in der Lebensmittel-, Futtermittel- und Pharmaindustrie eingesetzt. Der durchschnittliche Laktosegehalt der Milch bzw. des Milchserums beträgt 4,5 %. Die weltweit jährliche Molkeproduktion wird auf 72 Millionen Tonnen geschätzt [AIDER und DE HALLEUX, 2007].

Wie eingangs schon erwähnt werden aufgrund der zunehmenden Laktoseproduktion neue Wege der Wiederverwertung gesucht. Durch die Umwandlung der Laktose in neue wieder verwertbare Substanzen wird eine Aufwertung angestrebt.

Ihre Derivatisierungsprodukte finden häufig Anwendung als Prebiotika in „funktionellen“ Lebensmitteln; eine zunehmende aber unklar abgegrenzte Gruppe von Lebensmitteln, deren Gemeinsamkeit ein besonderer gesundheitlicher Zusatznutzen ist [GERLACH, 2007].

Der Laktulose und Laktobionsäure werden prebiotische Eigenschaften zugeschrieben. Sie fördern das Wachstum nützlicher Bakterien im Dickdarm [KONTULA et al., 1999]. Das heißt, die Produkte gelangen unzersetzt bis in den

Dickdarm, wo sie von Bifidobakterien metabolisiert werden und so zu deren Wachstum beitragen. Dies wirkt sich positiv auf die Darmflora aus.

Gibson und Roberfroid definierten 1995 Prebiotika als natürliche und nicht verdauliche Lebensmittelbestandteile, welche die Gesundheit verbessern sollen, indem sie die Darmflora durch die selektive Stimulation gewisser probiotisch aktiver Bakterien günstig beeinflussen.

Die Laktulose wird in der Lebensmittelindustrie in verschiedenen Produkten, wie Säuglings- und Babynahrung, Süßwaren, und jeglichen Milchprodukten verwendet.

Der wachstumsfördernde Einfluss der Laktulose auf Bifidobakterien wurde bereits vor 50 Jahren entdeckt [STROHMAIER, 1998].

Die gesundheitsfördernde Wirkung der Bifidobakterien basiert auf dem stabilisierenden Einfluss auf die ganze Darmflora. Sie bilden eine effektive Kolonisationsbarriere, die das Einnisten oder Überhandnehmen potentiell pathogener Mikroorganismen, die auch Bestandteil der Darmflora sind, verhindert [GERLACH, 2007].

Weitere Spezies wie, Clostridien, Laktobazillen, Peptostreptokokken und auch Enterokokken sind fähig Laktulose zu metabolisieren [SAARELA et al., 2003].

Laktulose eignet sich nicht nur als Prebiotika, sondern kommt auch, aufgrund der niederkalorischen Süßkraft, als Süßungsmittel in Diabetikerprodukten in Frage [MOYNIHAN und RUSSEL, 1997].

Die Laktobionsäure wird in der Lebensmittelindustrie nicht nur aufgrund seiner bereits diskutierten prebiotischen Eigenschaften eingesetzt, sondern auch wegen ihres besonderen süß- säuerlichen Geschmacks und ihrer Rolle als Chelatbildner. Die Vermeidung unerwünschter Geschmacks- und Bitterstoffe und die Erhaltung frischer Aromastoffe werden durch die Laktobionsäure gefördert. Weiters werden antioxidative Eigenschaften diskutiert [SAARELA et al., 2003].

## 2.2 Pyranose Dehydrogenase

Die Produktion der Pyranose Dehydrogenase (PDH, EC 1.1.99.29) ist für *Agaricaceae* und *Lycoperdaceae* charakteristisch. Sie gehören zu den „Abfall zersetzenden“ Pilzen. Sie wachsen in Wäldern auf lignocellulose- reichem Material, wie Blätter, Baumrinde, Stroh und dergleichen [VOLC et al., 2001]. Wie es scheint ist das Enzym am Abbau von Lignin beteiligt.

Die PDH, erstmals aus *Agaricus bisporus* und *Macrolepiota rhacodes* isoliert und charakterisiert, ist ein monomeres, glykosyliertes Flavoprotein von ungefähr 75 kDa. Die PDH, eine Chinon- abhängige Oxidoreduktase, ist wie sein verwandtes Enzym, die Pyranose- 2- Oxidase (P2O, EC 1.1.3.10), am Kohlehydratstoffwechsel von freien Zuckern sämtlicher höherer Pilze beteiligt. Im Gegensatz zur P2O wird die PDH extrazellulär produziert. Auch die fehlende Aktivität der PDH mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor unterscheidet die beiden Enzyme voneinander [VOLC et al., 1977; VOLC et al., 2001].

Die PDH zeigt eine enorm breite Substratspezifität und mehrere Varianten der Regioselektivität. Abhängig vom Substrat und der Bezugsquelle der PDH werden Oxidationen am C- 1, C- 2, C- 3 oder C- 4, aber auch Doppeloxidationen am C- 1, 2, C- 2, 3 oder C- 3, 4 beobachtet [SEDMERA et al., 2004; VOLC et al., 2000].

Beispielsweise oxidiert die PDH aus *Macrolepiota rhacodes* die D- Glukose ausschließlich am C- 3, während die *Agaricus bisporus* PDH am C- 2 und C- 3 des Substrats reagiert [VOLC et al., 2001; VOLC et al., 1998].

Die aus *Agaricus xanthoderma* gereinigte PDH zeigt, ähnlich wie die P2O, eine Tendenz zur Doppeloxidation der D- Galaktose am C- 2 und C- 3- Atom [VOLC et.al, 2003; KUJAWA et al., 2007].

Es wurde festgestellt, dass im Vergleich zur P2O, die C- 2 Oxidation der Galaktose zur 2- Keto- Galaktose – ein Zwischenprodukt der enzymatischen Isomerisierung der Galaktose zur Tagatose - durch die PDH eine höhere Ausbeute erzielt wird [VOLC et al, 1998].

Die PDH aus *Agaricus meleagris* erwies sich als die gegenwärtig best geeignete Alternative zur Umwandlung der D- Galaktose in D- Tagatose. Zusätzlich ist es möglich auch aus der Laktose auf analogem Wege die Laktulose zu gewinnen [SYGMUND et. al, 2008].

Eine weitere, für die PDH bezeichnende enzymatische Reaktion ist die Oxidation am C- 1 der Laktose. Das daraus resultierende Produkt ist die Laktobionsäure. Während die Laktose zur 2- Dehydrolaktose und im Folgenden zur 2, 3- Didehydrolaktose isomerisiert werden kann, ist gleichzeitig eine Oxidation zur Laktobionsäure beobachtbar [VOLC et al., 2004].

Diese Eigenschaften lassen auf ein vielversprechendes Potential der PDH als Katalysator verschiedener enzymatischer Isomerisierungsreaktionen hoffen. Die industrielle Anwendung der Pyranose Dehydrogenase verlangt nach einem effizienten und wirtschaftlich lukrativen Produktionssystem. Im Zuge dieser Erkenntnisse wurden in der vorliegenden Diplomarbeit rekombinante *Am*PDHs aus *Aspergillus nidulans* und aus *Pichia pastoris* charakterisiert.



**Abbildung 2: *Agaricus meleagris***

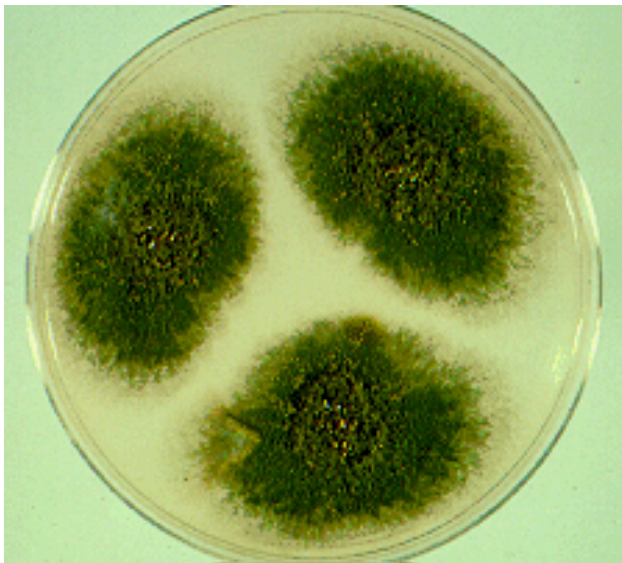
Fruchtkörper [10].

### 2.3 *Aspergillus nidulans*

*Aspergillus* ist eine Gattung der Schimmelpilze und wächst bevorzugt auf kohlehydratreichen Substanzen.

Es sind um die 180 Arten bekannt. Darunter gibt es einige Spezies wie *A. Oryzae* und *A.niger* mit einem bereits beträchtlich kommerziellen Wert.

*Aspergillus* wächst in einem weiten Temperatur- (10- 50 °C) und pH- (2- 11) Bereich. Die Fähigkeit kontinuierlich Metabolite an das Kulturmedium abzugeben und die faserartige Morphologie des Pilzes ermöglicht es die Zellen durch simple Filtration abzutrennen. Dies erleichtert die Kultivierung und Gewinnung der gewünschten Proteine [LUBERTOZZI und KEASLING 2009].



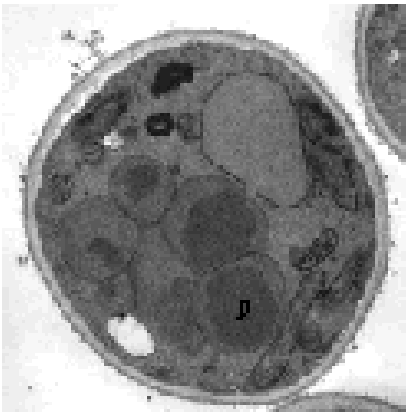
**Abbildung 3: *Aspergillus nidulans***

*Aspergillus nidulans* Kolonien bilden gelb- grüne Sporen [8].

### 2.4 *Pichia pastoris*

*Pichia pastoris* zählt zu den ca. 12 Hefearten, die die Fähigkeit aufweisen Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle auszuschöpfen. Im Jahre 1969 wurde *Pichia pastoris* erstmals als methylotrophe Hefe beschrieben. In den nachfolgenden Jahren wurden Kultivierungsmethoden mit Methanol als Kohlenstoffquelle entwickelt, die außerordentlich hohe Zelldichten (130 g/l Trockengewicht) erzielen [MÜLLER, 1999].

Durch Zugabe von Methanol in das Medium wird die Transkription und Synthese der Alkoholoxidase 1 (*AOX1*) durch den *AOX* Promotor reguliert. Die Expression der *AOX1* induziert die Produktion des Zielproteins. Danach erfolgt die Sekretion des Proteins aus der Zelle [PLANTZ et al., 2006].



**Abbildung 4: *Pichia pastoris***

Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Pichia pastoris* [7].

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Chemikalien

Gängige, in der höchsten Qualität erhältliche Chemikalien wurden von Sigma (ST. Louis, USA), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Fluka (Buchs, Schweiz) erworben.

