

**Untersuchung zur Produktion und gerichteten
Immobilisierung einer Alginat Lyase aus *Sphingomonas sp. A1***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dipl.-Biol. Christian Beyerodt
geboren am 15.12.1982 in Halle an der Saale

Halle (Saale) 2015

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. Markus Pietzsch
2. Prof. Dr. Reinhard Neubert
3. Prof. Dr. Christoph Syldatk

Tag der öffentlichen Verteidigung: 30.03.2016

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Christian Beyerodt, dass ich die vorliegende Arbeit - mit Ausnahme der aufgeführten Personen, Unterlagen bzw. Literaturstellen - selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe,

Halle, Datum

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe „Aufarbeitung biotechnischer Produkte“ des Institutes für Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Viele Menschen haben mich während dieser Zeit unterstützt und dazu beigetragen, dass ich diese Zeit der Promotion als einen positiven Lebensabschnitt in Erinnerung behalten werde. Diesen Personen möchte ich im Folgenden danken.

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Markus Pietzsch für das entgegengebrachte Vertrauen, mir das Thema zu überlassen, bedanken. Auch danke ich für die vielen konstruktiven Diskussionen, Kritiken und Hilfestellungen, welche diese Arbeit erst ermöglichten.

Weiterhin danke ich der Firma Lanxess, im speziellen Frau Dr. Hermsdorf und Herrn Dr. Schellenberg. Das interdisziplinäre Projekt wurde die Grundlage für meine Forschungen.

Ich danke natürlich auch der gesamten Arbeitsgruppe „AG-Pietzsch“ für die schöne Zeit und die zahlreichen Aktivitäten neben der Arbeit. Die Sommerfeste waren immer ein riesen Spaß. Im Besonderen danke ich Frau Dr. Seifert für das mühevollen Korrekturlesen und die vielen anregenden Diskussionen. Einen ganz besonders herzlichen Dank verdient mein Mitpromovent Uwe Hildebrandt. Mit ihm wurde es nie langweilig und unsere gemeinsame Zeit bleibt unvergessen.

Ich möchte meinen Eltern, Großeltern und meinem Bruder für das Vertrauen und die ständige Unterstützung während der ganzen Zeit danken.

Abschließend danke ich meiner Frau Konstanze, ohne ihre Kraft und Motivationskünste hätte ich diese Arbeit nie geschafft.

„Da steh ich nun, ich armer Tor und bin so
klug als wie zuvor.“

Johann Wolfgang von Goethe

Für meine Frau Konstanze.

Inhaltsverzeichnis und Abkürzungen

Inhaltsverzeichnis

Selbstständigkeitserklärung	2
Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis und Abkürzungen	6
Inhaltsverzeichnis	6
Abkürzungen	10
1 Einleitung und Zielsetzung	13
1.1 Stand des Wissens.....	13
1.1.1 Immobilisierung von Enzymen	13
1.1.2 Anwendung immobilisierter Enzyme	17
1.1.3 Aufbau und Eigenschaften von Biofilmen.....	18
1.1.4 Reverse Osmose Membranen	20
1.1.5 Modellenzym - Alginat Lyase	23
1.2 Motivation	25
1.3 Zielsetzung	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Chemikalien.....	26
2.2 Geräte	28
2.3 Puffer.....	29
2.4 Inkubationskammern	31
2.4.1 Inkubationskammer für die Modifikation der RO-Membran	31
2.4.2 Inkubationskammern für Glasobjektträger	31
2.5 Träger für die Immobilisierung	32
2.6 Analytik.....	32
2.6.1 Untersuchung der Löslichkeit der Proteine	32
2.6.2 Reinheitsbestimmung von Proteinen mittels SDS-PAGE	33
2.6.3 Färbung von SDS-PAGE Gelen mittels Coomassie	34
2.6.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	35
2.6.5 Bestimmung der Aminogruppendichte mittels o-Phthaldialdehyde.....	36
2.6.6 Bestimmung der Aminogruppendichte mittels Sulfo-LC-SPDP.....	38
2.6.7 Bestimmung der Carboxylgruppeneichte mittels Toluidinblau O	39
2.7 Bestimmung der Alginat Lyase Aktivität.....	41
2.7.1 Aktivität der löslichen Alginat Lyase	41
2.7.2 Bestimmung der Alginat Lyase Aktivität unter salinen Bedingungen (lösliches Enzym)	41

2.7.3	Aktivität der Alginat Lyase auf RO-Membranen	41
2.7.4	Bestimmung der Alginat Lyase Aktivität auf <i>Activated Thiol Sepharose</i> TM 4B42	41
2.7.5	Bestimmung der Alginat Lyase Aktivität auf <i>Chelating Sepharose</i>	42
2.7.6	Bestimmung der Stabilität der Alginat Lyase auf porösen Trägern	42
2.7.7	Bestimmung der Alginat Lyase Aktivität auf Glasobjektträgern	43
2.8	Molekularbiologische Arbeiten	44
2.8.1	Primer	44
2.8.2	Plasmidpräparation	44
2.8.3	Horizontale Agarose-Gelelektrophorese	44
2.8.4	Sequenzierung und Synthese von Plasmid-DNA	45
2.8.5	Transformation durch Hitzeschock	45
2.8.6	Kryokulturen	46
2.8.7	Reinigung von PCR-Produkten und Restriktionsverdauen	46
2.8.8	Generierung von Cystein-Varianten	46
2.8.9	Kolonie-PCR	47
2.9	Zellkultivierung	48
2.9.1	Medien zur Kultivierung von <i>E.coli</i> Zellen	48
2.9.2	Expression der Alginat Lyase in <i>E.coli</i> auf LB-Medium	49
2.9.3	Expression des Zielenzym auf GB-Medium	50
2.10	Zellaufschluss und Reinigung der Alginat Lyase	50
2.10.1	Zellaufschluss	50
2.10.2	Reinigung der Alginat Lyase mittels IMAC	51
2.11	Sprühtrocknung der Alginat Lyase	52
2.12	Größenausschlusschromatographie (SEC)	52
2.13	Immobilisierung der Alginat Lyase	53
2.13.1	Immobilisierung via His-tag an <i>Chelating Sepharose</i>	53
2.13.2	Immobilisierung an <i>Activated Thiol Sepharose</i> TM 4B via Disulfidbrücken	54
2.13.3	Immobilisierung an Maleinimid-funktionalisierte Objektträger	56
2.13.4	Immobilisierung an Kupfer-funktionalisierte Objektträger	57
2.13.5	Immobilisierung via His-tag an RO-Membranen	57
2.13.6	Immobilisierung via Disulfidbrücken an RO-Membranen	59
3	Ergebnisse	61
3.1	Produktion der Alginat Lyase in <i>E.coli</i>	61
3.1.1	Gendesign für die Alginat Lyase	61
3.1.2	Expression der Alginat Lyase auf LB-Medium	64
3.1.3	Reinigung der Alginat Lyase mittels Affinitätschromatographie	66

3.1.4	Untersuchung zur Anpassung der Kultivierung für ein <i>Upscaling</i> der Enzymproduktion	69
3.2	Charakterisierung der Alginat Lyase	70
3.2.1	Bestimmung der kinetischen Parameter der Alginat Lyase	70
3.2.2	Aktivität der Alginat Lyase unter salinen Bedingungen.....	72
3.2.3	Stabilität der Alginat Lyase in Abhängigkeit von der Zeit.....	73
3.2.4	Stabilität der Alginat Lyase nach Sprühtrocknung	74
3.3	Untersuchung zur gerichteten Immobilisierung an porösen Trägern	75
3.3.1	Untersuchung zur Immobilisierung über His- <i>tag</i>	76
3.3.2	Untersuchung zur Immobilisierung über Thiolgruppen	76
3.3.3	Untersuchung der Stabilität der Alginat Lyase auf porösen Trägern	81
3.4	Untersuchung zur Immobilisierung an funktionalisierten nichtporösen Oberflächen..	82
3.4.1	Untersuchung zur Kopplung an Kupfer-funktionalisierten Glasoberflächen...	82
3.4.2	Untersuchung zur Immobilisierung an Maleinimid-funktionalisierten Objektträger.....	82
3.5	Untersuchung der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche von RO-Membranen ..	84
3.6	Untersuchungen zur Immobilisierung an RO-Membranen	86
3.6.1	Untersuchung zur Immobilisierung über His- <i>tag</i>	86
3.6.2	Untersuchung zur Immobilisierung über Thiolgruppen	89
4	Diskussion	92
4.1	Produktion und Reinigung der Alginat Lyase	92
4.2	Biochemische Charakterisierung der Alginat Lyase	93
4.2.1	Untersuchung der kinetischen Parameter der Alginat Lyase.....	94
4.2.2	Aktivität der Alginat Lyase unter salinen Bedingungen.....	94
4.2.3	Stabilität der Alginat Lyase unter verschiedenen Lagerungsbedingungen ...	95
4.3	Charakterisierung der Oberfläche von RO-Membranen	96
4.4	Immobilisierung der Alginat Lyase	97
4.4.1	Vorbetrachtungen	97
4.4.2	Kopplung via His- <i>tag</i>	99
4.4.3	Kopplung über Thiolgruppen an Thiolsepharose.....	100
4.4.4	Kopplung an Maleinimid-funktionalisierte Objektträger.....	103
4.4.5	Kopplung an RO-Membran	103
5	Zusammenfassung	105
6	Ausblick.....	107
7	Literatur.....	108
8	Anhang	113
8.1	Sequenzen	113

8.2 Messdaten.....	115
9 Lebenslauf.....	116

Abkürzungen

AlgLys	Alginat Lyase
ATCC	American Type Culture Collection
AU	<i>Absorption Units</i> (engl. Zunahme der Absorption je Minute bei konstanten Bedingungen)
BFM	Biofeuchtmasse
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
BTM	Biotrockenmasse
Chisq	Fehler der Summe der Quadrate (Chi-Quadrat-Verteilung)
Cys	Cystein
CV	Säulenvolumen (engl. <i>column volume</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Desoxyribonucleic acid</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Echerichia Coli</i>
EDC	N-(Dimethylaminopropyl)-N'-Ethylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFB	<i>European Federation of Biotechnology</i>
GA	Glutaraldehyd
His-tag	Histidin-tag
IDA	Iminodiessigsäure (engl. <i>Iminodiacetic acid</i>)
IMAC	Affinitätschromatographie (engl. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	Geschwindigkeitskonstante
k.a.	Keine Angaben
kDa	Kilodalton
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
MOS	Mannuronsäure Oligosaccharide
n. a.	nicht angegeben
n. b.	nicht bestimmt
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NTA	Nitrilotriessigsäure (engl <i>Nitrilotriacetic acid</i>)
OD	Optische Dichte
P	Produkt
PA	Polyamid

PEG	Polyethylenglykol
ppm	Teile einer Millionen (10^{-6}) (engl. <i>parts per million</i>)
PS	Polysulfon
PTFE	Polytetrafluorethylen
rec.	Rekombinant (engl. <i>recombinant</i>)
RO	Reverse Osmose
SEC	Größenausschlusschromatographie (engl. <i>Size exclusion chromatography</i>)
REM	Rasterelektronenmikroskop
Sulfo-LC-	
SPDP	Sulfosuccinimidyl 6-[3'(2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoat
RT	Raumtemperatur
T	Träger
TBO	Toluidinblau O
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
rpm	Umdrehung in der Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
V_{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>

Englische Begriffe, auch wenn es deutsche Äquivalente gibt, werden nach eigenem Ermessen im Text benutzt und kursiv dargestellt. Weiterhin folgen kurze Definitionen der verwendeten Begriffe.

<i>Leaching</i>	Bezeichnet die Aktivität, welche während des Aktivitätsassays, von Immobilisaten abgelöst wird.
<i>Activated Thiol Sepharose™ 4B</i>	Agarose Matrix, welche mit Thiolresten aktiviert wurde.
<i>Chelating Sepharose Fast Flow</i>	Kommerzielle Agarose Matrix, welche mit Iminodiessigsäurereste (IDA) aktiviert wurde, um Nickel-Ionen zu komplexieren und letztlich, mit Histidin- <i>tag</i> modifizierte Proteine zu binden.
<i>Conditioning Film</i>	Bezeichnet die Ablagerung von Biopolymeren, welche der eigentlichen Biofilmbildung vorausgeht.
<i>Biofouling; Fouling</i>	Biofilmbildung auf Oberflächen, z.B. auf Membranfilter oder Rohrleitungen.
<i>Antifouling</i>	Gegen das (<i>Bio</i>) <i>Fouling</i> gerichtet.
<i>Feed-Wasser</i>	Salzwasser, welches dem Reverse Osmose Prozess zugeführt wird.
<i>Multipoint Attachment</i>	Kopplung eines Moleküls über mehrere Bindungen.

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Stand des Wissens

Jede chemische Reaktion in der Natur wird von Enzymen katalysiert. In der Biotechnologie macht man sich die Eigenschaften dieser Biokatalysatoren zunutze. Beispielhaft kann die hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität genannt werden. Daneben bieten die meist sehr milden Reaktionsbedingungen einen weiteren Vorteil gegenüber chemischen Verfahren. Durch Prozessvereinfachungen, Reduktion von Rohstoffen und Einsparung von komplexen Produktaufreinigungsverfahren können die Produktionskosten mit Hilfe von biotechnischen Prozessen reduziert werden. Es gibt viele Anwendungen von Enzymen in der Industrie [Liese et al., 2006]. So wurden z.B. Amylasen zur Stärkespaltung bei der Ethanolherstellung oder Chymosin und Pepsin zum Proteinabbau bei der Produktion von Molkereiprodukten schon im Mittelalter verwendet. In der Neuzeit, mit der Möglichkeit der Produktion und Reinigung von Enzymen, finden sich viele neue Anwendungen. Hier wird sich ihrer Eigenschaft als Synthesekatalysator bedient, indem Produkte wie Medikamente, Feinchemikalien und Vitamine hergestellt werden. Enzyme katalysieren auch den Abbau von diversen Substraten. Die Wirkung von Waschmitteln beispielsweise beruht darauf. Die Verminderung von *Biofouling* oder der Abbau von Biofilm sind weitere Beispiele [Kristensen et al., 2008]. Für die oben beschriebenen Anwendungen von Enzymen sollte auch der ökonomische Aspekt beachtet werden. Die Produktion und Reinigung von Enzymen ist mit der Entwicklung der Biotechnologie im Bereich der Molekularbiologie und Gentechnik effektiv und kostendeckend möglich. Um den Einsatz von Enzymen noch effizienter zu gestalten, wird sich der Immobilisierung der Biokatalysatoren bedient. Dieser Aspekt soll nun im Folgenden näher betrachtet werden.

1.1.1 Immobilisierung von Enzymen

Die Immobilisierung von Enzymen beschreibt den Prozess, in dem der Biokatalysator räumlich fixiert wird. Dadurch ist die Trennung von Produkt und Katalysator gewährleistet. Außerdem zeigt sich oftmals eine Verbesserung der Stabilität und/oder der Katalyseeigenschaften der Enzyme [Rodrigues et al., 2011]. In der Literatur unterscheidet man verschiedene Strategien zur Immobilisierung: Adsorption, kovalente Verknüpfung, Einschluss im polymeren Gel, Membranen oder Kapseln, und die Verknüpfung der Enzyme untereinander. In Abb. 1-1 sind diese schematisch dargestellt.

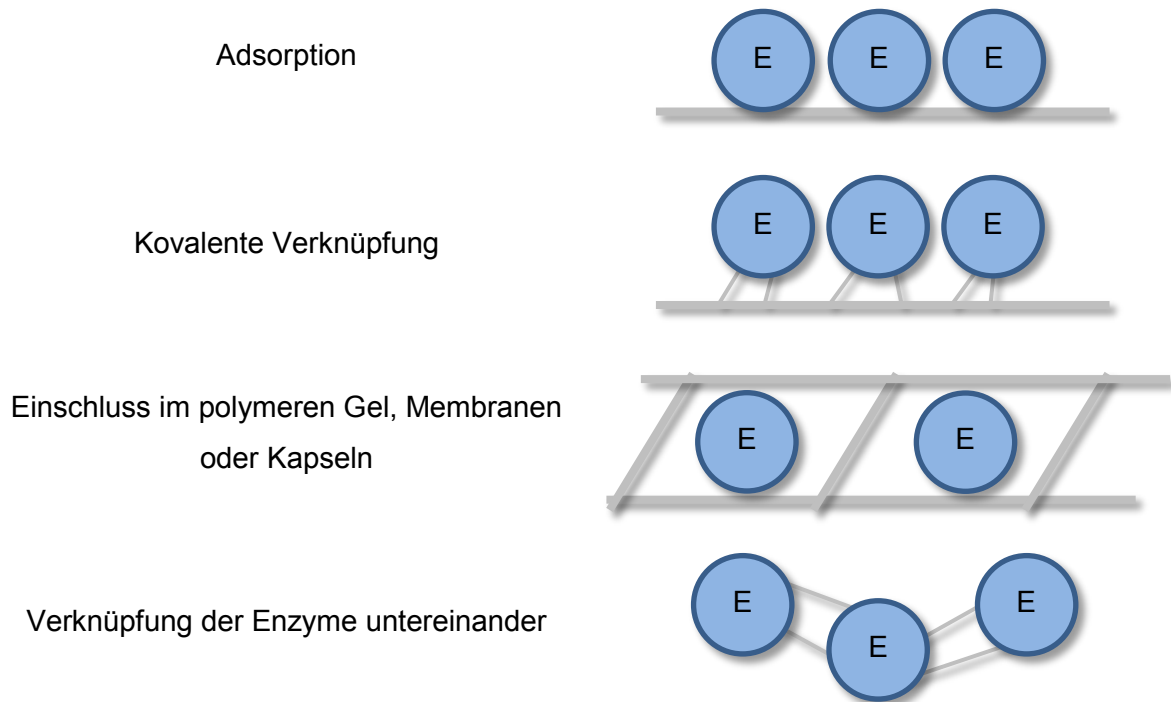


Abb. 1-1 **Schematische Darstellung verschiedener Immobilisierungsstrategien.** E steht für Enzym.

Die am einfachsten umzusetzende Immobilisierungsmethode ist die Adsorption. Bei genügend hoher Affinität bindet das Enzym an einen festen Träger. Die Bindung kann auf unterschiedlichen Wechselwirkungen beruhen [Cao, 2006a]:

- Unspezifische physikalische Adsorption (es wirken van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrücken)
- Ionische Bindungen
- Hydrophobe Interaktionen

Vorteile bei dieser Art der Immobilisierung sind die Reversibilität und die einfache Handhabung [Cao, 2006a]. Zudem sind keine chemischen Modifikationen am Enzym nötig [Albayrak und Yang, 2002]. Nachteilig bei dieser Variante der Bindung ist, dass sich das Enzym vom Trägermaterial ablösen kann und somit das *Leaching* oft sehr hoch ist. Dieses Phänomen kann z.B. durch zu hohe oder zu niedrige Ionenstärke oder pH-Wert-Veränderungen ausgelöst werden.

Bei der kovalenten Immobilisierung wird das *Leaching* reduziert, indem zwischen dem Enzym und dem Trägermaterial eine chemische Bindung gebildet wird. Es reagiert meist eine Aminosäureseitenkette des Proteins mit einer funktionellen Gruppe auf dem Trägermaterial. Zusätzlich ist oft eine Aktivierung des Trägers notwendig. Die physikalische Beschaffenheit, wie Porosität, Druckstabilität, Hydrophobizität, Biokompatibilität und die chemische Natur des

Materials, wirken sich generell auf die Enzymeigenschaften, wie Stabilität, Aktivität und Spezifität, aus [Cao, 2006b]. Dabei kann eine erhöhte Stabilität des Enzyms auf Kosten einer herabgesetzten Aktivität entstehen, oder die Substratspezifität ändert sich durch die räumliche Zugänglichkeit des aktiven Zentrums.

Eine weitere Immobilisierungsart ist der Enzymeinschluss. Zur Herstellung wird das Enzym mit einer Matrix, meist einem Gel, in Lösung gebracht. Anschließend wird die Matrix in eine unlösliche Form überführt. Dabei wird die Aktivität in dem Material eingeschlossen. Mit dieser Methode können auch ganze Zellen immobilisiert werden. Dabei gilt es zu beachten, dass das entsprechende Substrat auch in das Material eindringen kann, damit es umgesetzt werden kann. Diese Vorgehensweise ist einfach umzusetzen und effektiv [Cao, 2006c]. Der Einschluss von Tannase in eine Alginat-Matrix ist ein Beispiel für diese Prozedur [Yao et al., 2014]. Dieses Immobilisat wird in der Produktion von grünem Tee verwendet.

Eine spezielle Art von Immobilisierung sind so genannte Membranreaktoren. Dabei dient eine Membran als Träger für Enzyme und separiert zeitgleich das Produkt von den Ausgangsstoffen [Fontananova und Drioli, 2014]. Die enzymatische Trennung von D- und L-Aminosäuren erfolgt beispielsweise auf diesem Weg [Kragl et al., 2005].

Die Verknüpfung vieler Enzymmoleküle untereinander kann ebenfalls zur Immobilisierung genutzt werden. Dabei unterscheidet man in CLEAs (*cross-linked enzyme aggregates* – verknüpfte Enzymaggregate) und CLECs (*cross-linked enzyme crystals* – verknüpfte Enzymkristalle) [Cao et al., 2003].

CLECs entstehen durch die Quervernetzung reiner Proteinkristalle und setzen eine sehr saubere Enzymlösung voraus. Dadurch entstehen sehr robuste Katalysatoren [Margolin, 1996]. Ein Beispiel ist die Bildung von CLECs der Lacase aus *Trametes pubescens* [Patel et al., 2009]. Diese wurde zur enzymatischen Oxidation von Cellulose eingesetzt.

Durch gezielte Fällung und anschließende Quervernetzung von Enzymen können CLEAs erzeugt werden [Cao et al., 2000]. Neben der Immobilisierung selbst bietet diese Methode die Möglichkeit verschiedene Stoffe einzubringen bzw. zu co-immobilisieren, das zur Stabilität in organischen Lösungen führen kann [Mateo et al., 2006]. Beide Anwendungen haben den Vorteil, dass kein separater Träger notwendig ist. Zudem können durch die eingeschränkte strukturelle Mobilität der Enzyme Stabilisierungseffekte erreicht werden [Cao et al., 2003].

Die bisher beschriebenen klassischen Strategien beruhen in den meisten Fällen auf der ungerichteten Kopplung des Enzyms an den Träger. Das heißt, die räumliche Anordnung des Enzyms an die Matrix wird nur passiv durch die Auswahl des Trägermaterials und den Bedingungen beeinflusst.

Nach Analyse eines Zitierungsreports der Datenbank Web of ScienceTM finden sich ab 1975 erste Publikationen zum Thema gerichtete Immobilisierung. Ab 1990 finden sich bereits min-

desten 60 Publikationen pro Jahr zu diesem Thema. Im Jahr 2014 waren es über 500 Literaturstellen. Bei der gerichteten Immobilisierung, kann durch Einführen von *tags* oder spezifischen chemischen Modifikation am Protein der Kopplungspunkt festgelegt und so die Ausrichtung des Biokatalysators gesteuert werden [Camarero, 2008]. In Abb. 1-2 sind die gerichtete und ungerichtete Immobilisierung schematisch gegenüber gestellt.

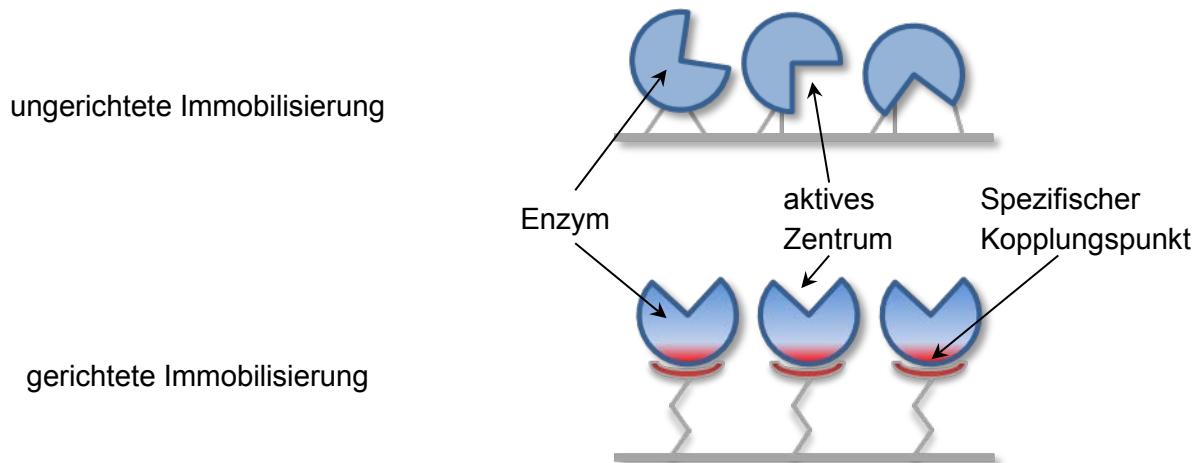


Abb. 1-2 **Schema zur Unterscheidung zwischen gerichteter und ungerichteter Immobilisierung.**

Bei der ungerichteten Immobilisierung kann ein Aktivitätsverlust oder eine Inaktivierung des Enzyms durch eine falsche Orientierung auf der Oberfläche des Trägers nicht ausgeschlossen werden. Dieses Problem wird mit dem Konzept der gezielten Orientierung des Enzyms umgangen. Zusätzlich kann, in manchen Fällen, durch die Festlegung des Kopplungspunktes eine Stabilisierung des Biokatalysators erreicht werden [Mansfeld et al., 1999]. Um die Orientierung zu erreichen, stehen viele Strategien zur Verfügung. Die Arbeitsgruppe um J. Camarero beschäftigt sich mit der Kopplung von Proteinen mit einer C-terminalen α -Thioester-Gruppe. Der peptidbasierende Träger besitzt eine N-terminale Cysteingruppe. Es bildet sich zunächst ein Intermediat, das spontan eine Peptidbindung ausbildet und somit die kovalente Kopplung realisiert [Camarero, 2008].

Ein weiterer Ansatz, zur gerichteten Kopplung, ist eine modifizierte Staudinger Ligationsreaktion. Dabei reagiert ein Protein mit Azid-Funktion mit einem Phosphan auf der Trägeroberfläche. Es entsteht eine Amid-Bindung [Kohn und Breinbauer, 2004]. Proteine können auch über Azid- und Alkyl-Funktionen mithilfe der so genannten „Click“-Chemie an Träger geknüpft werden. Hierbei handelt es sich um eine Kupfer-katalysierte Cycloaddition-Reaktion [Lin et al., 2006]. Alle drei Methoden setzen verschiedene chemische Modifikation des Proteins voraus; beziehungsweise wird die Azid-Funktion, im Fall der Staudingerreaktion, durch eine nicht-natürliche Aminosäure in das Protein eingebracht.

Durch die Entwicklung der Gentechnik in den vergangenen 20 Jahren ergeben sich zusätzliche Möglichkeiten, gezielte Veränderungen eines Proteins vorzunehmen, um diese zur Immobilisierung zu nutzen. Neben der klassischen Klonierung, um diverse *tags* einzuführen, ist es heute durch moderne PCR-Techniken möglich, an jedem Punkt des Proteins *tags* oder Aminosäuren mit reaktiven Seitenketten (z.B. Cystein) einzuführen. Beispielsweise kann die Bindung an Cellulose-Träger durch Einführen der Cellulosebindedomäne in ein Protein realisiert werden [Santiago-Hernández et al., 2006]. Die Reinigung von Proteinen erfolgt häufig über einen Histidin-*tag* (im folgenden *His-tag* abgekürzt). Histidin-Reste am C- oder N-terminalen Ende der Proteinkette binden unter Ausbildung eines, z.B., Nickel-Chelat-Komplexes an einem Trägermaterial. Diese reversible Kopplung stellt eine Art Immobilisierung dar [Santiago-Hernández et al., 2006]. Ebenfalls reversibel ist die Kopplung des Enzyms über einen oder mehrere Cystein-Reste an einen Träger. Dafür können native Cysteine genutzt werden. Diese müssen zugänglich sein und nicht im aktiven Zentrum liegen. Durch eine gezielte Mutation besteht die Möglichkeit Cysteinreste in das Protein einzufügen und darüber die Immobilisierung zu realisieren [Mansfeld et al., 1999].

Sowohl gerichtete als auch ungerichtete Immobilisierung können zu stabilen Biokatalysatoren auf diversen Trägern führen. Ihr Anwendungspotenzial soll im nächsten Abschnitt erläutert werden.

1.1.2 Anwendung immobilisierter Enzyme

Die Anwendungsmöglichkeiten immobilisierter Enzyme sind sehr vielfältig. Zunächst sollen jedoch die Vor- und Nachteile in

Tabelle 1-1 gegenübergestellt werden.

Tabelle 1-1: Vor- und Nachteile immobilisierter Enzymen für industrielle Anwendungen (adaptiert von [DiCosimo et al., 2013])

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> kontinuierliche und <i>batch</i>-weise Verfahren möglich 	<ul style="list-style-type: none"> Aktivitätsverlust durch Immobilisierung
<ul style="list-style-type: none"> wiederverwendbar 	<ul style="list-style-type: none"> ungünstige Veränderung der kinetischen Eigenschaften
<ul style="list-style-type: none"> erhöhte Stabilität (im Vergleich zum löslichen Enzym) bezüglich Temperatur und pH-Wert 	<ul style="list-style-type: none"> hohe Kosten für Träger und Immobilisierungsreagenzien
<ul style="list-style-type: none"> Trennung des Enzyms vom Produkt 	<ul style="list-style-type: none"> Diffusionslimitierung
<ul style="list-style-type: none"> Co-Immobilisierung mit anderen Enzymen möglich 	<ul style="list-style-type: none"> <i>Fouling</i> möglich

Ein Beispiel für eine erfolgreiche Anwendung ist die Immobilisierung von Glukoseisomerase. Das Enzym katalysiert die Isomerisierung von D-Xylose zu D-Xylulose. Aufgrund des großen Substratspektrums wird zudem die Umwandlung von Glukose in Fructose katalysiert. Die Produktion von Glukose-Fruktose-Sirup, einem typischen Süßungsmittel für Lebensmittel, ist von hoher ökonomischer Bedeutung. Für die Produktion dieses Nahrungsmittelzusatzes wird immobilisierte Glukoseisomerase genutzt. Dabei kommen verschiedene Verfahren zum Einsatz, unter anderem der Einschluss ganzer Zellen, aber auch Membranreaktoren [DiCosimo et al., 2013]. Weitere Beispiele für industrielle Anwendungen sind in Tabelle 1-2 aufgeführt.

Tabelle 1-2: Industrielle Anwendungen von Immobilisierten Enzymen (adaptiert von [DiCosimo et al., 2013])

Immobilisiertes Enzym	Anwendung
Pectin Lyase	Pectin Hydrolyse (Trübstoffe in Fruchtsäften)
Naringinase	Abbau von Bitterstoffen in Säften
β -Glucosidase, α -Arabinosidase, α -Rhamnosidase	Verbesserung von Weinaroma
Verschiedene Lipasen	Enzymatische Interesterifikation zur Herstellung von Ölen und Fetten mit gewünschten Eigenschaften und Reduktion von Transfetten
Verschiedene Lipasen	Produktion von Biodiesel

Die Anwendung von immobilisierten Enzymen zur Vermeidung von Biofilmen auf Oberflächen ist neuartig und industriell wenig umgesetzt. Dies soll Thema des nächsten Abschnitts sein.

1.1.3 Aufbau und Eigenschaften von Biofilmen

Biofilme sind Lebensgemeinschaften verschiedener Mikroorganismen, die sich in einer Polymermatrix auf Oberflächen ansiedeln [Beule, 2007]. Diese extrazelluläre Matrix besteht aus verschiedenen Biomakromolekülen wie Polysacchariden, Nukleinsäuren und Proteinen. Der Anteil an Polymeren kann im Biofilm bis zu 90 % ausmachen [Flemming und Wingender, 2010]. Die Zusammensetzung der Matrix ist von den beteiligten Mikroorganismen abhängig [Sutherland, 2001]. Biofilme sind ubiquitär verbreitet, im Besonderen an Kontaktflächen mit Wasser [Costerton et al., 1999]. Zur Ausbildung dient ein sogenannter *Conditioning Film* als Grundlage. Makromoleküle, wie z.B. Proteine, Polysaccharide oder niedermolekulare Substanzen wie Salze adsorbieren an der Oberfläche und ermöglichen damit das Anheften der

Mikroorganismen [Marshall, 1994]. Der Lebenszyklus eines solchen Biofilms ist in Abb. 1-3 gezeigt.

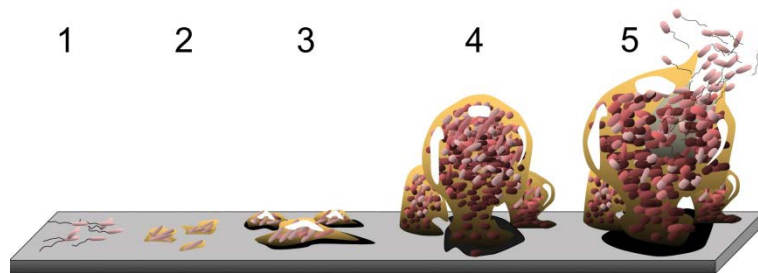


Abb. 1-3 **Biofilmentwicklung.** 1 Initialphase (*Conditioning Film* + erstes Anheften); 2 irreversible Anheftung; 3 und 4 Lebensphase (Vermehrung + Ausbildung der Matrix); 5 Ablösen von Mikroorganismen. Abbildung nach [Monroe, 2007].

Die Bedeutung von Biofilmen muss differenziert betrachtet werden. Sie zeigen positive Eigenschaften z.B. in Form der Normalflora im Gastrointestinaltrakt [Habash und Reid, 1999]. In biotechnologischen Prozessen wie z.B. Abwasserreinigung wird „aktiver“ Schleim eingesetzt und die sessile Form der Bakterien wird hier genutzt, um Schadstoffe aus dem Wasser abzubauen oder herauszuziehen [Huang et al., 2008].

Ein Beispiel für die nachteilige Auswirkung von Biofilmen ist der Bewuchs von Transplantaten, der sehr oft zu Komplikationen bei den betroffenen Patienten führt [Habash und Reid, 1999]. Die Kosten für die Bekämpfung von biofilmassoziierten Krankheiten belaufen sich auf mehrere Milliarden Dollar im Jahr [Post et al., 2004]. Neben der medizinischen Relevanz finden sich weitere Beispiele., wie die Beschädigung von Schiffsrümpfen oder Papiermühlen [Kristensen et al., 2008]. Aufgrund dieser negativen Folgen sind verschiedenste Strategien zur Vermeidung von Biofilmen entwickelt worden. Diese können in chemische, physikalische und biologische Methoden unterschieden werden.

Ein Beispiel für die chemische Biofilmbekämpfung ist die Verbindung Tributylzinn. Diese wurde lange Zeit als Zusatz in Farben für Schiffsanstriche genutzt. Die Löslichkeit in Meerwasser und die toxischen Schäden, welche sie hervorruft, führten allerdings dazu, dass zunehmend andere Substanzen genutzt bzw. gesucht werden, um *Antifouling* Effekte zu erzeugen [Abarzua und Jakubowski, 1995]. Ein weiteres Beispiel für eine chemische Bekämpfung von Biofilmen ist die Behandlung mit Hypochlorid oder Ozon [Cao et al., 2011; Simoes et al., 2010].

Als physikalische Methoden sind Vibration, elektronische Impulse oder auch Strahlung bekannt [Cao et al., 2011]. Auch Veränderungen an der Oberflächenstruktur können zur Verringerung von Biofilmen führen [Banerjee et al., 2010].

Ein relativ neuer Ansatz ist die Verwendung von Enzymen zur Vermeidung von *Fouling*. Enzyme sind in der Lage die Makromoleküle, die zum Anheften der Bakterien notwendig sind, abzubauen. Daneben kann die Matrix eines bestehenden Biofilms durch die Hydrolyse ihrer Bestandteile durch Enzyme zerstört werden [Kristensen et al., 2008]. Ein Beispiel ist die Alcalase, ein kommerziell genutztes Enzym. Dieses kann die Anheftung der Sporen der Grünalge *U. Linza*, der Diatomee *N. perminuta* und der Larve von *B. amphitrite* limitieren [Pettitt et al., 2004]. Diese Protease spaltet spezifisch Peptidbindungen und zeigt ein breites Substratspektrum. Ein Biofilm, gebildet von *P. fluorescens*, kann besser mit Proteasen als mit Amylasen reduziert werden [Molobela, 2010]. DNase I zeigte sich effektiv in der Reduktion eines Biofilmes, gebildet durch *P. aeruginosa* [Whitchurch et al., 2002]. Eine andere Nuclease, sekretiert von *B. licheniformis*, war in der Lage mit einem Fünftel an Enzymkonzentration von DNase I effektiv Biofilm abzubauen [Nijland et al., 2010]. Kohlenhydratspaltende Enzyme wie Dispersin B [Kaplan et al., 2004], Dextranase [Walker et al., 2007] und Cellulase [Loiselle und Anderson, 2003] sind *Antifouling*-wirksam. An den genannten Beispielen wird deutlich, dass ein effektiver Abbau jeglicher Art von Biofilm, am besten mit einem Mix aus verschiedenen Enzymen zu realisieren ist. Die vorangegangenen Beispiele bezogen sich auf Enzyme in Lösungen. Zudem wurden unlängst Enzyme auf Oberflächen immobilisiert, um *Fouling* zu vermeiden. Lysozym, Lysostaphin und Dispersin wurden auf diese Art und Weise mit Erfolg eingesetzt [Cordeiro und Werner, 2011].

1.1.4 Reverse Osmose Membranen

Im vorangegangenen Abschnitt wurde auf die Bedeutung von Biofilmen in industriellen Prozessen hingewiesen. Bei der Entsalzung von Wasser mittels Reverse Osmose Membranen (RO-Membranen) bildet sich mit der Zeit auf der Membranoberfläche ein Biofilm. Obwohl das zugeführte Wasser (*Feed-Wasser*) vorbehandelt wird, lässt sich dieser *Fouling*-Effekt, welcher die Filtrationsleistung der Membran deutlich herabsetzt [Bereschenko et al., 2011], nicht verhindern. Das Prinzip der Reversen Osmose beruht auf dem Rückhalt von Salzen durch eine Polyamidschicht, während das Wasser unter Druck über die Membran geleitet wird [Li und Wang, 2010]. RO-Membranen bestehen aus drei Schichten. In Abb. 1-4 ist der Aufbau einer RO-Membran dargestellt. Die Polyamidschicht wird durch eine Grenzphasenpolymerisation generiert. Dabei reagieren Phenylendiamin und Trimesoylchlorid zu einem vernetzten Polymer. Je nach Vernetzungsgrad kann ein Salzurückhalt bis zu 97 % und höher erreicht werden [Zhao et al., 2012]. Da eine vollständige Auspolymerisierung nicht erreichbar ist, generieren sich auf der Oberfläche der Polyamidschicht (im folgenden PA-Schicht abgekürzt) Carboxyl- und Aminogruppen, welche sich auch teilweise nachweisen lassen [Coronell et al., 2008].

Typischerweise wird die RO-Membran um ein Rohr gewickelt und ein Netz als Abstandhalter (*Spacer*) eingelegt. Das finale Element besteht aus einem weiteren Rohr, welches das vorher beschriebene einfasst. In Abb. 1-5 ist ein solches Element abgebildet.