### 3.2 Geräte

ÄKTA Explorer	Pharmacia Amersham (Uppsala, S)
Amicon Ultra- 15	Millipore (Bedford, USA)
Ultrafiltration Amicon 8400	Amicon Corp. (Beverly, USA)
Eppendorf Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Fermenter 42 L	Applicon (Schiedam, NL)
Fermenter 70 L	Applicon (Schiedam, NL)
Varioklav 500; 135 L	H+P Labortechnik GmbH (München,D)
Laborautoklav Certoklav EL 18 L	Certoklav Sterilizer GmbH (Traun, A)
pH Meter Metrohm 744	Metrohm (D)
Spectrophotometer DU- 650	Beckman (München, D)
Ultrazentrifuge Beckman L- 70	Beckman (München, D)
Zentrifuge Sorvall RC 26 Plus	Du Pont (Wilmington, USA)
Zentrifuge Sorvall Evolution RC	Du Pont (Wilmington, USA)
Schüttler Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg, D)
Sterilbank HS- P 18/2 (LF- Werkbank)	Heraeus (Hanau, D)
Phast System	Pharmacia Amersham (Uppsala, S)
Laborwaagen	Sartorius (Göttingen, D)
Electronic Moisture Analyser MA 30	Sartorius (Wien, A)
Membran Vakuumpumpe MZ 2C	Vacuubrand (Wertheim, D)
Leitfähigkeitsmessgerät	WTW (Weilheim, D)

### 3.3 Organismen

Die Organismen *Aspergillus nidulans* bzw. *Pichia pastoris* stammten von einer öffentlichen Stammhaltung.

### 3.4 Kultivierung

#### 3.4.1 Kultivierung von *Aspergillus nidulans*

##### 3.4.1.1 Bedingungen

Zur Vorkultur wurden sterile 300 ml Erlenmeyerkolben bereitgestellt und mit 150 ml MMA- Medium, wie unter 3.4.1.2 beschrieben, gefüllt. Als Inokulum dienten Sporen einer bewachsenen MMA- Platte. Die Sporen wurden mit einer Öse abgekratzt und in das Medium überführt.

Die Kultur wurde bei 37 °C 24 h bei 110 rpm geschüttelt.

Für die Hauptkultur wurden sterile 1000 ml Erlenmeyerkolben verwendet, die mit 400 ml MMA- Medium befüllt wurden. Die Biomasse der angewachsenen Vorkultur wurde mit einem sterilen Trichter und sterilem Miracloth- Papier abfiltriert, mit sterilem Wasser (ca. mit dem doppelten Volumen) nachgewaschen, und in die bereitgestellten Erlenmeyerkolben überimpft. Es wurde bei 37 °C und 110 rpm weiter angezüchtet. Zur Überprüfung der anwachsenden Kultur wurden Enzymaktivitäts- und Proteinmessungen (wie unter Abschnitt 3.5 und 3.6 angegeben) durchgeführt.

##### 3.4.1.2 Medien

Alle Medienkomponenten wurden in RO- Wasser gelöst und bei 121 °C 20 Minuten autoklaviert. Pyridoxin wurde danach unter sterilen Bedingungen dazugegeben.

Für die Vorkultur wurde 10 g Glukose/l zugegeben, für die Hauptkultur 20 g Maltose/l.



Tabelle 1: Medien für *Aspergillus nidulans*

<b>MMA Medium:</b>	0,52 g KCl
	0,52 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
	1,52 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$
	6 g $\text{NaNO}_3$ (steril filtrieren)
	1 ml Spurenelementlösung
	10 g Glukose (Vorkultur)/ 20 g Maltose (Hauptkultur)
	15 g Agar
	→ 1 L Wasser, pH 6,8
	Nach dem Autoklavieren wird 2 ml Pyridoxin (0,01 g/ 100 ml) dazugegeben
<b>Spurenelementlösung:</b>	40 mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$
	400 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
	800 mg $\text{FePO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
	800 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
	800 mg $\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
	8 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
	→ 1 L Wasser

### 3.4.2 Fermentation von *Pichia pastoris*

#### 3.4.2.1 Bedingungen

Die Expression der *AmPDH* in *Pichia pastoris* wurde in einem 42 L Fermenter unter Glycerol- bzw. Methanolzufuhr durchgeführt.

Es wurden 35 l mit 4,35 ml Spurenelementlösung/l Kulturmedium für die Fermentation vorbereitet (Abschnitt 3.4.2.2).

Als Vorkultur sollte 5– 10 % des gesamten Fermentationsvolumens verwendet werden.

Die Vorkultur wurde in 1000 ml Schikanenkolben angezüchtet. Dazu wurden 6 Kolben autoklaviert und mit je 300 ml YPD- Medium mit 50 mg/l Zeozin (siehe 3.4.2.2) befüllt.

Mit einem sterilen Zahnstocher wurde eine Einzelkolonie von einer bewachsenen YPD- Platte in die Kolben übertragen. Es wurde bei 30 °C und 150 rpm ca. 24 Stunden lang inkubiert, bis eine Optische Dichte zwischen 2– 6 erreicht wurde.

Es wurden alle 6 Kolben der Vorkultur (1800 ml) als Inokulum verwendet.

Nach Verbrauch des restlichen Glycerins wurde die Glycerin Fed- Batch Phase mit einer Zufuhr zwischen 120- 310 g Glycerin/h durchgeführt, bis die feuchte Biomasse auf 180- 220 g/l gestiegen war.

Als schließlich das gesamte Glycerin umgesetzt war wurde auf die Methanol Fed- Batch Phase umgestellt, um den *AOX* Promotor zu induzieren und die Expression des Enzyms einzuleiten. Anfänglich betrug die Zufuhr 60 g/h, um die Kultur langsam an Methanol zu gewöhnen. Später wurde die Methanol-Rate auf 180 g/h erhöht, bis eine feuchte Biomasse zwischen 350- 450 g/l erreicht war.

### 3.4.2.2 Medien

**Tabelle 2: Medien für *Pichia pastoris***

<b>YPD- Medium (Vorkultur):</b>	20 g/l Peptone
	10 g/l Hefeextrakt
	4 g/l Glukose
	50 mg/l Zeozin
<b>Medium (Hauptkultur):</b>	26,7 ml Phosphorsäure (85%)
	0,93 g Calciumsulfat
	14,9 g Magnesiumsulfat * 7 H <sub>2</sub> O
	4,13 g Kaliumhydroxid
	40 g Glycerol
	→ 1 L Wasser
<b>Spurenelemente:</b>	6 g Kupfersulfat
	0,08 g Natriumiodid
	3 g Magnesiumsulfat * H <sub>2</sub> O
	0,2 g Natriummolybdat * 2 H <sub>2</sub> O
	0,02 g Borsäure
	0,5 g Kobaltchlorid
	20 g Zinkchlorid
	65 g Eisensulfate * 7 H <sub>2</sub> O
	0,2 g Biotin
	5 ml Schwefelsäure
	→ 1 L Wasser, (steril filtrieren)

### 3.5 Standard PDH- Aktivitätstest

Bei dem Standardaktivitätstest wird Glukose oxidiert und gleichzeitig das Ferrocenium Ion zu Ferrocen reduziert. Das Ferrocenium Ion bildet in Lösung einen blauen Farbkomplex. Das Absorptionsmaximum liegt bei 300 nm. Bei der Aktivitätsbestimmung wird die Abnahme der Absorption bei diesem Extinktionsmaximum gemessen.

Der Test wurde bei 30 °C und einem pH- Wert von 7,5, 3 min. lang durchgeführt.

**Tabelle 3: Pipettierschema Standard PDH- Aktivitätstest**

770 µl	100 mM KPP, pH 7,5
200 µl	1 mM FcPF <sub>6</sub> , gelöst in 5 mM HCl
20 µl	Enzym
10 µl	2,5 M D- Glukose, gelöst in 100 mM KPP, pH 7,5

Die Ferroceniumlösung wurde täglich frisch hergestellt.

Die Reagenzien wurden bei 30 °C im Wasserbad temperiert. Der Test wurde mit Zugabe des Enzyms gestartet. Gemessen wurden Units/ml. Ein Unit ist diejenige Menge an Enzym, die 2 µmol Ferrocenium Ion pro Minute umsetzt.

### 3.6 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford- Test bestimmt [BRADFORD, 1976].

Bei diesem Test wird das Protein durch Coomassie- Brillant- Blau- Einlagerung photometrisch bei einer Wellenlänge von 590 nm nachgewiesen.

Die Standardgerade wurde in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 1 mg/ml mittels BSA- Serum bestimmt. Gemessen wird in mg/ml.

**Tabelle 4: Pipettierschema Bradford- Test**

1000 µl	Bradford- Reagens
20 µl	Enzym

### 3.7 Optische Dichte

Die Optische Dichte wird bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen.

1 ml der Probe wurde in eine Küvette pipettiert und der Wert photometrisch bestimmt. Als Blindwert wurde das jeweilige Kulturmedium verwendet.

### 3.8 Feuchte Biomasse

Die feuchte Biomasse wurde bestimmt, indem 2 ml Probe abzentrifugiert und das Pellet abgewogen wurde. Das Ergebnis wurde in g/l angegeben.

### 3.9 Reinigung

#### 3.9.1 Reinigung der *AmPDH* aus *Aspergillus nidulans*

Nach der Kultivierung findet man die *AmPDH* in dem Kulturmedium, da das Enzym extrazellulär produziert wird. Um das Enzym für die Reinigung zu gewinnen musste die Biomasse abgetrennt werden. Dies erfolgte durch Papierfiltration mittels Vakuumpumpe. Anschließend wurde das Volumen gemessen und die Enzymaktivität und der Proteingehalt ermittelt.

Nicht sofort weiter verwendete Proben wurden bei – 30 °C gelagert.

### **3.9.1.1 Ammonsulfatfällung**

Der erste Reinigungsschritt dient zur Gewinnung des Gesamtproteins.

Proteine in Lösung bilden mit Wassermolekülen Wasserstoffbrückenbindungen. Bei Zugabe von Salz wird die Hydrathülle der Proteine zerstört und es kommt zu einer Aggregation der Proteine.

Es wurde Ammonsulfat bis zu 100 % Sättigung (707 g/l bei 0 °C) unter dauerndem Rühren langsam dazugegeben. Hohe Konzentrationen von Ammonsulfat bewirken vermutlich eine Auffaltung des Enzyms, wodurch die Zugänglichkeit des Substrats am aktiven Zentrum erhöht wird [MATHÄ, 2001].

Die Lösung wurde dann bei 4 °C und 6000 rpm 30 min. abzentrifugiert. Das Pellet wurde in so wenig Auftragspuffer wie möglich (ca. 200 ml) gelöst. Der Überstand wurde zusätzlich abfiltriert und der entstandene Filterkuchen im selben Puffer resuspendiert.

### **3.9.1.2 Dialyse**

Nach der Ammonsulfatfällung ist der Salzgehalt der Probe zu hoch um gleich auf eine Anionenaustauschersäule aufzutragen. Eine geeignete Entsalzungsmethode ist die Dialyse. Die Poren des Dialyseschlauches erlauben nur Molekülen bis zu einer gewissen Größe den Durchtritt. Proteine bleiben im Inneren des Schlauches, Salze diffundieren nach außen.