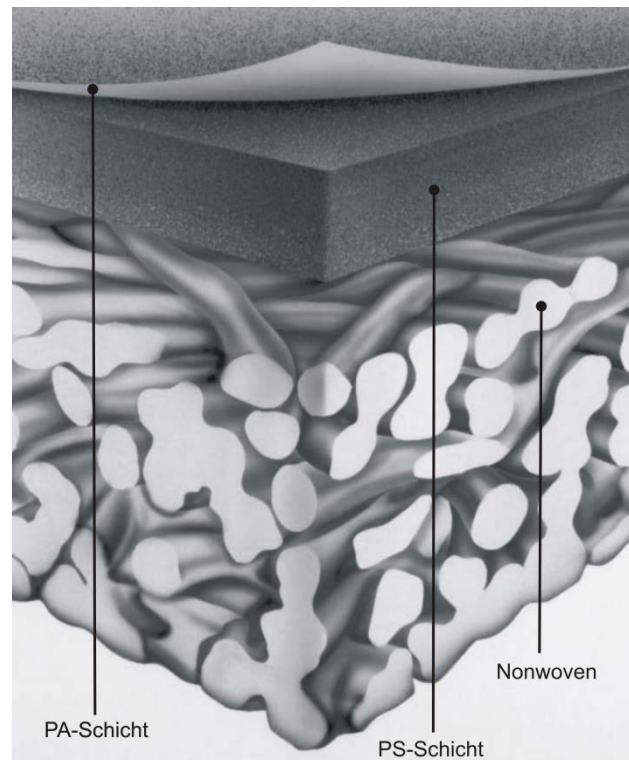


Abb. 1-4 **Schematische Darstellung einer RO-Membran.** PA steht für Polyamid und PS für Polysulfon. Die Darstellung wurde aus [Dow, 1998] entnommen.

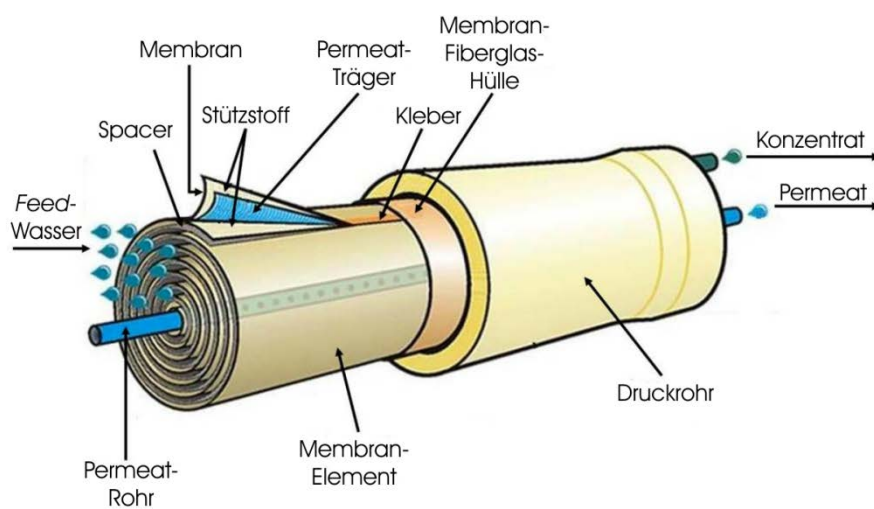


Abb. 1-5 **Schematische Darstellung von einem RO-Element.** Abbildung nach [Interior, 2015].

Die Verwendung der RO-Technik ist weit verbreitet. Sie wird zum Beispiel in der Schifffahrt zur Bereitstellung von Trinkwasser genutzt und auch in Wasseraufbereitungsanlagen. In den Vereinigten Arabischen Emiraten werden ca. 98 % des Trinkwassers durch Entsalzen von Meerwasser gewonnen [Mohamed et al., 2005].

Die Lebensdauer einer Brackwasser RO-Membran wird mit drei bis fünf Jahren angegeben. *Biofouling* kann die Lebenszeit allerdings auf unter zwei Jahre verkürzen [Madaeni et al., 2011]. Momentan gibt es dafür keine zufriedenstellende Lösung [Bereschenko et al., 2008]. Die Idee für die vorliegende Arbeit beruht auf dieser bis jetzt unvermeidbaren Lebenszeitverkürzung von RO-Membranen durch Biofilme. Zunächst wird ein Modellenzym auf die Oberfläche einer RO-Membran immobilisiert, um ein *Antifouling*-Effekt zu erhalten. Die Alginat Lyase als Alginat-abbauendes Enzym ist dafür ein passender Kandidat. Im nächsten Abschnitt soll näher darauf eingegangen werden.

1.1.5 Modellenzym - Alginate Lyase

Alginate ist ein Biopolymer aus Biofilmen, welches gut charakterisiert ist. Es wurde bereits als Modell-Polysaccharid für *Fouling*-Experimente im RO-Bereich eingesetzt [Li et al., 2007]. Alginate ist ein binäres lineares Heteropolymer, bestehend aus Mannuronsäure und Guluronsäure, welche 1→4 o-glykosidisch verknüpft sind. Es gibt drei verschiedene Formen des Alginats: Abschnitte, die nur aus Guluronsäure, Abschnitte, die nur aus Mannuronsäure bestehen, sowie Abschnitte, die beide Monomere enthalten (sogenannte Mischblöcke) [Smidsrød, 1974]. Die chemische Struktur aller drei Formen ist in Abb. 1-6 abgebildet.

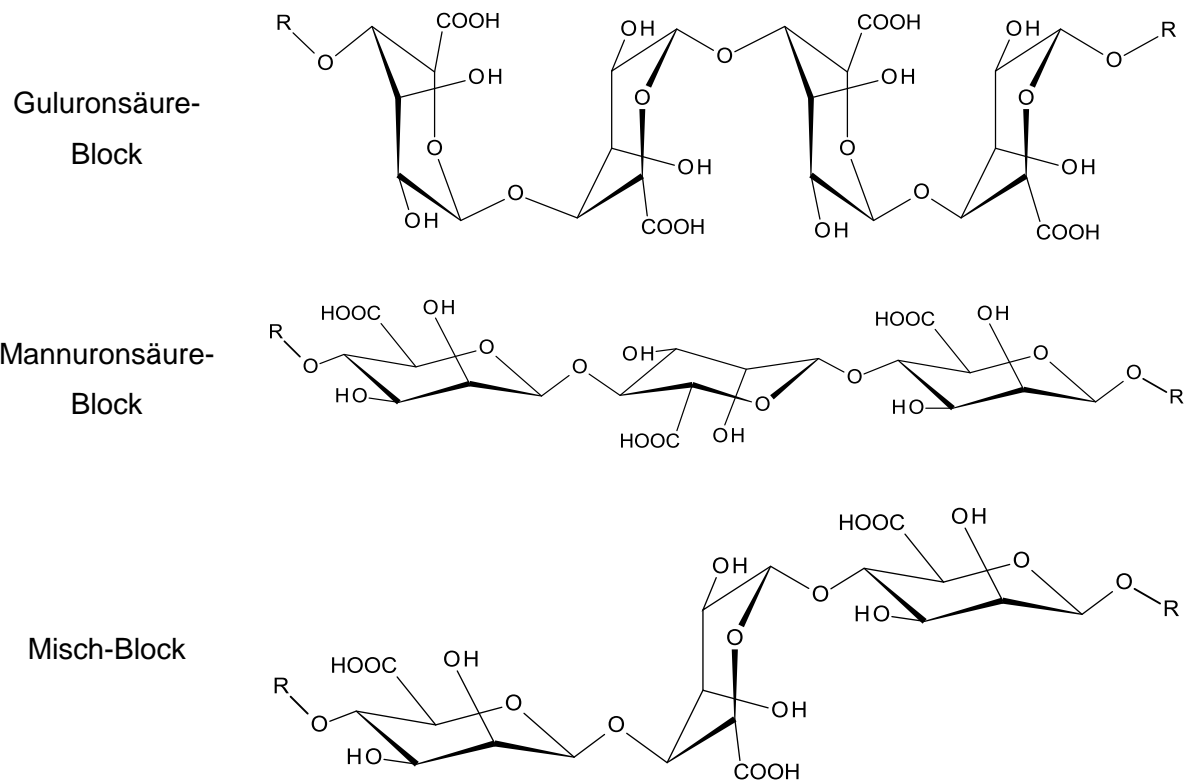


Abb. 1-6 Mögliche Strukturformeln von Alginate in Sesselkonformation.

Alginate kann in Abhängigkeit vom Anteil an Guluronsäure und der Verfügbarkeit von zweiwertigen Ionen, wie Calcium, eine Gelmatrix ausbilden. Dabei bildet sich die sogenannte *Egg-Box*-Struktur aus [Smidsrød, 1974]. Die Depolymerisierung dieses Biomakromoleküls erfolgt nicht durch eine Hydrolysereaktion. Der Abbau wird hingegen durch eine Lyase katalysiert, wobei es zur nicht-hydrolytischen Spaltung unter Ausbildung einer Doppelbindung kommt [Wong et al., 2000]. Diese Reaktion ist in Abb. 1-7 dargestellt.

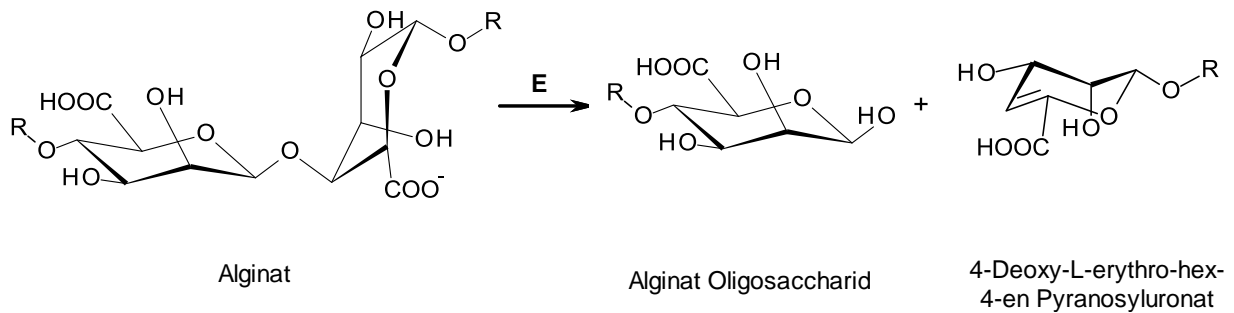


Abb. 1-7 **Reaktionsschema der nicht-hydrolytische Spaltung von Alginat durch eine Alginat Lyase katalysiert.** E kennzeichnet das Enzym, welches hier Alginat Lyase ist.

Der Reaktionsmechanismus folgt einer β -Eliminierungsreaktion in drei Schritten. Zunächst wird das Carboxylat (C6) des Substrats durch Ausbilden einer Salzbrücke und einer Säurefunktion des Enzyms aktiviert. Im zweiten Schritt wird das Proton durch eine Basenfunktion von C5 des Zuckers abstrahiert. Im letzten Schritt wird durch eine konzertierte Säure-Basen-Reaktion die glykosidische Bindung protoniert und damit die Doppelbindung zwischen C4 und C5 geschlossen [Gacesa, 1992]. Alginat Lyasen sind ubiquitär vertreten. Man findet sie beispielsweise in Bakterien aber auch in marinen Algen oder Schnecken [Wong et al., 2000]. In der Online-Datenbank CAZy [Lombard et al., 2014] werden insgesamt 23 Klassen von Polysaccharid Lyasen aufgeführt. Die Unterscheidung erfolgt nach Reaktionsmechanismen und strukturellen Eigenschaften der Enzyme. Die Substratspezifität ist ein weiteres Kriterium. Die Alginat Lyase A1-II' aus *Sphingomonas sp. A1* gehört zur Klasse 7 und zeichnet sich durch ihre geringe Substratspezifität aus, da sie in der Lage ist die drei Typen des Alginats zu spalten (Abb. 1-6) [Ogura et al., 2008]. Die genannte Alginat Lyase ist gut charakterisiert und ihre 3D-Struktur ist ebenfalls bekannt [Ogura et al., 2008]. Diese Kriterien der Alginat Lyase führten zu ihrer Auswahl als Modellenzym für diese Dissertation. Während die ALG-5 aus *Streptomyces sp.* erfolgreich über einen His-tag an magnetische Nanopartikel immobilisiert werden konnte [Shin et al., 2010], ist die Immobilisierung der A1-II' aus *Sphingomonas sp. A1* bisher noch nicht beschrieben.

1.2 Motivation

Biofilme führen zu großen Problemen in der Wasseraufbereitung mit RO-Membranen. Durch die Ansiedelung von Mikroorganismen werden der Fluss und die Filtrationsleistung der Filter gestört. Mit dem Einsatz von Enzymen können Biofilme abgebaut, beziehungsweise deren Bildung reduziert werden. Mit Hilfe der Immobilisierung kann die Langzeitstabilität von Biokatalysatoren erhöht werden. Übliche nicht gerichtete Immobilisierungsverfahren führen oft zu hohen Aktivitätsverlusten. Aus diesem Grund wird untersucht, ob mit rationalen (gerichteten) Immobilisierungsmethoden eine Kopplung des Modellenzym Alginat Lyase möglich ist.

1.3 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die rekombinante Produktion, Reinigung und Modifikation der Alginat Lyase A1-II' aus *Sphingomonas sp. A1*. Diese sollte als Modellenzym an RO-Membranen immobilisiert werden, um Biomakromoleküle effektiv abzubauen und damit die Grundlage für die Anheftung von Bakterien zu vermeiden. Das Enzym sollte mit rationalem Design so modifiziert werden, dass eine zielgerichtete reversible Immobilisierung möglich ist. Dabei wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen sollte der His-tag, welcher der Sequenz des Proteins angehängt wurde, zur Kopplung genutzt werden. Zum anderen sollten mit gerichteter Mutagenese Cystein-Reste in das Protein eingebracht werden und diese als Kopplungspunkte genutzt werden. Zunächst sollte an diversen Trägern die generelle Machbarkeit geprüft werden. Nach erfolgter Immobilisierung sollte die Aktivität des Enzyms auf dem Träger untersucht werden. Anschließend sollte die Immobilisierung auf die RO-Membranen übertragen werden. Ein wichtiger Aspekt war die Untersuchung des Einflusses der Immobilisierungsmethode.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2-1 zusammengestellt.

Tabelle 2-1: Übersicht der verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Reinheit [%]
Aceton	Carl Roth GmbH & Co	7328.2	99,9
Acryl/Bisacrylamid (30 %-ige Lösung)	Applichem	A4983,1000	k.a.
Agar	Carl Roth GmbH & Co	5210.2	k.a.
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Carl Roth GmbH & Co	K298.2	99,5
Ammoniumper- oxidsulfat	Carl Roth GmbH & Co	9592.3	98,0
Ampicillin	Applichem	A0839,0100	k.a.
Brilliant Blau G-250	Carl Roth GmbH & Co	3862.1	k.a.
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co	A512.1	k.a.
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co	A119.1	94,0
Dikaliumhydrogen- phosphat (K ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH & Co	P749.3	99,0
DTT	Carl Roth GmbH & Co	6908.3	99,0
EDTA	Carl Roth GmbH & Co	8043.2	99,0
Essigsäure (100 %-Lösung)	Carl Roth GmbH & Co	3738.2	k.a.
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co	K928.2	k.a.
Ethidiumbromid (1 %-Lösung)	Carl Roth GmbH & Co	2218.1	k.a.
Glutardialdehyd (50 %-Lösung)	Carl Roth GmbH & Co	4995.1	k.a.
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co	3783.4	99,5
Glycin	Carl Roth GmbH & Co	T873.2	98,5
Hefeextrakt I	Carl Roth GmbH & Co	2363.2	k.a.
Hefeextrakt II	OHLY	KAV	k.a.

Imidazol	Carl Roth GmbH & Co	X998.4	99,0
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co	6752.6	99,8
Lysine-NTA	Sigma	14580	97,0
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH & Co	KK36.2	98,5
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	Carl Roth GmbH & Co	P027.2	99,0
Maltodextrin	Fluka	31410	k.a.
Mannuronsäure Oli- gosaccharid	Elicityl	ALG500	k.a.
Methylviolett	Carl Roth GmbH & Co	T123.1	k.a.
Natrium Alginat	Fluka	71238	k.a.
Natrium Cyano- bohrhydrid	Sigma-Aldrich	156159	95,0
Natriumazid (NaN ₃)	Carl Roth GmbH & Co	K305.1	99,0
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co	3957.1	
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co	6771.1	99,0
Natrium-Tetraborat	Sigma-Aldrich	S9640	99,5
Nickelsulfat	Carl Roth GmbH & Co	T111.1	99,0
O-Phthaldialdehyde (OPA)	Sigma-Aldrich	79760	99,0
Pepton	Carl Roth GmbH & Co	8952.4	k.a.
Phosphorsäure (85 %-Lösung)	Carl Roth GmbH & Co	2608.2	k.a.
Salzsäure (37 %-Lösung)	Carl Roth GmbH & Co	4625.2	k.a.
SDS-20 %-Lösung	Carl Roth GmbH & Co	1057.1	k.a.
Sulfo-LC-SPDP	Thermo Scientific	21650	k.a.
TEMED	Carl Roth GmbH & Co	2367.3	99,0
Toluidinblau O (TBO)	Sigma-Aldrich	T3260	80,0
Tris(hydroxymethyl)- aminomethane	Carl Roth GmbH & Co	4855.3	99,9
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co	4227.3	99,0

2.2 Geräte

Alle verwendeten Geräte sind in Tabelle 2-2 beschrieben.

Tabelle 2-2 Übersicht der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Chromatographieanlage	Äkta Explorer	Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden)
Hochdruckhomogenisator	Emulsiflex C5	Avestin Inc. (Ottawa, Kanada)
Magnetrührer	HI 190 M	Hanna Instruments (Singapur)
pH-Meter	inoLab pH Level 2 inoLab pH 730	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (Weilheim)
Photometer	Genesys 6	ThermoSpectronic (Rochester, New York, USA)
Rollermixer	SRT 1	StuartScientific, UK
Schüttelinkubator	Innova 4230	InforsNew Brunswick Scientific (Edison, NJ, USA)
	Multitron II	Infors HT AG (Bottingen, Schweiz)
SDS-PAGE Anlage	Hoefer Mighty Small	Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden)
Spektralphotometer	Ultrospec 3300pro	Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden)
Sterilbank	Biological Safety Cabinet	Nuaire (Plymouth, MN, USA)
Thermoblock mit Aufsätzen für MTPs, 1,5 mL und 2,0 mL Reaktionsgefäße	Thermostat plus	Eppendorf AG (Hamburg)
Thermocycler (PCR)	TProfessional Basic Gradient	Biometra GmbH (Göttingen)
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg)
Ultra-Turrax	Miccra R-T D-1	ART moderne Labortechnik (Mühlheim)
UV-Detektor-Kamera	Syngene Gene Genius Bio Imaging System	VWR International GmbH (Darmstadt)

Vortexer	labDancer S40	VWR International GmbH (Darmstadt)
Waage	Sartorius BP221S Sartorius BL310 Sartorius CP3202 P	Sartorius AG (Göttingen)
Wipptisch	Rocky 1000	Fröbel Labortechnik (Lindau)
Zentrifuge	AvantiTM J-30I Zentrifuge 5810 R Zentrifuge 5415 R	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld) Eppendorf AG (Hamburg)
Zentrifugenrotor	JA-10 JA-30.50	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)

2.3 Puffer

Alle verwendeten Puffer sind in Tabelle 2-3 beschrieben.

Tabelle 2-3: Übersicht der verwendeten Puffer

Bezeichnung	Molarität [mol/L]	pH*	Bemerkungen zur Herstellung
Aufschlusspuffer	0,05 Tris 0,05 NaCl	7,5	
IMAC-Bindepuffer (Tris)	0,05 Tris 0,05 NaCl	7,5	
IMAC-Bindepuffer (Phosphat)	0,05 Phosphorsäure 0,05 NaCl	7,5	
IMAC-Elutionspuffer (Tris)	0,05 Tris 0,5 NaCl 0,5 Imidazol	7,5	
IMAC-Elutionspuffer (Phosphat)	0,05 Phosphorsäure 0,5 NaCl 0,5 Imidazol	7,5	
Bindepuffer I	0,05 Tris 0,05 NaCl	7,5	
Elutionspuffer I	0,05 Tris 0,05 NaCl 0,5 Imidazol		

Elutionspuffer II	0,05 Tris	
	0,05 NaCl	
	0,05 DTT	
Hochsalzpuffer	0,05 Tris	7,5
	1,0 NaCl	
Substratpuffer	0,02 Tris	7,5
Lysepuffer	0,05 Tris	8,0
	0,0002 MgCl ₂	MgCl ₂ (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)
	Lysozym	(1 mg/mL)
	Benzonase	Stock: 25 U/μL In Puffer 10 U/mL einstellen
Kopplungspuffer I	0,05 Phosphorsäure	6,0
	0,05 NaCl	
Kopplungspuffer II	0,050 Phosphorsäure	7,2
	0,150 NaCl	
	0,010 EDTA	
Waschpuffer	0,05 Phosphorsäure	7,5
	0,05 NaCl	
TAE	0,40 Tris	8,5
	0,01 EDTA	
	0,20 Essigsäure	

* Soweit nicht anders bemerkt, wurde der pH-Wert immer nach dem vollständigen Lösen aller Feststoffe im Lösungsmittel mit 0,1 - 8 M NaOH oder 0,1 - 4 M HCl eingestellt. Die Abweichung betrug maximal +/- 0,1 pH Einheiten.

2.4 Inkubationskammern

2.4.1 Inkubationskammer für die Modifikation der RO-Membran

Für die Inkubation der RO-Membran mit wässrigen Lösungen wurde eine Inkubationskammer (Edelstahl) gefertigt. Diese erlaubte die spezifische Behandlung einer Seite der eingelegten Membran. Die RO-Membranen sind nicht homogen; sie bestehen aus mehreren Schichten (vgl. 1.1.4). Die Polyamidschicht, welche dem *Feed-Wasser* zugekehrt ist, soll als Immobilisierungsoberfläche dienen. In Abb. 2-1A ist die Inkubationskammer dargestellt. Durch das Auflegen der Dichtung (O-Ring) und das Befestigen des Oberteils wurde gesichert, dass nur eine Membranfläche mit den Lösungen in Kontakt kam. Abb.2-1 B veranschaulicht eine RO-Membran, die für 30 min mit Methylviolett inkubiert wurde. Während die Vorderseite (Polyamidschicht) deutlich gefärbt wurde, trat die Rückseite nicht in Kontakt mit der Färbelösung.

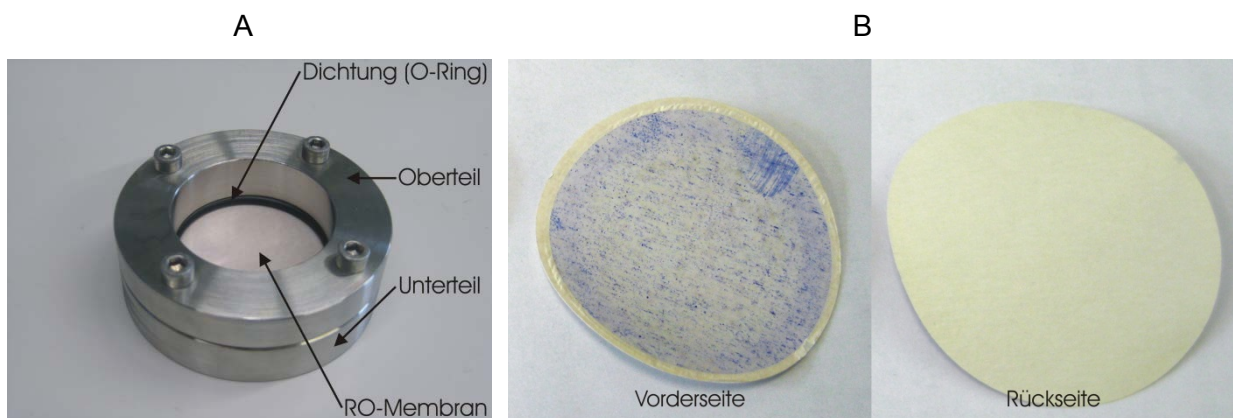


Abb. 2-1 **A. Membran-Inkubationskammer. B. Gefärbte RO-Membran.** Es wurden kreisrunde Stücke (\varnothing 5 cm) ausgestanzt, in die Inkubationskammer (A) eingespannt und 30 Minuten mit Methylviolett angefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung abgenommen und die Membran mehrfach mit Wasser gespült. Nach Trocknung (24 h bei Raumtemperatur) wurde die Membran aus der Halterung entnommen.

2.4.2 Inkubationskammern für Glasobjektträger

Neben der Inkubationskammer für die RO-Membranen wurden auch Kammern für die Inkubation von Objektträgern entwickelt (Abb. 2-2). Sie sollten das Behandeln der Träger mit minimalem Volumen (3-5 mL) ermöglichen.



Abb. 2-2 Inkubationskammer für Glasobjektträger mit drei Reaktionskammern. Der Boden wurde passgenau für klassische Objektträger (76 mm x 26 mm) ausgefräst.

2.5 Träger für die Immobilisierung

Sämtliche verwendete Materialien für die Untersuchung zur Immobilisierung sind in Tabelle 2-4 zusammengestellt.

Tabelle 2-4 Trägermaterialien für Immobilisierung

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Chelating Sepharose Fast Flow	Poröse Beads (Sepharose 6 B, quervernetzt)	Amersham Biosciences
<i>Activated Thiol</i> <i>Sepharose™ 4B</i>	Poröse Beads (Sepharose 4 B)	GE Healthcare
Maleinimid funktionalisierte Glasobjektträger	Glasoberfläche mit PEG-Schicht, Maleinimid funktionalisiert	MicroSurface Inc.
Kupfer funktionalisierte Glasobjektträger	Glasoberfläche mit PEG-Schicht, Kupfer funktionalisiert	MicroSurface Inc.
RO-Membran	Polyamid-Membran	Lanxess

2.6 Analytik

2.6.1 Untersuchung der Löslichkeit der Proteine

Für die Differenzierung in lösliche und unlösliche Proteine wurde nach dem in Abb. 2-3 dargestellten Schema verfahren. Proben aus einer Kultivierung werden als 1/OD Proben bezeichnet. Dafür wurde das Volumen der Probe nach Formel 2-1 berechnet.

$$Volumen_{probe} [mL] = \frac{1}{OD_{600}}$$

Formel 2-1 OD_{600} = Optische Dichte der Probe bei 600 nm zum entsprechenden Kultivierungszeitpunkt.

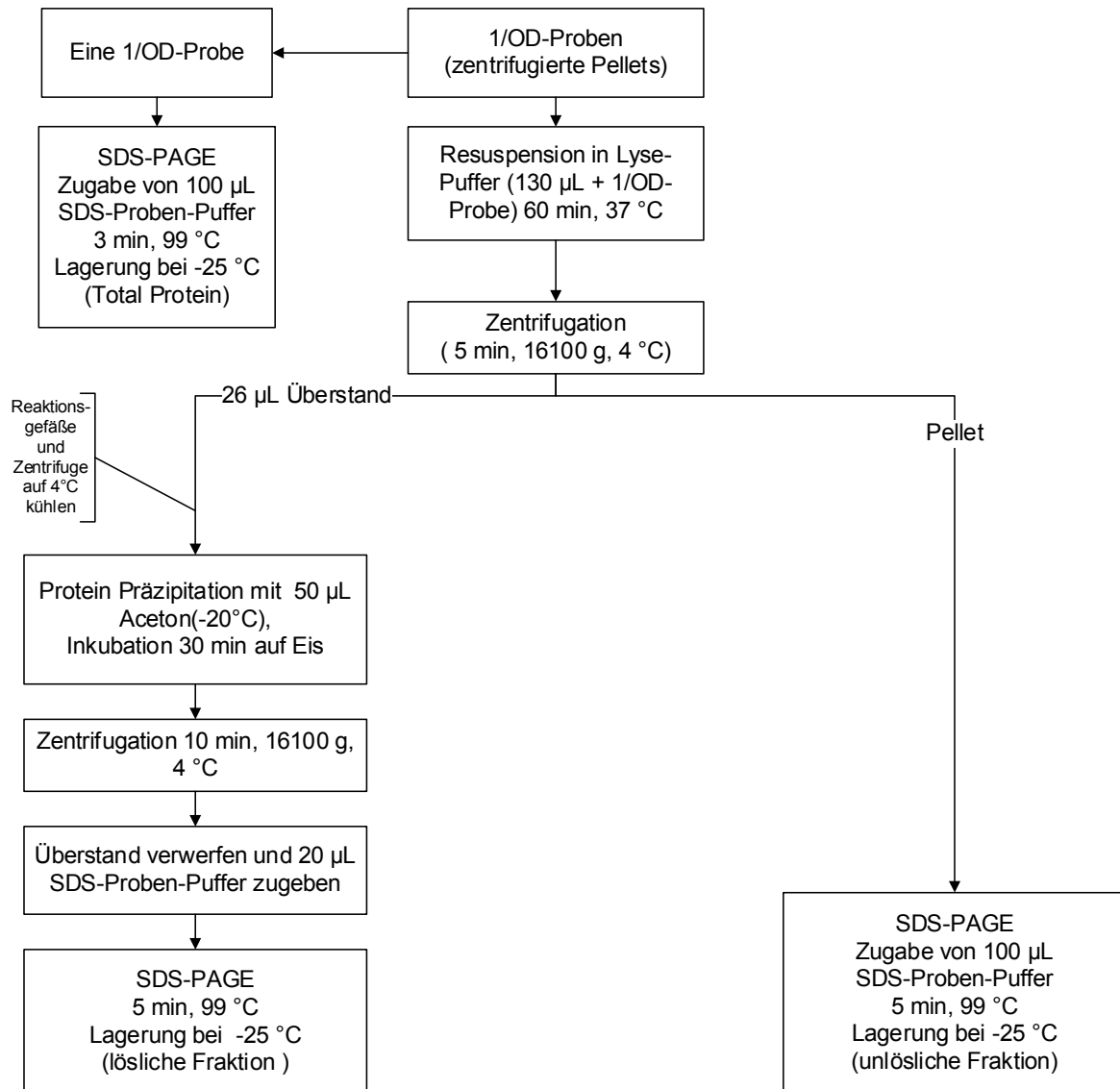


Abb. 2-3 Schema zur Behandlung von 1/OD-Proben zur Differenzierung zwischen löslichen und unlöslichen Proteinen.

2.6.2 Reinheitsbestimmung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Die Herstellung der eingesetzten Trenn- und Sammelgele erfolgte nach Tabelle 2-4. Die erforderlichen Lösungen für die SDS-PAGE wurden wie folgt hergestellt: Der Trenngelpuffer bestand aus 18,18 g Tris, 2 mL SDS-Lösung 20 % (w/v), sowie 100 µL 10 %-iger NaN_3 -

Lösung (w/v) und wurde mit dH₂O auf 80 mL aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,8 eingestellt und die Lösung mit dH₂O auf 100 mL aufgefüllt. Der Sammelgelpuffer bestand aus 6,06 g Tris, 2 mL SDS-Lösung 20 % (w/v), sowie 100 µL 10 % w/v, NaN₃-Lösung und wurde mit dH₂O auf 70 mL aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,8 eingestellt und schließlich mit dH₂O auf 100 mL aufgefüllt. Die 30 %-ige Acryl/Bisacrylamid-Lösung wurde von der Firma Applichem bezogen. Nach dem Lösen in dH₂O wurde mit dH₂O auf 100 mL aufgefüllt. Zur Herstellung der gesättigten APS-Lösung wurde Ammoniumperoxidsulfat in dH₂O gelöst, so dass noch ungelöstes APS am Boden verblieb. Der Probenpuffer setzte sich aus 2,72 g Tris, 15 mL dH₂O, 3 mL 3 M HCl, 25 mL SDS-Lösung 20 % (w/v), 50 mg Bromphenolblau und 50 g Glycerin zusammen. Nach dem Lösen wurde der pH-Wert mit 3 Molarer HCl auf 6,8 eingestellt und mit dH₂O auf 100 mL aufgefüllt. Vor Verwendung des Probenpuffers wurden 10 µL Mercaptoethanol/mL zugesetzt. Der verwendete Kathodenpuffer (10-fach konzentriert) enthielt pro Liter 30,28 g Tris, 144 g Glycin, 50 mL SDS-Lösung 20 % (w/v) und 1 mL NaN₃-Lösung 10 % (w/v). Die zu trennenden Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. Die jeweiligen Verdünnungsfaktoren wurden im entsprechenden Abschnitt angegeben. Zum Verdünnungen der Ansätze wurden zum Beispiel 50 µL Probe mit 50 µL Probenpuffer versetzt. Dies wurde als 1:1 Verdünnung bezeichnet. Es wurden 10 µL Probe bzw. 5 µL Molmassenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte zweistufig. In der ersten Stufe wurden die Gele 6 min bei 80 mA und 300 V und in der zweiten Stufe 30 min bei 60 mA und 300 V gefahren. Bei der Durchführung der Elektrophorese mit nur einem Gel wurde die Stromstärke in beiden Stufen halbiert.

Tabelle 2-4: Zusammensetzung der Trenngele und Sammelgele nach Laemmli (Schichtdicke 1mm) [Laemmli, 1970]

	2 Trenngele 12,5 % T	2 Sammelgele 4,5 % T
Gelpuffer	2,5 mL	1,25 mL
Acrylamid/ Bisacrylamid	4,2 mL	0,75 mL
destilliertes Wasser	3,3 mL	3,00 mL
TEMED	10 µL	10 µL
gesättigtes APS	20 µL	8 µL

2.6.3 Färbung von SDS-PAGE Gelen mittels Coomassie

Zur Herstellung der Färbelösung wurde 1 g Brilliant Blau G-250 in 700 mL dH₂O unter Rühren gelöst und anschließend 200 mL Isopropanol hinzugefügt. Danach wurden 100 mL Essigsäure zugesetzt und die Lösung filtriert. Die Entfärbelösung bestand aus 200 mL

Isopropanol und 100 mL Essigsäure. Diese wurde mit dH₂O auf 1000 mL aufgefüllt. Die Geltrocknerlösung enthielt je Liter 200 mL Ethanol und 100 mL Glycerin. Diese Lösung wurde mit dH₂O aufgefüllt. Die SDS-PAGE Gele wurden über Nacht in Färbelösung auf dem Wipptisch geschüttelt. Nach der Färbung wurde das Gel mit dH₂O abgespült und mit Entfärbelösung bis zum maximalen Kontrast entfärbt. Nach erneutem Spülen mit dH₂O wurden die Gele für 30 min in Geltrocknerlösung inkubiert. Die Gele wurden luftblasenfrei zwischen zwei mit dH₂O benetzten Cellophanfolien gelegt und 1 - 2 mL Geltrocknerlösung dazwischen pipettiert. Die anschließende Lufttrocknung erfolgte durch Einspannen in einen Rahmen für ein bis zwei Tage.

2.6.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Für das Farbreagenz wurden 100 mg Coomassie-Brillantblau G-250 in 50 mL 95 %-igem Ethanol gelöst, 100 mL 85 %ige Phosphorsäure zugesetzt und mit deionisiertem Wasser auf 600 mL aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung filtriert, 100 mL Glycerin zugesetzt und mit deionisiertem Wasser auf 1 L aufgefüllt. Nach 24 h konnte das Reagenz verwendet werden. Für den Test wurden 50 µL Proteinlösung mit 2 mL Farbreagenz versetzt, gut gemischt und bei 595 nm die Extinktion gegen einen Blindwert ermittelt. Als Kalibrierprotein wurde BSA eingesetzt. Der lineare Bereich für den Test nach BRADFORD liegt zwischen 5 und 500 µg Protein/mL [Bradford, 1976b].

2.6.5 Bestimmung der Aminogruppendichte mittels o-Phthaldialdehyde

O-Phthaldialdehyde (OPA) ist ein aminogruppensensitives Reagenz, welches zur Detektion von Aminogruppen auf der Oberfläche der RO-Membranen genutzt wurde [Janolino und Swaisgood, 1992]. In Abb. 2-4 ist der Reaktionsmechanismus dargestellt.

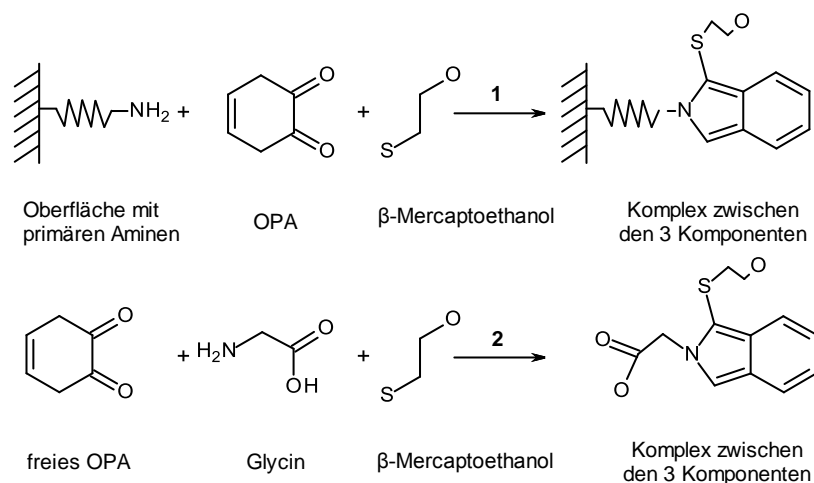


Abb. 2-4 **Reaktion primärer Amine mit einem Überschuss von OPA** in Gegenwart von β-Mercaptoethanol (1), sowie die sich anschließende Reaktion (2) des nicht reagierten OPA mit Glycin und β-Mercaptoethanol zu einem Komplex, der bei 340 nm stark absorbiert. Die Zeichnung ist von [Janolino und Swaisgood, 1992] adaptiert.

Für die Bestimmung der Aminogruppendichte wurde ein kreisrundes Membranstück (Durchmesser 5 cm) in die Inkubationskammer (vgl. Abschnitt 2.4.1) eingespannt. Die Membran wurde mit 0,1 M Borat-Puffer pH 9,5 gespült. Danach wurde die Oberfläche mit 3 mL Reagenz I für fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurden 20 µL des Überstands mit 800 µL 0,1 M Boratpuffer pH 9,5 und 40 µL Reagenz II versetzt. Das Gemisch wurde gemixt, für zwei Minuten inkubiert und die Absorption bei 340 nm gemessen. Neben der Oberfläche wurde eine Referenz mitgeführt, welche aus 20µL Reagenz I, 800 µL 0,1 M Boratpuffer pH 9,5 und 40 µL Reagenz II bestand. Als Blank-Probe diente ein Gemisch aus 20µL Reagenz I, 800 µL 0,1 M Boratpuffer pH 9,5 und 40 µL VE-Wasser. Zur Berechnung der Menge an Aminogruppen wurde die Differenz der Absorptionswerte zur Referenz genutzt und auf die Oberflächengröße (12,57 cm²) bezogen. In Tabelle 2-5 sind alle für den Assay benötigten Lösungen aufgeführt.

Tabelle 2-5 Lösungen für den OPA-Assay

Lösung	Komponente	g/L	Molarität [M]	pH-Wert
OPA	OPA in Ethanol (99,8 %)	33,5	0,25	-
Glycin	Glycin in 0,1 M Borat-Puffer	37,4	0,50	9,5
β -Mercaptoethanol I	β -Mercaptoethanol in 0,1 M Borat-Puffer	0,40	0,005	9,5
β -Mercaptoethanol II	β -Mercaptoethanol in 0,1 M Borat-Puffer	0,05	0,0006	9,5

Zusammensetzung der Reagenzien:

Reagenz I: 300 μ L OPA-Lösung und 300 μ L β -Mercaptoethanol I Lösung wurden aufgefüllt zu 50 mL mit VE-Wasser

Reagenz II: 500 μ L Glycin-Lösung und 500 μ L β -Mercaptoethanol II Lösung wurden aufgefüllt zu 30 mL mit VE-Wasser

2.6.6 Bestimmung der Aminogruppendichte mittels Sulfo-LC-SPDP

Eine weitere Methode, um Aminogruppen auf Oberflächen zu bestimmen wurde von Yoza et al [Yoza et al., 2003] beschrieben. Dabei wird das Linkermolekül Sulfo-LC-SPDP eingesetzt, welches an der Thiolgruppe eine chromophore Gruppe trägt. Nach Kopplung über den NHS-Ester an die Aminogruppen auf der Oberfläche der RO-Membranen und anschließendem Waschen lässt sich diese chromophore Gruppe mit DTT von der Oberfläche eluieren. Diese weist eine starke Absorption bei 343 nm auf. Mittels Kalibriergerade lässt sich die Konzentration der Aminogruppen bestimmen. Die Reaktionsfolge kann Abb. 2-5 entnommen werden.

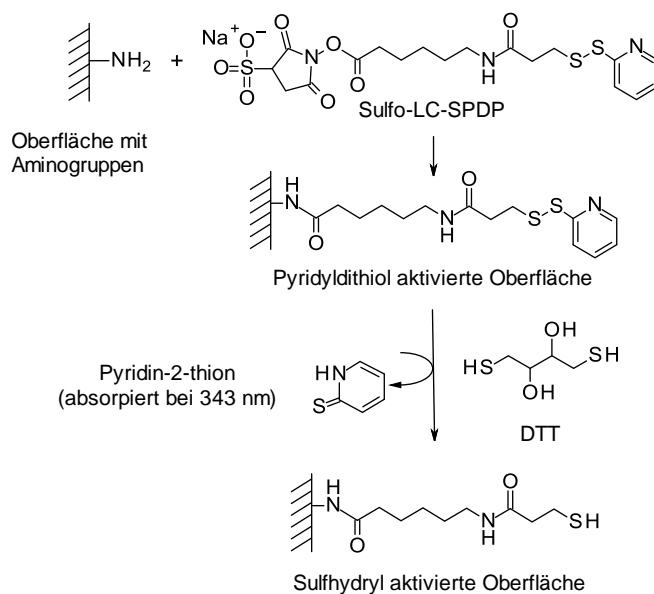


Abb. 2-5 **Reaktionsfolge zur Bestimmung der Aminogruppendichte mittels Sulfo-LC-SPDP.** Das Agens Sulfo-LC-SPDP reagiert mit den Aminogruppen der zu untersuchenden Oberfläche. Nach Abspülen des überschüssigen Reagenz wird die chromophore Gruppe (Pyridin-2-thion) durch DTT vom Träger eluiert. Im Eluat ist diese bei 343 nm photometrisch detektierbar. Mit Hilfe einer Kalibriergeraden kann so die Konzentration von Aminogruppen auf der Oberfläche berechnet werden.

Der Assay wird nachfolgend detailliert beschrieben. Zunächst wurde ein kreisrundes Stück RO-Membran in die Inkubationskammer (vgl. Abschnitt 2.4.1) eingespannt. Die Membran wurde mehrfach mit Kopplungspuffer II (siehe Abschnitt 2.3) gewaschen. Anschließend wurden 2 mL einer 0,5 mM Sulfo-LC-SPDP Lösung (in Kopplungspuffer II) für mindestens 30 Minuten auf der Membran inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Oberfläche mehrfach mit Kopplungspuffer II gewaschen. Abschließend wurde die Elution mit 2 mL einer

50 mM DTT Lösung (in Kopplungspuffer II) durchgeführt. Der Elutionsüberstand wurde photometrisch bei 343 nm vermessen. Parallel wurden verschiedene Konzentrationen der Sulfo-LC-SPDP-Lösung durch Verdünnung der Stammlösung hergestellt und mit einer DTT-Lösung versetzt. Die Absorption wurde bei 343 nm gemessen. Diese Proben dienen der Erstellung einer Kalibriergeraden. Unter Verwendung der Kalibriergeraden und unter Einbezug der Oberfläche ($12,57 \text{ cm}^2$) wurde die Menge an Aminogruppen pro Fläche berechnet.

2.6.7 Bestimmung der Carboxylgruppendichte mittels Toluidinblau O

Zur Ermittlung der Carboxylgruppen auf der Oberfläche von RO-Membranen wurde eine indirekte Methode mittels Toluidinblau O (TBO) genutzt. Als Grundlage diente die Arbeit von Tiraferri und Elimelech [Tiraferri und Elimelech, 2012]. Der Farbstoff bindet an die Säurereste und nach intensivem Waschen wird dieser mittels pH-Verschiebung wieder eluiert. Die Quantifizierung erfolgt photometrisch bei 630 nm. In Abb. 2-6 ist die Reaktionsfolge des Assays abgebildet.

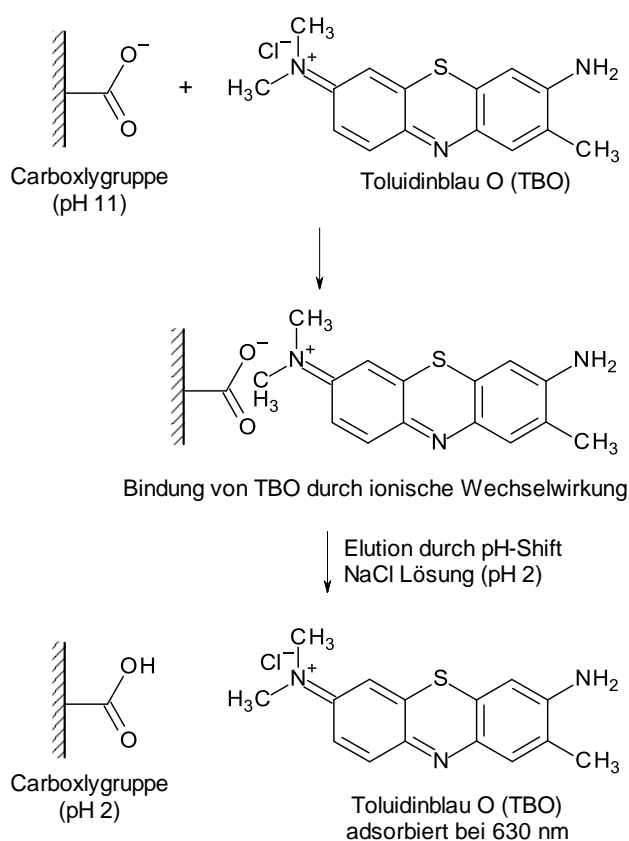


Abb. 2-6 **Reaktionsfolge zur Bestimmung der Carboxylgruppendichte mittels Toluidinblau O.** Das Agens Toluidinblau O (TBO) bindet über ionische Wechselwirkung die Carboxylgruppen der zu untersuchenden Oberfläche. Nach Abspülen des überschüssigen TBO wird das gebundene TBO eluiert und kann photometrisch bei 630 nm detektiert werden.

Mit Hilfe einer Kalibriergeraden kann so die Konzentration der Carboxylgruppen auf der Oberfläche berechnet werden.

Für das Assay wurde ein kreisrundes Stück RO-Membran in die aus Abschnitt 2.4.1 beschriebene Inkubationskammer eingespannt. Es folgten Waschschrte mit VE-Wasser und eine Äquilibrierung mit der TBO-Waschlösung. Die Membran wurde für 10 min mit der TBO-Lösung inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran aus der Kammer entnommen und in ein 50 mL Reaktionsgefäß übertragen. Es folgten intensive Waschschrte mit der TBO-Waschlösung. Am Ende wurde mit der TBO-Elutionslösung der Farbstoff eluiert und der Überstand photometrisch bei 630 nm untersucht. Zur Berechnung der Konzentration wurde eine Kalibriergerade erstellt. Dafür wurde eine TBO-Standardlösung mit bekannter Konzentration verdünnt (0,1; 0,3; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 μM) und ebenfalls bei 630 nm vermessen. Unter Verwendung der Kalibriergeraden und unter Einbezug der Oberfläche (12,57 cm^2) wurde die Menge an Carboxylgruppen pro Fläche berechnet. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in Tabelle 2-6 aufgeführt.

Tabelle 2-6 Lösungen für den TBO-Assay

Lösung	Komponente	g/L	Molarität [M]	pH-Wert
TBO-Waschlösung	NaCl in VE-Wasser	0,88	0,015	11
TBO-Elutionslösung	NaCl in VE-Wasser	11,69	0,2	2
TBO-Lösung	TBO in TBO-Waschlösung	0,3	2	11
TBO-Standardlösung	TBO in TBO-Elutionslösung	0,3	2	2

2.7 Bestimmung der Alginat Lyase Aktivität

2.7.1 Aktivität der löslichen Alginat Lyase

Das Reaktionsvolumen betrug 1 mL. Die Substratlösung enthielt 2 mg/mL Alginat und 20 mM Tris/HCl pH 7,5. Für die Reaktion wurden 980 µL der Substratlösung (bei 25°C im Wasserbad vortemperiert) in einer Küvette (Halb-Mikro, Carl Roth) in das Spektralphotometer (*Ultrospec 3100pro*, Amersham Biosciences) eingestellt und die Reaktion mit der Zugabe von 20 µL Enzymlösung gestartet. Dabei wurde die Absorption bei 235 nm gegen einen Blank (980 µL Substratlösung + 20 µL Puffer der Enzymlösung) gemessen. Mit der Software *Swift II* (Amersham Biosciences) wurde die Änderung der Absorption über die Zeit aufgenommen. Es wurde mit der Software eine lineare Korrelation erstellt und anschließend über den Anstieg die Aktivität nach Formel 2-2 berechnet.

$$AU = \frac{\Delta E/\text{min}}{0,02 \text{ mL}}$$

Formel 2-2: AU = Absorptionsunits; ΔE=Extinktionsänderung

2.7.2 Bestimmung der Alginat Lyase Aktivität unter salinen Bedingungen (lösliches Enzym)

Die Aktivität der Alginat Lyase wurde bei 0, 30, 60, 90, 150, 210, 300, 420, 510 und 600 mM NaCl getestet. Dabei wurde der Standard-Assay, beschrieben in 2.7.1, angewendet, wobei für die jeweilige Salzkonzentration die Substratlösung und der Blank mit der entsprechenden Menge NaCl versetzt wurden.

2.7.3 Aktivität der Alginat Lyase auf RO-Membranen

Für die Bestimmung der Aktivität auf der RO-Membran wurden kreisrunde Membranstücken (Ø 5 cm) in ein 50 mL Reaktionsgefäß so eingelegt, dass sie an der Gefäßwand mit der Rückseite hafteten. In den Boden des Gefäßes wurden dann 5 mL Substratlösung (2 mg/mL Alginat, 20 mM Tris/HCl pH 7,5) eingefüllt. Die Reaktion wurde mit dem Auflegen des Gefäßes auf einen Rollermixer (StuartTM Scientific) gestartet. In regelmäßigen Abständen wurden 700 µL Probe entnommen und in eine Küvette überführt. Die Absorption wurde bei 235 nm gemessen (Blindwert war die Substratlösung) und anschließend die Probe in das Gefäß zurückgegeben. Die Daten wurden gegen die Zeit aufgetragen. Nach Formel 2-3 wurde die Aktivität pro Fläche berechnet, wobei das Volumen der Substratlösung als Verdünnung beachtet wurde, da die Ausgangsaktivität auf 1 mL Substratlösung bezogen wurde. Zur Berechnung der Fläche ging nur ein Durchmesser von 4 cm ein, da der O-Ring zur Dichtung

0,5 cm dick war und somit die Fläche, welche benetzt wurde, effektiv um 1 cm im Durchmesser geschmälert wurde. Bei einem Radius von 2 cm betrug daher die aktive Fläche der Membran 12,57 cm².

$$AU \cdot cm^{-2} = \frac{\Delta E/min}{12,57 cm^2}$$

Formel 2-3: AU = Absorptionsunits, ΔE=Extinktionsänderung

2.7.4 Bestimmung der Alginat Lyase Aktivität auf *Activated Thiol SepharoseTM 4B*

Für die Aktivitätsbestimmung der Alginat Lyase an den Thiolbeads wurden je drei mal 10 mg Beads abgewogen und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,5 mL Substratlösung (2 mg/mL Alginat, 20 mM Tris/ HCl pH 7,5) gestartet. Nach 5, 10 und 15 Minuten wurden die Beads durch Filtration (PTFE Filter, Firma Roth) vom Produkt abgetrennt. Der Überstand wurde in eine Küvette überführt und die Absorption bei 235 nm gemessen (Blindwert war Substratlösung). Die drei Messwerte wurden gegen die Zeit aufgetragen und die Extinktionsänderung je Minute berechnet. Nach Formel 2-4 wurde die Aktivität je 1 g Beads berechnet.

$$AU \cdot g^{-1} = \frac{\Delta E/min}{g_{\text{eingesetzte Beads}}}$$

Formel 2-4 AU = Absorptionsunits, ΔE = Extinktionsänderung; $g_{\text{eingesetzte Beads}}$ = Masse an Beads welche für die Reaktion eingesetzt wurden [g]

2.7.5 Bestimmung der Alginat Lyase Aktivität auf *Chelating Sepharose*

Für die Aktivitätsbestimmung an den Nickel-Beads wurde wie in Abschnitt 2.7.5 verfahren. Die Trennung von Beads und Überstand erfolgte über Zentrifugation (16100 g; 1,5 Minuten).

2.7.6 Bestimmung der Stabilität der Alginat Lyase auf porösen Trägern

Für diese Untersuchung wurden ungefähr 100 mg Präseträger (entweder Nickel-Sepharose oder Thiolsepahrose mit Alginat Lyase beladen) abgewogen und mehreren Messzyklen unterworfen. Dabei wurde das Material für 5 min mit 5 mL Substrat-Lösung bei Raumtemperatur auf einem Rollermixer im Falcon inkubiert. Nach Filtration wurde die Absorptionzunahme

bei 235 nm photometrisch untersucht. Das Material wurde gewaschen, neu eingewogen und einem neuen Messzyklus unterworfen. Die Absorptionswerte wurden auf die eingesetzte Menge Beads bezogen und daraus wurde die relative Abnahme der Aktivität auf dem Träger berechnet.

2.7.7 Bestimmung der Alginat Lyase Aktivität auf Glasobjektträgern

Für die Bestimmung der Aktivität der Alginat Lyase auf Glasobjektträgern wurden 5 mL Substratlösung (auf 25°C vortemperiert) in einer Reaktionskammer vorgelegt. Die Reaktion wurde mit Zugabe des funktionalisierten Objektträgers gestartet. Zu definierten Zeiträumen wurden 700 µL aus dem Ansatz entnommen und die Absorption bei 235 nm gemessen. Anschließend wurde die Probe in den Ansatz zurückgeführt. Zur Berechnung der Aktivität wurde die Extinktionsänderung gegen die Zeit aufgetragen (Formel 2-5). Die Fläche des Objektträgers ging dabei mit 19,75 cm² ein.

$$AU \cdot cm^{-2} = \frac{\Delta E / min}{19,75 cm^2}$$

Formel 2-5: AU = Absorptionsunits, ΔE = Extinktionsänderung

2.8 Molekularbiologische Arbeiten

2.8.1 Primer

Die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) wurde mit der Synthese (inklusive HPLC-Reinigung und Lyophilisierung) der Oligonukleotide beauftragt. Die Primer wurden in sterilem Wasser gelöst (Konzentration: 100 pmol/ μ L) und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die in der Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 2-7 aufgeführt.

Tabelle 2-7 Übersicht der verwendeten Primer

Bezeichnung	Sequenz	Referenz
Primer für Kolonie-PCR (Abschnitt 2.8.9, S.47)		
T7-Primer	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	[Novagen, 2005]
T7-Term-Primer	5'-CTA GTT ATT GCT GAG CGG T-3'	[Novagen, 2005]
Primer für Site-directed Mutagenese (Abschnitt 2.8.8, S.46)		
fw-S93C	5'-ACG ATG AAA CTG TGT GGT AAA ACT GTG-3'	diese Arbeit
rev-S93C	5'-CAC AGT TTT ACC ACA CAG TTT CAT CGT-3'	
fw-S221C	5'-GCT AAG CTG TAC TGC CTG AGC GTG TCT-3'	
rev-S221C	5'-AGA CAC GCT CAG GCA GTA CAG CTT AGC-3'	
fw-S223C	5'-CTG TAC TCC CTG TGC GTG TCT CAT TCC-3'	
rev-S223C	5'-GGA ATG AGA CAC GCA CAG GGA GTA CAG-3'	
fw-S221,223C	5'-GCT AAG CTG TAC TGC CTG TGC GTG TCT-3'	
rev-S221,223C	5'-AGA CAC GCA CAG GCA GTA CAG CTT AGC-3'	

2.8.2 Plasmidpräparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde das GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit der Firma Fermentas verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß Handbuch. Nach Binden und Waschen der Plasmid-DNA an einer Silica-Säule erfolgte die Elution mit 50 μ L sterilfiltriertem Wasser.

2.8.3 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. In einem 1 %igen Agarosegel wurde bei 80 V die DNA in einem TAE-Puffer (vgl. Abschnitt 2.3) aufgetrennt. Zur Färbung der Nukleinsäure wurde Ethidiumbromid (1 μ g/mL) eingesetzt. Der Mas-

sruler DNA-Ladder Mix wurde als Molmassenstandard verwendet. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe von *GeneSnap* (Firma Syngene) und der Software *Gene-Tool* dokumentiert.

2.8.4 Sequenzierung und Synthese von Plasmid-DNA

Die Firma Eurofins MWG hat das Plasmid-Konstrukt der Alginat Lyase hergestellt und alle Sequenzierungsarbeiten durchgeführt.

2.8.5 Transformation durch Hitzeschock

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* Zellen wurden 50 mL LB-Medium mit einer 5 mL Vorkultur (*E.coli* BL21 Gold(DE3)) beimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5 - 0,6 bei 37°C und 80 rpm kultiviert. Alle weiteren erwähnten Lösungen wurden vor dem Einsatz sterilisiert (mit Hilfe von Filtration oder Autoklav). Die Zellen wurden bei 4°C und mit 3320 g abzentrifugiert und in 25 mL eiskaltem $CaCl_2$ resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (4°C, 3320 g). Das Pellet wurde in 5 mL eiskaltem $CaCl_2$ resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 750 μ L eiskaltem 99 %-igen Glycerin. Aliquote von 100 μ L wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Transformation erfolgte nach dem in Abb. 2-7 dargestellten Schema.

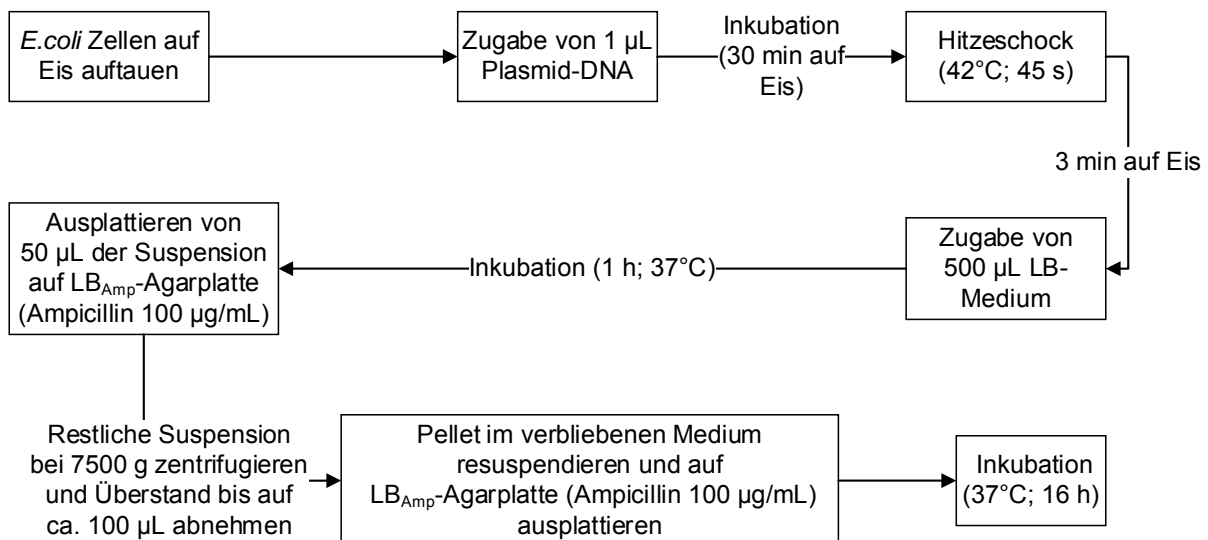


Abb. 2-7 Schema zur Hitze-Schock-Transformation von chemisch-kompetenten *E.coli* Zellen.

2.8.6 Kryokulturen

Zur Lagerung von *E.coli* Transformanten mit dem gewünschten Plasmid wurde eine Kryokultur verwendet. Dazu wurde der entsprechende Klon in 5 mL LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika für 16h bei 37°C und 120 rpm kultiviert. Von der Kultur wurden 700 µL mit 300 µL Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

2.8.7 Reinigung von PCR-Produkten und Restriktionsverdauen

Für die Reinigung von PCR-Produkten wurde das MSB® Spin PCRapace Kit von Invitex verwendet. Damit können DNA-Fragmente im Bereich 80 Bp bis 30.000 Bp von Nukleotiden, Primer, Puffern und Salzen getrennt werden. Nach der DNA-Bindung an das Säulenmaterial und einem Waschschrift wurde mit je 10 µL sterilem Wasser eluiert.

2.8.8 Generierung von Cystein-Varianten

Die *Site-directed* Mutagenese wird angewendet, um gezielt Aminosäuren in einer Nukleotidsequenz auszutauschen. Dabei wurden die Mutageneseprimer so designt, dass sie die gleiche Mutation tragen und zueinander komplementär sind. Sie können so an den Elternsträngen der Template-DNA binden. Für die Cystein-Varianten wurden zunächst die Einzelmutationen erstellt. Dabei diente die Plasmidpräparation der Wildtyp-Variante der Alginat Lyase als Template. Die Zusammensetzung vom PCR-Ansatz ist in Tabelle 2-8 beschrieben. In einer zweiten Mutagenese-Runde wurde die Plasmidpräparation der Variante S93C als Template genutzt. Die jeweiligen Primerpaare sind in Tabelle 2-7 aufgeführt.

Tabelle 2-8 PCR-Ansatz für *Site-directed* Mutagenese (PCR-Volumen 50 µL)

Komponente (Konzentration)	Konzentration im Ansatz	Volumen
Pfu Puffer mit MgSO ₄ (10x)	1 x	5 µL
dNTP Mix (2 mM)	0,2 mM	5 µL
Fw-Primer (12,5 µM)	0,25 µM	1 µL
Rev-Primer (12,5 µM)	0,25 µM	1 µL
Ausgangsplasmid	-	1 µL
Pfu DNA-Polymerase (2,5U/µL)	2,5 U	1 µL
Nukleasefreies Wasser	-	36 µL

Nach einem initialen 10-minütigem Denaturierungsschritt bei 95°C erfolgte die Zugabe der *Pfu* DNA-Polymerase. Die Amplifikation erfolgte in 25 Zyklen, welche aus je zwei Schritten bestanden. Zunächst erfolgte die Denaturierung für 30 Sekunden bei 95°C und dann das *Annealing* für 30 Sekunden bei 60-66°C. Als finaler Schritt wurde mittels der Restriktionsendonuklease *DpnI* (10 U) die methylierte parentale DNA fragmentiert und bei 37°C für 1 h abgebaut. Die Ansätze wurden, wie in Abschnitt 2.8.7 beschrieben, gereinigt und anschließend chemisch vermittelt in *E.coli* BL21 Gold (DE3) transformiert (siehe Abschnitt 2.8.5).

2.8.9 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde nach erfolgreicher Transformation (siehe Abschnitt 2.8.5) des Plasmidkonstrukts pET-20b(+)-AlgLys in *E.coli* BL21 Gold (DE3) durchgeführt. Die Klone wurden in 50 µL sterilfiltriertem Wasser resuspendiert und bei 99°C für fünf Minuten inkubiert. Von diesem Ansatz wurden 1 µL als Template-DNA in der PCR eingesetzt. Der PCR-Ansatz (20 µL) setzte sich, wie in Tabelle 2-9 beschrieben, zusammen.

Tabelle 2-9 Ansatz für Kolonie-PCR (Volumen 20 µL)

Komponente (Konzentration)	Konzentration im Ansatz	Volumen
Taq-Mastermix (2x)	1 x	10 µL
T7-Primer (12,5 mM)	0,2 µM	0,8 µL
T7-Term-Primer (12,5 µM)	0,2 µM	0,8 µL
Nukleasefreies Wasser	-	7,4 µL

Das PCR-Programm wurde in einem Thermocycler (Firma Biometra) wie folgt durchgeführt:

- | | | | |
|-------------|---------------|------|-------|
| 1. Schritt: | Denaturierung | 94°C | 5 min |
| 2. Schritt: | Denaturierung | 94°C | 30 s |
| 3. Schritt: | Annealing | 49°C | 30 s |
| 4. Schritt: | Verlängerung | 72°C | 50 s |
| 5. Schritt: | Verlängerung | 72°C | 5 min |

Schritte 2 bis 4 wurden 30 mal wiederholt.

2.9 Zellkultivierung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zelllinie *E.coli* BL21 Gold (DE3) (Stratagene) verwendet. In Tabelle 2-10 sind alle verwendeten Plasmide aufgeführt.

Tabelle 2-10 Übersicht der verwendeten Plasmide

Plasmid	Genetische Marken	Referenz
pET 20 b(+)	Expressionsvektor mit N-terminalen <i>pelB</i> -Sequenz und c-terminalen His-tag, <i>bla</i> -Gen(Amp.-Resistenz)	[Novagen, 2005]
pAL	pET 20 b(+) ohne <i>pelB</i> -Sequenz mit Gen (<i>NdeI/XhoI</i>) für Alginat Lyase aus <i>Sphingomonas sp. A1</i> (90322 NCBI)	
pAL S93C	pAL Punktmutante S93C	
pAL S221C	pAL Punktmutante S221C	diese Arbeit
pAL S223C	pAL Punktmutante S223C	
pAL S93,221C	pAL Punktmutante S93,221C	
pAL S93,223C	pAL Punktmutante S93,223C	
pAL S93,221,223C	pAL Punktmutante S93,221,223C	

2.9.1 Medien zur Kultivierung von *E.coli* Zellen

In Tabelle 2-11 ist die Zusammensetzung aller verwendeten Medien aufgelistet. Bei Bedarf wurde den Medien 100 mg/L Ampicillin zugesetzt.

Tabelle 2-11 Zusammensetzung der Medien zur Kultivierung von *E.coli* Zellen

Komponente	LB-Medium		GB-Medium	
	Bezeichnung	Konzentration [g/L]	Bezeichnung	Konzentration [g/L]
Nährstoffquelle	Hefeextrakt I	5	Hefeextrakt II	50
	Pepton	10		
Salze	NaCl	10	K ₂ HPO ₄	8,4
			NH ₄ Cl	0,5
			MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1
Zusätzliche C-Quelle	keine		Glycerin	10

Für das LB-Medium wurden die Komponenten in Wasser gelöst und anschließend bei 120°C autoklaviert. Für die Anfertigung von LB-Platten wurde zusätzlich 15 g/L Agar-Agar dem Me-

dium beigegeben. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf etwa 60°C abgekühlt und in Petrischalen gegossen (20 mL/Platte).

Die Zusammensetzung des GB-Mediums nach Gerber [Gerber et al., 2008] wurde entsprechend Tabelle 2-11 modifiziert. Als Substrat wurde Glycerin statt Glucose verwendet, um die Acetatbildung zu verringern. Durch die Reduzierung der Konzentration von $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ von 0,5 g/L auf 0,1 g/L konnte die Bildung von Präzipitaten vermindert werden. Das GB-Medium wurde in zwei Schritten erstellt. Zunächst wurden die Komponenten Hefeextrakt II, Ammoniumchlorid und Glycerin in Wasser gelöst und getrennt von den anderen Komponenten autoklaviert. Die Salze Dikaliumhydrogenphosphat und Magnesiumsulfat wurden als Stammlösungen hergestellt und autoklaviert. Vor der Kultivierung wurden die Komponenten vereinigt und der pH-Wert mit sterilem Natriumhydroxid auf 7,5 eingestellt.

2.9.2 Expression der Alginat Lyase in *E.coli* auf LB-Medium

Zur Expression Alginat Lyase wurde LB-Medium [Bertani, 1951] verwendet. Die Zusammensetzung des Mediums ist 2.9.1 zu entnehmen. In Abb. 2-8 ist der Ablauf der Kultivierung schematisch dargestellt.

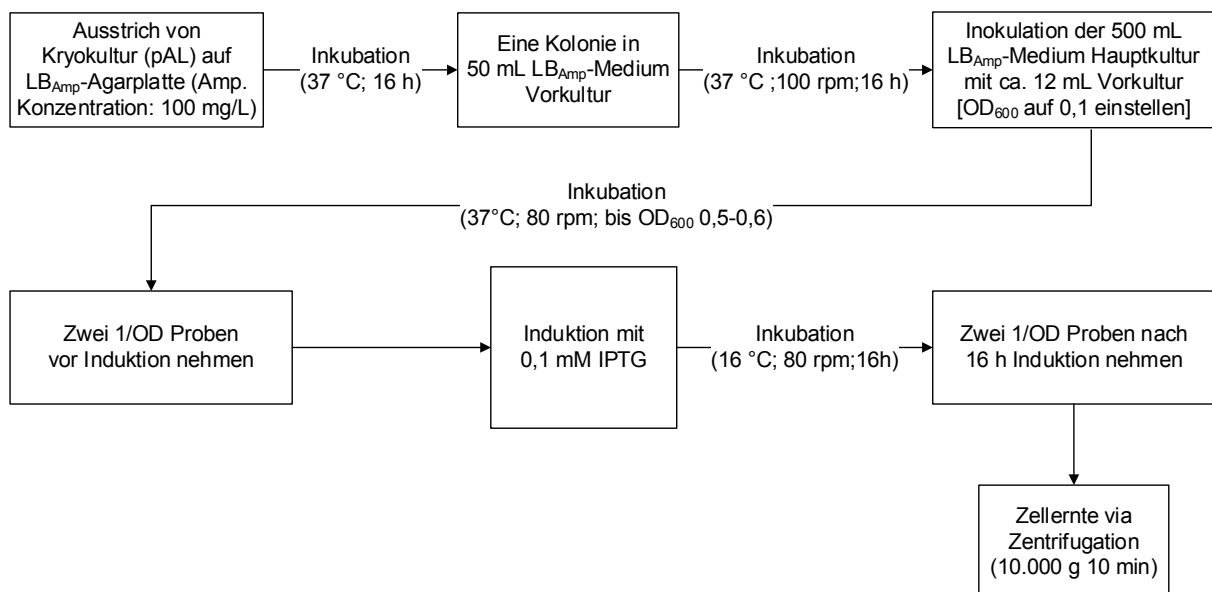


Abb. 2-8 Schema der Kultivierung von *E.coli* zur Expression des AlgLys-Gens.

Die gewonnene Biomasse wurde in ein 50 mL Reaktionsgefäß transferiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.9.3 Expression des Zielenzym auf GB-Medium

Die Kultivierung in GB-Medium (Zusammensetzung ist in Abschnitt 2.9.1 beschrieben) lief analog zu Abschnitt 2.9.2., mit der Ausnahme, dass die Expressionstemperatur nach der Induktion von 16°C auf 24°C geändert wurde. Die gewonnene Biomasse wurde in ein 50 mL Reaktionsgefäß transferiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.10 Zellaufschluss und Reinigung der Alginat Lyase

2.10.1 Zellaufschluss

Der Ablauf des Zellaufschlusses der Alginat Lyase ist in Abb. 2-9 dargestellt. Die SDS-Proben wurden anschließend im Verhältnis 1:2 mit SDS-Probenpuffer (vgl. Abschnitt 2.6.2) versetzt und bei 99°C für fünf Minuten inkubiert. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford [Bradford, 1976a] (siehe Abschnitt 2.6.4) und die Aktivität wurde nach dem Standardassay für die lösliche Alginat Lyase (vgl. Abschnitt 2.7.1) bestimmt.

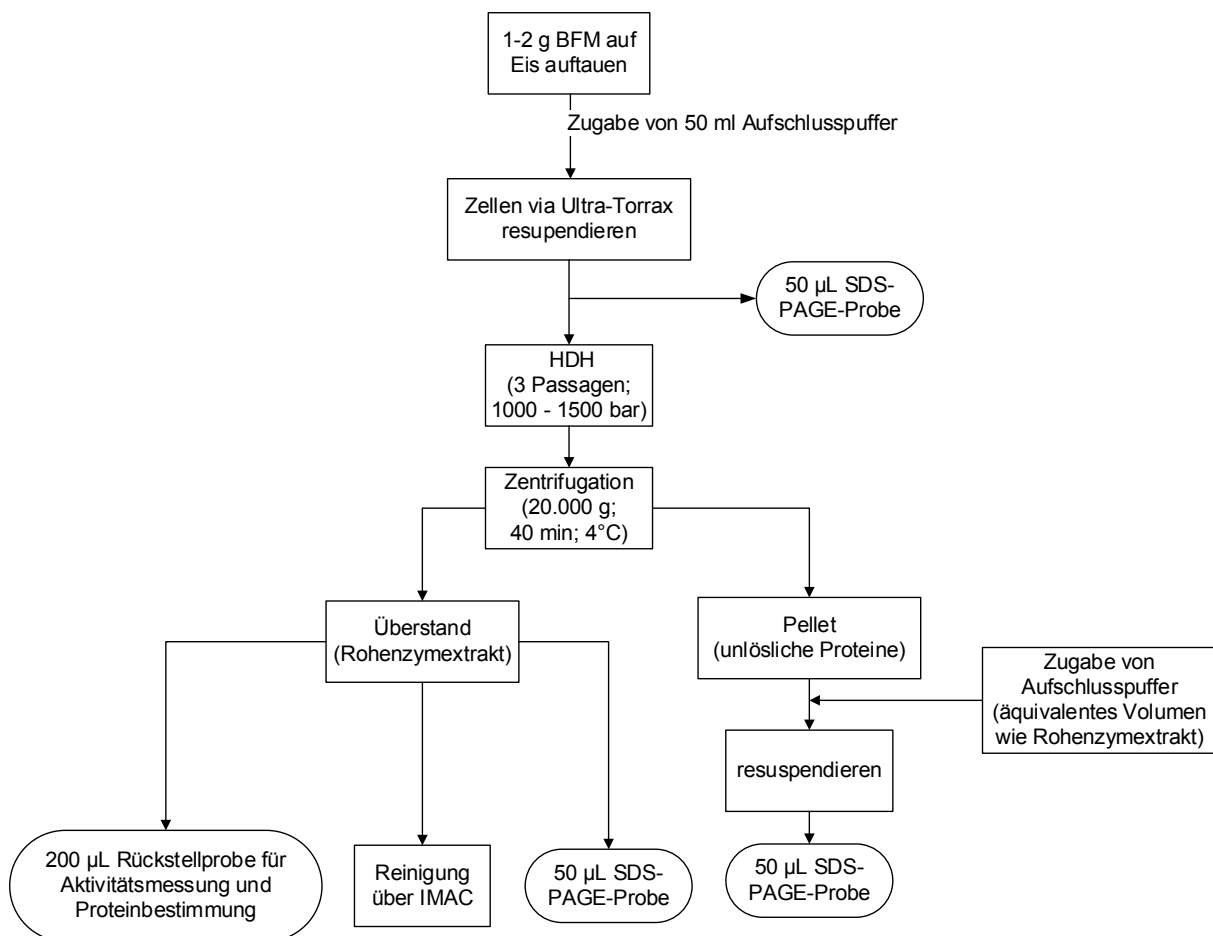


Abb. 2-9 Schema vom Zellaufschluss der *E.coli* Biofeuchtmasse.

2.10.2 Reinigung der Alginat Lyase mittels IMAC

Für die IMAC (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography; Affinitätschromatographie) wurden verschiedene Puffer genutzt. Die Auswahl des geeigneten Puffersystems während der Reinigung richtete sich nach Art der gewünschten Anwendung des Enzyms. Das generelle Vorgehen und die jeweiligen Besonderheiten (Puffer etc.) werden in den einzelnen Kapiteln erläutert.

Alle Affinitätschromatographieläufe wurden mit dem System Äkta Explorer von Amersham Bioscience durchgeführt. Die Datenaufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software Unicorn 4.1.

Alle bei der Chromatographie verwendeten Puffer und Lösungen wurden entgast und filtriert. Die Zusammensetzungen der verwendeten Binde- und Elutionspuffer werden im entsprechenden Abschnitt gesondert erläutert.

Als Säulenmaterial kam zunächst Streamline™ Chelating NTA und später *Chelating Sepharose Fast Flow* zum Einsatz. Bei Nichtgebrauch wurde die gepackte und mit Ni²⁺-Ionen beladene Säule in 20 % Ethanol gelagert. Vor Verwendung der Säule wurde diese zur Entfernung des Ethanols mit mindestens drei Säulenvolumen (CV) VE-Wasser gespült und mit fünf CV IMAC-Bindepuffer äquilibriert.

Die Beladung der Säule mit Proben erfolgte entweder direkt über eine Probenpumpe oder mittels eines 50 mL-Probenapplikators (Superloop™). Der verwendete Elutionsgradient sowie der Gradient Delay sind im entsprechenden Abschnitt des Ergebnisteils angegeben. Alle weiteren Parameter der Chromatographieläufe wurden in Tabelle 2-12 zusammengefasst.

Um das Ergebnis der Aufreinigung bewerten zu können, wurden von ausgewählten Fraktionen, die Protein enthielten (Absorption bei 280 nm), Proben für die SDS-PAGE angefertigt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:2 mit Probenpuffer versetzt und fünf Minuten bei 99 °C inkubiert. Die weitere Vorgehensweise ist in Abschnitt 2.6.2 beschrieben.

Tabelle 2-12 Parameter der Affinitätschromatographie

	XK 16/20	XK 26/20
Säulenvolumen	10,0 mL	51,0 mL
Fließgeschwindigkeit	3 mL/min	3 - 5 mL/min
Äquilibrieren	3 CV	3 CV
Waschen	2-4 CV	2-4 CV
Elutionsgradient	0-100 % B	0-100 % B
Fraktionsvolumen Elution	1 mL	5 mL

2.11 Sprühtrocknung der Alginat Lyase

Für die Sprühtrocknung wurde ein System der Firma Buchi (Mini Sprühtrockner B-290) genutzt. Die Anlage wurde laut Bedienungsanleitung und mit den in Tabelle 2-13 angegebenen Parametern betrieben. Vor der Trocknung wurde die Alginat-Lyase-Lösung mittels Dialyseschlauchs (CutOff 14 kDa) in Bindepuffer I (vgl. Abschnitt 2.3) dialysiert.

Tabelle 2-13 Parameter zur Sprühtrocknung der Alginat Lyase

Parameter	
Trägermaterial	Maltodextrin
Protein zu Träger Verhältnis	1 zu 100
Enzymlösung	3,37 mg/mL; 150 U/mL
Aufgetragenes Volumen	250 mL
Pumprate	20 %
Belüftungsrate	100 %
Inlet Temperatur	152 °C
Outlet Temperatur	89 °C
Flussrate	473 L/h

Das gewonnene sprühgetrocknete Enzym wurde portioniert und unter verschiedenen Bedingungen (-22°C; 4°C; RT) gelagert. Zur Analyse wurde das Produkt in VE-Wasser gelöst, wobei die theoretische Ausgangskonzentration eingestellt wurde. Nach dem Lösen erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung, wie in Abschnitt 2.6.4 beschrieben. Vor und nach der Sprühtrocknung wurde die Aktivität, wie in Abschnitt 2.7.1 dargelegt, ermittelt.

2.12 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Größenausschlusschromatographie (SEC – engl. *size exclusion chromatography*) wurde mittels SEC-Säulen (PD-10) der Firma *GE Healthcare* durchgeführt. Dafür wurde die Säule zunächst mit dem Bindepuffer II gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit einer Alginat-Lyase-Lösung (mit unterschiedlichen Cystein-Varianten) beladen. Danach wurde nochmals 5 mL Bindepuffer I aufgegeben. Der Durchfluss wurde in 500- μ L-Proben fraktioniert. Alle Proben wurden mittels Spektralphotometer bei 280 nm vermessen. Die Fraktionen mit den höchsten Werten wurden vereinigt.

2.13 Immobilisierung der Alginat Lyase

2.13.1 Immobilisierung via His-tag an *Chelating Sepharose*

Für die Immobilisierung wurde *Chelating Sepharose Fast Flow* der Firma Amersham (jetzt *GE Healthcare*) genutzt. Zum Waschen wurde die Sepharose mehrfach mit der jeweiligen Lösung unter Rühren aufgeschwemmt. Die Bindung des Enzyms an die Sepharose ist in Abb. 2-10 gezeigt. Der methodische Ablauf der Reaktion ist in Abb. 2-11 dargestellt.