Dazu wurde die Probe in einen Dialyseschlauch gefüllt und in Wasser mit etwas Auftragspuffer gegeben. Die Diffusion wird vom Konzentrationsgradienten und der Temperatur beeinflusst. Deshalb wurde diese Methode bei 4 °C durchgeführt, wobei das Wasser mit dem Puffer gerührt, und das Wasser mehrmals gewechselt wurde. Der Grad der Entsalzung wurde mittels Leitfähigkeit der Probe überprüft. Der Wert sollte dem des Auftragspuffers (2 mS/cm<sup>2</sup>) entsprechen.

### 3.9.1.3 Anionenaustauscherchromatographie

Die AEX basiert auf dem Prinzip der elektrostatischen Bindung. Das Gel EMD-DEAE beinhaltet positiv geladene Gruppen, die unter Austausch ihres Gegenions negative Moleküle an sich binden können. Sehr schwach bindende Moleküle werden bereits durch das Spülen mit Puffer A runtergewaschen. Durch den Aufbau eines Ionenstärkegradienten mit Puffer B werden nach und nach die gebundenen Moleküle wieder gelöst.

**Tabelle 5: Anionenaustauscherchromatographie *AmPDH Aspergillus nidulans***

<b>Säulenmaterial:</b>	Fractogel EMD- DEAE 20- 40 µm
<b>Säulenvolumen:</b>	45 ml
<b>Puffer A:</b>	20 mM BIS- TRIS pH 6
<b>Puffer B:</b>	20 mM BIS- TRIS mit 1 M NaCl pH 6
<b>Elution:</b>	Gradient von 0- 80 % Puffer B in 10 Säulenvolumina, bei einer Flussrate von 5 ml/min
<b>Fraktionsgröße:</b>	7,5 ml

Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden gepoolt und mittels Hydrophober Interaktionschromatographie weiter gereinigt.

### 3.9.1.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Das Prinzip der Hydrophoben Interaktionschromatographie beruht auf der Wechselwirkung zwischen hydrophoben Aminosäuren der Proteine und dem hydrophoben Adsorbent. Die Interaktion des Proteins mit dem Chromatographiegel ist abhängig von den hydrophoben Eigenschaften des Proteins und der Hydrophobizität der Liganden im Chromatographiegel. Weiters

spielen die Konzentration des Salzes im Elutionspuffer sowie pH- Wert und Temperatur eine Rolle.

Zunächst wurde der ALEX- Pool bis zu 50 % Sättigung (295 g/l) mit Ammonsulfat versetzt. Die Leitfähigkeit sollte denselben Wert der Leitfähigkeit des Puffer A erreichen. Das war im vorliegenden Fall 150 mS/cm<sup>2</sup>.

Anschließend wurde die Probe bei 30.000 rpm 30 min. in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert um die ausgefallenen Fremdproteine abzutrennen.

**Tabelle 6: Hydrophobe Interaktionschromatographie *AmPDH Aspergillus nidulans***

<b>Säulenmaterial:</b>	SOURCE PHE
<b>Säulenvolumen:</b>	22 ml
<b>Puffer A:</b>	50 mM KPP pH 6,5 mit 1,5 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Puffer B:</b>	50 mM KPP pH 6,5
<b>Elution:</b>	Gradient von 0– 100 % in 20 Säulenvolumina, bei einer Flussrate von 2,5 ml/min
<b>Fraktionsgröße:</b>	2,5 ml

### **3.9.1.5 Gelfiltration**

Die höchst aktiven Fraktionen nach der Hydrophoben Interaktionschromatographie wurden weiter über die Gelfiltration aufgereinigt.

Die Trennung basiert auf der unterschiedlichen Größe der Moleküle. Das Trennmateriale der Säule besteht aus Kügelchen. Die unterschiedlich großen Moleküle der aufzutrennenden Substanz dringen entsprechend ihrer Größe unterschiedlich weit in die Poren des Trenngels ein. Große Moleküle passieren die Säule schneller, da weniger Porenvolumen zur Verfügung steht.



**Tabelle 7: Gelfiltration *AmPDH Aspergillus nidulans***

<b>Säulenmaterial:</b>	Superose 12
<b>Säulenvolumen:</b>	180 ml
<b>Puffer:</b>	50 mM KPP, 100 mM KCl pH 7
<b>Elution:</b>	Flussrate: 0,2 ml/min
<b>Fraktionsgröße:</b>	0,5 ml

**3.9.2 Reinigung der *AmPDH* aus *Pichia pastoris***

Die *AmPDH* aus *Pichia pastoris* wurde analog der *AmPDH* aus *Aspergillus nidulans* gereinigt (siehe Abschnitt 3.9.1.1– 3.9.1.4).

Die Gelfiltration wurde in diesem Fall nicht durchgeführt.

**3.9.2.1 Anionenaustauscherchromatographie****Tabelle 8: Anionenaustauscherchromatographie *AmPDH Pichia pastoris***

<b>Säulenmaterial:</b>	Fractogel EMDA- DEAE 20- 40 µm
<b>Säulenvolumen:</b>	45 ml
<b>Puffer A:</b>	20 mM BIS- TRIS pH 6
<b>Puffer B:</b>	20 mM BIS- TRIS pH 6 mit 1 M NaCl
<b>Elution:</b>	Gradient von 0- 80 % Puffer B in 10 Säulenvolumen, bei einer Flussrate von 10 ml/min
<b>Fraktionsgröße:</b>	10 ml

### 3.9.2.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie

**Tabelle 9: Hydrophobe Interaktionschromatographie *AmPDH Pichia pastoris***

<b>Säulenmaterial:</b>	SOURCE PHE
<b>Säulenvolumen:</b>	22 ml
<b>Puffer A:</b>	50 mM KPP pH 6,5 mit 1,5 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Puffer B:</b>	50 mM KPP pH 6,5
<b>Elution:</b>	Gradient von 0– 100 % in 15 Säulenvolumen, bei einer Flussrate von 2,5 ml/min
<b>Fraktionsgröße:</b>	2,5 ml

## 3.10 Charakterisierung

### 3.10.1 Bestimmung der kinetischen Daten

#### 3.10.1.1 Elektronendonoren

Kinetische Konstanten  $V_{\max}$  und  $K_M$  wurden für verschiedene Substrate, wie unter Abschnitt 3.5 dargelegt, bestimmt. Anstelle der Glukose wurden unterschiedliche Zucker, in einem weiten Konzentrationsbereich, eingesetzt. Die Substratlösungen wurden in 100 mM KPP bei pH 7,5 hergestellt. Als Elektronenakzeptor wurde Ferrocenium verwendet.

Der  $K_M$ - Wert beschreibt diejenige Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit vorliegt.

Der  $V_{\max}$  - Wert erklärt sich als die höchste erreichbare Umsatzgeschwindigkeit. Das gesamte Enzym liegt als Enzym- Substrat- Komplex vor.

Nach Michaelis- Menten besteht zwischen Substratkonzentration und Umsatzgeschwindigkeit folgender Zusammenhang:

$$V = \frac{V_{\max} * [S]}{K_M + [S]}$$

[S]	Substratkonzentration
V	Umsatzgeschwindigkeit bei Substratkonzentration [S]
$V_{\max}$	maximale Umsatzgeschwindigkeit
$K_M$	Michaelis- Menten- Konstante

Die Werte wurden durch Messung der Enzymaktivität bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen bestimmt und mittels  $\Sigma$ - Plot 2000 Programm ausgewertet.

### **3.10.1.2 Bestimmung des pH- Optimums**

Die Enzymaktivität ist abhängig vom pH- Wert. Aus diesem Grund wurden für die weiteren Messungen kinetischer Daten von Elektronenakzeptoren pH- Optima festgelegt. Die Bestimmung der pH- Optima erfolgte anhand des Standardaktivitätstests. In diesem Fall wurde der pH- Wert verändert.

Pufferlösungen:

50 mM Citrat- Puffer pH: 2- 5

50 mM Phosphat- Puffer pH: 6- 7,5

50 mM Borat- Puffer pH: 8- 10

### **3.10.1.3 Elektronenakzeptoren**

Analog der Bestimmung kinetischer Daten von Substraten wurden die Werte für verschiedene Elektronenakzeptoren bestimmt. Hier wurden die Konzentrationen

der Elektronenakzeptoren für die jeweilige Messung verändert. Als Substrat wurde Glukose mit einer Endkonzentration von 0,025 M verwendet.

**Tabelle 10: Herstellung der Elektronenakzeptoren**

	Wellenlänge [nm]	Absorptionskoeffizient [mM <sup>-1</sup> *cm <sup>-1</sup> ]	Herstellung
1 mM FcPF <sub>6</sub>	300	4,3	5 mM HCl
10 mM 1,4- BQ	290	2,24	10 % DMSO
2- Chloro- 1,4-BQ	321	2,8	10 % Ethanol

Ferrocenium wurde in 5 mM HCl, 1,4- BQ in 5 ml DMSO mit 45 ml Wasser und 2- Chloro- 1,4- BQ in 5 ml Ethanol mit 45 ml Wasser gelöst. Die Endkonzentration der Lösungsmittel sollte nicht höher als 10 % sein.

### 3.10.2 SDS- Gelelektrophorese

Mit dieser Methode wurde nach jedem Reinigungsschritt die Reinheit der Fraktionen kontrolliert.

Weiters wurde das Molekulargewicht der *Am*PDH und seiner Untereinheiten bestimmt.

Die Probenvorbereitung erfolgte nach Laemmli [LAEMMLI, 1970]. Die Proben wurden 2 Minuten bei 99 °C abgekocht. Dadurch werden die Disulfidbrücken in Anwesenheit von Mercaptoethanol aufgebrochen. Das SDS im Puffer bindet an die Proteine.

**Tabelle 11: SDS- Gelelektrophorese: Methode mit dem Phastsystem**

Gel:	PhastGel Gradient 8- 25
Probenpuffer:	Laemmli
Standard:	dual color (BioRad)
Färbemethode:	Silberfärbung, nach Angabe des Herstellers durchgeführt

**Tabelle 12: SDS- Gelelektrophorese: Methode mit dem Mighty Small II System**

Trenngel:	Acrylamid/ BIS (30 %)	24 ml
	Gelpuffer	20 ml
	H <sub>2</sub> O	10 ml
	Glycerol	6 ml
	TEMED	20 µl
	APS (10%)	200 µl
Sammelgel:	Acrylamid/ BIS (30 %)	1,5ml
	TRIS HCl pH 6,8	1,5 ml
	H <sub>2</sub> O	6,9 ml
	SDS (5 %)	200 µl
	TEMED	6 µl
	APS (10 %)	60 µl
Laufbedingungen:	Sammelgel:	35 V, 45 min
	Trenngel:	95 V, 15 h
Probenpuffer:	Laemmli	
Standard:	dual color (BioRad)	
Färbemethode:	Silberfärbung, nach Angabe des Herstellers durchgeführt	

### 3.10.3 Deglykosylierung mit PNGase F

Die PNGase F (Peptid- N- Glykosidase F) spaltet spezifisch N- glykosidisch gebundene Zuckerreste vom Asparaginrest des Peptids ab.