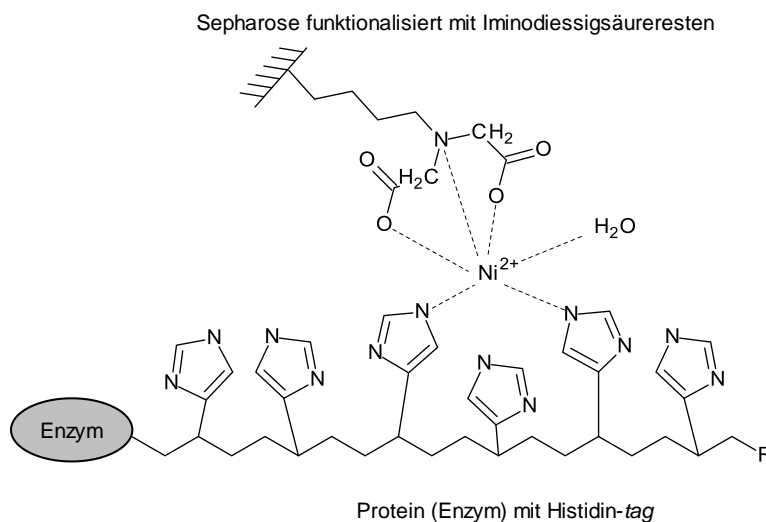


Abb. 2-10 **Bindung des Enzyms an die Sepharose.** Zweiwertiges Nickel wird durch den Chelator Iminodiessigsäure fest gebunden. Der His-tag des Proteins, in dem Fall das Enzym, bildet einen Chelat-Komplex mit dem Nickel-Ion. Dadurch wird das Enzym an die Sepharose immobilisiert.

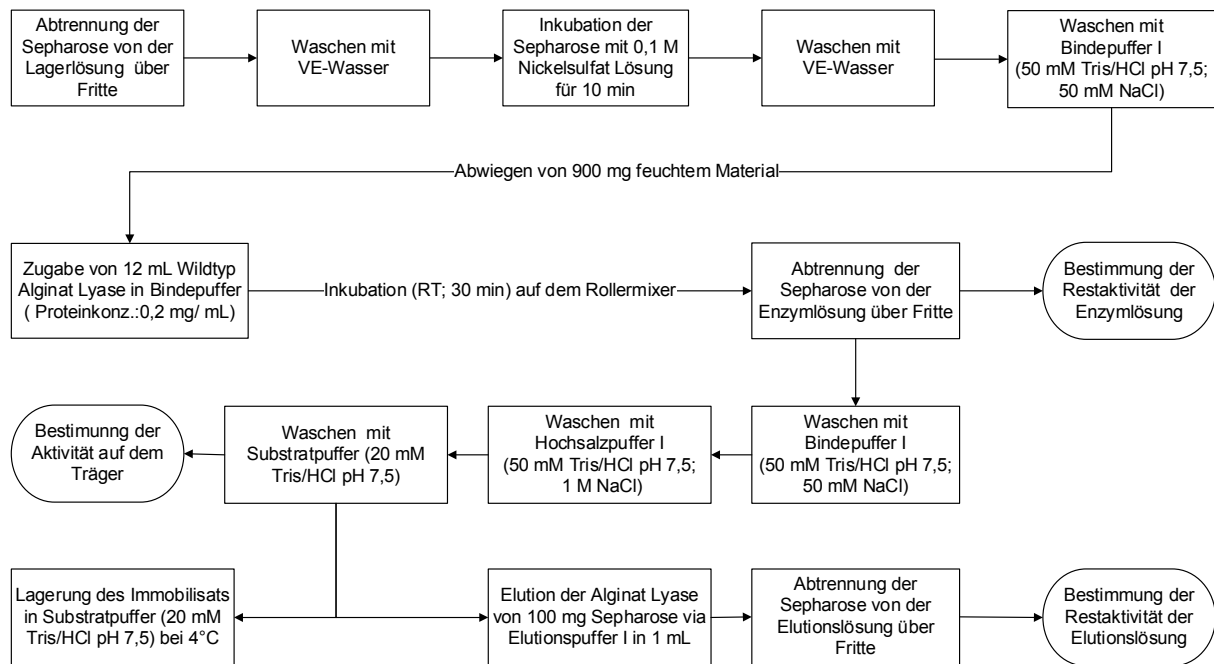


Abb. 2-11 Schematischer Ablauf der Immobilisierung der Alginat Lyase an Nickel-Sepharose-Beads (*Chelating Sepharose Fast Flow*) via His-tag.

Die Aktivitätsbestimmung des Enzyms in Lösung wurde, wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben, durchgeführt. Auf dem Träger wurde, wie in Abschnitt 2.7.5 beschrieben, vorgegangen.

2.13.2 Immobilisierung an *Activated Thiol Sepharose™ 4B* via Disulfidbrücken

Vor der Immobilisierung wurde die Enzymlösung mittels SEC von allen Reduktionsmitteln befreit und in Bindepuffer I umgepuffert. Die Cystein-Varianten (siehe Abschnitt 2.8.8) S93C, S223C, S93/223C und S93/221/223C sowie das Wildtyp (WT) Enzym der Alginat Lyase wurden zur Immobilisierung eingesetzt. Die Immobilisierungsreaktion ist in Abb. 2-12 gezeigt. Der methodische Ablauf der Reaktion ist in Abb. 2-13 dargestellt. Die Aktivitätsbestimmung des Enzyms in Lösung wurde, wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben, durchgeführt. Auf dem Träger wurde, wie in Abschnitt 2.7.5 beschrieben, vorgegangen.

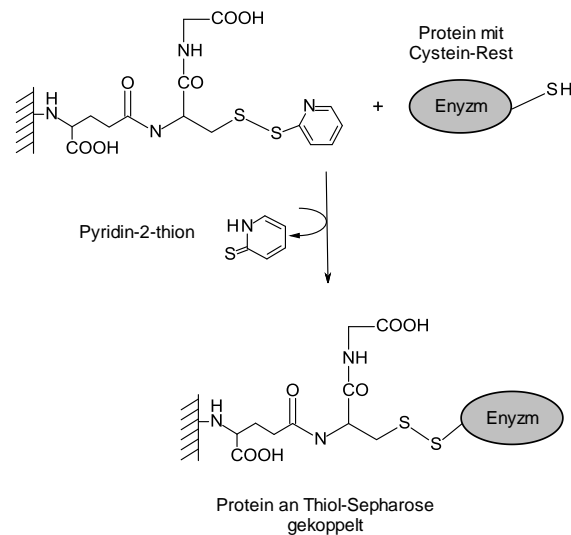


Abb. 2-12 **Immobilisierungsreaktion zwischen *Activated Thiol Sepharose™ 4B* und dem Enzym.** Die Sepharose trägt eine Thiol-Gruppe, welche mit einem chromophoren Rest (Pyridin-2-thion) verbunden ist. Wird das Material mit einem Protein, in diesem Fall das Enzym, welches Cystein-Reste besitzt, zur Reaktion gebracht, so bildet sich eine Disulfidbrücke zwischen den Thiolgruppen aus und das chromophore Molekül wird eluiert. Als Resultat ist das Enzym an die Sepharose immobilisiert.

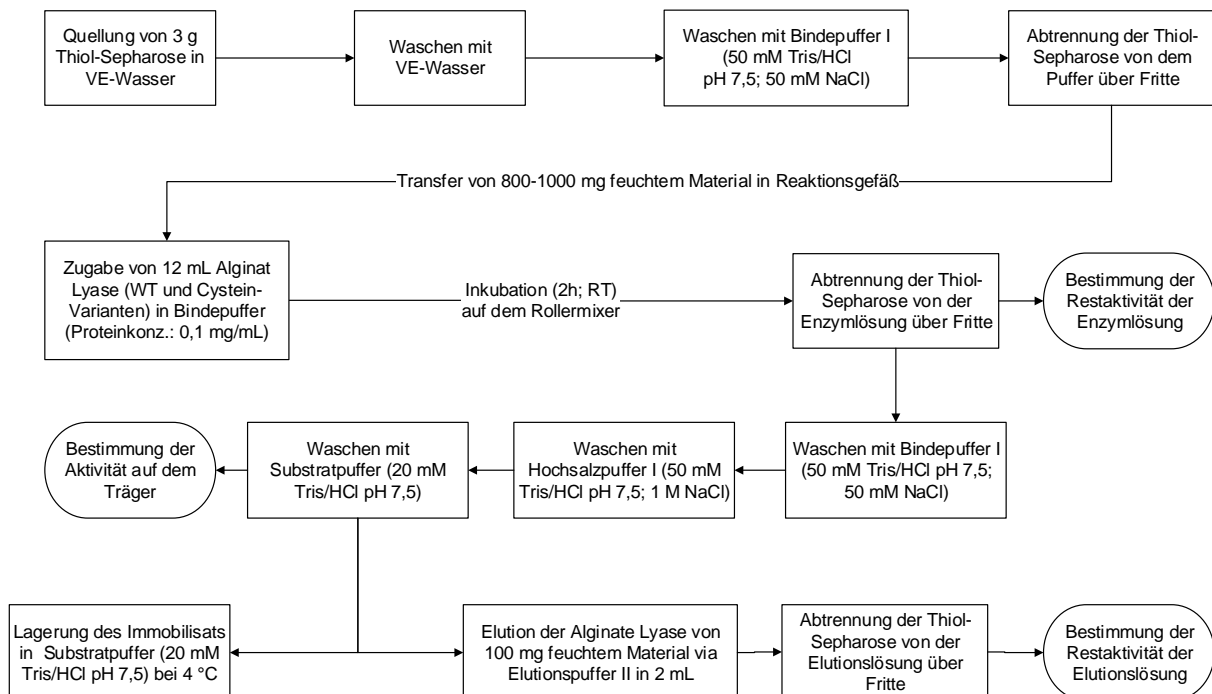


Abb. 2-13 **Schematischer Ablauf der Immobilisierung der Alginat Lyase an *Activated Thiol Sepharose™ 4B*.** WT: Wildtyp

Die Aktivitätsbestimmung des Enzyms in Lösung wurde wie in Abschnitt 2.7.1 durchgeführt. Auf dem Träger wurde wie in Abschnitt 2.7.5 beschrieben vorgegangen.

2.13.3 Immobilisierung an Maleinimid-funktionalisierte Objektträger

Die Firma MicroSurface Inc. produziert diverse funktionalisierte Objektträger. Dafür wird eine Polyethylenglycol-Schicht auf die Objektträger aufgebracht und modifiziert. Zur Kopplung der Cystein-Varianten wurden Maleinimid-funktionalisierte Träger verwendet. Diese wurden mit Bindepuffer I gewaschen. Im Anschluss wurden die Träger mit 10 AU Alginat Lyase (Cystein-Varianten oder WT) in 5 mL Bindepuffer I für 2 Stunden inkubiert. Nach der Kopplung wurde der Überstand abgenommen und dessen Restaktivität nach Abschnitt 2.7.1 bestimmt. Die Objektträger wurden mit Bindepuffer I und Hochsalzpuffer I gewaschen. Vor der Messung der Aktivität auf dem Träger (Abschnitt 2.7.7) wurde mit Substratpuffer gespült. Im Anschluss wurde wieder mit dem Substratpuffer gespült und der Träger darin gelagert. Die komplette Immobilisierung wurde in den unter Abschnitt 2.4.2 beschriebenen Inkubationskammern für Objektträger durchgeführt. Die Kopplungsreaktion ist in Abb. 2-14 dargestellt.

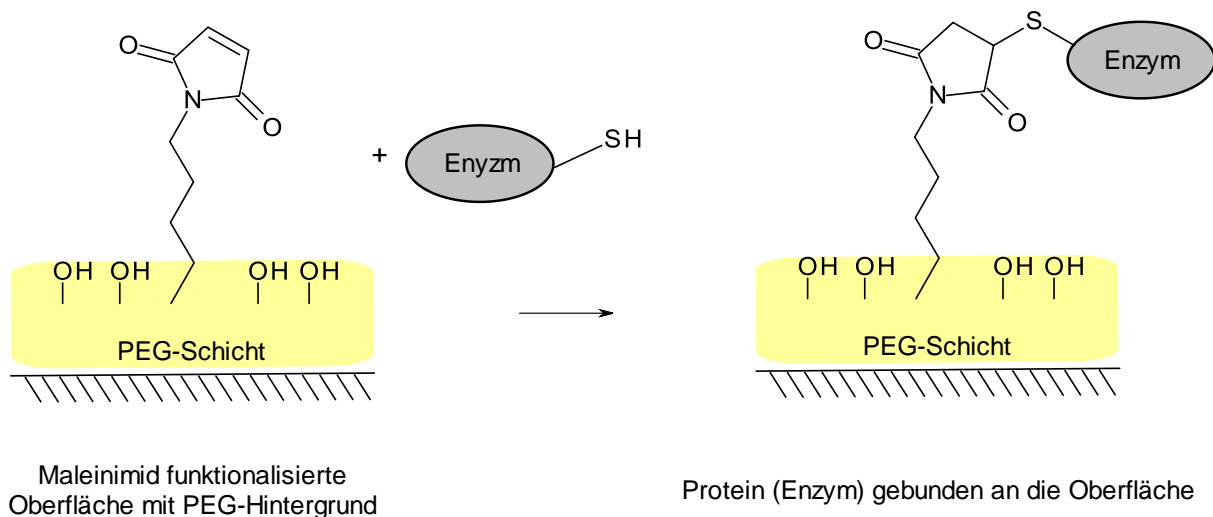


Abb. 2-14 **Kopplungsreaktion zwischen funktionalisiertem Objektträger und Enzym.** Die Oberfläche des Materials trägt eine PEG-Schicht, um einen chemisch neutralen Hintergrund zu erzeugen. Zusätzlich ist die Oberfläche mit Maleinimid funktionalisiert. Dieses reagiert mit der Thiolgruppe des Proteins, in diesem Fall dem Enzym. Im Ergebnis ist der Biokatalysator an die Oberfläche immobilisiert.

2.13.4 Immobilisierung an Kupfer-funktionalisierte Objektträger

Der Versuchsablauf entspricht dem in Abschnitt 2.13.4 beschriebenen. Die einzigen Unterschiede waren die Verwendung vom Wildtyp-Enzym mit His-tag und von Kupfer-funktionalisierten Objektträgern.

2.13.5 Immobilisierung via His-tag an RO-Membranen

Bevor die RO-Membranen für die Immobilisierung eingesetzt werden konnten, mussten sie modifiziert werden. Die Reaktionen sind in Abb. 2-15 dargestellt.

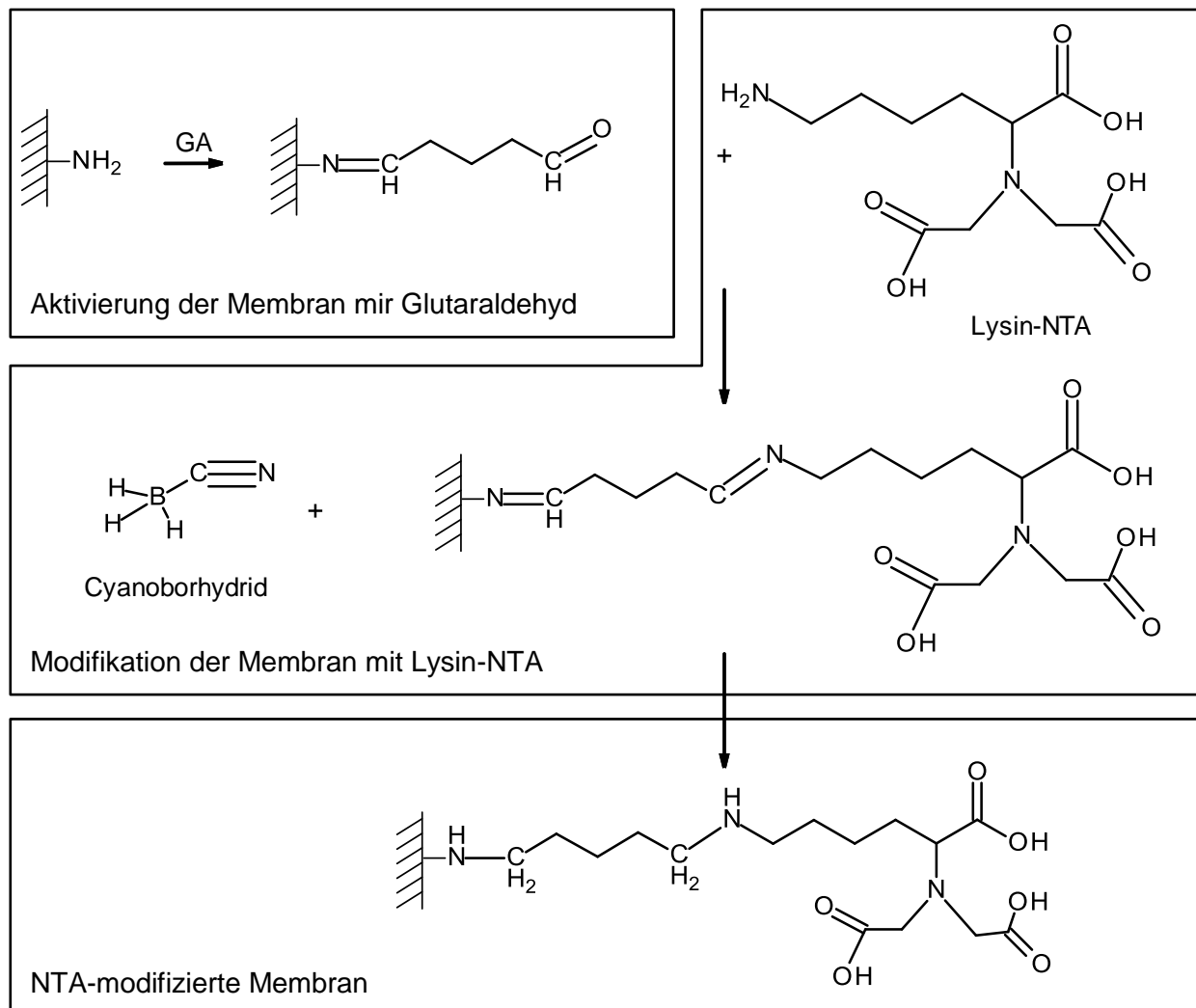


Abb. 2-15 **Reaktionen zur Aktivierung und Modifikation der RO-Membran. Mit Hilfe von Glutaraldehyd wurden die Aminogruppen der Oberfläche aktiviert.** Lysin-NTA kann daran binden. Die Bindung wurde durch eine Schiff'sche-Base-Reaktion mit Cyanoborhydrid stabilisiert. Im Ergebnis trägt die RO-Membran NTA auf der Oberfläche.

Nachdem die Membran aktiviert und mit Lysin-NTA modifiziert wurde, erfolgte analog dem Sepharose-Material die Inkubation mit Nickel-Ionen. Im Anschluss folgte die Immobilisierung des His-getaggtten Enzyms. Der Reaktionsmechanismus ist vergleichbar mit der Chelating

Sepharose aus Abschnitt 2.13.1. Im jetzigen Fall hingegen, sind es drei reaktive Sauerstoffatome, die das Nickel komplexieren. Dies hat seinen Grund in den drei Säuregruppen der NTA. Der Komplex ist in Abb. 2-16 dargestellt.

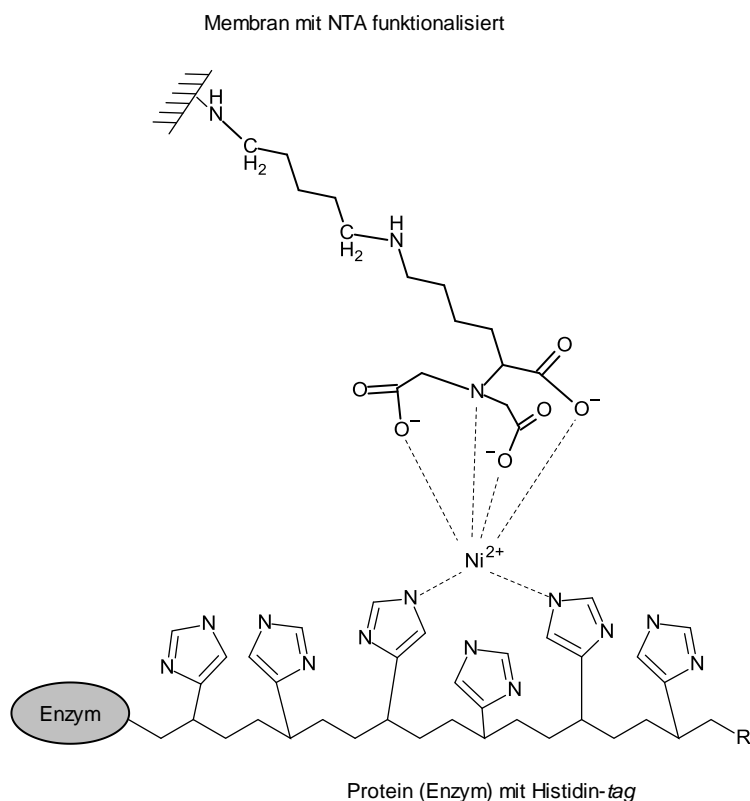


Abb. 2-16 **Bindung des Enzyms an die aktivierte Oberfläche der RO-Membran.** Nachdem die NTA-Gruppe aufgebracht wurde, konnte diese Nickel-Ionen binden. Der Histag des Enzyms konnte nun den Chelatkomplex ausbilden und somit an die Oberfläche binden.

Die Methodik zur Modifikation und Immobilisierung ist in Abb. 2-17 schematisch zusammengefasst. Für die Modifikation wurden kreisrunde Membranstücken (Durchmesser: 5 cm) ausgestanzt und anschließend in die Inkubationskammer (vgl. Abschnitt 2.4.1) eingespannt. Die Fläche, welche der Reaktion dann zur Verfügung stand, betrug $12,57 \text{ cm}^2$. Zur Berechnung der Fläche ging nur ein Durchmesser von 4 cm ein, da der O-Ring der Dichtung 0,5 cm dick war und somit die Fläche effektiv um 1 cm im Durchmesser geschmälert war. Die Membranen schüttelten zur Inkubation (innerhalb der Inkubationskammer) in einem Inforceschüttler bei 25°C und 60 rpm. Nach dem Übertragen der Membranstücken in ein Reaktionsgefäß, erfolgten drei Waschschritte bei Raumtemperatur auf einen Rollermixer. Die Aktivitätsbestimmung im Überstand erfolgte wie in Abschnitt 2.7.1 und auf der Membran wie in Abschnitt 2.7.3 beschrieben.

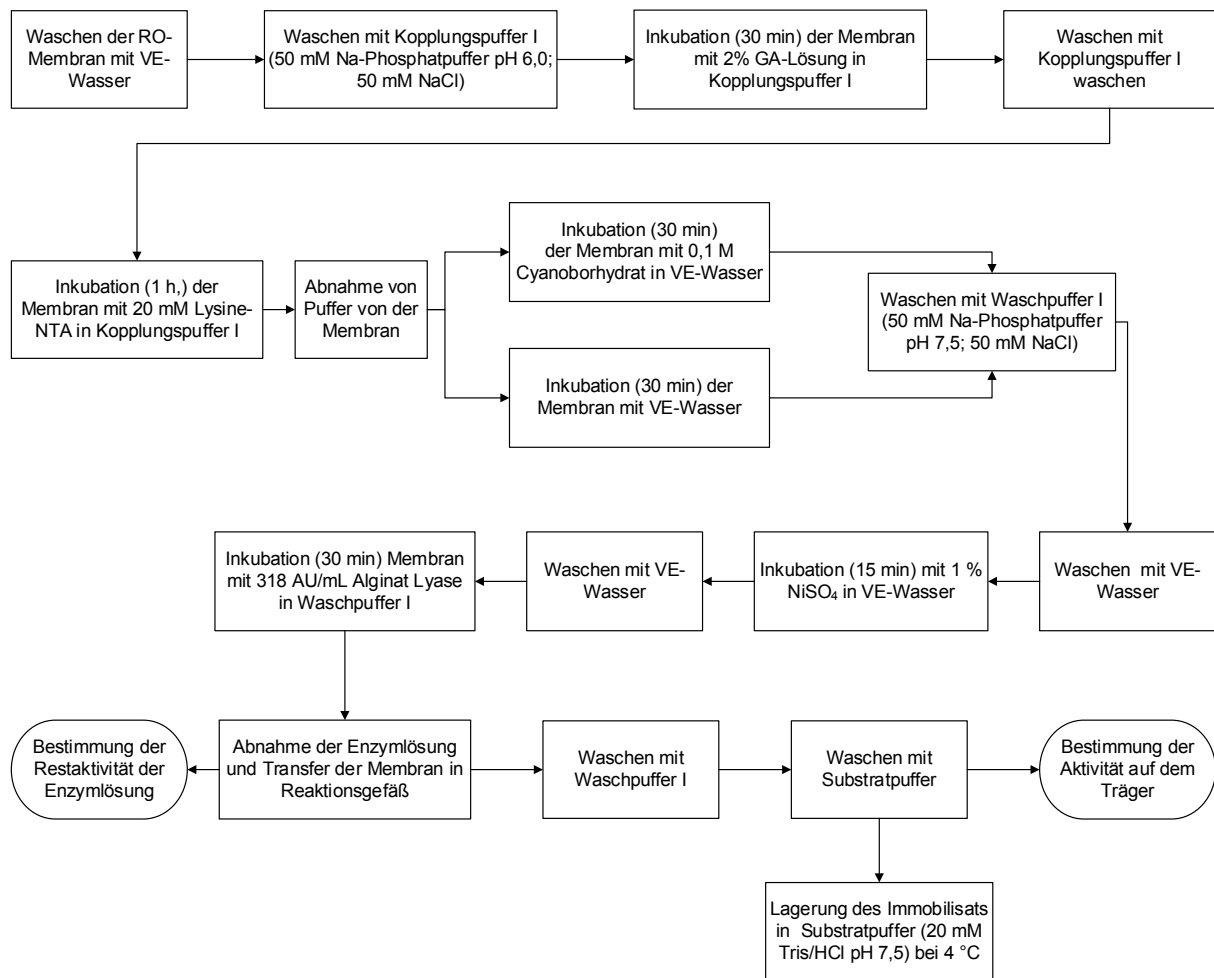


Abb. 2-17 Schematischer Ablauf der Modifikation der RO-Membranen und die anschließende Immobilisierung der Alginat Lyase über den His-tag. VE-Wasser: voll entsalztes Wasser; GA: Glutaraldehyd; NTA: Nitrilotriessigsäure.

2.13.6 Immobilisierung via Disulfidbrücken an RO-Membranen

Zur Kopplung der Cystein-Varianten der Alginat Lyase an die RO-Membranen wurden diese zuvor mit einem Linkermolekül (Sulfo-LC-SPDP) aktiviert. Die Reaktionen sind in Abb. 2-18 gezeigt. Der methodische Ablauf der Modifikation und der Immobilisierung ist in Abb. 2-19 dargestellt.

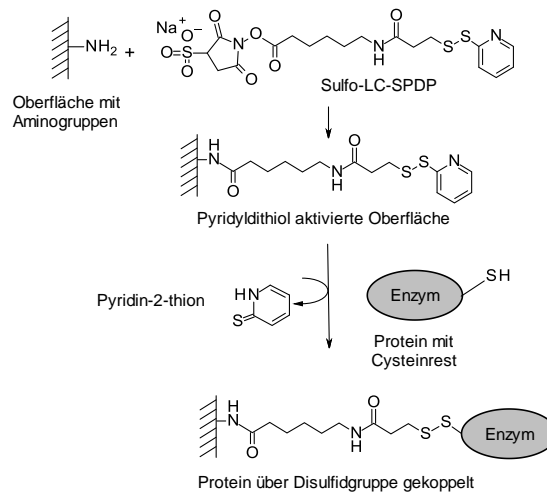


Abb. 2-18 **Reaktionen zur Funktionalisierung der RO-Membran mit Sulfo-LC-SPDP und anschließende Kopplung des Enzyms.** Die Aminogruppen der Oberfläche reagieren mit dem Kopplungsagens Sulfo-LC-SPDP. Die chromophore Gruppe (Pyridin-2-thion) wurde durch das Protein mit Cystein-Gruppen eluiert und das Protein band sich an die Oberfläche.

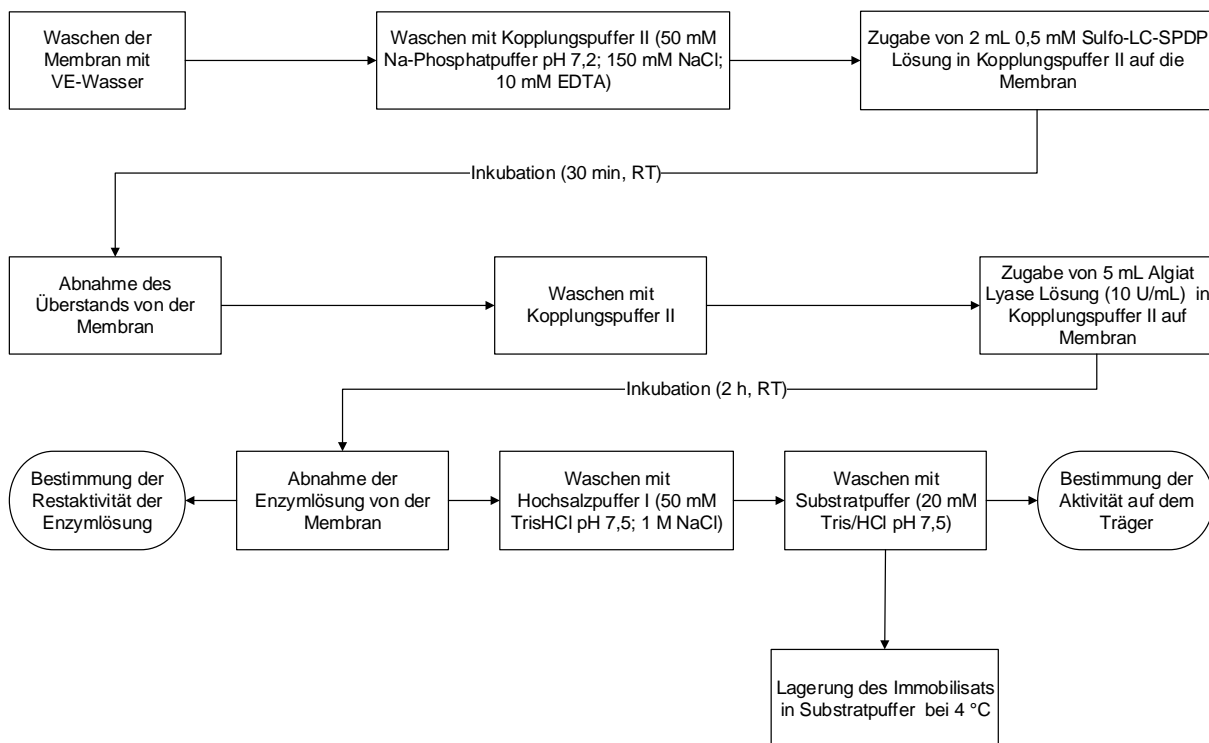


Abb. 2-19 **Schematischer Ablauf der Modifikation der RO-Membran und anschließende Immobilisierung der Cystein-Varianten der Alginat Lyase.**

Für die Immobilisierung wurden verschiedene Cystein-Varianten der Alginat Lyase (siehe 2.8.8) eingesetzt. Dafür wurden die Varianten zuvor mittels SEC, wie in Abschnitt 2.12 beschrieben, vom Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol abgetrennt. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie in Abschnitt 2.7.3 erläutert.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit waren Untersuchungen zur Herstellung und der gezielten Immobilisierung einer Alginat Lyase. Zur Produktion des Enzyms war es zunächst notwendig die rekombinante Expression zu etablieren.

3.1 Produktion der Alginat Lyase in *E.coli*

Miyake und Kollegen publizierten im Jahr 2004 eine Gensequenz für eine Alginat Lyase, A-II', aus *Sphingomonas sp. A1*, welche ein breites Substratspektrum aufweist [Miyake et al., 2004]. In dieser Arbeit wurde beschrieben, wie das Enzym erfolgreich in *E.coli* exprimiert und charakterisiert wurde. Gentechnisch wurde ein His-tag zu Reinigungszwecken angehängt. Das Gen wurde durch eine Homologiestudie entdeckt, es zeigt eine große genetische Ähnlichkeit zu dem Enzym Alginta Lyase A1-I.aus *Sphingomonas sp. A1*. Zusätzlich trug das Gen eine N-terminale Erweiterung von 81 Nukleotiden. Um die Ergebnisse vergleichen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit das Enzym um 27 Aminosäurereste (entspricht den 81 Nukleotiden) am N-Terminus gekürzt [Miyake et al., 2004]. Die Nukleotidsequenz (Uniprot ID: Q75WP3 [UniProt, 2014]) dieses Enzyms war Vorlage für alle folgenden Untersuchungen in dieser Dissertation. Das Gen für die Alginat Lyase wird im Folgenden mit AlgLys abgekürzt. Für die Expression in *E.coli* sollte die *Codon Usage* angepasst und ebenfalls ein His-tag am C-Terminus angehängt werden. Zudem wurden zu Klonierungszwecken vor und nach der Gensequenz Restriktionsschnittstellen eingefügt.

3.1.1 Gendesign für die Alginat Lyase

Mit Hilfe des Programms *Gendesigner* wurde die Nukleotidsequenz der Alginat Lyase so optimiert, dass sie an die *Codon Usage* von *E.coli* angepasst ist. In Abb. 3-1 wird die *Codon Usage* für *E.coli* und *Sphingomonas sp. A1* verglichen. Man erkennt, dass einige Codons, wie z.B. CAG für Glutamin, von beiden Organismen gleich und in ähnlicher hoher Frequenz genutzt werden. Es gibt aber auch Codons, wie z.B. CTC für Leucin, welche in beiden Organismen gleich selten genutzt werden. Eine Expression könnte durch geringe Codon Nutzung geringer ausfallen. Es sollte daher bei einer Expression in *E.coli* das Codon CTG genutzt werden. Dieses Codon kommt in hoher Frequenz vor. Demnach stehen vermutlich genügend t-RNAs für die Translation zur Verfügung. Die Nukleotidsequenz des Gens wurde gegen die Häufigkeit der Codons in der *E.coli* Codon-Usage-Tabelle aufgetragen und ist in Abb. 3-2 dargestellt. Für die Sequenz des Alginat Lyase Gens waren die Codons CTC, CTT und TTG kritisch. Diese codieren für Leucin und wurden durch CTG ersetzt. Die Nukleotidsequenz und die daraus resultierende Aminosäuresequenz ist im Anhang in Kapitel 8 unter Abb. 8-1 dargestellt.

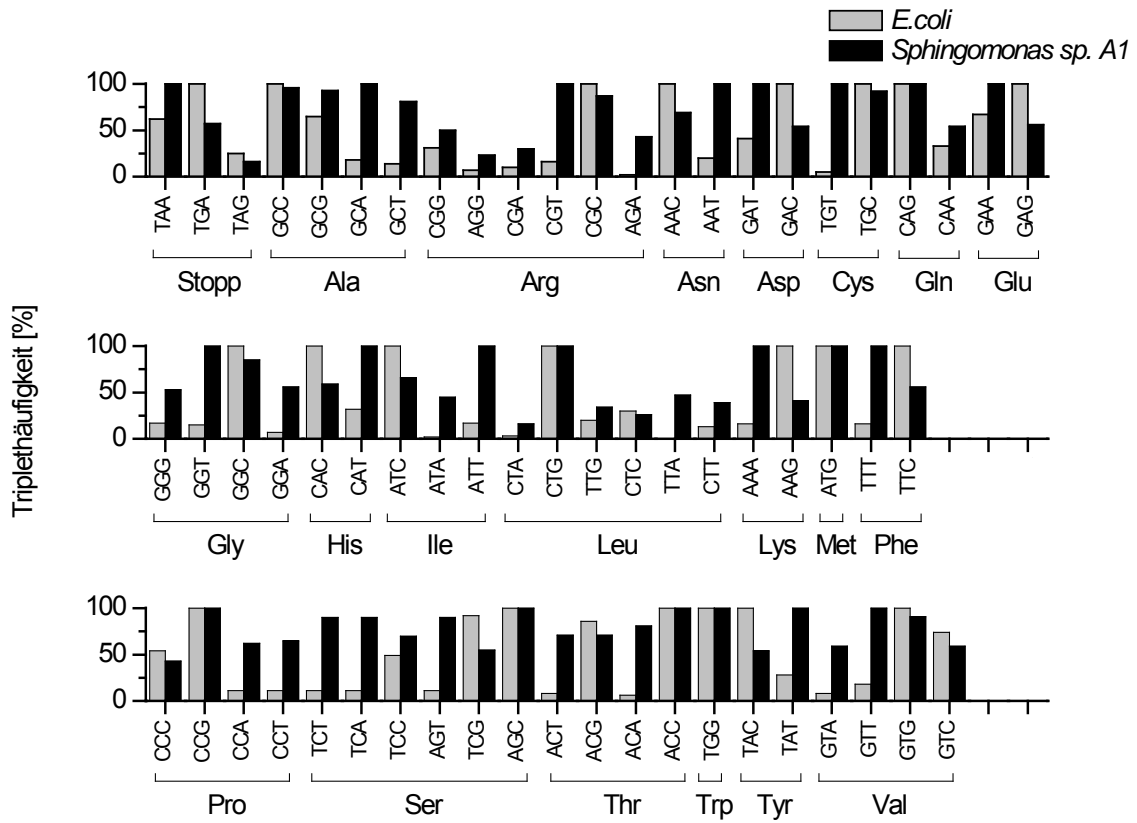


Abb. 3-1 Vergleich der **Codon Usage** von *E. coli* und *Spingomonas sp. A1*. Für den Vergleich wurde die Software GCUA (Graphical Codon Usage Analyser) genutzt [Fuhrmann et al., 2004]. Die Codon Usage Tabellen wurden aus der Kazusa-Datenbank entnommen [Nakamura et al., 2000].

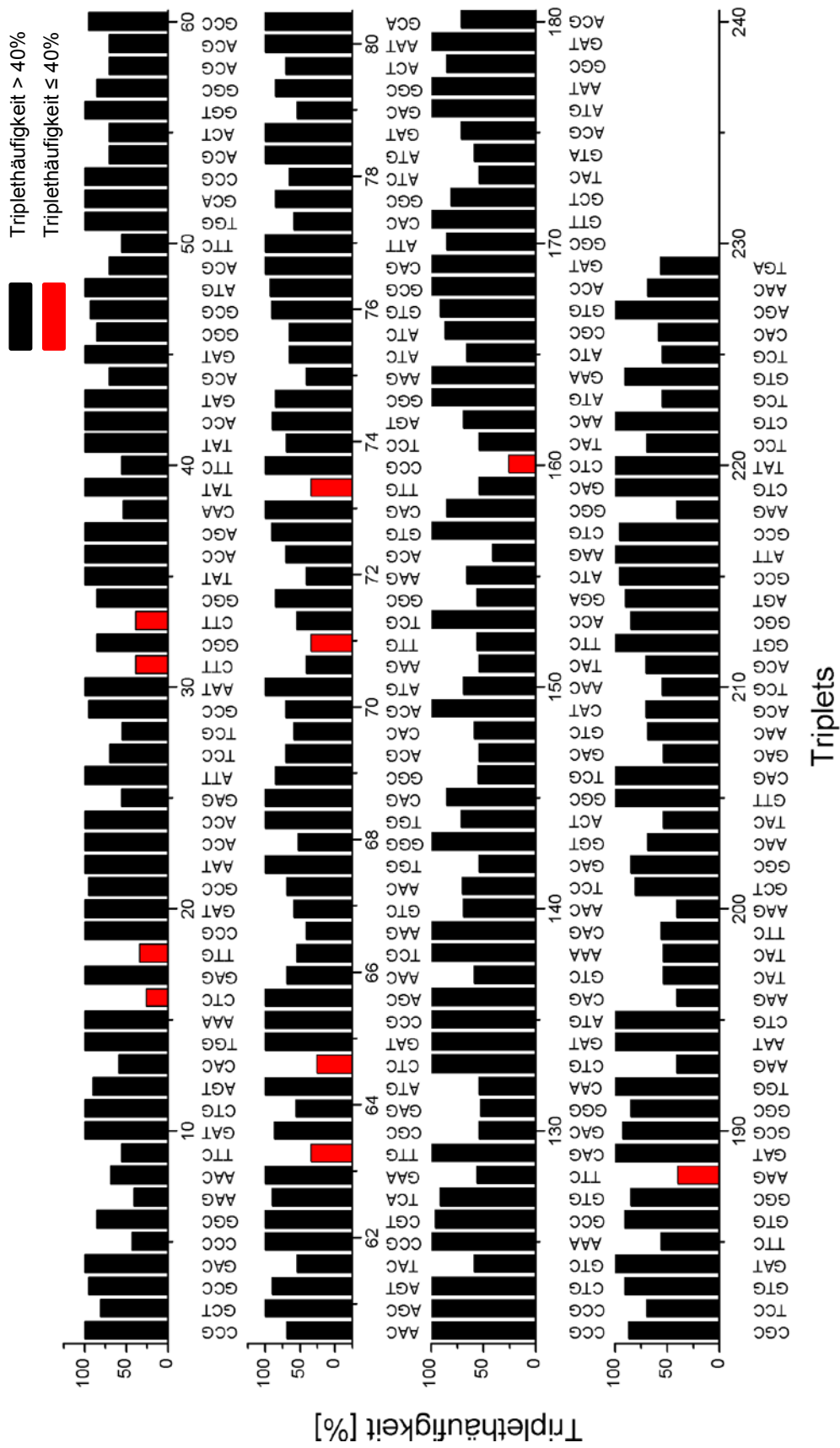


Abb. 3-2 Triplets der Sequenz der Alginat Lyase aufgetragen gegen die Häufigkeit in der Codon-Usage-Tabelle von *E.coli*. Um kritische Codons für die Expression in *E.coli* abzuschätzen, wurde die Sequenz mit Hilfe der Software GCUA analysiert [Fuhmann et al., 2004] und graphisch gegen die Häufigkeit der Triplets in der Codon-Usage-Tabelle für *E.coli* [Nakamura et al., 2000] aufgetragen.