Probenvorbereitung:

Zu 9 µl der Proben mit einer Proteinkonzentration zwischen 0,1- 0,2 mg/ml wurde 1µl „Denaturing Buffer“ dazugegeben und 10 min. bei 100 °C abgekocht.

Anschließend wurde:

2 µl 10x G7 „Reaction Buffer“

2 µl 10% NP- 40

5 µl H<sub>2</sub>O

1 µl PNGase F

dazugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Deglykosylierung wurde anhand der SDS- PAGE mit Silberfärbung sichtbar gemacht.

### 3.10.4 Isoelektrische Fokussierung

Darunter versteht man die Auftrennung nach den isoelektrischen Punkten (IEP).

Die unterschiedlich geladenen Teilchen wandern im elektrischen Feld durch einen pH- Gradienten bis zu ihren jeweiligen IEP.

Der IEP eines Proteins ist die Summe aller Ladungen, die Null beträgt.

#### **Tabelle13: Isoelektrische Fokussierung: Methode mit dem Multiphor II System**

Gel:	CleanGel IEF (Polyacrylamidgel T = 5 %, C = 3 %)
Ampholine:	530 µl 2,5– 5 Pharmalyte
	170 µl 3– 5 Ampholyte

Standard:	BioRad 4,45– 9,6
	Sigma 3,6– 9,3
Temperatur:	10 °C
Färbemethode:	Silberfärbung, nach Angaben des Herstellers

Das Trockengel wurde 1 Stunde lang mit den oben angegebenen Mengen an Ampholinen und 9,8 ml H<sub>2</sub>O rehydratisiert und bei 500 V, 8 mA, 8 W für 30 min. vorfokussiert.

Nach dem Auftragen der Proben (10 µl mit einer Proteinkonzentration von 0,05 mg/ml) erfolgte die Trennung bei 1200 V, 16 mA, 16 W ca. 4 Stunden lang.





## 4. Ergebnisse

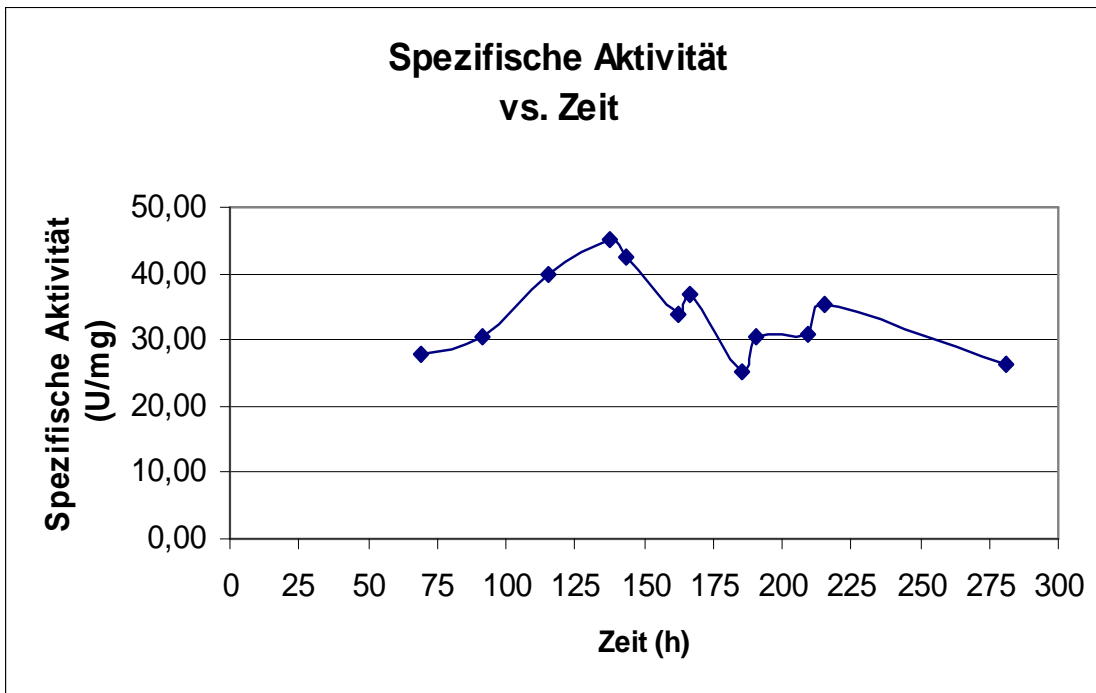
### 4.1 Kultivierung

#### 4.1.1 Kultivierung von *Aspergillus nidulans*

*Aspergillus nidulans* wurde erstmals über einen Zeitraum von 12 Tagen kultiviert. Während dieser Zeit wurden Enzymaktivität und Proteingehalt aufgezeichnet. Daraus ergibt sich die in Abbildung 5 dargestellte Spezifische Aktivität. Sie erreichte einen Höchstwert von 45,25 U/mg nach 137,5 Stunden (6. Kultivierungstag). Bis dato stieg die Enzymaktivität (siehe Tabelle 14) auf einen Wert von 3,62 U/ml an, erreichte nach 167 Stunden (7. Kultivierungstag) ihr Maximum mit 5,53 U/ml und sank danach wieder ab. Der Proteingehalt war erst ab dem 3. Kultivierungstag zu verzeichnen, erreichte analog der Enzymaktivität zur selben Zeit ihren Höchststand von 0,15 mg/ml und blieb dann konstant. Daraus resultiert die sinkende Spezifische Aktivität.

**Tabelle 14: Verlauf der *AmPDH*- Produktion in *Aspergillus nidulans***

Zeit (h)	U/ml	mg/ml	U/mg	U gesamt
0	0,025	0	0	19.60
16,50	0,14	0	0	108
24	0,38	0	0	304
40,5	0,64	0	0	1024
47,5	0,82	0,02	41	1312
69,5	1,68	0,06	28,00	2688
91,5	2,12	0,07	30,29	3392
115,5	3,20	0,08	40,00	5120
137,5	3,62	0,08	45,25	5800
143,5	4,26	0,1	42,60	6820
162	4,72	0,14	33,71	7552
167	5,53	0,15	36,87	8860
185,5	3,8	0,15	25,33	6080
190,5	4,56	0,15	30,40	7300
209,5	4,61	0,15	30,73	7380
215,5	5,3	0,15	35,33	8440
281	3,92	0,15	26,13	6280



**Abbildung 5: Verlauf der AmPDH- Aktivität während der Kultivierungsphase von *Aspergillus nidulans***

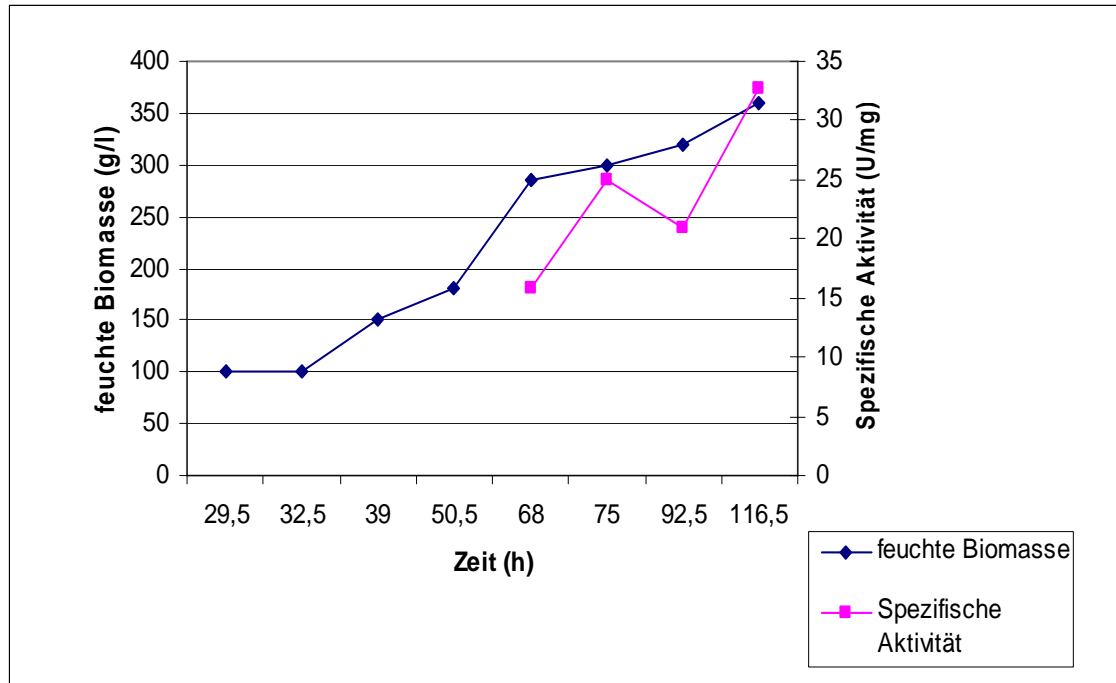
#### 4.1.2 Fermentation von *Pichia pastoris*

Nachdem die Vorkultur eine OD von 3,3 (sollte zwischen 2– 6 liegen) erreicht hatte, wurde inokuliert.

Nach ca. 30 Stunden bei 400 rpm war das restliche Glycerin umgesetzt. Bis dahin sollte eine feuchte Biomasse zwischen 90- 150 g/l erreicht werden. Im vorliegenden Fall ist der Wert auf 100 g/l gestiegen (dargestellt in Abb. 6).

Die Glycerin Fed- Batch Phase wurde gestartet. Nach 50 Stunden hatte die feuchte Biomasse 150 g/l erreicht. Es wurde von der Glycerin auf die Methanol Fed- Batch Phase umgestellt. Wie Abbildung 6 zeigt konnte im Folgenden eine

Spezifische Aktivität von 15,91 U/mg gemessen werden. Am Ende wurde ein Höchstwert von 32,79 U/mg. Die feuchte Biomasse stieg auf 360 g/l an.



**Abbildung 6: Veränderung der Biomasse bzw. Enzymaktivität der AmpDH während der Fermentation von *Pichia pastoris***

## 4.2 Reinigung

### 4.2.1 Reinigung der *AmPDH* aus *Aspergillus nidulans*

#### 4.2.1.1 Reinigungsschema

Tabelle 15 fasst die Ergebnisse der Reinigung der *AmPDH* aus *Aspergillus nidulans* zusammen.

**Tabelle 15: Reinigungsverlauf der *AmPDH* aus *Aspergillus nidulans***

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Protein gesamt [mg]	Aktivität gesamt [U]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Reinigung [- fach]
Rohextrakt	1200	204	2760	13,53	100	1
AIEX	97,5	19,5	607,7	31,16	22,02	2,3
HIC	25	2,24	124,84	55,86	20,04	4,1
Gelfiltration	1	0,1	3,53	35,33	2,83	2,6

Das verwendete Kulturfiltrat zeigte anfänglich eine Gesamtaktivität von 2760 U und ein Gesamtprotein von 204 mg.

Nach der Anionenaustauscherchromatographie stieg die spezifische Aktivität von 13,53 U/mg auf 31,16 U/mg. Dieser Reinigungsschritt weist mit 22,02 % die höchste Ausbeute auf.