Für die Expression des Enzyms Alginate Lyase aus *Sphingomonas sp. A1* wurde das Gen mit einer optimierten Sequenz durch die Firma MWG-Eurofin synthetisiert und in den Expressionsvektor pET-20b(+) kloniert. Dieser Vektor wurde ausgewählt, da dieser die Möglichkeit der Selektion durch eine Ampicillinresistenz bietet und die Expression erst mit der Induktion mittels IPTG erfolgt. Nach Erhalt der Plasmid-DNA wurde diese in den Expressionsstamm *E.coli* BL21 (DE3) Gold transformiert (vgl. Abschnitt 2.8.5). Von den erhaltenen Klonen wurden acht in einer Kolonie-PCR (vgl. Abschnitt 2.8.9) mit Primern für den T7-Promotor und T7-Terminator eingesetzt und die erhaltenen Amplifikate mittels Gelelektrophorese analysiert. Das Ergebnis der Elektrophorese ist in Abb. 3-3 dargestellt.

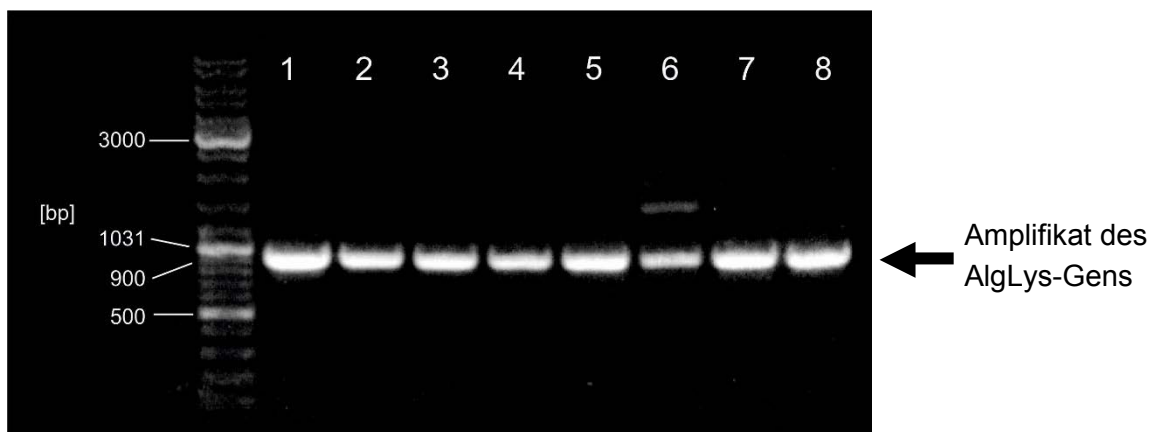


Abb. 3-3 **Auswertung der Agarosegelelektrophorese nach Kolonie PCR der Transformanten des pET-20b(+)-AlgLys Konstruktes.** (1 % Agarosegel) Spur 1 bis 8: Amplifikate acht verschiedener Klone, die mittels Kolonie-PCR unter Verwendung von T7-Promotor und T7-Terminator Primern erhalten wurden [je 3µl].

Für sieben Klone konnte ein PCR-Fragment mit 800 bp amplifiziert werden. Die Amplifikatgröße entsprach den Erwartungen und damit sind die sieben Klone als positiv zu werten. Ein Klon (Spur 6) zeigte ein Nebenprodukt und ist somit als negativ zu bewerten. Die Plasmid DNA vom Klon 2 (Spur 2) wurde sequenziert und künftig als pAL (pET-20b(+)) inklusive AlgLys-Gen bezeichnet. Das Ergebnis stimmte zu 100 % mit der in Auftrag gegebenen Sequenz überein (ausgeführt durch MWG-Eurofins). Von diesem *E.coli* Klon wurde eine Kryokultur angelegt (Abschnitt 2.8.6), diese war dann Ausgangspunkt für alle weiteren Untersuchungen.

3.1.2 Expression der Alginate Lyase auf LB-Medium

Zunächst wurde die Expression des AlgLys-Proteins im klassischen LB-Medium [Bertani, 1951] untersucht. Die Expression des Enzyms wurde in Anlehnung an die Literatur [Miyake et al., 2004] durchgeführt. Für die Expression des Enzyms wurden *E.coli*-Zellen, die pAL

tragen, in LB-Medium inokuliert und, wie in Abschnitt 2.9.1 beschrieben, kultiviert. Um zwischen löslichen und unlöslichen Proteinen zu differenzieren, wurden 1/OD-Proben, wie in Abschnitt 2.6.1 erläutert, aufbereitet. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE analysiert (Abschnitt 2.6.2). Das Ergebnis ist in Abb. 3-4 dargestellt. Es ist erkennbar, dass es bereits vor der Induktion zur Expression des Gens kam und das Zielprotein (MW 25,5 kDa) im geringen Umfang exprimiert wurde. Der T7-Promotor des pET-20b(+)-Vektors besitzt eine sogenannte Basalexpression und ist somit nicht zu „100 % dicht“. Dieser Effekt wird als „leaky“ Expression [Giacalone et al., 2006] bezeichnet.

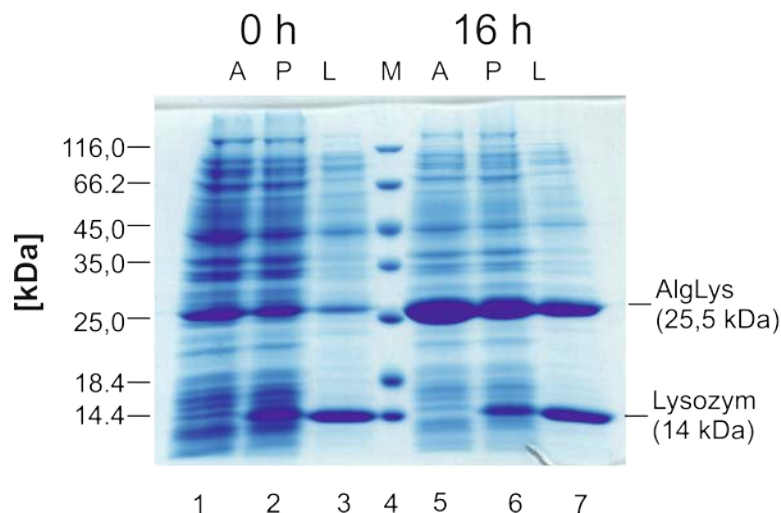


Abb. 3-4 **SDS-PAGE-Analyse der Expression der Alginat Lyase in LB-Medium bei 16°C**. Die Kultur wurde mit einer Vorkultur, welche 16h bei 37°C gewachsen war, inokuliert. Es wurde eine OD von 0,1 eingestellt und die Kultur bei 37°C bis zu einer OD von 0,5 kultiviert (ca. 2h). Es wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten eine 1/OD Probe erstellt. 0 h = vor der Induktion; 16 h = 16 Stunden nach Induktion mit 0,1 mM IPTG. In Spur 4 (M) wurde ein Protein-Marker aufgetragen [5 µl]. Die Proben wurden in Gesamtzellprotein (A), unlösliche Proteine (P) und lösliche Proteine (L) unterschieden [Beladung je 10 µl Probe].

In Spur 6 und 7 in Abb. 3-4 sind zwei annähernd gleich starke Banden der Alginat Lyase zu erkennen. Daher ist anzunehmen, dass die Verteilung des Enzyms nach dem enzymatischen Aufschluss mittels Lysozym in unlösliche und lösliche Fraktion, in etwa gleich ist. Im späteren Verlauf wurde ein Hochdruckhomogenisator (HDH) eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass der wesentliche Anteil des Enzyms in der löslichen Fraktion zu finden ist (Abschnitt 3.1.3).

Die Expression bei 16°C über 16 h in LB-Medium war erfolgreich. Das Enzym Alginat Lyase wurde überexprimiert und konnte im löslichen und unlöslichen Anteil der Zellproteine nachgewiesen werden. Die Biomasse wurde abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -22°C gelagert.

3.1.3 Reinigung der Alginat Lyase mittels Affinitätschromatographie

Nachdem die Expression des Enzyms durchgeführt wurde, erfolgte die Reinigung. Die Biomasse wurde mittels Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile von dem Rohenzymextrakt mittels Zentrifugation bei 20.000 g abgetrennt. Der Überstand wurde mittels Metall-Chelating-Affinitätschromatographie aufgearbeitet und dadurch das Zielprotein aufgereinigt. Der gesamte Prozess ist in Abschnitt 2.10 ausführlich erläutert. Der Verlauf der Reinigung wurde sowohl am Computer mit Hilfe der Software Unicorn 4.10 (Amersam Biosciences) als auch mit SDS-PAGE-Analyse (siehe Abschnitt 2.6.1) verfolgt und ist in Abb. 3-5 gezeigt.

Anhand der UV-Kurve (schwarze Linie) ist erkennbar, dass zunächst nichtbindende Proteine die Säule passieren. Während des folgenden Waschschrilles eluierte bereits eine geringe Menge Zielprotein (vgl. SDS-Page Abb. 3-5 B Spur 6 deutliche Bande der Alginat Lyase bei 25 kDa). Dieses Austragen lässt sich mit dem Erreichen der Säulenkapazität erklären und wurde in späteren Experimenten vermieden, indem eine größere Säule und Material mit höherer Kapazität benutzt wurden (vgl. Abschnitt 2.10.2). Nach dem Waschschrill wurde die Elution damit initiiert, dass ein Stufengradient von 10 auf 500 mM Imidazol gefahren wurde. Mit zunehmender Imidazolkonzentration setzte die Elution des Zielproteins ein. Indikator war hier die Leitfähigkeit (rote Linie). In der anschließenden SDS-PAGE ist erkennbar, dass im Vergleich von Spur 1 (Gesamtzellprotein) und Spur 2 (lösliches Protein) der Hauptanteil des Zielproteins in der löslichen Fraktion zu finden ist. Im Durchlauf und der Waschfraktion (Spur 4 und 5) sind nur geringe Mengen an Enzym zu finden. Die Elutionsfraktionen (Spur 8-14) zeigen einen hohen Anteil an Alginat Lyase und nur geringe Verunreinigungen.

Insgesamt war die Reinigung erfolgreich. Das Reinigungsprotokoll wurde mit Tris/HCl- bzw. Natriumphosphatpuffer mehrfach erfolgreich während der Arbeit wiederholt.

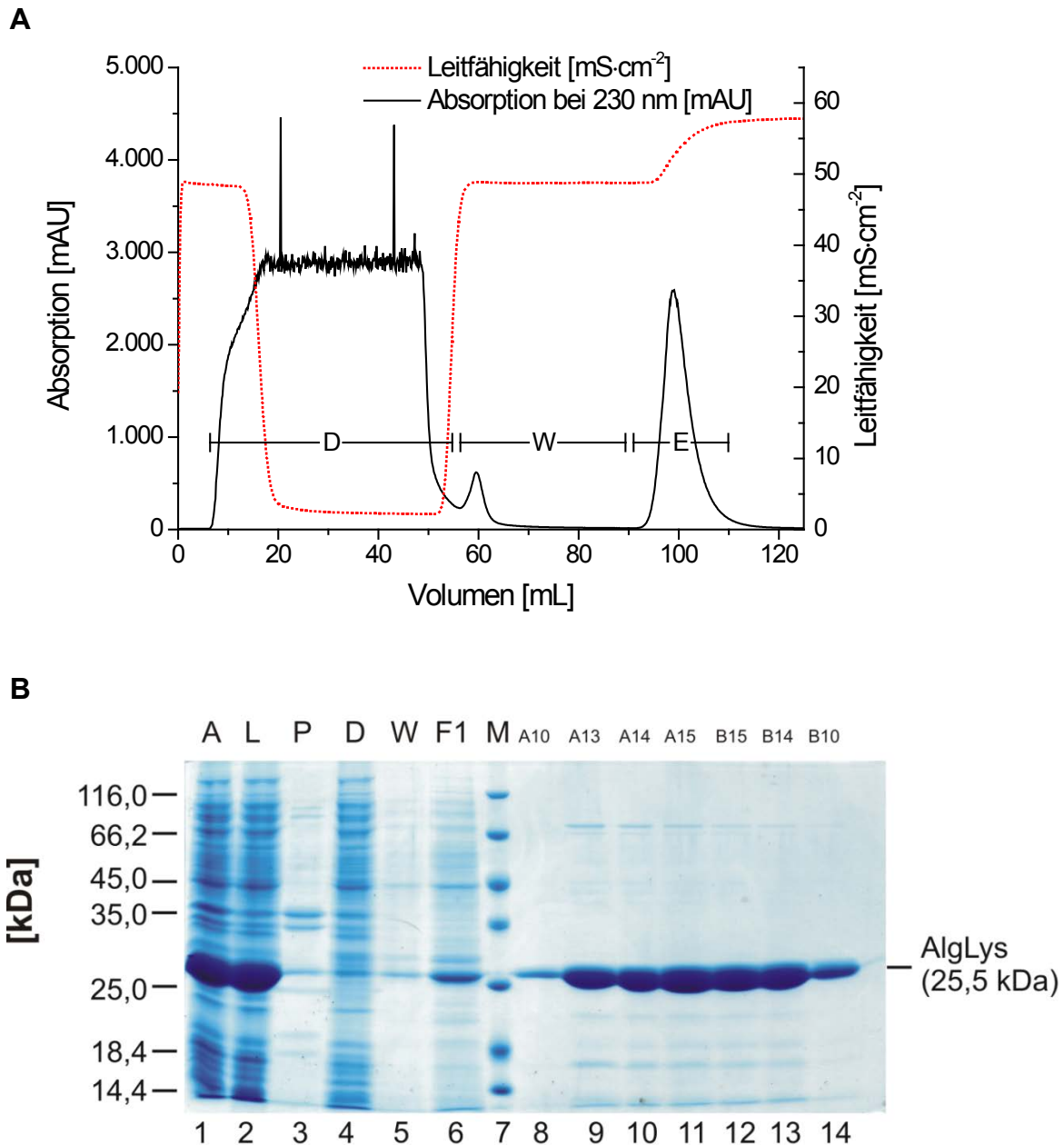


Abb. 3-5 Reinigung der Alginate Lyase aus *E. coli*

A: Chromatogramm der IMAC. Das Rohenzymextrakt (41 mL) wurde auf eine Nickel-Sepharose Säule (H 200 mm; Ø 16 mm) aufgetragen. CV: 5,1 mL; Flussrate: 3 mL/min. Nach Probenaufrag wurde die Säule mit 4 CV Bindepuffer gewaschen. Anschließend wurde über einen Stufengradienten mit 0-100 % Elutionspuffer und einen Gradienten *Delay* von 30 mL eluiert. Mittels UV-Detektor (280 nm) wurde eluiertes Protein detektiert

B: SDS-PAGE. Die Expression des Enzyms erfolgte in *E.coli* BL21 (DE3) Gold mit pAL in LB-Medium im 500 mL Maßstab bei 16 °C. Induktion mit 0,1 mM IPTG für 4h. Vor Probenaufrag wurden die Proben im Verhältnis 1:2 mit Probenpuffer gemischt und 5min bei 99 °C inkubiert. Spur 1: Gesamtprotein [A] vor HDH; 2: lösliche Fraktion [L] nach HDH; 3: unlösliche Fraktion [P] nach HDH; 4: Durchlauf [D]; 5: Waschfraktion [W]; 6: Peak bei 60 mL [F1]; 7: Marker [M]; 7-12 Elutionsfraktionen A8 – A10 (1:20 Verdünnungen).

Im Anschluss wurde die Aktivität und der Proteingehalt des Rohenzymextraktes der Elutionsfraktionen (oder entsprechend die Fraktionen gepoolt) gemessen (siehe 2.7.1). Da Alginat Lyase ein Polymer-spaltendes Enzym ist (vgl. Abschnitt 1.1.5) und kein einheitliches Produkt entsteht, lässt sich keine klassische Aktivität berechnen. In dieser Arbeit wurde deshalb zur Beschreibung der Aktivität, wie in der Literatur [Haugen et al., 1990; Shin et al., 2010], die Absorptionsunits (AU) gewählt. Dabei entspricht eine AU der Zunahme der Absorption bei 235 nm um 1 pro Minute bei definiertem pH-Wert (7,5) und Temperatur(25°C). Abschließend wurde eine Reinigungstabelle erstellt. In Tabelle 3-1 ist eine solche Reinigungstabelle für die Chromatographie dieses Abschnittes, exemplarisch für alle später folgenden, dargestellt.

Tabelle 3-1 Reinigungstabelle für Alginat Lyase aus *E.coli* mittels Nickel-Affinitätschromatographie.

RS	Volumen [mL]	Protein Konz. [mg/mL]	Spezifische Aktivität [AU _{235nm} /mg]	Gesamt Aktivität [AU _{235nm}]	Ausbeute [%]	RF
RE	41	4,17	21,3	3638,8	100	1.0
IMAC	8	5,29	75,2	3166	87	3,5

RS: Reinigungsschritt; RF: Reinigungsfaktor; RE: Rohenzymextrakt

Das gereinigte Enzym konnte sowohl in Elutionspuffer als auch dialysiert in anderen gängigen Puffern, wie 50 mM Tris/HCl pH 7,5 und 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5, über mehrere Wochen bis zur Verwendung gelagert werden (vgl. Abschnitt 3.2.3).

3.1.4 Untersuchung zur Anpassung der Kultivierung für ein *Up-scaling* der Enzymproduktion

In Hinblick auf die Produktion größerer Mengen sollte die Expression des Enzyms so angepasst werden, dass eine Fermentation im 10 L Maßstab möglich ist. Bei einer Temperatur von 16°C ist die Translationsgeschwindigkeit in *E.coli* Zellen vermindert und somit die Löslichkeit der Zielproteine erhöht. Es sollte untersucht werden, ob die Kultivierung bei 24°C zu ähnlichen Enzymausbeuten führt. Zudem wurde der Einsatz eines modifizierten Mediums nach Gerber [Gerber et al., 2008] getestet. Der Einsatz von Komplexmedium im Bioreaktor mittels *Fed-batch* Verfahren führt oft zu hohen Biomasseausbeuten. Glycerin wurde als Kohlenstoff-Quelle genutzt. Mit Änderung der Temperatur und des verwendeten Mediums konnten die folgenden Beobachtungen gemacht werden. Die Biofeuchtmasse wurde um 0,34 g erhöht. Die Enzymmenge im Rohenzymextrakt konnte um Faktor 2,5 erhöht werden. Diese Ergebnisse sind in Abb. 3-6 dargestellt

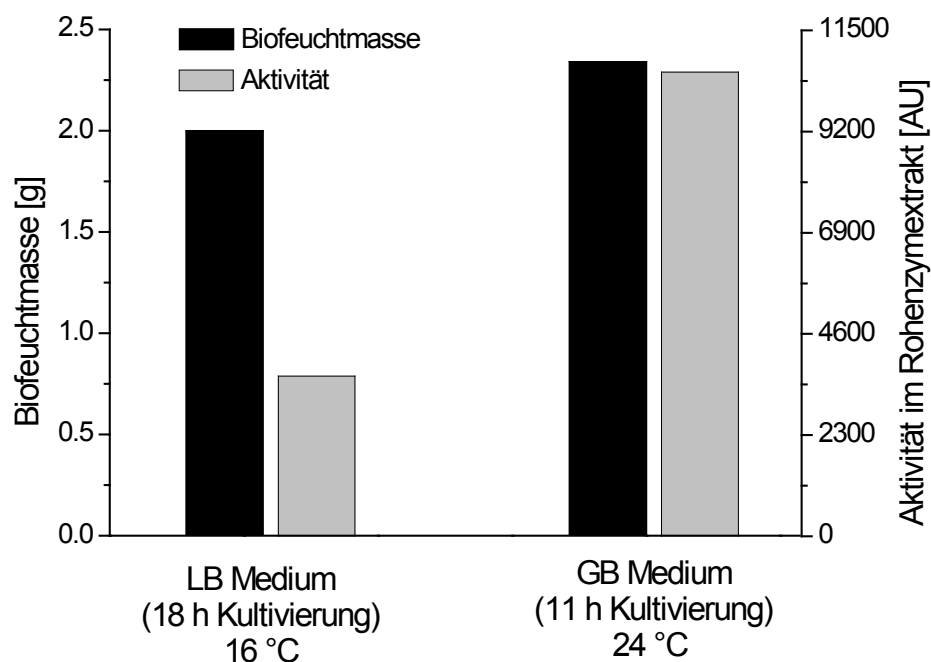


Abb. 3-6 **Biomasseausbeute und Aktivität der Alginat Lyase unter verschiedenen Expressionsbedingungen.** Es wurde je 500 mL Hauptkultur des entsprechenden Mediums mit einer Vorkultur aus LB angeimpft und eine Start OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Die Kultivierung bis zum Erreichen einer optischen Dichte von ca. 0,5 wurde bei 37°C durchgeführt. Dann erfolgte mit 0,1 mM IPTG die Induktion und die entsprechende Expressionstemperatur wurde eingestellt. Die Zellen wurden nach der angegebenen Zeit geerntet und die Biofeuchtmasse (BFM) ermittelt. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss mittels HDH. Nach der Zentrifugation wurde im Rohenzymextrakt mittels Enzymassay (Abschnitt 2.7.1) die Aktivität bestimmt.

3.2 Charakterisierung der Alginat Lyase

Nachdem die Produktion (vgl. Abschnitt 3.1) des Enzyms Alginat Lyase etabliert war, erfolgte vor dem Einsatz in Immobilisierungsversuchen eine Charakterisierung des Biokatalysators.

3.2.1 Bestimmung der kinetischen Parameter der Alginat Lyase

Zur Charakterisierung eines Enzyms werden unter anderem die Reaktionskonstante K_M und die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten V_{max} bestimmt. Die Parameter K_M und V_{max} wurden mit Alginat (MW 100.000 – 200.000 g/mol [Sigma-Aldrich, 2012]) und mit Mannuronsäure Oligosaccharide (25 bis 35 Monosaccharid Einheiten; Firma Elicityl) bestimmt. Im Folgenden wird diese Verbindung mit MOS abgekürzt. Die Versuchsbeschreibung ist in Abschnitt 2.7.1 gezeigt. In Abb. 3-7 ist das Ergebnis dargestellt.

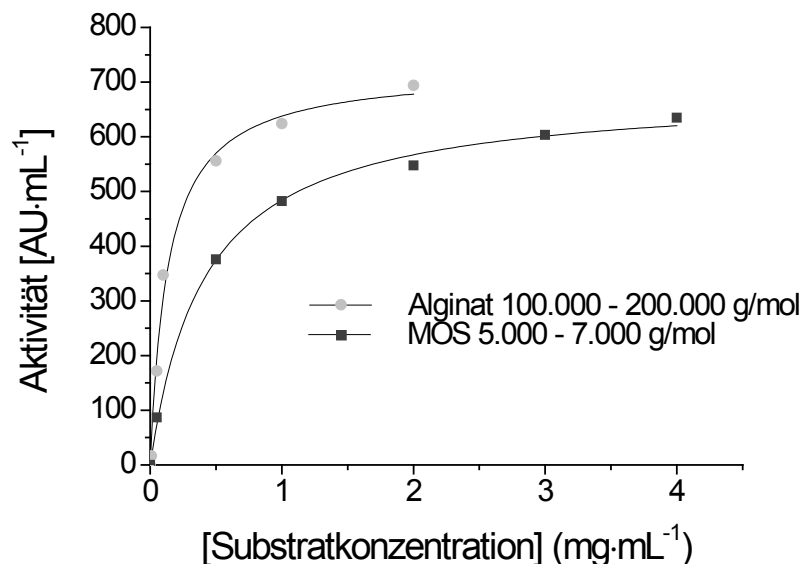


Abb. 3-7 **Abhängigkeit der Alginat Lyase-Aktivität von der Substratkonzentration zweier verschiedener Substrate.** Für die Ermittlung der Michaelis-Menten-Kinetik wurden verschiedene Substratkonzentrationen im Standardassay (vgl. Abschnitt 2.7.1, pH 7,5 und 25°C, 4,2 mg/ml Enzym) eingesetzt und die resultierende Aktivität gegen die Konzentration aufgetragen. Die Anpassung der Daten erfolgte mit Hilfe der Formel 3-1.

$$y = \frac{V_{max} \cdot [S]}{(K_M + [S])}$$

Formel 3-1: y = Aktivität; S = Substratkonzentration; V_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit; K_M = Reaktionsgeschwindigkeitskonstante

Tabelle 3-2 Parameter für die Anpassung nach Michaelis-Menten für die Alginat Lyase Kinetik.

Substrat	Parameter		
	V_{\max} [AU/mL]	K_M [mg/mL]	R^2
Alginat	724,06 ± 25,396	0,14 ± 0,0200	0,992
Mannuronsäure Oligosaccharid	684,44 ± 13,33	0,414 ± 0,036	0,998

Für das Substrat Mannuronsäure Oligosaccharide wurde ein größerer K_M -Wert im Vergleich zum polymeren Substrat Alginat ermittelt. Mit dem K_M -Wert kann die optimale Konzentration an Substrat ermittelt werden, die notwendig ist um den Assay in Substratsättigung durchzuführen.

3.2.2 Aktivität der Alginat Lyase unter salinen Bedingungen

Eine mögliche Anwendung des Enzyms Alginat Lyase liegt in der Vermeidung von Biofilmen im Reverse Osmose Prozess. Dieser Prozess findet Anwendung in der Aufbereitung von Brackwasser und Meerwasser. Deshalb wurde untersucht, in welchem Maß das Enzym salztolerant ist. Dafür wurde der Aktivitätsassay so modifiziert (siehe Abschnitt 2.7.2), dass die Aktivität bei verschiedenen Salzkonzentrationen gemessen werden konnte. Das Ergebnis ist in Abb. 3-8 graphisch dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass zunächst die Aktivität mit steigender Natriumchloridkonzentration zunimmt. Ab etwa 90 mmol/L NaCl sinkt die Aktivität allerdings kontinuierlich. Erhöht sich die Konzentration auf über 300 mmol/L NaCl, sinkt die Aktivität auf unter 50 %.

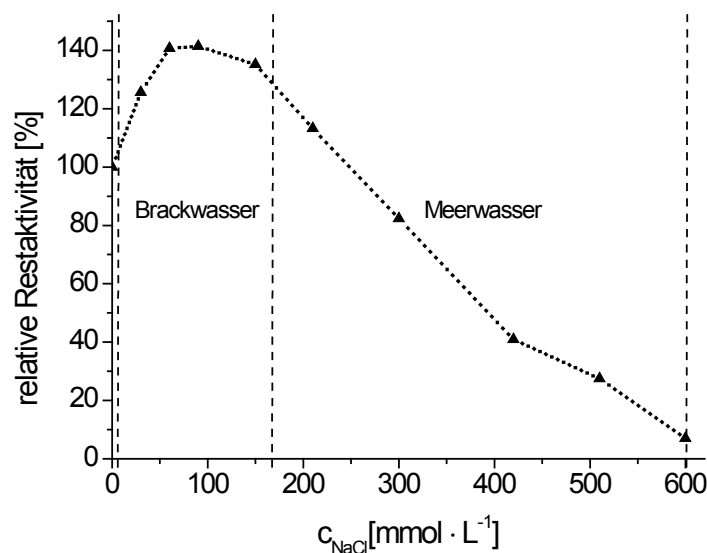


Abb. 3-8 **Alginat Lyase-Aktivität in Abhängigkeit von der Natriumchloridkonzentration.**

Der Standardassay (Abschnitt 2.7.1) wurde so modifiziert, dass die Substratlösung verschiedene Salzkonzentrationen aufwies und somit die Änderung der Aktivität unter verschiedenen salinen Bedingungen getestet werden konnte. Die Aktivität ohne Natriumchlorid wurde 100 % gesetzt.

Brackwasser wird laut NGWA (National Ground Water Association®) mit 1000 bis 10.000 ppm gelösten Salzen angegeben [NGWA, 2010]. Das entspricht 0,1 bis 1 % oder maximal 171 mmol/L NaCl. In diesem Bereich ist das Enzym hoch aktiv (Abb. 3-8). Meerwasser kann bis zu 35.000 ppm Salz enthalten und hat damit 3,5 % oder bis zu 600 mmol/L NaCl in Lösung. In diesem Bereich wird nur eine geringe Enzymaktivität (<10 %) erreicht.

3.2.3 Stabilität der Alginat Lyase in Abhängigkeit von der Zeit

In Hinblick auf eine industrielle Anwendung des Enzyms ist die Stabilität über die Zeit in Abhängigkeit von der Temperatur von großem Interesse. Um dies zu untersuchen, wurde das Enzym in löslicher Form in 50 mM TrisHCl-Puffer, pH 7,5 bei -20°C, 4°C und Raumtemperatur, für 24 Wochen gelagert und mehrfach die Aktivität bestimmt (vgl. Abschnitt 2.7.1). Aus Abb. 3-9 ist abzulesen, dass die Lagerungsbedingungen in einem Zeitraum von fünf Wochen keinen signifikanten Einfluss auf die Veränderung der Aktivität über die Zeit haben. Insgesamt sinkt die Aktivität um 5-10 % innerhalb dieser Zeit. Bei längerer Lagerung des Enzyms sinkt die Aktivität auf 25 % bei Raumtemperatur und bis zu 60 % bei 4°C Lagertemperatur. Besonders stabil zeigte sich die Enzymlösung, wenn sie mit 50 % (v/v) Glycerol versetzt und bei -20 °C gelagert wurde. Der Aktivitätsverlust betrug dabei nach 24 Wochen nur 11 %.

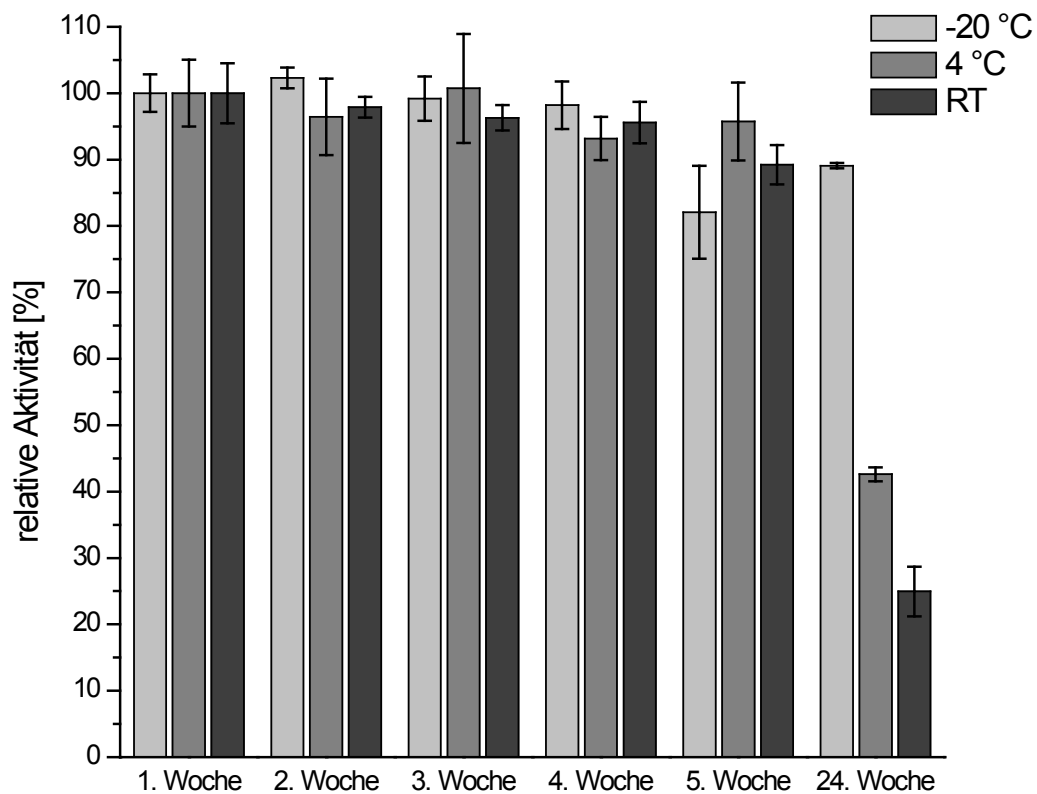


Abb. 3-9 **Alginat Lyase-Aktivität über die Zeit.** Aus einer definierten Enzymlösung wurde je ein Anteil bei -20 °C (in 50 % (v/v) Glycerol) sowie bei 4°C und bei RT (ohne Glycerol) gelagert, und in regelmäßigen Abständen die Aktivität bestimmt (Abschnitt 2.7.1). Es sind relative Werte dargestellt, wobei das Ergebnis der ersten Messung 100 % gesetzt wurde.

3.2.4 Stabilität der Alginat Lyase nach Sprühtrocknung

Eine Variante Enzyme stabil zu lagern ist die Sprühtrocknung. Es wurde untersucht, ob eine Sprühtrocknung des Enzyms möglich ist. Des Weiteren wurde die Stabilität des Enzyms nach diesem Prozess studiert. Die Versuchsbeschreibung ist in 2.11 dargestellt. In Abb. 3-10 ist das Ergebnis zusammengefasst.

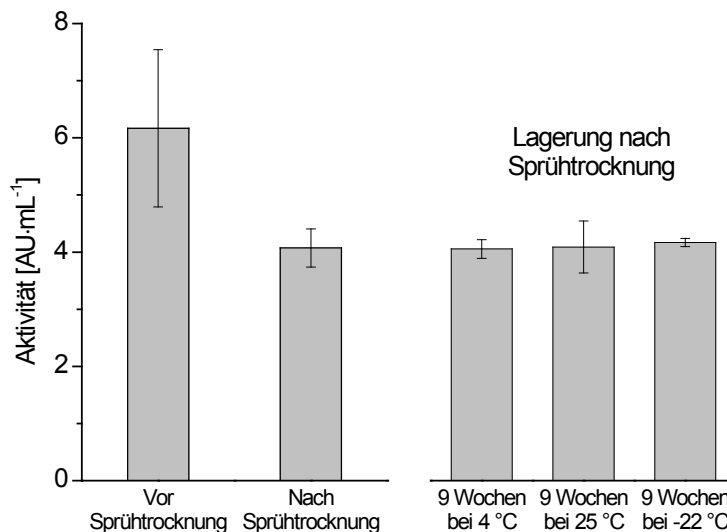


Abb. 3-10 **Aktivität der Alginat Lyase nach Sprühtrocknung.** Eine definierte Menge Enzym wurde in einer Maltodextrinlösung (Verhältnis Protein zu Träger war 1:100) verdünnt und zur Sprühtrocknung eingesetzt. Die Versuchsbeschreibung ist in Abschnitt 2.11 aufgeführt. Vor bzw. nach der Sprühtrocknung wurde die Aktivität, wie in Abschnitt 2.11 beschrieben, gemessen. Anschließend wurde das pulvrige Produkt bei 4 °C, Raumtemperatur und -22 °C gelagert, und nach 66 Tagen die Enzymaktivität bestimmt. Für die Aktivitätsbestimmung nach der Sprühtrocknung bzw. Lagerung wurde das Produkt in VE-Wasser so gelöst, dass die Ausgangskonzentration (theoretisch) wiederhergestellt wurde.

Aus Abb. 3-10 ist abzulesen, dass die Aktivität infolge des Sprühtrocknungsprozesses um etwa 34 % sank. Die verschiedenen Lagerungsbedingungen hatten keinen Einfluss auf die Stabilität des Enzyms in getrockneter Form. Das Enzym Alginat Lyase ließ sich also in Gegenwart von 99 % Maltodextrin sprühtrocknen. Zudem war es bis zu zwei Monate in Pulverform stabil lagerungsfähig.

3.3 Untersuchung zur gerichteten Immobilisierung an porösen Trägern

Nachdem das Enzym charakterisiert wurde, werden in den nächsten Abschnitten die Ergebnisse zur Immobilisierung der Alginat Lyase dargestellt.

Bei einer gerichteten Immobilisierung wurde ein Enzym auf einer Oberfläche so ausgerichtet, dass das aktive Zentrum zum Substrat hin exponiert ist. Dabei wurden möglichst die Bereiche des Proteins modifiziert, die keinen Einfluss auf die Katalyse haben. Im Fall der Alginat Lyase boten sich zwei Strategien an. Zum einen lag der His-*tag* günstig gegenüber dem aktiven Zentrum (vgl. Abb. 3-12). So konnte dieser zur Immobilisierung über Nitrilotriessigsäure- und Iminodiessigsäurereste (NTA oder IDA) genutzt werden. Zum anderen sollten gezielt Aminosäurereste durch Cystein ausgetauscht werden, damit eine Kopplung über Thiolgruppen möglich wird.

Ein Ziel dieser Arbeit war die gezielte und wenn möglich, reversible Immobilisierung der Alginat Lyase an Reverse Osmose Membranen. Bevor dieser bislang nur unzureichend charakterisierte Träger untersucht wurde, sollte die grundsätzliche Machbarkeit der gezielten reversiblen Immobilisierung an kommerziell erhältlichen und gut charakterisierten Trägern untersucht werden. Dafür wurden zunächst poröse Träger genutzt. Diese bieten eine hohe Kapazität, haben aber den Nachteil, dass es im Fall von polymeren Substraten, wie hier z.B. Alginat, zu hohen Diffusionslimitierungen kommen kann.

3.3.1 Untersuchung zur Immobilisierung über His-tag

Zunächst wurde die Aktivität der an Nickel-Sepharose-Beads (*Chelating Sepharose Fast Flow*) gebundenen Alginat Lyase untersucht. Da die Reinigung mit diesem Material erfolgreich war (Abschnitt 3.1) wurde angenommen, dass das Enzym stabil am Material gebunden wird. Die Aktivität wurde allerdings erst nach der Elution mit dem löslichen Enzym getestet. Nun sollte der am Chromatographiematerial gebundene Biokatalysator untersucht werden. Bei diesem Experiment (Abschnitt 2.13.1) konnten 68 % des Enzyms gebunden werden. Allerdings konnte nur 1,4 % der Ausgangsaktivität auf dem Material gemessen werden. Nach der Elution wurde nahezu die gesamte gebundene Aktivität wieder gefunden. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-11 dargestellt. Es kommt wahrscheinlich zur Diffusionslimitierung, welche die Ausbeute stark verfälscht. Schlussfolgernd kann festgehalten werden, dass eine reversible Immobilisierung der Alginat Lyase an Nickel-Sepharose möglich ist. Insgesamt konnte eine Ausbeute von $1,35 \text{ AU/g}_{\text{Sepharose}} (\approx 18 \text{ mg}_{\text{Enzym/g}_{\text{Sepharose}}})$ erzielt werden.