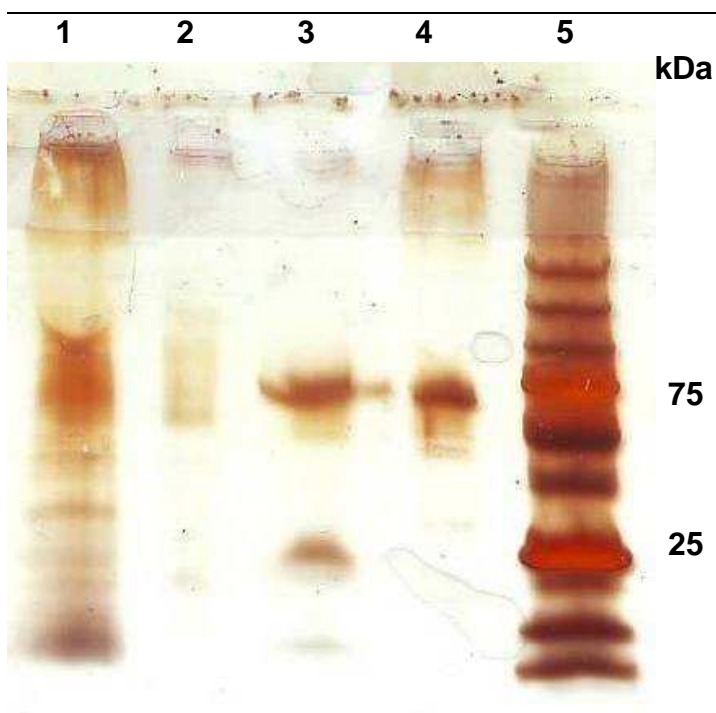
Die höchste Spezifische Aktivität wurde nach der Hydrophoben Interaktionschromatographie mit 55,86 U/mg erreicht mit etwa derselben Ausbeute von 20,04 %.

Ein geringer Teil der Probe nach HIC wurde weiters noch über die Gelfiltrationschromatographie gereinigt um eine homogene PDH zu erhalten. Die Spezifische Aktivität betrug danach 35,33 U/mg. Das liegt daran, dass beim Auftragen der Probe auf die Gelfiltrationssäule über einen 200 µl Loop in etwa

ein Drittel der Probe verloren ging und zudem eine Untereinheit von 25 kDa abgetrennt wurde.

#### 4.2.1.2 SDS- PAGE

Anhand der SDS- PAGE wurde die Reinheit des Enzyms nach jedem Reinigungsschritt überprüft und schließlich das Molekulargewicht der reinen *AmPDH* bestimmt.



**Abbildung 7: SDS- PAGE mit Silberfärbung: Reinigung der *AmPDH* aus *Aspergillus nidulans***

**Spalte 1:** Rohextrakt, **Spalte 2:** Pool nach AIEX, **Spalte 3:** Pool nach HIC, **Spalte 4:** Pool nach Gelfiltration, **Spalte 5:** Standard.

Die Proteinkonzentration der Proben lag zwischen 0,8 und 0,1 mg/ml. Es wurden 6 µl Probe mit 0,05 µg/µl aufgetragen.

Die Probe nach der AIEX wurde etwas zu verdünnt aufgetragen, deshalb sind nicht alle Banden gut sichtbar.

Die meisten Fremdproteine konnten durch die HIC abgetrennt werden, wie Spalte 3 zeigt. Es sind noch 2 Banden zu erkennen, eine bei etwa 67 kDa und eine bei 25 kDa. Nach der Gelfiltration blieb nur noch eine Bande bei 67 kDa über. Das Enzym war rein.

## 4.2.2 Reinigung der *AmpDH* aus *Pichia pastoris*

### 4.2.2.1 Reinigungsschema

In Tabelle 16 wird der Reinigungsverlauf der *AmpDH* aus *Pichia pastoris* subsumiert.

**Tabelle 16: Reinigungsverlauf der *AmpDH* aus *Pichia pastoris***

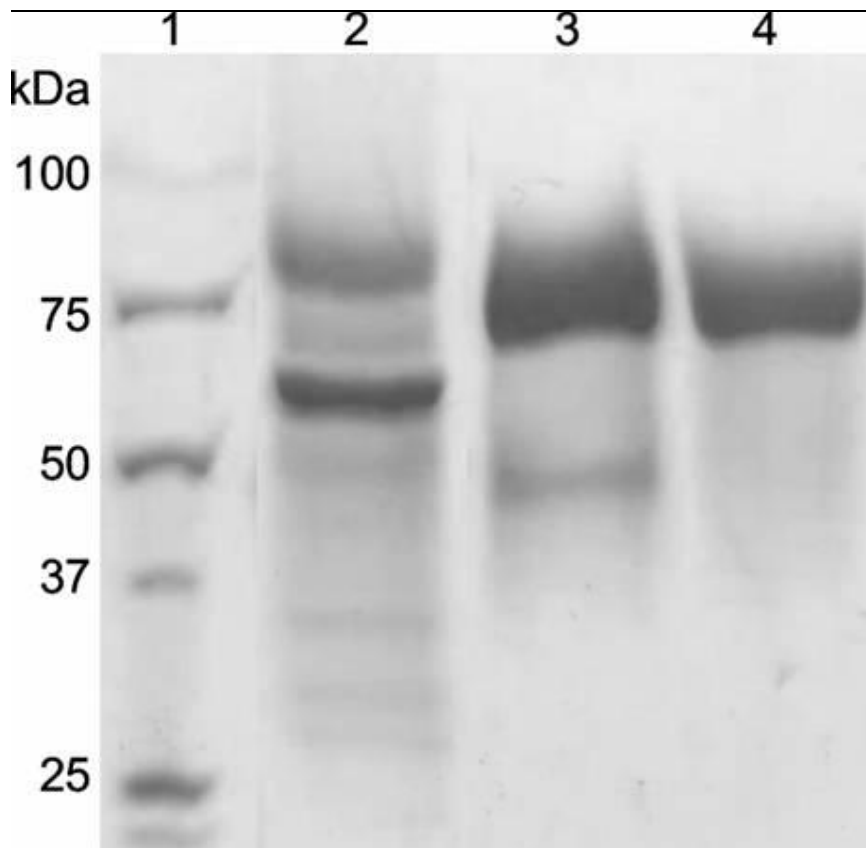
Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Protein gesamt [mg]	Aktivität gesamt [U]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Reinigung [- fach]
Rohextrakt	1150	1403	1725	12,3	100	1
AIEX	120	216	216	38,89	49	3,2
HIC	80	85	85	46,8	23	3,8

Das Gesamtprotein im Rohextrakt betrug 1403 mg und die Gesamtaktivität belief sich auf 1725 U.

Nach der AIEX stieg die spezifische Aktivität von 12,3 U/mg auf 38,89 U/mg. Nach der HIC stieg diese weiter an auf 46,8 U/mg. Die Ausbeute der AIEX war um mehr als das Doppelte höher als die Ausbeute der HIC.

#### 4.2.2.2 SDS- PAGE

Abbildung 8 veranschaulicht die Effizienz der einzelnen Reinigungsschritte der *Amp*PDH aus *Pichia pastoris*



**Abbildung 8: SDS- PAGE mit Silberfärbung: Reinigung der *Amp*PDH aus *Pichia pastoris***

**Spalte 1:** Standard, **Spalte 2:** Rohextrakt, **Spalte 3:** Pool nach AIEX, **Spalte 4:** Pool nach HIC

Die Proteinkonzentration der Proben betrug für das Rohextrakt 10,6 mg/ml, für den AIEX- Pool 2,12 mg/ml, für den HIC- Pool 4 mg/ml und für die reine Wildtyp PDH 2 mg/ml.

Es wurden 6 µl Probe mit einem Proteingehalt von 0,1 µg/µl aufgetragen.

Wie Saplte 4 zeigt war die *AmPDH* aus *P. pastoris* nach der HIC rein. Es ist nur noch eine Bande sichtbar bei etwa 75 kDa. Die Bande ist relativ breit. Dies lässt einen hohen Zuckerrest vermuten.

## 4.3 Charakterisierung

### 4.3.1 Elektronendonoren

Tabelle 17: Ergebnisse der Elektronendonoren

	<i>AmPDH</i> aus <i>Aspergillus nidulans</i>		<i>AmPDH</i> aus <i>Pichia pastoris</i>		PDH aus <i>Agaricus meleagris</i>	
	$V_{\max}$ [U/mg]	$K_M$ [Mm]	$V_{\max}$ [U/mg]	$K_M$ [Mm]	$V_{\max}$ [U/mg]	$K_M$ [Mm]
Glukose	43,26	0,86±0,06	33,39	0,58±0,11	41,4	0,82±0,03
Galaktose	41,95	1,02±0,27	42,58	1,07±0,13	43,7	1,05±0,05
Arabinose	48,18	1,32±0,24	30,64	0,49±0,05	33,5	0,54±0,08
Xylose	40,55	1,03±0,17	58,88	1,59±0,06	39,1	1,93±0,17
Laktose	28,7	113,94±7,48	28,14	128,3±118,79	35,6	134±6,3

Die Tabelle zeigt, dass die kinetischen Konstanten der *AmPDH* aus *Aspergillus nidulans* den Werten der *AmPDH* aus *Pichia pastoris* ähnlich sind.

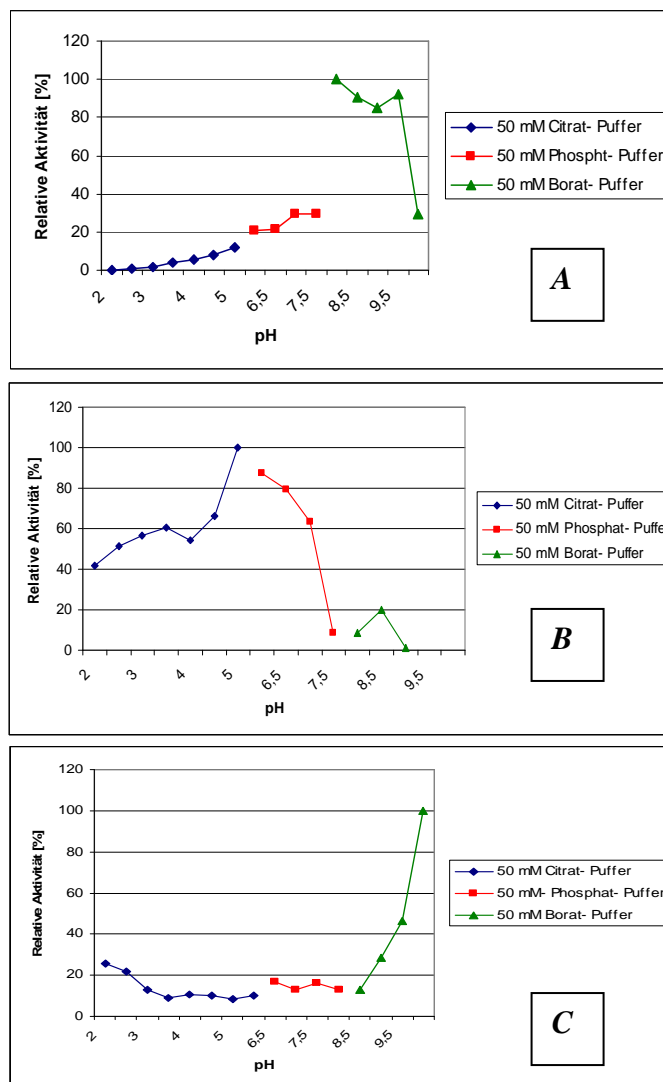
Beide Enzyme zeigen eine breite Substratspezifität. Glukose, Galaktose, Arabinose und Xylose weisen sich als bevorzugte Substrate. Deren  $K_M$ -Werte sind eindeutig niedriger als der  $K_M$ -Wert der Laktose.