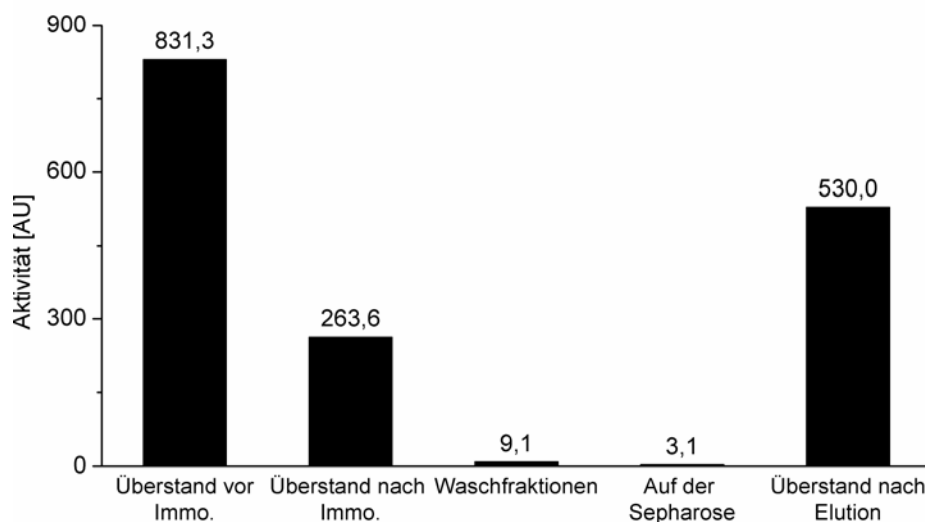


Abb. 3-11 Immobilisierung von Alginat Lyase an Nickel-Sepharose-Beads. Es wurde ca. 1g Nickel-Sepharose-Material mit 831,3 AU Alginat Lyase inkubiert. Nach Abnahme des Überstandes, wurde das Material mehrfach gewaschen und die Aktivität auf dem Träger gemessen. Abschließend wurde ein Teil des Materials mit Puffer (50 mM Tris, 50 mM NaCl und 500 mM Imidazol) inkubiert und somit Enzym wieder eluiert. Die genaue Durchführung ist Abschnitt 2.13.1 beschrieben. Die Angaben sind jeweils auf die Gesamtmenge bezogen.

3.3.2 Untersuchung zur Immobilisierung über Thiolgruppen

In diesem Abschnitt soll die Immobilisierung der Alginat Lyase mittels Thiolgruppen beschrieben werden. Es handelt sich dabei ebenfalls um eine gerichtete Immobilisierung. Anhand der 3D-Struktur wurden drei Serin-Reste in der Aminosäuresequenz ausgewählt, wel-

che sich durch ihre Lage auszeichneten. Sie lagen gegenüber vom aktiven Zentrum des Enzyms (vgl. Abb. 3-12) auf zwei verschiedenen β -Faltblättern

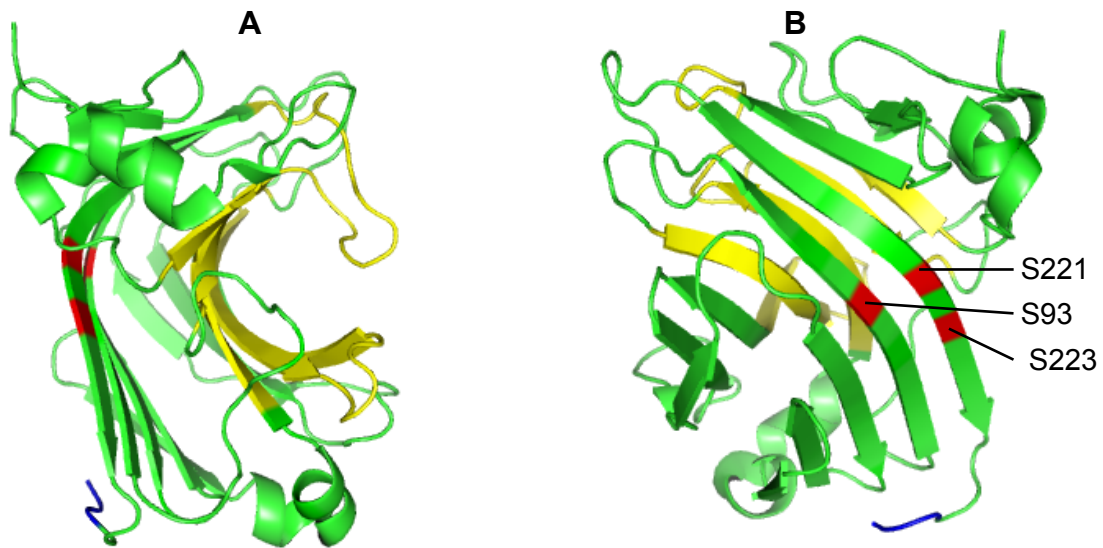


Abb. 3-12 **3D-Modell der Alginate Lyase.** Zur Darstellung wurde die PDB-Datei 2Z42 mit dem Computerprogramm PyMOL graphisch aufgearbeitet. Rot markiert sind die Serin-Reste, welche durch gerichtete Mutation in Cysteine substituiert wurden (S steht hier für Serin). Das aktive Zentrum ist gelb und der His-tag blau gefärbt. A und B stellen verschiedene Blickwinkel auf das gleiche Molekül dar.

Cystein ist, wie Serin, polar und neutral geladen. Cystein trägt eine Thiolgruppe, während Serin eine Hydroxylgruppe besitzt (siehe Abb. 3-13). Da die Alginate Lyase A1-II' keine nativen Cysteine in Ihrer Sequenz trägt, wäre eine Kopplung über Disulfidbrücken nur über diese Spots, welche durch gerichtet Mutationen substituiert wurden, möglich.

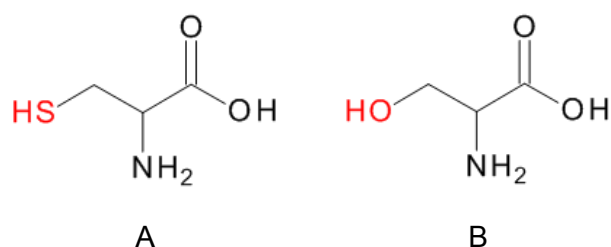


Abb. 3-13 **Strukturformel für Cystein (A) und Serin (B)**

Zur Einführung der Mutationen wurden acht verschiedene Primer entwickelt und über mehrere PCR-Schritte jede mögliche Einfach-, Zweifach- und Dreifach-Variante generiert (vgl. Abschnitt 2.8.1). Nach erfolgreicher Transformation wurden verschiedene Klone sequenziert. Von jeder Variante wurde ein positiv sequenzierter Klon als Kryokultur bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und für die folgende Produktion von Cystein-Varianten der Alginate Lyase genutzt. Die Produktion der Enzym Cystein-Varianten erfolgte analog zum Wildtyp-Enzym, wobei aber dem

Elutionspuffer der IMAC β -Mercaptoethanol als reduzierendes Agens zugefügt wurde. Vor der Immobilisierung wurden die Cystein-Varianten über eine Größenausschlusschromatographie (2.12) von dem β -Mercaptoethanol abgetrennt.

Für die Immobilisierung wurde *Activated Thiol SepharoseTM 4B* genutzt. Dieses Material zeichnet sich durch eine hohe Kapazität (2-3 mg/mL für Mercaptoalbumin ist die reduzierte Variante des Humanen Albumins) und die Möglichkeit der Kopplung über Thiolgruppen aus. Thiolsepharose ist vierprozentige Agarose, welche durch Gluthathion und 2,2'-Dipyridyldisulfid aktiviert wird. Reagiert das Material mit Proteinen, welche Cystein tragen, wird die chromophore Gruppe Pyridin-2-thion (bei 343 nm photometrisch messbar) eluiert. Die Reaktion der Cystein-Variante mit der Matrix ist in Abb. 3-14 dargestellt.

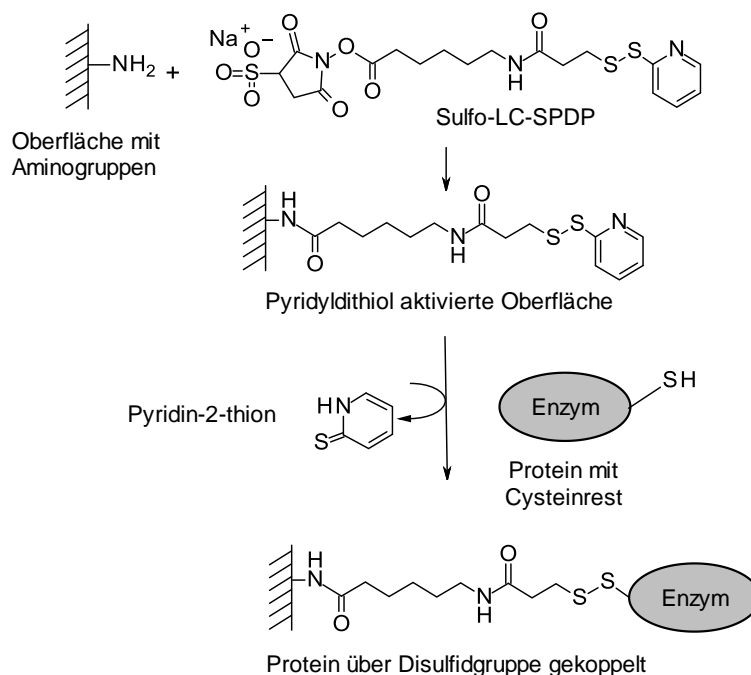


Abb. 3-14 **Reaktion eines Proteins mit Cystein-Rest und Thiolsepharose.** Das Protein substituiert die chromophore Gruppe von der Matrix. Damit bildet sich eine Disulfidbrücke zwischen dem Protein und der Matrix. Zeitgleich wird die chromophore Gruppe von der Membran eluiert.

Es wurde versucht die Wildtyp-Variante, zwei Einzelaustausch-Varianten, eine Doppelaustausch- und eine Dreifachaustausch-Variante an das Material zu koppeln. Dafür wurde die Thiolsepharose mit den einzelnen Enzymlösungen inkubiert und im Anschluss die Aktivität im Überstand gemessen (siehe 2.13.2). Die Aktivität auf dem Träger wurde, wie in 2.7.4 beschrieben, gemessen. Zur Elution vom Träger wurde ein DTT-haltiger Puffer (siehe 2.3) genutzt. In Abb. 3-15 ist das Ergebnis der Immobilisierung dargestellt.

Es konnten zwar 17 % der Wildtypaktivität gekoppelt werden, aber die Aktivität ließ sich weder auf dem Material noch in einer folgenden Elution wiederfinden (schwarze Balken in Abb.

3-15 A). Dagegen konnten bei der Einzelaustausch-Variante S223C bis zu 69 % der eingesetzten Aktivität gekoppelt werden (blauer Balken). Von der Doppelaustausch-Variante S93/223C wurden 48 % (oranger Balken) und der Dreifachaustausch-Variante S93/221/223C (violetter Balken) nur 22 % der Aktivität gekoppelt. Der größte Verlust bei den Cystein-Varianten zeigte sich bei der Doppelaustausch-Variante S93/223C mit knapp 32 % der theoretisch gekoppelten Aktivität. Der Verlust errechnet sich aus der theoretisch immobilisierten Aktivität abzüglich der im Eluat nachweisbaren Aktivität.

Auf dem Träger konnten für die Variante S93C bis zu 12 % der theoretisch immobilisierten Aktivität (diese ergibt sich aus der Aktivität im Überstand vor der Immobilisierung abzüglich der Aktivität im Überstand nach der Immobilisierung und der Aktivität in den Waschfraktionen) nachgewiesen werden (roter Balken Abb. 3-15 B). Für die Dreifachaustausch-Variante S93/22/223C waren es nur 6 %.

Von der theoretisch immobilisierten Aktivität konnten für die Einzelaustausch-Variante S93C 94 % (roter Balken) und nur 63 % für die Variante S223C (blauer Balken) vom Material eluiert werden. Für die Mehrfachausch-Varianten waren es 33 % für S93/223C (oranger Balken) und 11 % für S93/21/223C (violetter Balken).

Insgesamt bleibt hier als Ergebnis festzuhalten, dass die Alginate Lyase reversibel und aktiv an Thiolträger gebunden werden kann. Auch nach Lagerung bei 4°C in Substratpuffer, für mehr als vier Monate, konnte die gleiche Menge Enzym für alle Varianten von dem Material eluiert werden.

Im Fall der Einzelaustausch-Variante S223C wurde insgesamt eine Ausbeute von 5,9 AU/g_{Sepharose} (bezogen auf hochmolekulares Substrat) erzielt.

In einem weiterführenden Experiment mit einem kürzerkettigen Substrat, Manuronsäure Oligosaccharid (nur 30 Monosaccharid-Einheiten), konnten 18 AU/g_{Sepharose} (3-fach mehr als mit dem Polymer Alginate) auf dem Träger nachgewiesen werden. Die Versuchsbeschreibung ist in 2.7.4 aufgeführt. Es wurden 47,3 U eluiert und somit 38 % der gebundenen Aktivität auf dem Träger mit dem kurz-kettigen Substrat nachgewiesen. Alle Messdaten sind im Anhang zu finden.

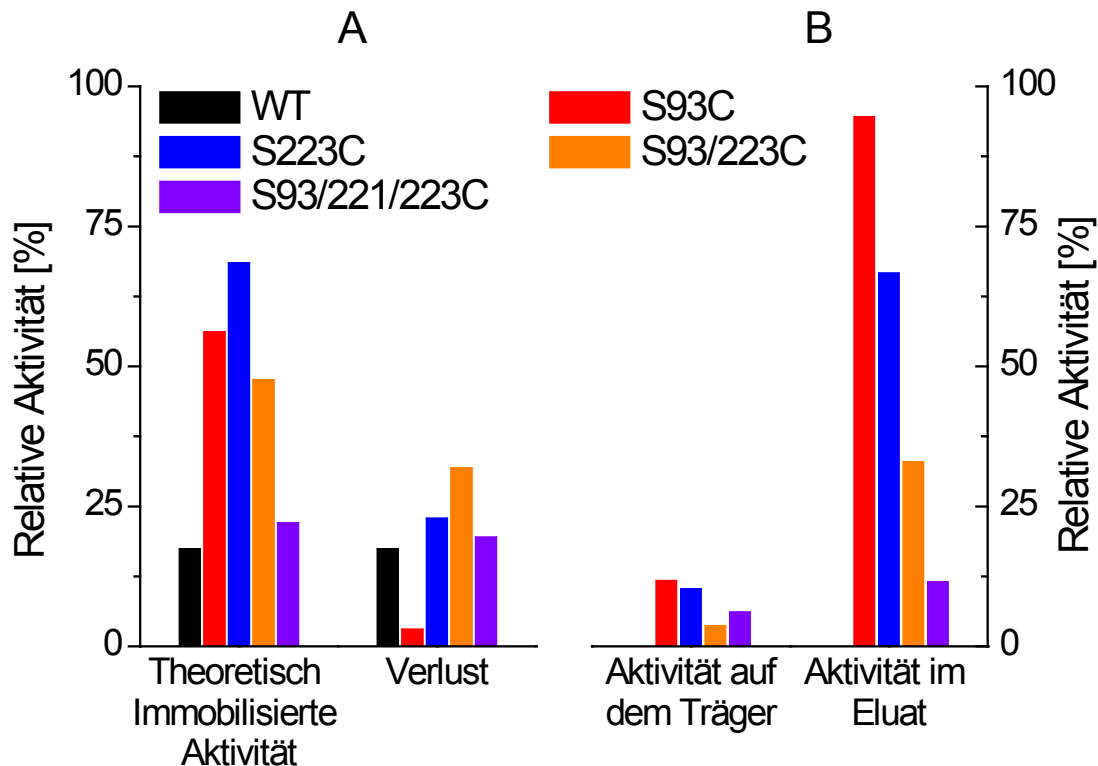


Abb. 3-15 Immobilisierung verschiedener Cystein-Varianten der Alginate Lyase an *Activated Thiol Sepharose™ 4B*.

A: Darstellung der theoretisch immobilisierten und verloren gegangenen Aktivität. Für die Darstellung wurde die Ausgangsaktivität auf 100 % gesetzt. Für die Immobilisierung wurden 0,9 bis 1,2 g Thiolsepharose Beads mit 12 mL Enzymlösungen (0,1 mg_{protein}/mL) inkubiert. Nach der Immobilisierung wurde der Überstand abgenommen und die Aktivität bestimmt (siehe Abschnitt 2.7.1). Danach folgten Waschschriffe mit 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, und verschiedenen NaCl-Konzentrationen. Die theoretisch immobilisierte Aktivität ergibt sich aus der Aktivität im Überstand vor der Immobilisierung abzüglich der Aktivität im Überstand nach der Immobilisierung und der Aktivität in den Waschfraktionen. Der Verlust errechnet sich aus der theoretisch immobilisierten Aktivität abzüglich der im Eluat nachweisbaren Aktivität.

B: Darstellung der Aktivität auf dem Träger und im Eluat. Für die Berechnung der relativen Aktivität wurde hier die theoretisch immobilisierte Aktivität auf 100 % gesetzt. Zehn mg von dem Immobilisat mit Substratlösung (20 mM Tris/HCl pH7,5; 2 mg/mL Alginate) wurden für drei verschiedene Zeiträume inkubiert und nach Abtrennen der Beads vom Überstand durch Filtration die Zunahme der Absorption bei 235 nm gemessen. Über die Zunahme der Absorption zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde die Aktivität auf dem Material berechnet. Zusätzlich wurden 100 mg Beads mit 50 mM DTT-Puffer versetzt, so dass das Enzym von dem Material eluiert wurde. Dieses Eluat wurde dann ebenfalls auf die Enzymaktivität untersucht (siehe Abschnitt 2.7.1).

3.3.3 Untersuchung der Stabilität der Alginat Lyase auf porösen Trägern

Nachdem die unterschiedlichen Alginat Lyase-Varianten erfolgreich an Nickel- oder Thiolsepharose gebunden werden konnten, wurde nun die Stabilität der Aktivität beim mehrfachen Einsatz des Immobilisates als Katalysator getestet. Einer der großen Vorteile einer Immobilisierung von Biokatalysatoren ist die Wiederverwendbarkeit des Enzyms.

Um dies zu prüfen wurde die Aktivität der Alginat Lyase, welche an Nickel- und Thiolsepharose gekoppelt war, mehrfach bestimmt. Dabei wurde zwischen den einzelnen Katalysesritten das Material mit Waschpuffer gewaschen. Die Durchführung ist in Abschnitt 2.7.6 beschrieben. Das Ergebnis ist in Abb. 3-16 dargestellt.

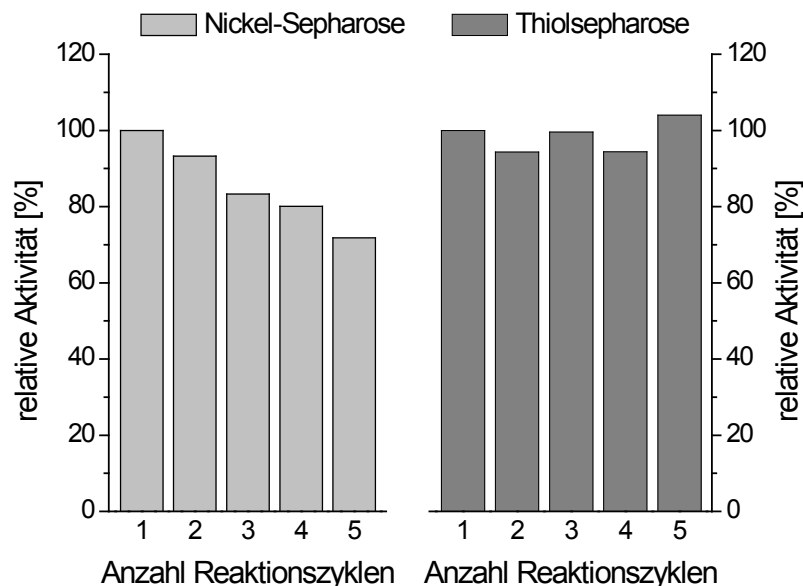


Abb. 3-16 **Aktivität der immobilisierten Alginat Lyase über mehrere Katalysezyklen.** Das Wildtyp-Enzym wurde über den His-*tag* an Nickel-Sepharose und die Einzelaustausch-Variante S223C über Cystein an Thiolsepharose gekoppelt und mehrfach zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Dafür wurden 100 mg Beads abgewogen und mit Substrat für fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Substratlösung abfiltriert und der Überstand bei 235 nm vermessen. Die Beads wurden gewaschen und neu eingewogen. Die gewonnene Menge wurde anschließend erneut dem Assay unterzogen. Dieses Verfahren wurde fünf Mal wiederholt. Die Absorptionwerte in Abhängigkeit der Beadmenge wurden zur Berechnung der Aktivität genutzt. Die Ausgangsaktivität für die Nickel-Sepharose entsprach ca. 10 AU/g_{Sepharose} und für die Thiolsepharose ca. 2 AU/g_{Sepharose}. Diese Werte wurden jeweils auf 100 % gesetzt. Die genaue Versuchsbeschreibung ist unter Abschnitt 2.7.6 aufgeführt.

Im Fall der Nickel-Sepharose sinkt die Aktivität kontinuierlich. Insgesamt nahm die Aktivität nach fünf Zyklen um 29 % ab. Allerdings konnte in den Waschfraktionen keine Aktivität nachgewiesen werden. Das deutet darauf hin, dass die Inkubation mit Substratlösung das Ablösen des Enzyms auslöst. Bei der Anwendung der Thiol-Sepharose stellte sich ein anderes Bild dar. Die Aktivität schwankte um 100 % und blieb damit stabil.

3.4 Untersuchung zur Immobilisierung an funktionalisierten nichtporösen Oberflächen

3.4.1 Untersuchung zur Kopplung an Kupfer-funktionalisierten Glasoberflächen

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass eine stabile, orientierte und reversible Immobilisierung der Alginat Lyase an porösen Trägern möglich ist. Für die Anwendung in der Filtration durch Membranen ist allerdings eine Kopplung an weniger porösen Oberflächen essentiell. Um dieses Konzept der gerichteten Immobilisierung an wenig bis gar nicht porösen Oberflächen zu zeigen, wurde ein weiteres Modellsystem gewählt. Für die Untersuchung wurden verschiedene funktionalisierte Glasobjektträger verwendet. Es wurden eine Maleinimid- und Kupfer-funktionalisierte Oberfläche genutzt. Die Glasobjektträger besaßen eine PEG-Beschichtung, in der dann die verschiedenen Funktionen verankert waren.

Zunächst wurde die Immobilisierung über den His-tag an Glasobjektträgern untersucht, welche mit NTA-Gruppen funktionalisiert waren und Kupfer im Chelat-Komplex trugen. Als Kontrollen wurden unbehandelte Glasobjektträger mitgeführt. Die genaue Durchführung ist Abschnitt 2.13.4 zu entnehmen. Auf der funktionalisierten Oberfläche wurden etwa 0,5 mAU/cm² nachgewiesen. Die Aktivität, welche durch *Leaching* frei wurde, hatte den gleichen Betrag. Demnach konnte das Enzym nicht stabil gekoppelt werden. Auf dem Kontrollobjektträger konnte keine Aktivität nachgewiesen werden (Abschnitt 2.7.7).

3.4.2 Untersuchung zur Immobilisierung an Maleinimid-funktionalisierten Objektträger

An die Maleinimid-funktionalisierten Glasobjektträger wurden das Wildtyp-Enzym, die Einzelaustausch-Variante S93C und die Dreifachaustausch-Variante S93/221/223C gekoppelt. Die genaue Durchführung ist Abschnitt 2.13.3 zu entnehmen. Während der Immobilisierung nahm die Aktivität im Überstand um ca. 0,5 U ab. Im Fall des Wildtyp Enzyms konnte keine Aktivität auf dem Träger nachgewiesen werden. Für die Einzelaustausch-Variante S93C

konnten $0,05 \text{ mAU/cm}^2$ und für die Dreifachaustausch-Variante $0,8 \text{ mAU/cm}^2$ auf dem Glasobjektträger nachgewiesen werden (Abschnitt 2.7.7). Aus Abb. 3-17 A wird deutlich, dass die Dreifach- und Einzelaustausch-Variante das Polymer Alginat ähnlich gut umsetzten. Im Fall des Oligomers MOS kann die Dreifachaustausch-Variante deutlich mehr umsetzen. Diese erzielte den dreifachen Aktivitätswert der Polymerspaltung. Dagegen ist bei der Einzelaustausch-Variante nur eine 1,5-fache Aktivitätserhöhung gegenüber dem hochpolymeren Substrat zu verzeichnen.

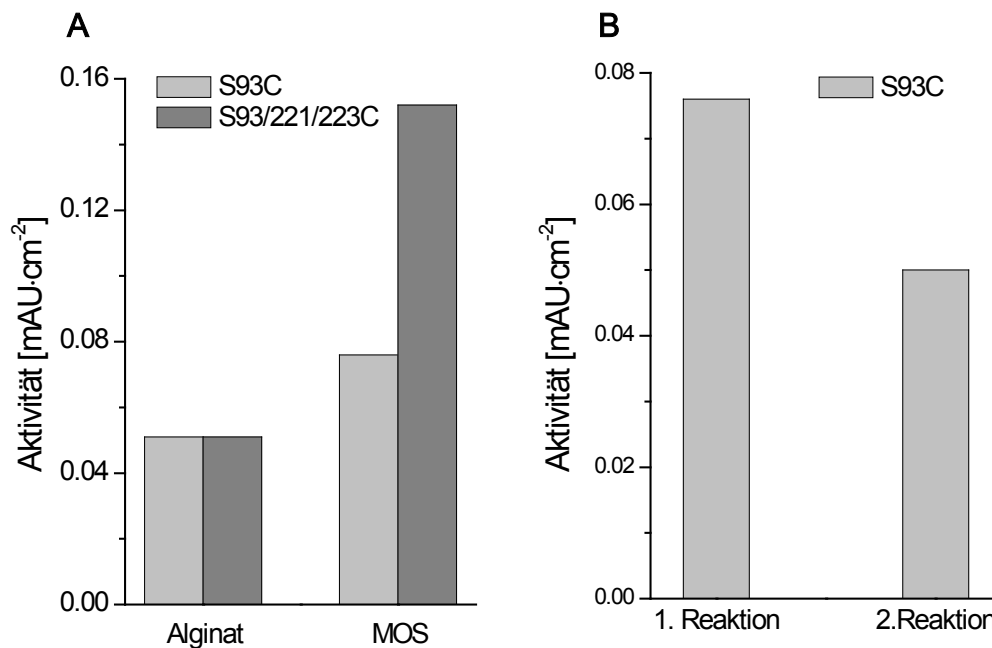


Abb. 3-17 **Aktivität immobilisierter Alginat Lyase Varianten.**

A: Vergleich der Aktivität der Einzelaustausch-Variante S93C und der Dreifachaustausch-Variante S93/221/223C auf Maleinimid-funktionalisierten Glasobjektträgern immobilisiert. Zunächst wurde die Aktivität mit Alginat Substratlösung (siehe Abschnitt 2.7.7) bestimmt. Im Anschluss wurden die Träger gewaschen und die Messung mit dem kurzkettigen Substrat MOS wiederholt.

B: Stabilität der Enzymaktivität (Einzelaustausch-Variante S93C) auf dem Malinimid-funktionalisierten Objektträger. Diese Daten sind von einem separaten Experiment. Der Objektträger wurde nach der Immobilisierung mehrfach gewaschen und dann mit Substratlösung (20 mM Tris/HCl pH7,5; 2 mg/mL Alginat) inkubiert. Nach definierten Zeiträumen wurde die Zunahme der Absorption bei 235 nm im Überstand gemessen und daraus die Aktivität berechnet (siehe Abschnitt 2.7.7). Anschließend wurde der Objektträger mit Substratpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5) gewaschen und für die zweite Reaktion genutzt.

Hinsichtlich der Stabilität (in Abb. 3-17 B dargestellt) war erkennbar, dass die Aktivität auf dem Träger nach einer Reaktion um 34 % abnahm (Abb. 3-17 B). Ein *Leaching* konnte nicht

festgestellt werden. Die Alginat Lyase lässt sich also prinzipiell an Oberflächen koppeln und nachweisen. Dieses Konzept sollte nun auf die Reverse Osmose Membran übertragen werden. Zuvor jedoch wurde dessen Oberfläche hinsichtlich funktioneller Gruppen, an die eine kovalente Bindung erfolgen könnte, charakterisiert.

3.5 Untersuchung der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche von RO-Membranen

Neben der Herstellung der Alginat Lyase war die Immobilisierung des Enzyms an RO-Membranen eines der Hauptziele dieser Arbeit. Dafür wurden zunächst handgefertigte und später semi-automatisch produzierte Membranen verwendet.

Als Ausgangspunkt für eine erfolgreiche kovalente Immobilisierung sind reaktive Gruppen auf der Oberfläche notwendig. Die verwendeten Membranen wurden zunächst auf Reaktanten wie Amino- und Carboxylgruppen untersucht.

Zur Bestimmung der Aminogruppendichte wurden zwei verschiedene Methoden angewendet. Zum einen eine indirekte Methode mit o-Phthaldialdehyd (OPA) [Janolino und Swaisgood, 1992] genutzt. Zum anderen wurde eine direkte Methode mit Sulfosuccinimidyl 6-[3'(2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoat (Sulfo-LC-SPDP) [Yoza et al., 2003] angewendet. Die Methode mit OPA gilt als indirekt, da die Aminogruppen zunächst mit OPA abgesättigt werden und anschließend das nicht abreagierte OPA nachgewiesen wird. Im Gegensatz dazu gilt die Methode mit dem Sulfo-LC-SPDP als direkt, da hier die Aminogruppen mit dem Reagenz reagieren. Der Überschuss wird abgewaschen und die chromophore Gruppe wird nur von dem gebundenen Reagenz direkt abgespalten und nachgewiesen.

Für die Bestimmung der Carboxylgruppeneichte wurde die Substanz Toluidinblau O (TBO) verwendet (vgl. Abschnitt 2.6.7) [Tiraferri und Elimelech, 2012].

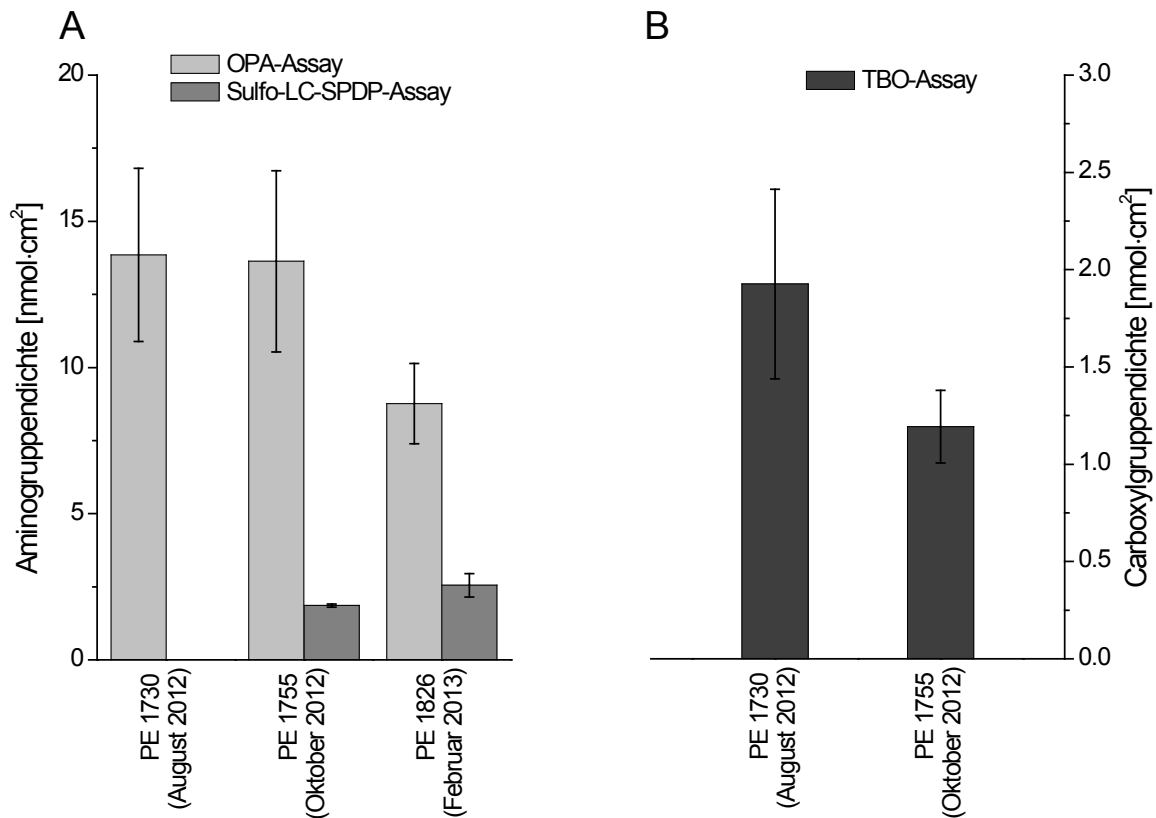


Abb. 3-18 **Bestimmung der Dichte der funktionellen Gruppen auf den RO-Membranen.**

Für die Bestimmung wurden kreisrunde Membranstücke ausgestanzt und in die Inkubationskammer (Abschnitt 2.4.1) eingespannt. Anschließend wurden die Membranen verschiedenen Assays zur Bestimmung der Aminogruppendichte (A) und der Carboxylgruppeneichte (B) unterzogen. (Die Durchführung wurde in den Abschnitten 2.6.5, 2.6.6 und 2.6.7 beschrieben.)

Die Membranen wurden direkt vom Hersteller bezogen, welcher die Produktionsbedingungen ständig weiterentwickelt. Generell konnte für die beiden Assays der Aminogruppen-Bestimmung beobachtet werden, dass sich die Werte für gleiche Membranen bei unterschiedlicher Methode um den Faktor 10 (vgl. Abb. 3-18 A) unterscheiden. Die Gründe werden in Abschnitt 4.3 diskutiert. Zudem wurde festgestellt, dass die Aminogruppendichte, welche mittels OPA-Assay gemessen wurde, von anfänglich 14 auf ca. 9 nmol/cm² abnahm. Auch die Carboxylgruppeneichte sank von 1,9 auf 1,2 nmol/cm² ab (vgl. Abb. 3-18 B). Prinzipiell sind funktionelle Gruppen auf der RO-Membran nachweisbar, demnach können diese zur Kopplung von Linkermolekülen für eine Immobilisierung genutzt werden.

3.6 Untersuchungen zur Immobilisierung an RO-Membranen

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass funktionelle Gruppen für die Immobilisierung auf der RO-Membran zur Verfügung stehen und dass sich das Enzym Alginat Lyase prinzipiell über His-tag oder über Thiolgruppen (Cysteine) immobilisieren lässt. Nachfolgend werden nun die Möglichkeiten zur Immobilisierung der Alginat Lyase an die RO-Membranen untersucht.

3.6.1 Untersuchung zur Immobilisierung über His-tag

Zunächst werden die Ergebnisse der Immobilisierung über den His-tag an die RO-Membran dargestellt. Dafür wurde die Membran mit Glutaraldehyd (GA) aktiviert und anschließend mit α,α -Bis(carboxymethyl)-L-lysinhydrat (Lysin-NTA) inkubiert. Dieses Molekül, welches in Abb. 3-19 dargestellt ist, sollte als Linker fungieren, wobei an die Aminogruppen der RO-Membran eine NTA-Gruppe gebunden werden sollte. Die Membran wurde mit Cyanoborhydrid versetzt um die Kopplung von Lysin-NTA zu stabilisieren. Die genauen Versuchsbedingungen sind in Abschnitt 2.13.5 beschrieben.

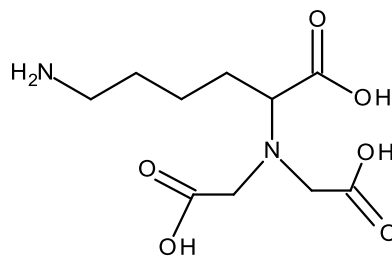


Abb. 3-19 **Strukturformel für α,α -Bis(carboxymethyl)-L-lysinhydrat(Lysin-NTA).**

Die drei Carbonsäurereste des Lysine-NTA bilden einen Chelator und können Nickel komplexieren. Der His-tag eines Proteins bildet ebenfalls einen Chelator aus und kann daher an den Komplex binden. Somit kommt es zu einer reversiblen Immobilisierung. Imidazol als kompetitives Agens kann das Protein vom NTA-Nickel-Komplex verdrängen und so gezielt das Protein von der Oberfläche eluieren. Nachdem die Membran modifiziert wurde, erfolgte die Immobilisierung der Alginat Lyase. Das Resultat ist in Abb. 3-20 A dargestellt. Die Ausgangsaktivität nimmt um 20 % ab. In der Waschfraktion wurden 2,8 % der Ausgangsaktivität wieder gefunden. Eine Aktivität von 19,1 % wurden theoretisch immobilisiert. Nach der Immobilisierung wurde die Aktivität auf der Membran untersucht. Dabei wurde die Membran mit 5 mL Substratlösung inkubiert. Nach 10 Minuten wurde die Veränderung der Adsorption bei 235 nm in der Substratlösung untersucht. Zeitgleich wurde die Änderung der Adsorption über 2,5 Minuten kontinuierlich in der Küvette weiter aufgezeichnet, um die Aktivität, die von der

Substratlösung abgelöst wurde, abzuschätzen. Die Membran wurde dann gewaschen und in der nächsten Reaktion mit Substrat eingesetzt. Das Resultat ist in Abb. 3-20 B dargestellt. In der ersten Reaktion wurde eine Aktivität von 0,03 AU für die ganze Membran gemessen (entspricht 2,4 mAU/cm²). Die Aktivität in der Küvette ohne Membran war genauso hoch. Die Aktivität auf der Membran reduzierte sich nach der ersten Reaktion auf 0,02 AU und mit jeder folgenden Reaktion verringerte sich die Aktivität weiter. Insgesamt wurde die Membran viermal mit Substrat inkubiert. Das *Leaching* je Zyklus entsprach in etwa der Aktivität auf der Oberfläche bzw. war sogar größer als auf der Membran. Die Gründe für dieses unerwartete Ergebnis wird in der Diskussion in Abschnitt 4.4.1 ausführlich erörtert. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Kopplung über den His-tag erfolgte. Allerdings führte das *Leaching* dazu, dass die Aktivität nicht auf dem Träger verblieb.