### 4.3.2 Bestimmung des pH- Optimums

Der Verlauf der *Am*PDH- Aktivität mit verschiedenen Elektronenakzeptoren bei unterschiedlichen pH- Werten wird in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt.

Alle kinetischen Daten der Elektronenakzeptoren wurden anschließend unter den im Folgenden beschriebenen pH- Bedingungen gemessen.

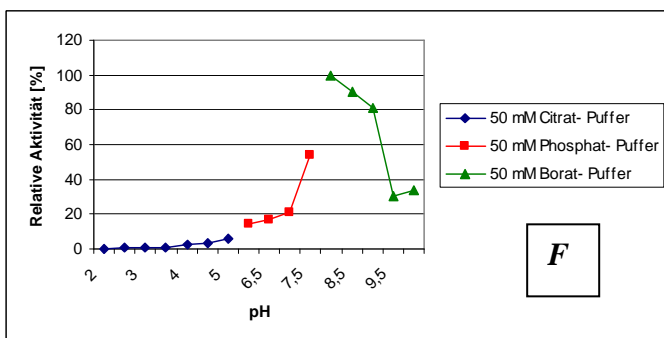
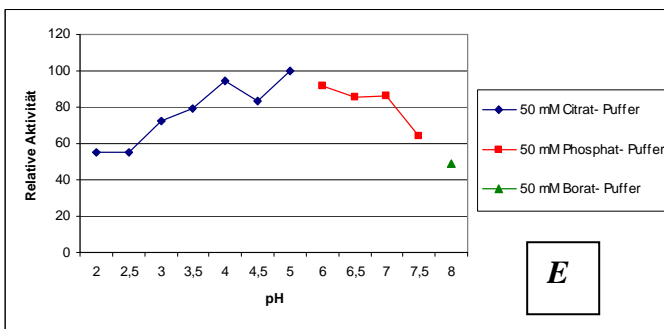
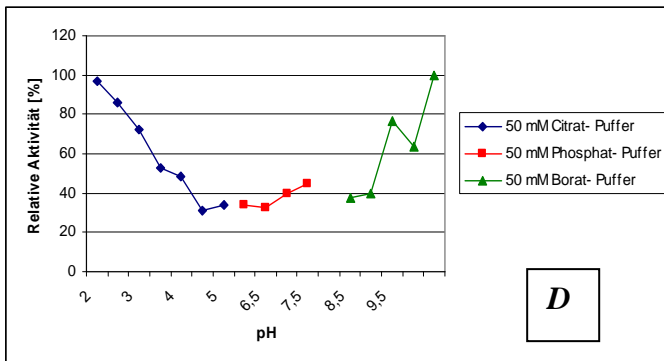


**Abbildung 9: pH- Optimum der rekombinanten *Am*PDH aus *Aspergillus nidulans***

**A.** Das pH- Optimum für Ferrocenium liegt im alkalischen Bereich bei pH 8,5.

**B.** Das pH- Optimum für 2- Chloro- 1,4- BQ als Elektronenakzeptor liegt bei pH 5.

**C.** Mit 1,4- BQ zeigt sich sowohl im sauren als auch im basischen Bereich ein pH- Optimum.



**Abbildung 10: pH- Optimum der rekombinanten *AmPDH* aus *Pichia pastoris***

**D.** Die *AmPDH* aus *Pichia pastoris* zeigt genauso wie die *AmPDH* aus *Aspergillus nidulans* zwei pH- Optima mit 1,4- BQ. Für alle weiteren Messungen wurde pH 2 herangezogen.

**E.** Mit 2- Chloro- 1,4- BQ ist das Enzym über einen weiten Bereich aktiv. Das pH- Optimum liegt bei pH 5.

**F.** Das pH- Optimum für Ferrocenium liegt bei pH 8.

#### 4.3.3 Elektronenakzeptoren

**Tabelle 18: Ergebnisse der Elektronenakzeptoren**

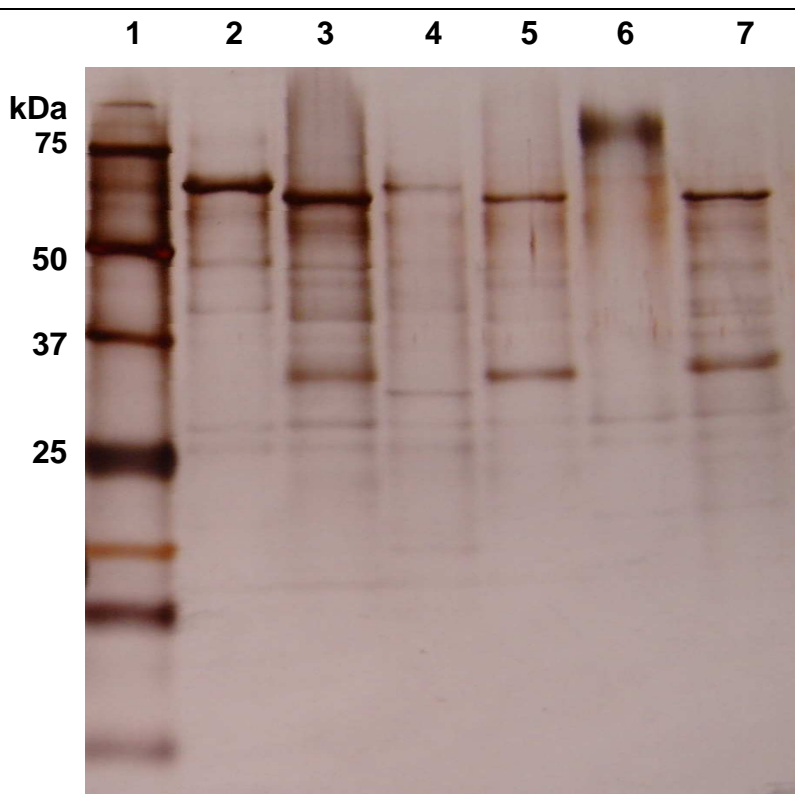
	<i>AmPDH</i> aus <i>Aspergillus nidulans</i>		<i>AmPDH</i> aus <i>Pichia pastoris</i>		PDH aus <i>Agaricus meleagris</i>	
	$V_{\max}$ [U/mg]	$K_M$ [Mm]	$V_{\max}$ [U/mg]	$K_M$ [Mm]	$V_{\max}$ [U/mg]	$K_M$ [Mm]
<b>Ferrocenium</b>	289,73	0,22±0,03	248,47	0,17±0,04	93,9	0,13±0,03
<b>1,4- BQ</b>	52,77	1,03±0,06	36,02	0,66±0,09	68,5	1,8±0,11
<b>2- Chloro-1,4- BQ</b>	9,88	0,61±0,11	7,87	0,78±0,20	13,6	0,55±0,11

Die Ergebnisse der Elektronenakzeptoren beider Enzyme sind signifikant ähnlich.

Ferrocenium zeigt mit seinen niedrigen  $K_M$ - und hohen  $V_{\max}$ - Werten gegenüber den Benzochinonen eine weit höhere katalytische Effizienz für beide Enzyme.

#### 4.3.4 Deglykosylierung mit PNGase F

Die Molekulargewichte der glykosylierten/ deglykosylierten *Am*Pyranose Dehydrogenase wurden durch SDS- PAGE mit anschließender Silberfärbung sichtbar gemacht.



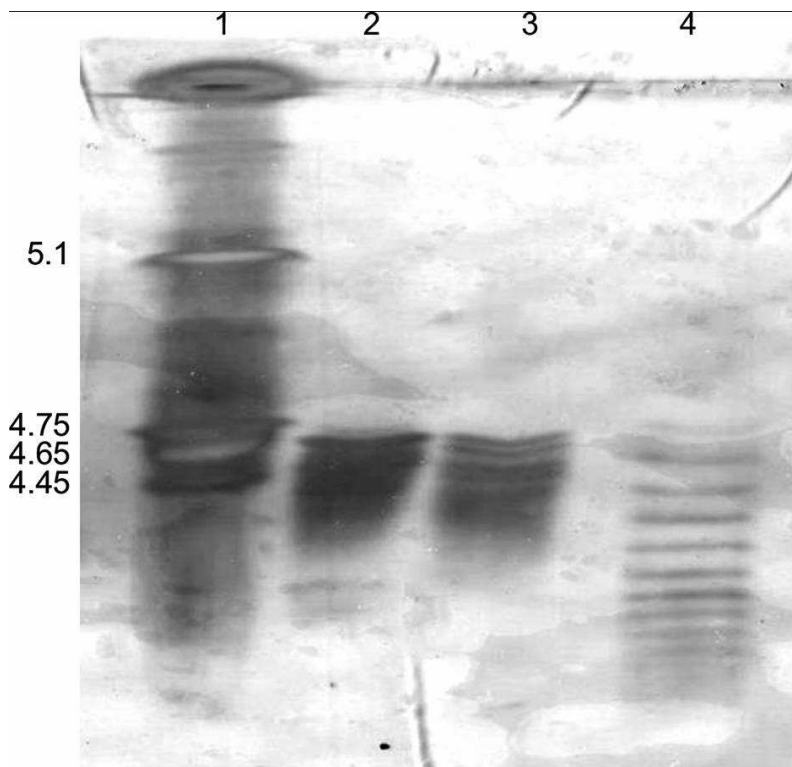
**Abbildung 11: SDS- PAGE mit Silberfärbung: Deglykosylierung mit PNGase F**

**Spalte 1:** Standard, **Spalte 2:** PDH Wildtyp glykosyliert, **Spalte 3:** PDH Wildtyp deglykosyliert, **Spalte 4:** *Am*PDH aus *Aspergillus nidulans* glykosyliert, **Spalte 5:** *Am*PDH aus *Aspergillus nidulans* deglykosyliert, **Spalte 6:** *Am*PDH aus *Pichia pastoris* glykosyliert, **Spalte 7:** *Am*PDH aus *Pichia pastoris* deglykosyliert. Die Abbildung macht sichtbar, dass die rekombinanten *Am*PDHs unterschiedlich glykosyliert sind. Die *Am*PDH aus *Pichia pastoris* weist einen höheren Zuckerrest, als die *Am*PDH aus *Aspergillus nidulans* auf, wie Spalte 4 und 6 verdeutlichen. Spalte 4 zeigt eine Bande bei etwa 67 kDa, Spalte 6 hingegen weist eine Bande über 75 kDa auf.

Die Wildtyp PDH weist einen Kohlehydratanteil von 7 % auf [Sygmund *et. al.*, 2008]. Vergleichbar in ihrer Glykosylierung sind die Wildtyp PDH und die AmPDH aus *Aspergillus nidulans*, ersichtlich aus den Spalten 2, 3, 4, und 5. Die Banden liegen auf derselben Höhe.

#### 4.3.5 Isoelektrische Fokussierung

Die Isoelektrische Fokussierung nach dem Multiphor II System zeigt die Auftrennung der Wildtyp PDH, der AmPDH aus *Aspergillus nidulans* und der AmPDH aus *Pichia pastoris* nach ihren Isoelektrischen Punkten.



**Abbildung 12: Isoelektrische Fokussierung mit Silberfärbung**

**Spalte 1:** Standard, **Spalte 2:** PDH aus *Agaricus meleagris*, **Spalte 3:** AmPDH aus *Aspergillus nidulans*, **Spalte 4:** AmPDH aus *Pichia pastoris*

Die Auftrennung nach den isoelektrischen Punkten ergab mehrere Banden.

Die PDH aus *A. meleagris* zeigt 3 Hauptbanden bei pI 4,20; 4,35; 4,45 [SYGMUND et al., 2008]. Eine ähnliche Auftrennung weist die AmPDH aus *Aspergillus nidulans* auf. Die Banden liegen in etwa im selben Bereich; zwischen pI 4,15 bis 4,65. Eine deutlich größere Anzahl an Banden sind unter Spalte 1 zu erkennen. Die AmPDH aus *Pichia pastoris* weist eine Vielzahl an Isoformen auf.

## 5. Diskussion

### 5.1 Kultivierung

Sowohl die Kultivierung des *Aspergillus nidulans* in Schüttelkolben als auch die Fermentation der *Pichia pastoris* stellten sich als erfolgreich heraus.

Beide Kultivierungsmethoden waren im Vergleich zur Anzüchtung der Wildtyp PDH zeitsparend. Die Kultivierung der Wildtyp PDH erwies sich als langwierig. Die stehende Kultivierung in Rouxflaschen ergab nach 6 Wochen eine Aktivität von 4 U/ml [SYGMUND et al., 2008].

Bei der Kultivierung der AmPDH aus *Aspergillus nidulans* wurde bereits nach 7 Tagen eine Ausbeute von 5,53 U/ml erreicht. Durch die Fermentation der AmPDH aus *Pichia pastoris* konnte schon nach 5 Tagen 20 U/ml erzielt werden. Die erwartete Ausbeute der Fermentation war etwas höher. Vermutlich war die Methanolzufuhr von 160- 180 g/h in den letzten Stunden zu hoch.

### 5.2 Reinigung

Die Reinigung der AmPDH sowohl aus *Aspergillus nidulans* als auch aus *Pichia pastoris* erfolgte in mehreren Schritten. Als erstes wurde die Ammonsulfatfällung durchgeführt, darauf folgte die Dialyse, Anionenaustauscherchromatographie (AEX), die Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) und im Falle der AmPDH aus *Aspergillus nidulans* zusätzlich die Gelfiltration.

Für beide Enzyme stellte sich die Anionenaustauscherchromatographie als derjenige Reinigungsschritt mit der höchsten Ausbeute heraus. Als effektivster Reinigungsschritt für beide rekombinanten PDHs erwies sich jedoch die Hydrophobe Interaktionschromatographie, mit einem Reinigungsfaktor für die AmPDH aus *Aspergillus nidulans* von 4,1 und für die AmPDH aus *Pichia pastoris* von 3,8.

Nach diesem Reinigungsschritt erreichte die AmPDH aus *Aspergillus nidulans* eine spezifische Aktivität von 55, 86 U/mg, die reine AmPDH aus *Pichia*

*pastoris* 46,8 U/mg. Diese Werte sind mit den Ergebnissen der Reinigung der Wildtyp PDH vergleichbar. Die PDH aus *Agaricus meleagris* wurde 18-fach mit einer Spezifischen Aktivität von 2,9 U/mg auf 53,4 U/mg gereinigt [SYGMUND et al., 2008].

### 5.3 Charakterisierung

Bezogen auf die Charakterisierung zeigen sich sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede zwischen den beiden rekombinanten PDHs, aber auch mit der bereits charakterisierten Wildtyp PDH.

Die Wildtyp PDH aus *Agaricus meleagris* ist ein monomeres Polypeptid mit einem kovalent gebundenen Flavin- adenin- dinukleotid. Das Molekulargewicht bestimmt durch SDS- PAGE beträgt 67 kDa [SYGMUND et al., 2008]. Die molekulare Masse der rekombinanten *AmPDH* aus *Aspergillus nidulans* beläuft sich auf ebenfalls 67 kDa, die *AmPDH* aus *Pichia pastoris* in etwa auf 75 kDa.

Die Unterschiede der Molekulargewichte werden auch durch das Ergebnis der Deglykosylierung mit PNGase F deutlich. Vergleicht man die Banden der beiden glykosylierten rekombinanten *AmPDHs* zeigen sich Abweichungen. Die *AmPDH* aus *Pichia pastoris* weist einen höheren Zuckeranteil auf, woraus unter anderem das höhere Molekulargewicht resultiert. In ihrer Glykosylierung sind die *AmPDH* aus *Aspergillus nidulans* und die Wildtyp PDH eher miteinander vergleichbar.

Weitere Unterschiede werden durch die Auftrennung der Enzyme in ihre isoelektrischen Punkte erkennbar. Die IEF verdeutlicht, dass die *AmPDH* aus *Pichia pastoris* mehr Isoformen aufweist als die *AmPDH* aus *Aspergillus nidulans*, und die Wildtyp PDH. Dies ist auch der Grund dafür, dass bei der SDS- PAGE (Abbildung 8) die *AmPDH* aus *Pichia pastoris* keine scharfe Bande ergab.

Hinsichtlich der Molekulargröße, Glykosylierung und Isoelektrischen Fokussierung sind sich die Wildtyp PDH und die *AmPDH* aus *Aspergillus nidulans* ähnlicher.



Zur Ermittlung kinetischer Daten wurden zuerst die pH- Optima für einige Elektronenakzeptoren bestimmt. Aus der Literatur sind die pH- Optima für die Wildtyp PDH bekannt [SYGMUND et al., 2008]. Sie liegen für Ferrocenium bei pH 8,5, für 1,4- BQ bei pH 3 und für 2- Chloro- 1,4- BQ bei pH 5.

Die Werte für die pH- Optima der rekombinanten Enzyme sind unter Abschnitt 4.3.2 dargestellt. Sie weisen signifikante Ähnlichkeit auf. Für den Elektronenakzeptor Ferrocenium zeigt sich eindeutig ein scharfes Aktivitätsmaximum im basischen Bereich (*Aspergillus nidulans*: pH 8,5, *Pichia pastoris*: pH 8). Für 1,4- BQ zeigt die *AmPDH* zwei pH- Optima, eines im sauren und eines im basischen Bereich. Da sich herausstellte, dass 1,4- BQ im unteren pH- Bereich stabiler ist, wurden alle kinetischen Daten bei saurem pH- Wert gemessen (*AmPDH* aus *Aspergillus nidulans*: pH 2, *AmPDH* aus *Pichia pastoris*: pH 2). Mit 2- Chloro- 1,4- BQ zeigen beide rekombinanten PDHs über einen weiteren pH- Bereich relativ hohe Aktivität. Die Maximalwerte sind für *AmPDH* aus *Aspergillus nidulans* und *AmPDH* aus *Pichia pastoris* bei pH 5 erreicht.

Nach der Ermittlung der pH- Optima wurden kinetische Konstanten für ausgewählte Elektronenakzeptoren (Ferrocenium, 1,4- BQ und 2- Chloro- 1,4- BQ) aber auch Elektronendonoren (Glukose, Galaktose, Arabinose, Xylose und Laktose) bestimmt. In Bezug auf die Elektronenakzeptorspezifität bzw. Substratspezifität zeigen die untersuchten Enzyme eindeutig Gemeinsamkeiten. Hinsichtlich der Gruppe der Elektronenakzeptoren hält sich die Auswahl bedingt. Es eignen sich Ferrocenium sowie einfache Chinone. Ferrocenium ist mit seinen niedrigen  $K_M$ - und hohen  $V_{max}$ - Werten für beide rekombinanten Enzyme der beste Elektronenakzeptor, gefolgt von 1,4- BQ und 2- Chloro- 1,4- BQ. Die Substratspezifität betreffend stellte sich heraus, dass Monosaccharide bevorzugt werden. Aus Tabelle 17 wird klar, dass Galaktose und Laktose im Vergleich zu Glukose, Arabinose und Xylose relativ hohe  $K_M$ - und niedrige  $V_{max}$ - Werte aufweisen. Im Allgemeinen zeichnen sich beide rekombinanten Enzyme durch eine breite Substratspezifität aus, vergleichbar mit der, der Wildtyp PDH. *Agaricus meleagris* PDH wird durch eine weitgehende Substratspezifität charakterisiert. Substrate wie Glukose, Galaktose und Arabinose werden

bevorzugt. Diese sind Bestandteile von Hemicellulose [SYGMUND et al., 2008]. Aldosen werden Hexosen vorgezogen [SEDMERA et al., 2004].

## 6. Schlussbetrachtung

Ziel dieser Diplomarbeit war die Kultivierung, Reinigung und Charakterisierung zweier rekombinanter Pyranose Dehydrogenasen aus dem Pilz *Aspergillus nidulans* und der Hefe *Pichia pastoris*. Anschließend sollten die Enzyme bezüglich ihrer Eigenschaften miteinander verglichen werden. Auch ein Vergleich zur bereits charakterisierten PDH aus *Agaricus meleagris* sollte hergestellt werden.

Die Kultivierung der *A. meleagris* PDH stellte sich als sehr langwierig und nicht besonders ertragreich heraus [Sygmund et al., 2008]. Die Produktion der rekombinanten Enzyme war im Vergleich dazu einfacher. Die Kultivierungs- bzw. Fermentationsdauer beider Organismen, sowohl des *Aspergillus nidulans* als auch der *Pichia pastoris*, war viel kürzer und effizienter. Besonders die Fermentation der *Pichia pastoris* war zielführend und erreichte eine hohe Enzymausbeute.

Die Reinigung der rekombinanten Enzyme wurde in mehreren Schritten vollzogen: Ammonsulfatfällung, AIEX, HIC, GF. Die Reinigung der *AmPDH* aus *Aspergillus nidulans* stellte sich etwas problematischer dar. Durch die faserartige Beschaffenheit des Pilzes ergaben sich Schwierigkeiten beim Auftragen des Rohextrakts auf die Säule. Die *AmPDH* aus *Pichia pastoris* hingegen konnte ohne Hindernisse gereinigt werden.

Die reinen Enzyme wurden dann hinsichtlich ihrer Eigenschaften verglichen. Es wurden pH- Optima und kinetische Konstanten bestimmt.

Hinsichtlich der Gruppe der Elektronenakzeptoren eignen sich Ferrocenium und einfache Chinone.

Beide Enzyme zeigen eine breite Substratspezifität, wobei Monosaccharide bevorzugt werden. Die Umsatzraten der Glukose und Galaktose sind im Vergleich zur Laktose viel höher.