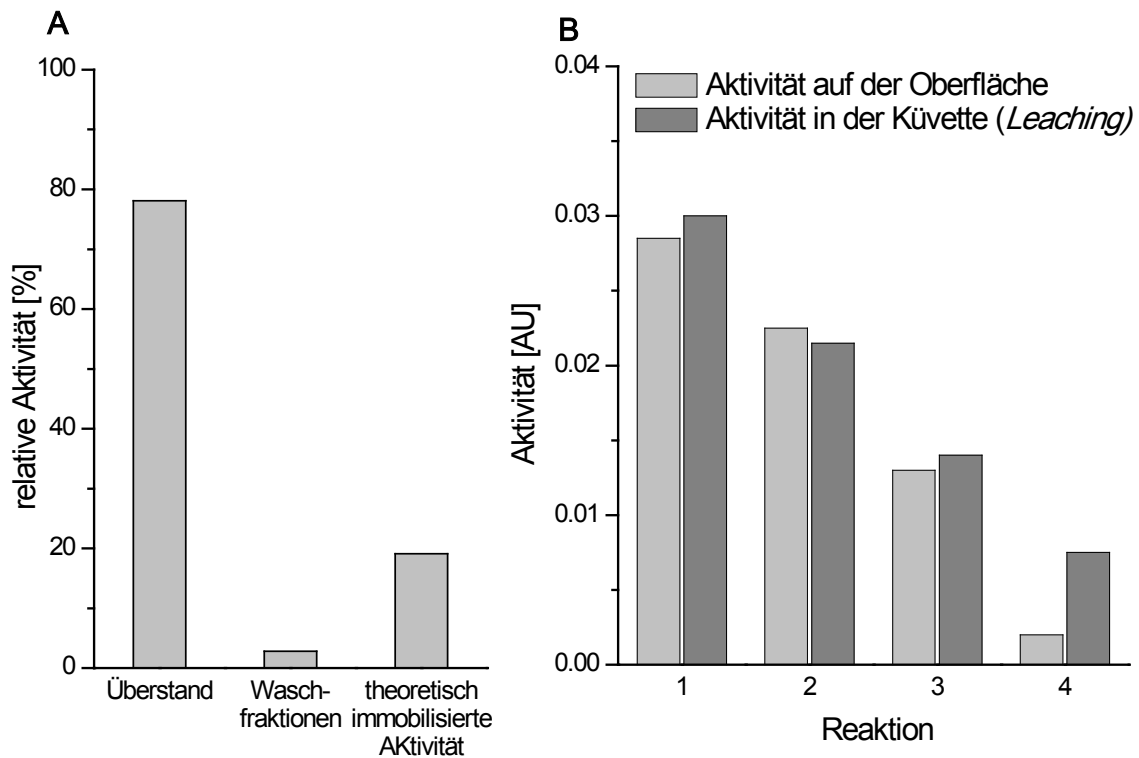


Abb. 3-20 A: Aktivität der Alginate Lyase während der einzelnen Immobilisierungsschritte über den His-tag an eine mit Lysin-NTA modifizierte RO-Membran. Für die Immobilisierung wurden kreisrunde Membranstücke (PE 1622) ausgestanzt und in die Inkubationskammer (vgl. Abschnitt 2.4.1) eingespannt. Anschließend wurde die Membran mit Glutaraldehyd (GA) aktiviert und mit Lysin-NTA inkubiert. Die Immobilisierung erfolgte mit einer Alginate Lyase Lösung (insgesamt 318 AU). Diese Ausgangsaktivität wurde auf 100 % gesetzt. Nach dem Immobilisierungsschritt folgten drei Waschschrte. Für die einzelnen Schritte wurden Proben auf Aktivität untersucht (Abschnitt 2.7.1). Die theoretisch immobilisierte Aktivität errechnete sich durch die Subtraktion der Aktivität nach der Immobilisierung und der Aktivität in den Waschfraktionen.

B: Aktivität der immobilisierten Alginate Lyase auf der RO-Membranoberfläche und im Assayüberstand. Dazu wurde die Membran mit 5 mL Substratlösung (20 mM Tris/HCl pH7,5; 2 mg/mL Alginate) inkubiert und nach 10 min die Zunahme der Absorption bei 235 nm im Überstand gemessen. Anschließend wurde die Substratlösung in der Küvette weiterhin ohne Immobilisat kontinuierlich auf Absorptionsänderung untersucht. Das Ergebnis stellt die Aktivität dar, welche durch *Leaching* entsteht.

3.6.2 Untersuchung zur Immobilisierung über Thiolgruppen

Um auf der RO-Membran Thiolgruppen für die Immobilisierung einzuführen, wurde ein Linkermolekül, Sulfosuccinimidyl-6-[3'-(2-pyridyldithio)-propionamido] hexanoat (Sulfo-LC-SPDP), verwendet. Es handelt sich dabei um einen NHS-Ester, welcher an die Aminogruppen auf der Membran koppelt. In Abb. 3-21 sind die Aktivierung der Membran und die Immobilisierung schematisch dargestellt.

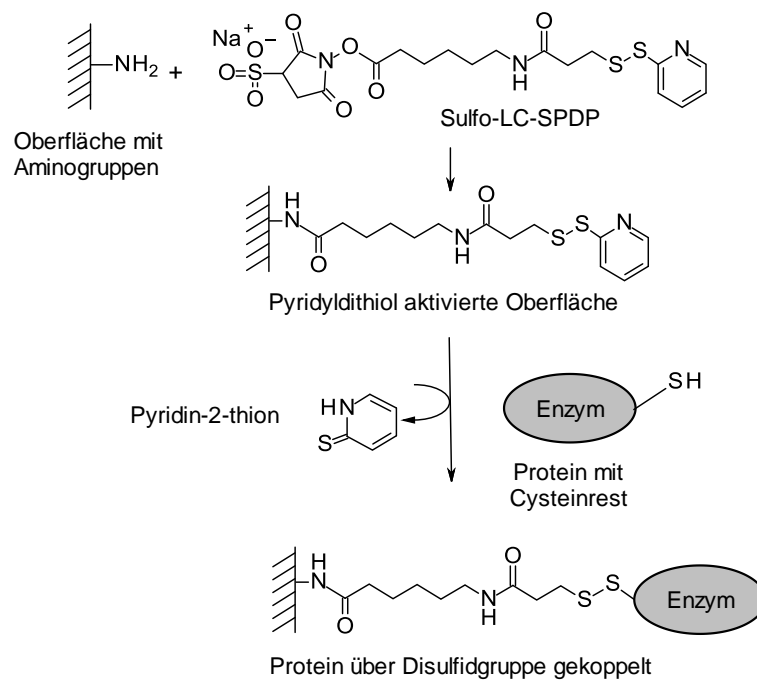


Abb. 3-21 **Aktivierung der RO-Membran mittels Sulfo-LC-SPDP Linkermolekül und anschließende Immobilisierung der Alginat Lyase mittels Disulfidbrücken.**

Für die Immobilisierung wurden verschiedene Cystein-Varianten der Alginat Lyase und das Wildtyp-Enzym genutzt. Die genaue Versuchsbeschreibung ist in Abschnitt 2.13.6 aufgeführt.

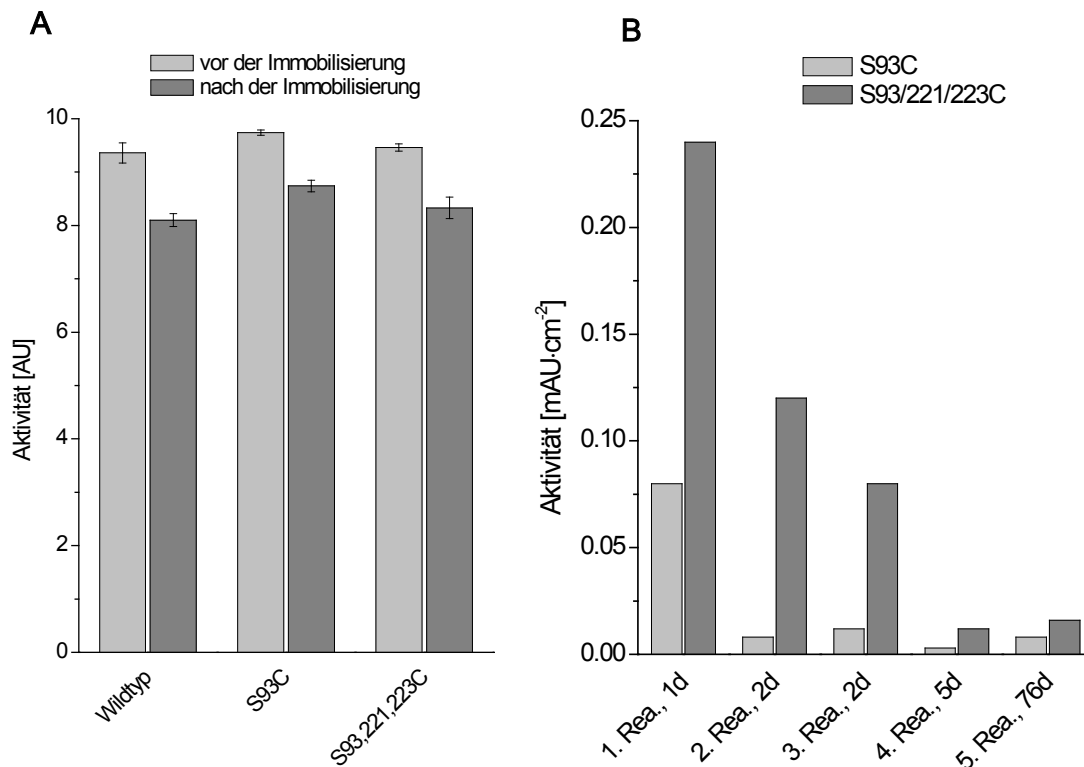


Abb. 3-22 A: Aktivität der Alginat Lyase im Überstand vor und nach der Immobilisierung über die Thiolgruppen an einer Sulfo-LC-SPDP modifizierten RO-Membran. Für die Immobilisierung wurden kreisrunde Membranstücke (PE 1817) ausgestanzt und in die Inkuabtionskammer (vgl. 2.4.1) eingespannt. Anschließend wurde die Membran mit Sulfo-LC-SPDP aktiviert. Je eine Membran wurde mit Wildtyp-Enzym, Einzelaustausch-Variante S93C und Dreifachaustausch-Variante S93/221/223C inkubiert. Vor und nach der Kopplung wurde im Überstand die Aktivität bestimmt.

B: Aktivität der immobilisierten Alginat Lyase an RO-Membranen in mehreren Reaktionen. Die Aktivität wurde am ersten Tag einmal, am zweiten Tag zweimal und am fünften sowie am 76. Tag einmal gemessen. Zwischenzeitlich wurden die Membranen nach der Reaktion gewaschen und in Substratpuffer gelagert. Die Messung erfolgte wie in Abschnitt 2.7.3 beschrieben.

In Abb. 3-22 A ist zu erkennen, dass die Aktivität des Wildtyps um 1,26 AU von 9,36 auf 8,1 AU im Überstand sank. Die Aktivität für die Einzelaustausch-Variante S93C sank um 1 AU. Für die Dreifachaustausch-Variante S93/221/223C betrug die Abnahme 1,13 AU. In den Waschfraktionen konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Nach der Immobilisierung konnte keine Aktivität auf der mit Wildtyp inkubierten Membran gemessen werden. Membranen, welche mit Cystein-Varianten inkubiert wurden (Abb. 3-22 B), zeigten hingegen Aktivität. In der ersten Reaktion konnte für die Einzelaustausch-Variante S93C 0,08 mAU/cm² gemessen werden. Die Dreifachaustausch-Variante S93/221/223C zeigte eine Aktivität von 0,24 mAU/cm². Die Aktivität blieb dabei für 11 Wochen nachweisbar. Am Tag 76 nach der

Immobilisierung konnten noch $0,008 \text{ mAU/cm}^2$ für die Einzelaustausch-Variante S93C gemessen werden. Die Dreifachaustausch-Variante S93/221/223C zeigte nach dieser Zeit eine Aktivität von $0,016 \text{ mAU/cm}^2$. Insgesamt war die Aktivität der Dreifachaustausch-Variante höher als die der Einzelaustausch-Variante. Allgemein war eine Kopplung der Dreifachaustausch-Variante der Alginat Lyase an eine RO-Membran für elf Wochen stabil.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Produktion, Reinigung und Immobilisierung einer Alginat Lyase aus *Sphingomonas sp. A1*. Es sollte damit die Grundlage geschaffen werden, diesen Biokatalysator auf Oberflächen zu koppeln, um in nachfolgenden Arbeiten die Bildung von Biofilm auf diesen Oberflächen zu vermeiden. Der initiale Schritt bei der Biofilmbildung ist ein *Conditioning Film*. Dieser besteht aus Biomakromolekülen wie Proteinen, Polysacchariden und Nukleinsäuren [Kerchove und Elimelech, 2007], welche die Adhäsion der Mikroorganismen ermöglichen. Die Zusammensetzung ist von den Organismen in der unmittelbaren Umgebung abhängig. Ein besonders gut untersuchtes und charakterisiertes Biopolymer, welches die Anhaftung von Mikroorganismen fördert, ist Alginat [Kerchove und Elimelech, 2007]. Die Alginat Lyase aus *Sphingomonas sp. A1* baut Alginat ab und zeichnet sich durch ihr breites Substratspektrum aus [Miyake et al., 2004]. Das Enzym könnte also einen Biofilm, welcher aufgrund von Alginat (als *Conditioning Film*) gebildet wird, verhindern. Aus diesem Grund wurde dieser Biokatalysator als Modellenzym ausgewählt. Als potentiell biofilmgefährdetes Material wurden Reverse Osmose Membranen [Matin et al., 2011] untersucht. Diese Filtereinheiten werden zur Entsalzung von Wasser genutzt. In dem Prozess kommt es trotz intensiver Vorbehandlung des zugeführten Wassers zur Biofilmbildung auf den Membranen [Lee et al., 2006].

4.1 Produktion und Reinigung der Alginat Lyase

Im ersten Kapitel des Ergebnisteils wurde die rekombinante Produktion der Alginat Lyase aus *Sphingomonas sp. A1* dargestellt. Grundlage hierfür waren die Publikationen von Miyake und Ogura und ihrer Kollegen [Miyake et al., 2004; Ogura et al., 2008]. In Tabelle 4-1 sind die Expression und Reinigung von Miyake et al. und die in dieser Arbeit erarbeiteten Ergebnisse gegenüber gestellt.

Tabelle 4-1 Gegenüberstellung der Produktionsbedingungen der Alginat Lyase im Vergleich der vorliegenden Arbeit mit der Literatur.

	Miyake[Miyake et al., 2004]	vorliegende Arbeit
Vektor	pET21b	pET20b
<i>E.coli</i> Stamm	<i>E.coli</i> BL21(DE3)	<i>E.coli</i> BL21(DE3) Gold
Temperaturprofil während der Kultivierung	16°C keine Zeitangaben	37°C bis zur Induktion und 24°C für 4h Expression
Kultivierungsmedium	LB	GB (Vorkultur LB)
Kulturvolumen	1,5 L	0,5 L
IPTG Konzentration [mM]	0,1	0,1
Zellaufschluss	Ultraschallaufschluss	Hochdruckhomogenisator
Reinigungsschritte	IMAC und Ionenaustauschchromatographie	IMAC
Totalprotein [mg]	627	260
spezifische Aktivität [AU/mg] (Assay-Bedingungen nach der Ursprungspublikation [Miyake et al., 2004])	86,2	79,0
Ausbeute	24,1 %	59,1 %

Zur Gewinnung des Zielenzym wurde ein Protokoll erarbeitet, das sich in verschiedenen Parametern (wie Medium, Temperatur und Aufschlussmethode) von der Literaturangabe unterscheidet. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Ausbeute um 35 % erhöht werden konnte. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität des Enzyms ergab einen ähnlichen Wert. Die via SDS-PAGE ermittelte Reinheit (Abb. 3-5) war bereits nach einem chromatographischen Schritt durch die IMAC zufriedenstellend, so dass Verluste durch weitere Aufarbeitungsschritte vermieden werden konnten.

In der vorliegenden Arbeit konnte das Zielenzym in ausreichender Menge und Reinheit produziert werden. Nach der Herstellung soll nun die biochemische Charakterisierung der Alginat Lyase diskutiert werden.

4.2 Biochemische Charakterisierung der Alginat Lyase

Im Anschluss an die Produktion erfolgte eine biochemische Charakterisierung des Enzyms, um die optimalen Bedingungen für die Anwendung in nachfolgenden Experimenten zu ermitteln.

4.2.1 Untersuchung der kinetischen Parameter der Alginat Lyase

In Abschnitt 3.2.1 wurde die Bestimmung von V_{\max} und K_M dargestellt. Die Werte sind in Tabelle 4-2 im Vergleich zu publizierten Daten gegenüber gestellt.

Tabelle 4-2 Kinetische Parameter der Alginat Lyase^a im Vergleich mit der Literatur

Publikation	Assay Bedingungen	K_M [mg/mL]	V_{\max} [U/mg]
Vorliegende Arbeit	20 mM TrisHCl pH 7,5; 25°C	0,14	79,0
[Miyake et al., 2004]	50 mM TrisHCl pH 7,2; 25°C	n.a.	86,2
[Ogura et al., 2008]	50 mM TrisHCl pH 7,5; 30°C	0,018	42,9

^a Alginat Lyase A1-II' aus *Sphingomonas* sp. A1; n.a.: nicht angegeben

Die Angabe U bezieht sich, wie schon in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, auf Absorptionsunits. Demnach entspricht 1 U einer Zunahme um 1 bei 235 nm, konstantem pH-Wert, Temperatur und dem gegebenen Substrat.

Yamasaki und Kollegen ermittelten ein V_{\max} mit 46 min⁻¹ und der K_M -Wert mit 0,0015 mg/mL [Yamasaki et al., 2005]. Aus der Publikation konnten keine Informationen über die Auswertmethodik und die verwendete Enzymkonzentration entnommen werden. Ein direkter Vergleich ist daher nicht möglich.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte für V_{\max} sind mit denen aus der Literatur vergleichbar. Die Werte für K_M liegen etwa um einen Faktor 10 auseinander. Dies lässt sich wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Substrate zurückführen. Ebenfalls können die verschiedenen Temperaturen einen Einfluss gehabt haben.

4.2.2 Aktivität der Alginat Lyase unter salinen Bedingungen

In Kapitel 3.2.2 wurde die Untersuchung der Toleranz der Alginat Lyase gegenüber Natriumchlorid beschrieben. Diese Experimente dienten der Simulation von Anwendungsbedingungen im Rahmen der Immobilisierung auf einer RO-Membran. Die Daten lassen den Rückschluss zu, dass eine Anwendung des Enzyms unter Brackwasserkonditionen (bis 172mM NaCl) möglich ist. Hier konnte gezeigt werden, dass die Aktivität auf bis zu 140 % (bei 90 mM) gesteigert werden kann im Vergleich zu Bedingungen ohne NaCl. Bei ca. 500 mM NaCl (Meerwasserkonditionen) wurde eine einer Restaktivität von 30 % erreicht. Höhere Salzkonzentrationen führen zur Inaktivierung des Zielenzym. Singh und Kollegen beschreiben einen ähnlichen Effekt bei der Alginat Lyase aus *Aspergillus oryzae*. Auch hier nahm die Aktivität mit Erhöhung der NaCl-Konzentration zu. Bei 150 mM wurden 196 % der Ausgangsaktivität erreicht [Singh et al., 2011]. Konzentrationen über 150 mM NaCl, wie in der vorgelegten Arbeit, wurden von Singh et al. nicht getestet. Die Alginat Lyase aus *Pseudoalteromonas* sp. SM0524 lieferte hingegen andere Ergebnisse [Li et al., 2011]. Hier kam es zu

einer Aktivitätssteigerung auf ca. 170 % bei 200 mM NaCl und erst nach über 1000 mM sank die Aktivität; bei 1200 mM waren es nur noch ca. 60 %. Rahman und Kollegen beschrieben zwei Isoenzyme der Alginat Lyase aus dem Seehasen *Aplysia kurodai*, welche unterschiedliche Aktivitätsmaxima in Abhängigkeit von der NaCl Konzentration haben. Für das Isoenzym *AkAly28* lag das Optimum bei NaCl-Konzentrationen über 0,2 M und für die Variante *AkAly33* lag es bei 0,1 M. Es wird spekuliert, dass eventuell eine Anpassung an marine Bedingungen die Salztoleranz der Enzyme bedingt [Rahman et al., 2010].

Die Inaktivierung der Alginat Lyase bei höheren Salzkonzentrationen lässt sich durch Umfaltungprozesse ohne Präzipitation erklären. Durch die hohe Ionenstärke kommt es wahrscheinlich zur Umfaltung des Proteins, bei der das Enzym die Aktivität verliert.

Das gewählte Modell Enzym Alginat Lyase aus *Sphingomonas sp. A1* kann also für RO-Membranen in der Brackwasser Entsalzung angewendet werden. Beim Einsatz im Bereich von Meerwasserentsalzung müssen andere Enzyme etabliert werden.

4.2.3 Stabilität der Alginat Lyase unter verschiedenen Lagerungsbedingungen

Für eine biotechnologische Anwendung von Enzymen spielt die Lagerstabilität eine große Rolle.

Lagerung in löslicher Form bei verschiedenen Temperaturen:

Die Lagerung bei 4°C und in löslicher Form führte nur zu einer geringen Abnahme der Aktivität von nicht mehr als 5 % nach 5 Wochen. Nach 6 Monaten bei -20°C in Puffer, welcher mit Glycerin (50 % w/w) versetzt wurde, konnte ebenfalls nur eine geringe Abnahme gemessen werden. In der Literatur wurde beschrieben, dass sich Alginat Lyasen aus anderen Organismen für 3 Monate bei -18°C stabil lagern ließen [Davidson et al., 1977; Elyakova und Favorov, 1974; Nakada und Sweeny, 1967]. Die Alginat Lyase kann also ohne größere Aktivitätsverluste in löslicher Form gelagert werden.

Lagerung nach Sprühtrocknung bei verschiedenen Temperaturen:

Als Alternative wurde im Rahmen der vorgelegten Arbeit getestet, ob sich das Enzym sprühtrocknen lässt und wie lagerungsfähig es in dieser Form war. Bei diesem Prozess wird die Enzymlösung in der Regel mit einem Additiv (Träger) versetzt, welcher Stabilität während des Sprühtrocknungsprozesses vermitteln soll [Adler und Lee, 1999]. In der vorliegenden Arbeit wurde Maltodextrin verwendet. Es wurden bereits auch andere Polysaccharide, wie Saccharose, Laktose, Dextrin und weitere eingesetzt [Millqvist-Fureby et al., 1999]. Durch die hohe Temperatur während des Sprühtrocknungsprozesses mit Maltodextrin sank die Restaktivität der Alginat Lyase auf 66 %. Je nach Optimierung des Prozesses konnten für

eine α -Amylase 90 % [Samborska et al., 2005], für ein Trypsin 99 % [Millqvist-Fureby et al., 1999] und für eine Lipase 100 % Restaktivität gemessen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass der in dieser Arbeit gezeigte Prozess noch weiter optimiert werden könnte. Dafür könnten verschiedene Parameter (wie Temperatur des In- und Outlets, sowie die Trägersubstanz) des Prozesses angepasst werden. Die Aktivität nach 9 Wochen Lagerung bei 4°C, bei Raumtemperatur und bei -22°C betrug nach Lösen in destilliertem Wasser ca. 4 U/mL und hatte nicht abgenommen. Die Lagerung in sprühgetrockneter Form ist somit für 9 Wochen ohne Verlust möglich.

Für das Projekt war die Lagerung des löslichen Enzyms in Puffer bei 4°C für bis zu fünf Wochen ausreichend.

4.3 Charakterisierung der Oberfläche von RO-Membranen

Zur Realisierung der Immobilisierung von Enzymen auf der Oberfläche der RO-Membran, wurden die verfügbaren funktionellen Gruppen untersucht. Aus dem Aufbau der Membran (vgl. Abschnitt 1.1.4) ergibt sich, dass sowohl Amino- als auch Carboxylgruppen als Verknüpfungsansätze vorhanden sein könnten. Für RO-Membranen des Herstellers Dow wurde eine Carboxyl-Gruppendichte von 0,17 bis 0,5 nmol/cm² bestimmt [Tiraferri und Elimelech, 2012]. In der Arbeit von Gershkovich wurde eine Konzentration von 17-20 nmol/cm² für Membranen aus der Firma Dow und Hydranautics angegeben [Gershkovich, 2009]. Beide Publikationen nutzen, wie in der vorliegenden Arbeit, den TBO-Assay zur Bestimmung der Carboxylgruppen. Die hier vorliegenden Ergebnisse für Membranen der Firma Lanxess lagen für Carboxylgruppen zwischen 1 und 2 nmol/cm². Die Ergebnisse für die Aminogruppen liegen deutlich höher. Es konnten bis zu 14 nmol/cm² detektiert werden. Allerdings war das Ergebnis hier vom verwendeten Assay abhängig. Mit dem OPA-Assay lagen die Werte um den Faktor 10 höher als beim Sulfo-SPDP-Assay. Für die Membranen aus der Arbeit von Gershkovich wurden 6 bis 12 nmol/cm² für Aminogruppen angegeben [Gershkovich, 2009]. Die Ermittlung bei den Kollegen Gershkovich erfolgte indirekt und analog dem TBO-Assay mit der Substanz Orange II. Die Charakterisierung der Morphologie der RO-Membranoberfläche ist schwierig. Zum einen findet die Polymerisierung nicht einheitlich über die ganze Fläche statt. Zum anderen zeigte sich bei der Untersuchung mittels REM [Zhao et al., 2012], dass die Oberfläche uneben und gefurcht ist, was zu einer gewissen Rauigkeit bis zu 120 nm führt. Dies erklärt die teilweise unterschiedlichen Ergebnisse bei verschiedenen Assays. Die Substanz Sulfo-LC-SPDP hat ein viermal größeres Molekulargewicht als OPA. Damit ist für die jeweiligen Assays unterschiedliches Diffusionsverhalten anzunehmen. In Abb. 4-1 ist die Oberfläche dargestellt.

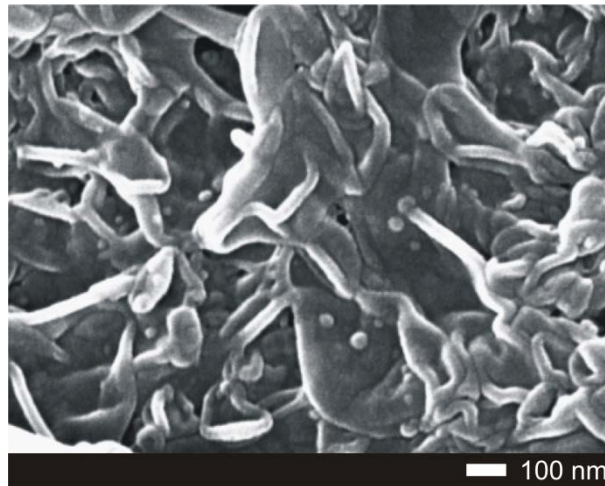


Abb. 4-1 REM-Bild der RO-Membran Oberfläche, entnommen aus [Zhao et al., 2012].

Es konnten Aminogruppen und Carboxylgruppen detektiert werden, wobei sich die jeweilige Dichte von einer Membran-Charge zur nächsten veränderte. Die Membranen wurden zusätzlich durch das Fraunhofer Institut für Werkstoffmechanik in Halle an der Saale über XPS-Analysen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass das Verhältnis von Stickstoff, Kohlenstoff und Sauerstoff sich so veränderte, dass von einem höheren Polymerisationsgrad am Ende der Projektlaufzeit auszugehen ist. Dies würde die Verringerung der funktionellen Gruppen, wie sie in dieser Arbeit gemessen wurde, erklären.

4.4 Immobilisierung der Alginat Lyase

4.4.1 Vorbetrachtungen

Bei der Durchführung der Immobilisierungsexperimente zeigte sich immer wieder, dass sich nur ein geringer Teil der theoretisch gekoppelten Aktivität auf dem Trägermaterial nachweisen ließ. Aus diesem Grund soll der detaillierten Diskussion der Ergebnisse ein allgemeiner Teil zu den Problematiken bei der Immobilisierung von Enzymen vorangestellt werden.

Die Aktivität auf dem Träger wird generell durch verschiedene Faktoren beeinflusst [Cao, 2006b]:

- Porengröße und damit der Diffusion des Substrates in das Material
- Trägermaterial
- Anzahl an Gruppen, die an der Kopplung beteiligt sind
- Spacer

- Dichte der Funktionellen Gruppen auf der Trägeroberfläche
- Physiko-chemische Einflüsse in der direkten Umgebung des Enzyms (*Microenvironment*)

Zunächst soll die Diffusionslimitierung thematisiert werden. Die Diffusion folgt dem Fick'schen Diffusionsgesetz (Formel 4-1)

$$V_D = D_e \cdot \frac{F}{r} \cdot \Delta S$$

Formel 4-1 Fick'sches Diffusionsgesetz; V_D = Diffusionsgeschwindigkeit; D_e = Diffusionskonstante; F = Diffusionsfläche; r = Diffusionsstrecke; ΔS = Differenz der Substratkonzentration am Enzym und außerhalb des Trägers.

Bei einem gegebenen System lassen sich D_e , F und r zu einem Permeabilitätsfaktor P zusammenfassen. Es folgt daraus

$$V_D = P \cdot \Delta S$$

Formel 4-2 P = Permeabilitätsfaktor

Der Permeabilitätsfaktor ist im Wesentlichen von der Temperatur, dem Widerstand des Lösungsmittels, der Geometrie des Trägers und dem Molekulargewicht des Substrates abhängig. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen internen und externen Transporteffekten. Externe Effekte sind die Umströmung des Trägers mit der Substratlösung. Interne Effekte beinhalten die Phänomene, welche durch die Diffusion in die Poren des Trägers ausgelöst werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden poröse Träger wie Sepharose genutzt. Zusätzlich wurden weniger poröse Materialien wie aktivierte Objektträger und RO-Membranen verwendet. In allen Experimenten konnte durch den Einsatz von oligomeren Substrat eine höhere Aktivität auf dem Träger gezeigt werden als mit dem polymeren Substrat Alginat. Dies stellt ein Indiz für eine Diffusionslimitierung dar. Es konnten nie 100 % der theoretisch gekoppelten Aktivität auf den Trägern nachgewiesen werden. Als Ursache kommen hier mehrere Punkte in Betracht:

- Reduktion der Aktivität durch sterische Behinderung des Enzyms
- Unspezifische Kopplungsreaktionen des Enzyms mit dem Trägermaterial
- Einfluss der unmittelbaren Umgebung des Enzyms am Träger

Für α -Amylase (stärkespaltendes Enzym) wurde gezeigt, dass durch die Immobilisierung der endokatalytische auf den exokatalytischen Mechanismus umgestellt wird [Boundy et al., 1976]. Erklärt wurde dies durch die sterische Behinderung des Enzyms, wenn es gekoppelt wird. Für die Alginat Lyase lässt sich ebenfalls auf eine solche sterische Behinderung schließen.

Eldin und Kollegen zeigten für das Enzym β -Galaktosidase, dass die Kopplungsmethode und das Trägermaterial direkten Einfluss auf das *Microenvironment* des Biokatalysators haben [Mohy Eldin et al., 1999]. Es wurden andere pH-Optima und die Veränderung der kinetischen Parameter beobachtet. Die unmittelbare Umgebung des Enzyms an dem Träger beeinflusst die Katalyse. Denkbar wären hier ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen des Substrats mit dem Träger. Funktionelle Gruppen des Trägers beeinflussen den pH-Wert unmittelbar am Enzym. Diese Effekte sind für die in dieser Arbeit beschriebenen Systeme ebenfalls wahrscheinlich.

4.4.2 Kopplung via His-tag

Ziel der Arbeit war die gerichtete Immobilisierung der Alginat Lyase an RO-Membranen. Dafür wurden zwei Strategien entwickelt. Die Immobilisierung sollte über den bereits vorhandenen His-tag erfolgen und die Kopplung über Thiolgruppen untersucht werden. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse zur Kopplung über den His-tag diskutiert.

Durch die Reinigung über den His-tag (vgl. 4.1) war bereits klar, dass das Enzym erfolgreich über diesen gebunden und anschließend aktiv eluiert werden konnte. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob das Enzym, welches auch auf der Nickel-IDA-Sepharose gebunden ist, aktiv ist. Es zeigte sich, dass der Wert für die Aktivität auf dem Träger deutlich unter dem der eluierten Aktivität lag. Es konnten nur 1,4 % des Ausgangswertes erreicht werden. Diese Differenz lässt sich durch Diffusionslimitierung erklären (siehe Abschnitt 4.4.1.) Das Ergebnis belegt, dass sich das Enzym aktiv auf dem Träger immobilisieren lässt.

Das angestrebte Ziel, die Immobilisierung auf RO-Membranen, sollte im nächsten Schritt mit einem weniger porösen Material simuliert werden. Dafür wurden funktionalisierte Objektträger verwendet. Diese Glasflächen wurden kommerziell bezogen und waren mit Polyethylenglycol beschichtet, welches anschließend mit IDA-Gruppen aktiviert worden war. Diese bildeten einen Chelatkomplex mit Kupferionen. Dieser Chelatkomplex wurde zur Kopplung genutzt [Cha et al., 2005]. In den durchgeführten Versuchen wurde zunächst eine 10 %-ige Abnahme der Aktivität in der Enzymlösung, die zur Immobilisierung genutzt wurde, gemessen. Dies suggerierte jedoch nur eine tatsächliche Immobilisierung des Enzyms, denn dieser Anteil ließ sich vollständig in der Waschfraktion wiederfinden. Die minimale Aktivität, die auf dem Träger nachweisbar war, wurde durch *Leaching* verloren.

In Abschnitt 3.6.1 wurde beschrieben, wie die Oberfläche der RO-Membranen so modifiziert wurde, dass auf dem Material NTA-Gruppen zur Verfügung standen. Diese wurden mit Nickel beladen und das Enzym dann über den His-tag gekoppelt. Auch bei diesem Versuch zeigte sich, dass die Alginat Lyase wahrscheinlich durch die Inkubation mit der Substratlösung eluiert wurde. Die Aktivität auf der Oberfläche war genauso groß wie die des *Leaching*. Betrachtet man das Ergebnis zur Stabilität der Lyase auf den Nickel-Sepharose Beads, welcher in Abschnitt 3.3.3 beschrieben wurde, so zeigt sich, dass mit jedem Katalysezyklus die Aktivität leicht abnimmt. Die Substratlösung besteht aus Alginat in Tris-Puffer gelöst. Alle drei Materialien (die Sepharose, der Objektträger als auch die RO-Membran) wurden mehrfach mit Tris-Puffer gespült und die Waschfraktionen auf Aktivität der Alginat Lyase untersucht. Dabei konnte nie Aktivität nachgewiesen werden. Das *Leaching* kann demnach nur durch das Alginat erklärt werden. Dieses Polysaccharid komplexiert zweiwertige Ionen, wie Calcium-Ionen aber auch Nickel- und Kupfer-Ionen [Abu Al-Rub et al., 2004]. Es ist denkbar, dass das Alginat das Metallion aus dem Chelat-Komplex zwischen His-tag und IDA bzw. NTA-Gruppe herauslöst. Die Kopplung des Enzyms wäre dann aufgelöst. Die langsame Elution des Enzyms von dem Sepharose-Träger lässt sich damit erklären, dass die Konzentration an Nickel-Ionen im Vergleich zum Alginat sehr viel höher ist als die Konzentration der Nickelionen auf der RO-Membran oder dem der Cu-Ionen auf dem Objektträger. Auch nach der Immobilisierung einer Alginat Lyase aus *Streptomyces sp. ALG-5* zeigte sich, dass mit jedem Reaktions-Zyklus die Aktivität des Enzyms auf dem Träger sukzessiv abnahm [Shin et al., 2010].

4.4.3 Kopplung über Thiolgruppen an Thiolsepharose

Die zweite Strategie zur Kopplung der Alginat Lyase war die Nutzung von Thiolgruppen. Diese bietet mehrere Vorteile [Grazu et al., 2005]:

- Durch die gezielte Einbringung von Cystein-Resten wird die Orientierung des Enzyms auf dem Träger festgelegt.
- Wird mehr als ein Cystein-Rest eingeführt, kommt es zum *Multipoint-Attachement*, was zu einer erhöhten Stabilität führen kann.
- Die Kopplung an eine zweite Thiolgruppe, also die Ausbildung einer Disulfidgruppe, ist reversibel. Eine Mehrfachbeladung des Materials ist daher möglich.

Das Enzym Alginat Lyase A-II' aus *Sphingomonas sp. A1* besitzt nativ keine Cystein-Reste. Aus der Aminosäuresequenz wurden drei Serine ausgesucht, welche sich auf der von dem aktiven Zentrum gegenüberliegenden Seite befinden. Es wurden die Positionen Serin 93, 221 und 223 ausgewählt (siehe Abb. 3-12). Durch ortsgerichtete Mutation wurden diese Se-

rine durch Cysteine ersetzt. Die Reinigung der Enzym-Varianten musste angepasst werden. Die Verwendung eines Reduktionsmittels wie DTT oder β -Mercaptoethanol war nötig, um eine Kopplung zwischen den einzelnen Enzymmolekülen zu unterbinden.

Nachdem Einzel-, Doppel- und Dreifachaustausch-Varianten des Enzyms produziert und ihre Aktivität nachgewiesen war, wurden diese zunächst an einem Modellträger immobilisiert und die Aktivität auf dem Material getestet.

In Abb. 3-15 in Abschnitt 3.3.2 wurde gezeigt, dass die Immobilisierung von der Anzahl an eingeführten Cystein-Resten abhängt. Die höchste Aktivität auf dem Träger konnte für die Einzelaustausch-Variante der Alginat Lyase gemessen werden. Bei den Doppel- und Dreifachaustausch-Varianten waren die Werte geringer. Auch konnte hier insgesamt weniger gebunden und eluiert werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-3 gegenübergestellt.

Tabelle 4-3: Ergebnisse der Immobilisierung von verschiedenen Cystein-Varianten der Alginat Lyase an Thiolsepharose

Cystein-Variante der Alginat Lyase	Theoretisch gekoppelte Aktivität [%] ¹	Auf dem Träger gemessene Aktivität [%] ²	Eluierte Aktivität [%] ²
S93C	60	11,2	84
S223C	70	10	61
S93/223C	52	4	35
S93/221/223C	27	4	7

¹bezogen auf die eingesetzte Ausgangsaktivität

²bezogen auf die theoretisch gekoppelte Aktivität

Das Fraktionierungslimit für Sepharose 4B liegt bei 30.000 bis 50.000 kDa für Dextrane [Williams et al., 1999]. Die Poren sind also wesentlich größer als bei der Nickel-Sepharose (10 bis 1.000 kDa Fraktionierungslimit). Das Alginat (200 kDa) kann bei Sepharose 4B also wesentlich besser eindringen und damit ist die Diffusionslimitierung im Gegensatz zur Nickel-Sepharose geringer (vgl. Abschnitt 4.4.1). Es wurden 11 % der theoretisch gebundenen Aktivität gemessen (gilt für die Einzelaustausch-Variante S93C der Alginat Lyase). Die immobilisierten Mehrfach-austausch-Varianten zeigten nur etwa die Hälfte der Aktivität, welche die Einzelaustausch-Varianten aufwiesen. Für die Protease TLP (*thermolysin-like protease*) konnte eine Kopplung zwischen 0,2 bis 1,2 mg_{Protein}/g_{Sepharose} nachgewiesen werden [Mansfeld et al., 1999]. Legt man die eluierte Aktivität der Alginat Lyase von der Sepharose zugrunde, so erhält man eine Kopplung für die Einzelaustausch-Variante von 1,2 mg_{Protein}/g_{Sepharose}. Für die TLP wurde allerdings keine so starke Aktivitätsreduktion gemessen. Das

Substrat für den Assay war Casein. Mit einem Molekulargewicht der einzelnen Komponenten von 19-25 kDa konnte dieses Substrat sicher leichter in die Sepharose eindringen und somit ergab sich hier ein weniger starker Effekt der Diffusionslimitierung (vgl. Abschnitt 4.4.1).

Ein weiterer Grund für die geringe Aktivität auf der Oberfläche könnte die Dichte der Enzymmoleküle auf dem Träger sein. In Abb. 4-2 ist der Anteil an Aktivität, der auf der Matrix gemessen wurde, in Bezug auf die Aktivität, die nach Zugabe von Reduktionsmittel eluiert wurde, dargestellt.

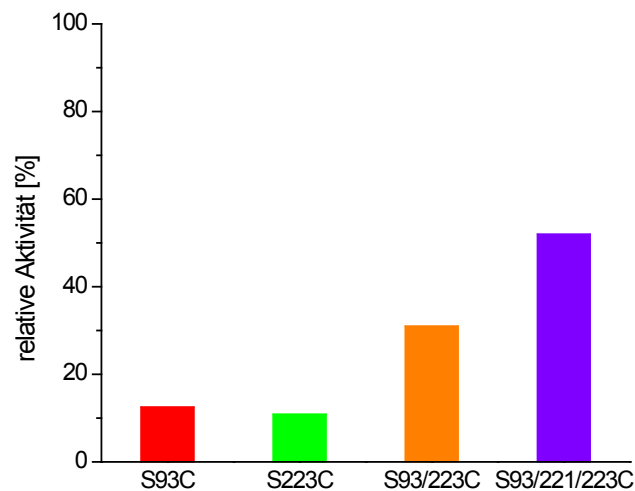


Abb. 4-2 Alginat Lyase Aktivität auf der Thiolsepharose bezogen auf die eluierte Menge an Enzym. Für die relativen Werte wurden die Aktivitäten, die auf der Sepharose gemessen wurden, durch die Aktivitäten nach der Elution geteilt und mit 100 multipliziert. Die theoretisch immobilisierte Aktivität der einzelnen Varianten wurde auf 100 % gesetzt.