Die PDH ist ein vielversprechender Biokatalysator für verschiedene enzymatische Isomerisierungsreaktionen von Kohlehydraten. Die industrielle Verwendung der Pyranose Dehydrogenase beansprucht ein effizientes aber auch ökonomisch rentables Produktionssystem mit hohen Umsatzraten. Dazu

sind weitere Untersuchungen hinsichtlich struktureller und katalytischer Eigenschaften notwendig, wofür sich die *AmPDH* aus *Pichia pastoris* eignet.

## 7. Zusammenfassung

Laktose, eines der wesentlichsten Bestandteile der Molke, fällt bei der Herstellung von Milchprodukten als Abfallprodukt an. Vielversprechende Möglichkeiten zur Verwertung der Laktose bietet das Enzym PDH (Pyranose Dehydrogenase, EC 1.1.99.29). Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung rekombinanter *AmPDH* aus *Aspergillus nidulans* und aus *Pichia pastoris*, neuen Biokatalysatoren zur enzymatischen Herstellung von Laktulose und Laktobionsäure.

Bei der Kultivierung der *AmPDH* aus *Aspergillus nidulans* konnten Ausbeuten von über 5 U/ml erreicht werden. Die Herstellung der rekombinanten *AmPDH* mit *Pichia pastoris* war besonders erfolgreich. Bei der Fermentation wurden bis zu 20 U/ml erzielt. Die anschließende Reinigung erfolgte in mehreren Schritten: Ammonsulfatfällung, Anionenaustauscherchromatographie, Hydrophobe Interaktionschromatographie und Gelfiltration.

Die *AmPDH* aus *Aspergillus nidulans* zeigt ein Molekulargewicht von 67 kDa, die *AmPDH* aus *Pichia pastoris* ist mit 75 kDa etwas größer (ermittelt anhand der SDS-Page). Letztere weist auch einen höheren Zuckeranteil und deutlich mehr Isoformen auf.

Beide rekombinanten PDHs zeichnen sich durch eine breite Substratspezifität aus. Bevorzugt werden Monosaccharide.

Hinsichtlich der Gruppe der Elektronenakzeptoren hält sich die Auswahl bedingt. Es eignen sich Ferrocenium sowie einfache Chinone.



## 8. Summary

Lactose is among the most abundant carbohydrates. Its principal source is whey, a by-product in the dairy industry. New recycling processes and products based on lactose are under way to improve its total market. The enzyme PDH (pyranose dehydrogenase, EC 1.1.99.29) shows a great promise for carbohydrate conversions.

The principle aim of this work was the characterization of two recombinant enzymes from two different sources, once from *Aspergillus nidulans* and once from *Pichia pastoris* for the enzymatic synthesis of lactulose and lactobionic acid.

The cultivation of *Aspergillus nidulans* reached an enzyme- yield of about 5 U/ml, the fermentation of *Pichia pastoris* achieved 20 U/ml. Purification to a high homogeneity was obtained by ammonium sulphate precipitation, ion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography and gelfiltration.

The PDH was determined to be a glycosylated monomer. The *Aspergillus nidulans* AmPDH reveals a molecular weight of 67 kDa. The *Pichia Pastoris* AmPDH shows 75 kDa (reviewed by SDS- Page). The sugar content of the AmPDH from *Pichia pastoris* is higher than the sugar content for the *Aspergillus nidulans* AmPDH.

Both enzymes show a broad sugar specificity. Monosaccharides are preferred substrates. Regarding the electron acceptors they are restricted. Ferrocenium and simple quinones are compatible.





## 9. Literaturverzeichnis

1. AIDER M, DE HALLEUX D. Isomerization of lactose and lactulose production: review. *Trend in Food Science and Technology*, 2007; 18: 356-364.
2. BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
3. BUCHHOLZ K, SEIBEL J. Industrial carbohydrate biotransformations. *Carbohydrate Research*, 2008; 343: 1966-1979.
4. GAVRILESCU M, CHISTI Y. Biotechnology- a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*, 2005; 23: 471-499.
5. GERLACH S. Wirkung eines Bifidojoghurts mit Laktulose und eines konventionellen Joghurts auf Darmphysiologie und bakterielle Metaboliten als Risikomodulatoren der Kolonkarzinogenese sowie Darmflora und Blutlipiden bei gesunden Erwachsenen. Justus- Liebig- Universität Giessen, Dissertation 2007.
6. GIBSON G R, ROBERFROID M B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 1995; 125: 1401-1412.
7. Internet:  
<http://www.mbmp.ruhr-uni-bochum.de/imperia/md/images/luebben/pichia-ausschnitt.gif> (29.September 2009)
8. Internet:  
<http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/nidulans1.gif> (2.September 2009)
9. Internet:  
<http://class.fst.ohio-state.edu/FST605/images/Lactose-1.gif> (4. August 2009)

10. Internet:

[http://www.fungaljungal.org/guide/pages/Agaricus\\_meleagris\\_jpg.htm](http://www.fungaljungal.org/guide/pages/Agaricus_meleagris_jpg.htm) (1. August 2009)

11. KONTULA P, SUIHKO M.-L, VON WRIGHT A, MATTILA-SANDHOLM T. The effect of lactose derivatives on intestinal lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 1999; 82: 249-256.

12. KUJAWA M, VOLC J, HALADA P, SEDMERA P, DIVNE C, SYGMUND C, LEITNER C; PETERBAUER C, HALTRICH D. Properties of pyranose dehydrogenase purified from litter-degrading fungus *Agaricus xanthoderma*. *FEBS J.*, 2007; 274: 879-894.

13. LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227: 680-685.

14. LICHTENTHALER W F, PETERS S. Carbohydrates as green raw materials for the chemical industry. *Comptes Rendus Chimie*, 2004; 7: 65-90.

15. LUBERTOZZI D, KEASLING J D. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnology Advances*, 2009; 27: 53-75.

16. MATHÄ R. Pyranose Dehydrogenase aus *Agaricus xanthoderma*: Reinigung Charakterisierung und technologische Anwendung zur Herstellung von Laktulose. BOKU Wien, Diplomarbeit 2007.

17. MONYNIHAN P J, RUSSEL R R B. Non digestible oligosaccharides: healthy food for the colon? *Proceedings of the International Symposium, Wageningen, Netherlands*, 1997; 57-66.

18. MÜLLER F. Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung der Sterolglykosyltransferase aus *Pichia pastoris*, 1999.
19. OLE K, VEDEL BORCHERT T, CRONE FUGLSANG C. Industrial enzyme applications. *Current opinion in Biotechnology*, 2002; 13: 345-351.
20. PLANTZ B A, SINHA J, VILLARETE L, NICKERSON K W, SCHLEGEL VL. *Pichia pastoris* fermentation optimization: energy state and testing a growth-associated model. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006; 72: 207-305.
21. SAARELA M, HALLAMAA K, MATTILA-SANDHOLM T, MÄTTÖ J. The effect of lactose derivatives lactulose, lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *International Dairy Journal*, 2003; 13: 291-302.
22. SEDMERA P, HALADA P, PETERBAUER C, VOLC J. A new enzyme catalysis: 3,4-oxidation of some aryl [beta]-D-glycopyranosides by fungal pyranose dehydrogenase. *Tetrahedron Lett.*, 2004; 45: 8677-8680.
23. STROHMAIER W. Lactulose: Status of health-related applications. *International Dairy Federation*, 1998; 9804: 262-271.
24. SYGMUND C, KITTL R, VOLC J, HALADA P, KUBATOVA E, HALTRICH D, PETERBAUER C K. Characterization of pyranose dehydrogenase from *Agaricus meleagris* and its application in the C-2 specific conversion of D-galactose. *Journal of Biotechnology*, 2008; 133: 334-342.
25. VOLC J, KUBATOVA E, WOOD D A, DANIEL G. Pyranose 2-dehydrogenase, a novel sugar oxidoreductase from the basidiomycete fungus *Agaricus bisporus*. *Arch. Microbiol.*, 1997; 167: 119-125.

26. VOLC J, SEDMERA P, HALADA P, PRIKRYLOVA V, DANIEL G. C-2 and C-3 oxidation of D-Glc, and C-2 oxidation of D-Gal by pyranose dehydrogenase from *Agaricus bisporus*. Carbohydrate Research, 1998; 310: 151-156.
27. VOLC J, KUBATOVA E, SEDMERA P, HALTRICH D. Screening of basidiomycete fungi for the quinone-dependent sugar C-2/C-3 oxidoreductase, pyranose dehydrogenase, and properties of the enzyme from *Macrolepiota rhacodes*. Arch. Microbiol., 2001; 176: 178-186.
28. VOLC J, SEDMERA P, HALADA P, DWIVEDI P, COSTA-FERREIRA M. Conversion of D-Galactose to D-threo-hexos-2, 3-diulose by fungal pyranose oxidase. J. Carbohydr. Chem., 2003; 207-216.
29. VOLC J, SEDMERA P, KUJAWA M, HALADA P, KUBATOVA E, HALTRICH D. Conversion of lactose to [beta]-galaktopyranosyl-(1→4)-D-arabino-hexos-2-ulose-(2-dehydrolactose) and lactobiono-1,5-lactone by fungal pyranose dehydrogenase. Journal of Molecular Catalysis, 2004; 30: 177-184.
23. ZUNDERT M, HOFFMANN R. Lactose: a by-product turns into a main ingredient: Lactose derivatization. Carbohydrates in Europe, 1999; 25: 28-31.

*„Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.“*

# Doris Gschnitzer

## *Curriculum vitae*

Geburtsdatum	03.10.1982
Geburtsort	Sterzing
wohnhaft in	Wien
Staatsbürgerschaft	Italien

### **Ausbildung**

---

08/2008	Beginn der Diplomarbeit zum Thema „Heterologe Produktion rekombinanter Pyranose Dehydrogenase: Ein neuartiger Biokatalysator zur Synthese von Laktulose und Laktobionsäure“ an der <i>Universität für Bodenkultur Wien</i> unter der Betreuung von Univ. Prof. Dipl.- Ing. Dr. Dietmar Haltrich
12/2005	Beginn des 2. Studienabschnitts mit dem Wahlschwerpunkt Ernährung und Umwelt an der <i>Universität Wien</i>
12/2005	Abschluss der ersten Diplomprüfung
10/2002	Beginn des Studiums Ernährungswissenschaften an der <i>Universität Wien</i>
07/2002	Matura an der deutschsprachigen Lehrerbildungsanstalt „Josef Gasser“, Brixen, Italien

### **Praktika**

---

02/2007 – 03/2007	<i>Universität Wien, Institut für Ernährungswissenschaften</i> Praktikantin unter der Betreuung von Dr., Ass. Prof. Petra Rust
06/2008 – 08/2008	<i>Universität für Bodenkultur Wien</i> Praktikantin unter der Betreuung von Univ. Prof. Dipl.- Ing. Dr. Dietmar Haltrich

### **Sprachliche Kenntnisse**

---

Deutsch	Muttersprache
Italienisch	Fließend in Wort und Schrift
Englisch	Fließend in Wort und Schrift