Es konnten zwar nur 2 AU von 59 AU der Dreifachaustausch-Variante an 1 g Sepharose effektiv gebunden werden (diese waren mit DTT eluierbar), aber davon konnten 1 AU/g Thiolsepharose gemessen werden. Für die Einzelaustausch-Variante S93C konnten von 89 AU 53 AU/g Thiolsepharose gebunden werden, aber nur 7 AU/g Sepharose waren auf der Matrix nachweisbar. Es wäre denkbar, dass die Mehrfachaus-tausch-Varianten mehrere Thiolgruppen binden und daher die Dichte der Enzyme auf der Oberfläche geringer ist. Dadurch könnte die sterische Behinderung verringert und der Zugang zum Substrat verbessert sein. Dieses Phänomen sollte bei der Anwendung von immobilisierten Enzymen, welche große Substrate spalten, bedacht werden. Für das Projekt war essentiell, dass sich das Enzym reversibel und aktiv über die Thiolgruppen koppeln ließ. Dies konnte mit Hilfe der Thiolsepharose gezeigt werden.

4.4.4 Kopplung an Maleinimid-funktionalisierte Objektträger

Weiter wurde untersucht, inwieweit sich das bisher gezeigte Konzept auf eine weniger poröse Oberfläche übertragen lässt. Dafür wurden zwei Austausch-Varianten der Alginat Lyase an Maleinimid-funktionalisierte Objektträger immobilisiert. Für die Untersuchung wurden die Einzelaustausch-Variante S93C und die Dreifachaustausch-Variante S93/221/223C genutzt. Beide Varianten ließen sich auf dem Objektträger nachweisen. Für die beiden Enzym-Varianten konnte die Kopplung einer Aktivität von 0,5 AU je Objektträger nachgewiesen werden. Die Oberfläche ist mit etwa 20 cm^2 wesentlich geringer als die der porösen Materialien. Sepharose 4B besitzt beispielsweise eine Oberfläche von 5 m^2 pro mL Matrix [SigmaAldrich, 2006]. Deshalb wurden nur sehr geringe Aktivitäten gemessen. Von der gekoppelten Aktivität (0,17 Au) konnten nur 0,2 % auf der Oberfläche detektiert werden. Auch hier führte der Einsatz von oligomerem Substrat zu einer Aktivitätssteigerung um den dreifachen Wert. Da es sich aber um Material handelt, das wesentlich weniger porös ist, erklärt sich der Effekt vermutlich dadurch, dass das Enzym große Substrate, wie das polymere Alginat, infolge einer sterischen Behinderung schlecht umsetzen kann. Durch die Aktivierung des Polyethylenglykol mit IDA-Gruppen auf dem Objektträger sind zum Beispiel ionische Wechselwirkungen denkbar, welche das Enzym inaktivieren könnten.

Generell konnte die Alginat Lyase an eine wenig poröse Oberfläche immobilisiert werden und aktiv nachgewiesen werden. Somit konnte das Konzept nun abschließend an den RO-Membranen getestet werden.

4.4.5 Kopplung an RO-Membran

Die Kopplung der Alginat Lyase über die Thiolgruppen der eingeführten Cystein-Reste war stabil über 5 Reaktionszyklen an Thiolsepharose (vgl. Abschnitt 3.3.3). Bevor die RO-Membran für die Immobilisierung eingesetzt werden konnte, mussten zunächst Thiolgruppen auf die Oberfläche gebracht werden. Dafür wurde ein *Linker*-Molekül, Sulfo-LC-SPDP, eingesetzt. Dies ist eine kommerziell erhältliche Substanz, welche über eine NHS-Ester-Funktion an Aminogruppen (z.B. auf Oberflächen) koppeln kann. Sie verfügt darüber hinaus über eine Thiolgruppe, welche durch eine chromophore Gruppe geschützt ist [ThermoScientific, 2011]. Nachdem die RO-Membran modifiziert worden war, konnten die Enzym-Varianten an die Oberfläche gekoppelt werden. Von ca. 90 AU konnten zwischen 0,5 und 1 AU auf ca. 12 cm^2 immobilisiert werden. Davon konnten auf der Membran bis zu 0,3 % nachgewiesen werden. Bei Verwendung des niedermolekularen Substrates ließ sich auch hier eine Steigerung von ca. 50 % der Aktivität für die Dreifach-Variante zeigen. Eine Diffusionslimitierung kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, da die Oberfläche der Membran aufgrund ihrer Rauigkeit (vgl. Abb. 4-1) letztlich auch eine gewisse Porösität entwickelt.

Insgesamt blieb über 11 Wochen (4°C, in Substratpuffer) Aktivität auf der Membran nachweisbar. Allerdings nahm dabei die Aktivität bei der Einzelaustausch-Variante S93C um 90 %, von 0,08 mAU/cm² auf 0,008 mAU/cm² und für die Dreifachaustausch-Variante um 93 %, von 0,24 mAU/cm² auf 0,016 mAU/cm², ab (vgl. Abb. 3-22).

Es zeigte sich eindeutig, dass bei der Dreifachaustausch-Variante mehr Aktivität nachweisbar war. Somit erweist sich ein *Multipoint Attachment* für die Alginate Lyase an RO-Membranen als vorteilhaft. Es scheint, dass die Dichte der Enzymmoleküle auf der Oberfläche einen Einfluss auf die Stabilität und Aktivität der Enzyme hat. Dies konnte auch für eine Penicillin G Acylase (PGA), die auf Thiol-modifizierten Epoxid-Trägern immobilisiert wurde, gezeigt werden [Grazu et al., 2005]. In dieser Publikation wurden sechs verschiedene Cystein-Varianten einer PGA generiert. Je nach Lage des Cysteins in der Proteinsequenz und des Vorkommens eines Multipoint Attachments, waren die Stabilisierungseffekte unterschiedlich ausgefallen. Letztlich konnte für eine Variante eine Stabilisierung (um den Faktor 30) gegenüber der Inaktivierung durch organische Lösungsmittel erreicht werden.

Saeki et al konnte zeigen, dass sich Lysozym an einer RO-Membran immobilisieren lässt [Saeki et al., 2013]. Dafür wurde die Membranherstellung verändert und ein zusätzliches *Linker*-Molekül in die Polyamidschicht eingebracht. Dies wurde dann zur Kopplung genutzt [Saeki et al., 2013]. In dieser Arbeit wurde jedoch keine Aktivität direkt auf dem Träger nachgewiesen. Es konnte lediglich die Verringerung der Biofilmbildung nachgewiesen werden. Allerdings nahm die Filtrationsleistung der Membran um 50 % ab.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorgelegten Arbeit war es, Reverse Osmose Membranen, die in der Wasserentsalzung eingesetzt werden, mit Enzymen stabil zu modifizieren. Dazu wurde das Modell-Enzym Alginat Lyase ausgewählt, da dieses effektiv Alginat depolymerisieren kann. Die rekombinante Expression und Reinigung dieses Enzyms aus *Sphingomonas sp. A1* wurde im Rahmen der Arbeit erfolgreich realisiert. Durch Kultivierung in einem speziellen Komplex-Medium konnte die Expression und Enzym-Ausbeute um den Faktor 2,5 im Vergleich zur Kultivierung in Standard LB-Medium erhöht werden.

Neben der Produktion des Enzyms stand die gerichtete Immobilisierung der Alginat Lyase im Fokus der vorliegenden Dissertation. Die zielgerichtete Orientierung des Enzyms auf dem Trägermaterial sollte genutzt werden, um die Zugänglichkeit zum Substrat und/oder die Aktivität des Enzyms zu verbessern. Zusätzlich kann es dabei zu Stabilisierungseffekten kommen. Um die Ausrichtung des Enzyms zu gewährleisten, wurden zwei Strategien gewählt. Zum einen sollte die Immobilisierung über den His-tag erfolgen, da dieser auf der gegenüberliegenden Seite des aktiven Zentrums des Enzyms gelagert ist. Zum anderen wurden durch ortsgerichtete Mutation Enzym-Varianten erstellt, welche auf der gegenüberliegenden Seite des aktiven Zentrums ein, zwei oder drei Cystein-Reste tragen.

Zunächst wurde die Immobilisierung an porösen Trägern gezeigt um die generelle Machbarkeit der gerichteten reversiblen Kopplung zu zeigen. Die Daten deuten auf eine Substrat-Diffusionslimitierung hin. Mit dem Einsatz eines kleineren Substrates konnte etwa 30 % der eingesetzten Aktivität auf dem Träger wieder gefunden werden. Die Ausbeute für eine Einzelaustausch-Variante betrug 7 AU/g Thiolsepharose. Für die Doppel- und Dreifachaus-tausch-Varianten war das Ergebnis geringer. Über den His-tag konnten 1,35 AU/g Nickel-Sepharose *Beads* immobilisiert werden.

Um das Modell, bezüglich Kopplung über Thiolgruppen, an wenig porösen Oberflächen zu verifizieren, wurden die verschiedenen Enzym-Cystein-Varianten auf modifizierte Objektträger immobilisiert. Es zeigte sich, dass die Variante mit 3 Cysteinresten mit 0,8 AU/m² die höchste Aktivität zeigte.

Die Immobilisierung an der Reverse Osmose Membran zeigte vergleichbare Ergebnisse. Die Aktivität der gekoppelten Dreifachaus-tausch-Variante lag bei anfänglich 2,4 AU/m², sank nach Lagerung auf 0,2 AU/m² ab und blieb für 11 Wochen nachweisbar. Verbesserungen der Aktivität oder Ausbeute konnten im Rahmen dieser Dissertation nicht erreicht werden. Für

alle angewandten Methoden zeigten sich ähnliche Phänomene, wie Diffusionslimitierung und sterische Behinderung der Zugänglichkeit des Enzyms für das polymere Substrat. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Enzym mit *Antifouling*-Eigenschaften nach genetischer Modifikation an RO-Membranen zielgerichtet gekoppelt werden konnte.

6 Ausblick

Im Verlauf der Arbeiten ergaben sich einige Fragen, die in Zukunft untersucht werden könnten.

In Folgeprojekten sollte untersucht werden, ob die Menge an Alginate Lyase ausreichend ist, um effektiv eine Biofilmbildung auf der Membran zu erreichen. Dafür müssten Biofilm-Assays auf den modifizierten Membranen durchgeführt werden. Daneben ist essentiell die Leistung der Membran bezüglich Filtration und Flussrate zu untersuchen. Eine gute *Antifouling*-Eigenschaft der Membran nützt wenig, wenn ihre eigentliche Funktion zerstört ist.

Zwischen den RO-Membranen wurde ein Plastiknetz, der so genannte Spacer, eingelegt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Spacer Ausgangspunkt für das *Fouling* der Systeme sein können [Vrouwenvelder et al., 2009]. Ein weiterer interessanter Ansatzpunkt wäre also die *Antifouling*-Enzyme auf diesen Plastiknetzen zu immobilisieren. Generell wurde bereits gezeigt, dass es möglich ist Biokatalysatoren auf Polypropylen zu immobilisieren [Bayramoglu et al., 2011; Vasileva et al., 2012].

Im Allgemeinen weisen Biofilme viele verschiedene Biomakromoleküle auf [Kristensen et al., 2008]. Es wäre also zweckmäßig, neben der hier als Modellenzym verwendeten Alginate Lyase noch weitere Enzyme auf den RO-Membranen zu immobilisieren. Passende Kandidaten wären zum Beispiel Proteasen wie Alcalase® [Pettitt et al., 2004] oder Nukleasen [Nijland et al., 2010].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verwendung der Alginate Lyase unter Meerwasser-Konditionen nicht möglich wird, da es zur Inaktivierung des Enzyms kommt. Um dieses Problem zu lösen, könnte man eine Alginate Lyase aus einem salztoleranten Organismus, wie beispielsweise *Agarivorans*, verwenden. Ein anderer Ansatz wäre eine molekularbiologische Veränderung des Gens für das hier untersuchte Enzym von *Sphingomonas sp. A1*. Der Einsatz einer „*directed Evolution*“ zur Entwicklung einer salztoleranten Variante des Biokatalysators mit gleichbleibender Affinität zu Alginate wäre ein passender Ansatz.

7 Literatur

- Abarzua, S. und Jakubowski, S. (1995). "BIOTECHNOLOGICAL INVESTIGATION FOR THE PREVENTION OF BIOFOULING .1. BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PRINCIPLES FOR THE PREVENTION OF BIOFOULING." *Marine Ecology Progress Series*, **123**, 301-312.
- Abu Al-Rub, F. A., El-Naas, M. H., Benyahia, F. und Ashour, I. (2004). "Biosorption of nickel on blank alginate beads, free and immobilized algal cells." *Process Biochemistry*, **39**, 1767-1773.
- Adler, M. und Lee, G. (1999). "Stability and surface activity of lactate dehydrogenase in spray dried trehalose." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **88**, 199-208.
- Albayrak, N. und Yang, S.-T. (2002). "Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on tosylated cotton cloth." *Enzyme and Microbial Technology*, **31**, 371-383.
- Banerjee, I., Pangule, R. C. und Kane, R. S. (2010). "Antifouling Coatings: Recent Developments in the Design of Surfaces That Prevent Fouling by Proteins, Bacteria, and Marine Organisms." *Advanced Materials*, **23**, 690-718.
- Bayramoglu, G., Hazer, B., Altintas, B. und Arica, M. Y. (2011). "Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis." *Process Biochemistry*, **46**, 372-378.
- Bereschenko, L. A., Heilig, G. H. J., Nederlof, M. M., van Loosdrecht, M. C. M., Stams, A. J. M. und Euverink, G. J. W. (2008). "Molecular characterization of the bacterial community at different compartments of a full-scale reverse osmosis water purification plant." *Appl Environ Microbiol.*
- Bereschenko, L. A., Prummel, H., Euverink, G. J. W., Stams, A. J. M. und van Loosdrecht, M. C. M. (2011). "Effect of conventional chemical treatment on the microbial population in a biofouling layer of reverse osmosis systems." *Water Research*, **45**, 405-416.
- Bertani, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*." *J Bacteriol*, **62**, 293-300.
- Beule, A. G. H., W. . (2007). "Bacterial Biofilms." *Laryngo-Rhino-Otol*, **86**, 886-898.
- Boundy, J. A., Smiley, K. L., Swanson, C. L. und Hofreiter, B. T. (1976). "Exoenzymic activity of alpha-amylase immobilized on a phenol-formaldehyde resin." *Carbohydrate Research*, **48**, 239-244.
- Bradford, M. M. (1976a). "RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING." *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Bradford, M. M. (1976b). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem*, **72**, 248-54.
- Camarero, J. A. (2008). "Recent developments in the site-specific immobilization of proteins onto solid supports." *Biopolymers*, **90**, 450-458.
- Cao, L. (2006a). "Adsorption-based Immobilization." In: *Carrier-bound Immobilized Enzymes*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 53-168.
- Cao, L. (2006b). "Covalent Enzyme Immobilization." In: *Carrier-bound Immobilized Enzymes*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 169-316.
- Cao, L. (2006c). "Enzyme Entrapment." In: *Carrier-bound Immobilized Enzymes*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 317-395.
- Cao, L., Langen, L. v. und Sheldon, R. A. (2003). "Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?" *Current Opinion in Biotechnology*, **14**, 387-394.
- Cao, L., van Rantwijk, F. und Sheldon, R. A. (2000). "Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase." *Organic Letters*, **2**, 1361-1364.

- Cao, S., Wang, J., Chen, H. und Chen, D. (2011). "Progress of marine biofouling and antifouling technologies." *Chinese Science Bulletin*, 1-15.
- Cha, T., Guo, A. und Zhu, X. Y. (2005). "Enzymatic activity on a chip: The critical role of protein orientation." *Proteomics*, **5**, 416-419.
- Cordeiro, A. L. und Werner, C. (2011). "Enzymes for Antifouling Strategies." *Journal of Adhesion Science and Technology*, **25**, 2317-2344.
- Coronell, O., Marinas, B. J., Zhang, X. J. und Cahill, D. G. (2008). "Quantification of functional groups and modeling of their ionization behavior in the active layer of FT30 reverse osmosis membrane." *Environmental Science & Technology*, **42**, 5260-5266.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. und Greenberg, E. P. (1999). "Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections." *Science*, **284**, 1318-1322.
- Davidson, I. W., Lawson, C. J. und Sutherland, I. W. (1977). "ALGINATE LYASE FROM AZOTOBACTER-VINELANDII PHAGE." *Journal of General Microbiology*, **98**, 223-229.
- DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulouse, A. J. und Bohlmann, G. (2013). "Industrial use of immobilized enzymes." *Chemical Society Reviews*, **42**, 6437-6474.
- Dow. (1998). "Dow Filmtec - FT30 Membrane Description." *Product Information*.
- Elyakova, L. A. und Favorov, V. V. (1974). "Isolation and certain properties of alginate lyase VI from the mollusk *Littorina* sp." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, **358**, 341-354.
- Flemming, H.-C. und Wingender, J. (2010). "The biofilm matrix." *Nat Rev Micro*, **8**, 623-633.
- Fontananova, E. und Drioli, E. (2014). "Membrane Reactors: Advanced Systems for Intensified Chemical Processes." *Chemie Ingenieur Technik*, **86**, 2039-2050.
- Fuhrmann, M., Hausherr, A., Ferbitz, L., Schodl, T., Heitzer, M. und Hegemann, P. (2004). "Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene." *Plant Molecular Biology*, **55**, 869-881.
- Gacesa, P. (1992). "ENZYMATIC DEGRADATION OF ALGINATES." *International Journal of Biochemistry*, **24**, 545-552.
- Gerber, S., Kirchhof, K., Kressler, J., Schmelzer, C. E. H., Scholz, C., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2008). "Cloning, expression, purification, and characterization of a designer protein with repetitive sequences." *Protein Expression and Purification*, **59**, 203-214.
- Gershkovich, E. (2009). "Immobilization of Antimicrobial Peptides Onto Reverse Osmosis Polyamide Membranes to Inhibit Biofilm Growth: Membrane Characterization and Optimization of Synthetic Methodologies." Ben Gurion University.
- Giacalone, M. J., Gentile, A. M., Lovitt, B. T., Berkley, N. L., Gunderson, C. W. und Surber, M. W. (2006). "Toxic protein expression in *Escherichia coli* using a rhamnose-based tightly regulated and tunable promoter system." *Biotechniques*, **40**, 355-364.
- Grazu, V., Abian, O., Mateo, C., Batista-Viera, F., Fernandez-Lafuente, R. und Guisan, J. M. (2005). "Stabilization of enzymes by multipoint immobilization of thiolated proteins on new epoxy-thiol supports." *Biotechnology and Bioengineering*, **90**, 597-605.
- Habash, M. und Reid, G. (1999). "Microbial biofilms: Their development and significance for medical device-related infections." *Journal of Clinical Pharmacology*, **39**, 887-898.
- Haugen, F., Kortner, F. und Larsen, B. (1990). "KINETICS AND SPECIFICITY OF ALGINATE LYASES .1. A CASE-STUDY." *Carbohydrate Research*, **198**, 101-109.
- Huang, L.-N., De Wever, H. und Diels, L. (2008). "Diverse and Distinct Bacterial Communities Induced Biofilm Fouling in Membrane Bioreactors Operated under Different Conditions." *Environmental Science & Technology*, **42**, 8360-8366.
- Interior, U. S. D. o. t. (2015). "Bureau of Reclamation U.S. Department of the Interior." <http://www.usbr.gov/>.
- Janolino, V. G. und Swaisgood, H. E. (1992). "A spectrophotometric assay for solid-phase primary amino-groups." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **36**, 81-85.
- Kaplan, J. B., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H. und Ramasubbu, N. (2004). "Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms." *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 2633-6.

- Kerchove, A. J. d. und Elimelech, M. (2007). "Impact of alginate conditioning film on deposition kinetics of motile and nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* strains." *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 5227-5234.
- Kohn, M. und Breinbauer, R. (2004). "The Staudinger ligation - A gift to chemical biology." *Angewandte Chemie-International Edition*, **43**, 3106-3116.
- Kragl, U., Wöltinger, J., Karau, A., Leuchtenberger, W. und Drauz, K. (2005). "Membrane Reactors at Degussa." In: *Technology Transfer in Biotechnology*, Springer Berlin Heidelberg, 289-316, 92.
- Kristensen, J. B., Meyer, R. L., Laursen, B. S., Shipovskov, S., Besenbacher, F. und Poulsen, C. H. (2008). "Antifouling enzymes and the biochemistry of marine settlement." *Biotechnol Adv*, **26**, 471-81.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature*, **227**, 680-685.
- Lee, S., Ang, W. S. und Elimelech, M. (2006). "Fouling of reverse osmosis membranes by hydrophilic organic matter: implications for water reuse." *Desalination*, **187**, 313-321.
- Li, D. und Wang, H. T. (2010). "Recent developments in reverse osmosis desalination membranes." *Journal of Materials Chemistry*, **20**, 4551-4566.
- Li, J.-W., Dong, S., Song, J., Li, C.-B., Chen, X.-L., Xie, B.-B. und Zhang, Y.-Z. (2011). "Purification and Characterization of a Bifunctional Alginate Lyase from *Pseudoalteromonas* sp SM0524." *Marine Drugs*, **9**, 109-123.
- Li, Q. L., Xu, Z. H. und Pinnau, I. (2007). "Fouling of reverse osmosis membranes by biopolymers in wastewater secondary effluent: Role of membrane surface properties and initial permeate flux." *Journal of Membrane Science*, **290**, 173-181.
- Liese, A., Seelbach, K. und Wandrey, C. (2006). "Industrial biotransformations." John Wiley & Sons.
- Lin, P. C., Ueng, S. H., Tseng, M. C., Ko, J. L., Huang, K. T., Yu, S. C., Adak, A. K., Chen, Y. J. und Lin, C. C. (2006). "Site-specific protein modification through Cu-I-catalyzed 1,2,3-triazole formation and its implementation in protein microarray fabrication." *Angewandte Chemie-International Edition*, **45**, 4286-4290.
- Loiselle, M. und Anderson, K. W. (2003). "The Use of Cellulase in Inhibiting Biofilm Formation from Organisms Commonly Found on Medical Implants." *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, **19**, 77-85.
- Lombard, V., Ramulu, H. G., Drula, E., Coutinho, P. M. und Henrissat, B. (2014). "The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013." *Nucleic Acids Research*, **42**, D490-D495.
- Madaeni, S. S., Afshar, M., Jaafarzadeh, N., Tarkian, F. und Ghasemipanah, K. (2011). "Rearrangement of membrane elements in the pressure vessels for optimum utilization of reverse osmosis process." *Chemical Engineering Research & Design*, **89**, 48-54.
- Mansfeld, J., Vriend, G., Van den Burg, B., Eijssink, V. G. H. und Ulbrich-Hofmann, R. (1999). "Probing the Unfolding Region in a Thermolysin-like Protease by Site-Specific Immobilization." *Biochemistry*, **38**, 8240-8245.
- Margolin, A. L. (1996). "Novel crystalline catalysts." *Trends in Biotechnology*, **14**, 223-230.
- Marshall, K. C. (1994). "Microbial adhesion in biotechnological processes." *Current Opinion in Biotechnology*, **5**, 296-301.
- Mateo, C., Fernandes, B., van Rantwijk, F., Stolz, A. und Sheldon, R. A. (2006). "Stabilisation of oxygen-labile nitrilases via co-aggregation with poly(ethyleneimine)." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **38**, 154-157.
- Matin, A., Khan, Z., Zaidi, S. M. J. und Boyce, M. C. (2011). "Biofouling in reverse osmosis membranes for seawater desalination: Phenomena and prevention." *Desalination*, **281**, 1-16.
- Millqvist-Fureby, A., Malmsten, M. und Bergenstahl, B. (1999). "Spray-drying of trypsin - surface characterisation and activity preservation." *International Journal of Pharmaceutics*, **188**, 243-253.

- Miyake, O., Ochiai, A., Hashimoto, W. und Murata, K. (2004). "Origin and diversity of alginate lyases of families PL-5 and-7 in *Sphingomonas* sp strain A1." *Journal of Bacteriology*, **186**, 2891-2896.
- Mohamed, A. M. O., Maraqa, M. und Al Handhaly, J. (2005). "Impact of land disposal of reject brine from desalination plants on soil and groundwater." *Desalination*, **182**, 411-433.
- Mohy Eldin, M. S., Portaccio, M., Diano, N., Rossi, S., Bencivenga, U., D'Uva, A., Canciglia, P., Gaeta, F. S. und Mita, D. G. (1999). "Influence of the microenvironment on the activity of enzymes immobilized on Teflon membranes grafted by γ -radiation." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **7**, 251-261.
- Molobela. (2010). "Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria." *African Journal of Microbiology Research*, **4**, 1515-1524.
- Monroe, D. (2007). "Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms." *Plos Biology*, **5**, 2458-2461.
- Nakada, H. I. und Sweeny, P. C. (1967). "Alginate Acid Degradation by Eliminases from Abalone Hepatopancreas." *Journal of Biological Chemistry*, **242**, 845-851.
- Nakamura, Y., Gojobori, T. und Ikemura, T. (2000). "Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000." *Nucleic Acids Research*, **28**, 292-292.
- NGWA. (2010). "NGWA Information Brief ", http://www.ngwa.org/Media-Center/briefs/Documents/Brackish_water_info_brief_2010.pdf, 4.
- Nijland, R., Hall, M. J. und Burgess, J. G. (2010). "Dispersal of Biofilms by Secreted, Matrix Degrading, Bacterial DNase." *PLoS ONE*, **5**, e15668.
- Novagen. (2005). "pET System Manual 11th Edition."
- Ogura, K., Yamasaki, M., Mikami, B., Hashimoto, W. und Murata, K. (2008). "Substrate recognition by family 7 alginate lyase from *Sphingomonas* sp. A1." *Journal of Molecular Biology*, **380**, 373-385.
- Patel, I., Ludwig, R., Mueangtoom, K., Haltrich, D., Rosenau, T. und Potthast, A. (2009). "Comparing soluble *Trametes pubescens* laccase and cross-linked enzyme crystals (CLECs) for enzymatic modification of cellulose 10(th) EWLP, Stockholm, Sweden, August 25-28, 2008." *Holzforschung*, **63**, 715-720.
- Pettitt, M. E., Henry, S. L., Callow, M. E., Callow, J. A. und Clare, A. S. (2004). "Activity of commercial enzymes on settlement and adhesion of cypris larvae of the barnacle *Balanus amphitrite*, spores of the green alga *Ulva linza*, and the diatom *Navicula perminuta*." *Biofouling*, **20**, 299-311.
- Post, J. C., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L. und Ehrlich, G. D. (2004). "The role of biofilms in otolaryngologic infections." *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, **12**, 185-90.
- Rahman, M. M., Inoue, A., Tanaka, H. und Ojima, T. (2010). "Isolation and characterization of two alginate lyase isozymes, AkAly28 and AkAly33, from the common sea hare *Aplysia kurodai*." *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, **157**, 317-325.
- Rodrigues, R. C., Berenguer-Murcia, A. und Fernandez-Lafuente, R. (2011). "Coupling Chemical Modification and Immobilization to Improve the Catalytic Performance of Enzymes." *Advanced Synthesis & Catalysis*, **353**, 2216-2238.
- Saeki, D., Nagao, S., Sawada, I., Ohmukai, Y., Maruyama, T. und Matsuyama, H. (2013). "Development of antibacterial polyamide reverse osmosis membrane modified with a covalently immobilized enzyme." *Journal of Membrane Science*, **428**, 403-409.
- Samborska, K., Witrowa-Rajchert, D. und Goncalves, A. (2005). "Spray-drying of alpha-amylase - The effect of process variables on the enzyme inactivation." *Drying Technology*, **23**, 941-953.
- Santiago-Hernández, J. A., Vásquez-Bahena, J. M., Calixto-Romo, M. A., Xoconostle-Cázares, G. B., Ortega-López, J., Ruíz-Medrano, R., Montes-Horcasitas, M. C. und Hidalgo-Lara, M. E. (2006). "Direct immobilization of a recombinant invertase to Avicel by *E. coli* overexpression of a fusion protein containing the extracellular

- invertase from *Zymomonas mobilis* and the carbohydrate-binding domain CBD Cex from *Cellulomonas fimi*." *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 172-176.
- Shin, J., Choi, S., Kim, D., Kim, H., Lee, J.-H., Lee, I. und Lee, E. (2010). "Heterologous expression of an alginate lyase from *Streptomyces* sp. ALG-5 in *Escherichia coli* and its use for preparation of the magnetic nanoparticle-immobilized enzymes." *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **34**, 113-119.
- Sigma-Aldrich. (2012). "Molecular weight of Na-Alginate (Produktnummer 71238)."
- SigmaAldrich. (2006). "Sephacrose® 4B Product Number 4 B200 Product Description." *Product Information*.
- Simoës, M., Simoës, L. C. und Vieira, M. J. (2010). "A review of current and emergent biofilm control strategies." *Lwt-Food Science and Technology*, **43**, 573-583.
- Singh, R. P., Gupta, V., Kumari, P., Kumar, M., Reddy, C. R. K., Prasad, K. und Jha, B. (2011). "Purification and partial characterization of an extracellular alginate lyase from *Aspergillus oryzae* isolated from brown seaweed." *Journal of Applied Phycology*, **23**, 755-762.
- Smidsrød, O. (1974). "Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state." *Faraday discussions of the Chemical Society*, **57**, 263-274.
- Sutherland, I. W. (2001). "The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment." *Trends in Microbiology*, **9**, 222-227.
- ThermoScientific. (2011). "SPDP Crosslinkers." *Product Information*.
- Tiraferri, A. und Elimelech, M. (2012). "Direct quantification of negatively charged functional groups on membrane surfaces." *Journal of Membrane Science*, **389**, 499-508.
- UniProt. (2014). UniProt Consortium <http://www.uniprot.org/>.
- Vasileva, N., Iotov, V., Ivanov, Y., Godjevargova, T. und Kotia, N. (2012). "Immobilization of beta-galactosidase on modified polypropylene membranes." *International Journal of Biological Macromolecules*, **51**, 710-719.
- Vrouwenvelder, J. S., Graf von der Schulenburg, D. A., Kruithof, J. C., Johns, M. L. und van Loosdrecht, M. C. M. (2009). "Biofouling of spiral-wound nanofiltration and reverse osmosis membranes: A feed spacer problem." *Water Research*, **43**, 583-594.
- Walker, S. L., Fourgialakis, M., Cerezo, B. und Livens, S. (2007). "Removal of microbial biofilms from dispense equipment: The effect of enzymatic pre-digestion and detergent treatment." *Journal of the Institute of Brewing*, **113**, 61-66.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. und Mattick, J. S. (2002). "Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation." *Science*, **295**, 1487.
- Williams, A., Hagel, L. und Wu, C.-s. (1999). "2 - Size Exclusion for Analysis and Purification of Aqueous Macromolecules." In: *Column Handbook for Size Exclusion Chromatography*, Academic Press, San Diego, 27-74.
- Wong, T. Y., Preston, L. A. und Schiller, N. L. (2000). "Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications." *Annual Review of Microbiology*, **54**, 289-340.
- Yamasaki, M., Ogura, K., Hashimoto, W., Mikami, B. und Murata, K. (2005). "A structural basis for depolymerization of alginate by polysaccharide lyase family-7." *Journal of Molecular Biology*, **352**, 11-21.
- Yao, J., Chen, Q., Zhong, G., Cao, W., Yu, A. und Liu, Y. (2014). "Immobilization and Characterization of Tannase from a Metagenomic Library and Its Use for Removal of Tannins from Green Tea Infusion." *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**, 80-86.
- Yoza, B., Arakaki, A., Maruyama, K., Takeyama, H. und Matsunaga, T. (2003). "Fully automated DNA extraction from blood using magnetic particles modified with a hyperbranched polyamidoamine dendrimer." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **95**, 21-26.
- Zhao, Y., Qiu, C., Li, X., Vararattanavech, A., Shen, W., Torres, J., Hélix-Nielsen, C., Wang, R., Hu, X., Fane, A. G. und Tang, C. Y. (2012). "Synthesis of robust and high-performance aquaporin-based biomimetic membranes by interfacial polymerization-membrane preparation and RO performance characterization." *Journal of Membrane Science*, **423-424**, 422-428.

8 Anhang

8.1 Sequenzen

```

1 GAATTCCATATGCCA GCCGCTGCTCCAGGT AAAAAGTTCGATCTG TCTCATTGGAAACTG
1 E F H M P A A A P G K N F D L S H W K L
61 CAACTGCCAGACGCG AACACCACTGAAATT TCCTCTGCTAATCTG GGTCTGGGTTATACG
21 Q L P D A N T T E I S S A N L G L G Y T
121 TCTCAGTACTTTTAC ACCGACACTGATGGC GCTATGACTTTTTTGG GCTCCAACCACCGGT
41 S Q Y F Y T D T D G A M T F W A P T T G
181 GGCACCACCGCCAAC TCCTCTTATCCGCGC TCTGAGCTGCGCGAA ATGCTGGACCCTAGC
61 G T T A N S S Y P R S E L R E M L D P S
241 AACTCTAAAAGTTAAC TGGGGCTGGCAAGGC ACCCACACGATGAAA CTGTCTGGTAAAAGT
81 N S K V N W G W Q G T H T M K L S G K T
301 GTGCAGCTGCCGTCC AGCGGTAAGATCATC GTAGCGCAGATCCAC GGCATTATGGATGAC
101 V Q L P S S G K I I V A Q I H G I M D D
361 GGTACCAACGCTCCG CCGCTGGTCAAGGCT GTGTTCCAGGACGGC CAGCTGGACATGCAG
121 G T N A P P L V K A V F Q D G Q L D M Q
421 GTTAAGCAAAAAGTCT GACGGTACCGGCTCC GATGTACACAAGTAC TTTACTGGTATCAAA
141 V K Q N S D G T G S D V H N Y F T G I K
481 CTGGGCGACCTGTAC AACATGGAAATCCGC GTAAGTACGCGGTGTT GCGTATGTAAGTATG
161 L G D L Y N M E I R V T D G V A Y V T M
541 AACGGTGATACCCGT TCTGTGATTTTCGTA GGCAAAGATGCTGGT TGGAAAAACCTGAAA
181 N G D T R S V D F V G K D A G W K N L K
601 TACTACTTCAAAGCG GGTAAGTATGTACAG GACAATACCAGCACC GGCAGGCTCTGCTATC
201 Y Y F K A G N Y V Q D N T S T G G S A I
661 GCTAAGCTGTACTCC CTGAGCGTGTCTCAT TCCAATCATCACCAT CACCATCACTGATGA
221 A K L Y S L S V S H S N H H H H H H * *
721 CCGCTCGAGCGG
241 P L E R

```

Abb. 8-1 Nukleotidsequenz und die korrespondierende Aminosäuresequenz der **Alginate Lyase aus *Sphingomonas sp. A1***. Die Sequenz wurde für die *E.coli* Codon Usage optimiert. In Gelb ist das Gen markiert und Rot kennzeichnet den His-tag, beides auf Aminosäureebene. Mit Grau wurden die Restriktionsschnittstellen auf Nukleotidebene hervorgehoben. Sterne kennzeichnen Stopp-Codons.

In Abb. 8-2 ist ein Sequenzierergebnis für eine Variante mit Austausch von Serin an Stelle 93 der Aminosäuresequenz zu Cystein, beispielhaft dargestellt. Dabei wurde zunächst das Sequenzierergebnis von Nukleotid in die Aminosäuresequenz mit ExPASy translatiert. Es wurde dann ein Alignment zwischen der Ursprungssequenz und der erhaltenen Sequenz mit Hilfe von EMBOSS-Needle (Paarweises Sequenz Alignment von Proteinsequenzen) generiert.

```

1      PAAAPGKNFDLSHWKLQLPDANTTEISSANLGLGYTSQYFYTTDTDGAMTF      50
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1      PAAAPGKNFDLSHWKLQLPDANTTEISSANLGLGYTSQYFYTTDTDGAMTF      50

51     WAPTTGGTTANSSYPRSELREMLDPSNSKVNWGWQGTHMKLCGKTVQLP      100
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||.|||||||
51     WAPTTGGTTANSSYPRSELREMLDPSNSKVNWGWQGTHMKLSGKTVQLP      100

101    SSGKIIVAQIHGIMDDGTNAPPLVKAVFQDQQLDMQVKQNSDGTGSDVHN      150
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
101    SSGKIIVAQIHGIMDDGTNAPPLVKAVFQDQQLDMQVKQNSDGTGSDVHN      150

151    YFTGIKLGDLNMEIRVTDGVAYVTMNGDTRSVDFVGKDAGWKNLKYFFK      200
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
151    YFTGIKLGDLNMEIRVTDGVAYVTMNGDTRSVDFVGKDAGWKNLKYFFK      200

201    AGNYVQDNTSTGGSIAIAKLYSLSVSHSNHHHHHHH                      234
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
201    AGNYVQDNTSTGGSIAIAKLYSLSVSHSNHHHHHHH                      234

```

Abb. 8-2 **Alignment der Aminosäuresequenzen des Wildtyps und der Einzelaustausch-Variante der Alginat Lyase.** In der oberen Zeile ist die Sequenz der substituierten Variante aufgeführt. Die untere Zeile stellt die ursprüngliche Wildtypsequenz dar. Mit Rot ist die Stelle der Substitution gekennzeichnet. Das Alignment wurde mit Hilfe von EBOSS-Needle erstellt.

8.2 Messdaten

In Tabelle 8-1 sind die Messdaten zur Immobilisierung auf *Activated Thiol Sepharose™ 4B* aufgeführt.

Tabelle 8-1 Messdaten zur Immobilisierung auf *Activated Thiol Sepharose™ 4B*

	Wildtyp	S93C	S221C	S223C	S93/221/ 223C
Aktivität vor der Immobilisierung [AU]	92	89	92	102	59
Aktivität nach der Immobilisierung [AU]	72	36	27	48	43
Aktivität in Waschfraktionen [AU]	4	3	2	5,5	3
Theoretisch immobilisierte Aktivität [AU]	16	50	63	48,5	13
Aktivität auf dem Träger [AU]	0	5,9	6,5	1,8	0,8
Eluierte Aktivität [AU]	0	47,3	42	16	1,5
Verlust [AU]	16	2,7	21	32,5	11,5

Die theoretisch immobilisierte Aktivität ergibt sich aus der Aktivität im Überstand vor der Immobilisierung abzüglich der Aktivität im Überstand nach der Immobilisierung und der Aktivität in den Waschfraktionen. Der Verlust errechnet sich aus der theoretisch immobilisierten Aktivität abzüglich der im Eluat nachweisbaren Aktivität.

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Christian Beyerodt
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet
Akademischer Grad: Dipl. Biologe

Ausbildung

- 01/2011 – 05/2015 **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
Promotion am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte
Thema: „**Untersuchung zur Produktion und gerichteten Immobilisierung einer Alginat Lyase aus *Sphingomonas sp. A1***“
- 05/2010 – 12/2010 **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
Diplomarbeit am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte
*Thema: „**Untersuchungen zur enzymkatalysierten Synthese von GDP-Mannose**“*
- 10/2005 - 12/2010 **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
Studium der Biologie (Diplom)
- 08/2002 - 08/2005 **Schule des zweiten Bildungsweges – Abendschule und Kolleg Halle/ S.**
Allgemeine Hochschulreife
- 08/1999 - 08/2002 **Medizinische Fachschule der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
Ausbildung zum med.-techn.-Laboratoriumsassistent
- 08/1997 - 08/1999 **Realschule „Dr. Thodor Neubauer“, Hohenturm**
Erweiterter Realschulabschluss