

Charakterisierung thermostabiler
Glykosidhydrolasen
zum Abbau von Lignocellulose

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg-Harburg
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Saskia Blank

aus

Berlin

2013

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Bioraffinerien	3
1.1.1 Klassifizierung von Bioraffinerien	4
1.2 Lignocellulose.....	5
1.2.1 Lignocellulose-Bioraffinerie.....	7
1.3 Glykosidhydrolasen.....	9
1.3.1 Klassifizierung von Glykosidhydrolasen.....	10
1.3.2 Hydrolysemechanismen von Glykosidhydrolasen.....	11
1.3.3 Cellulasen	14
1.3.4 Xylanasen.....	15
1.3.5 Industrielle Anwendungen von Cellulasen und Xylanasen	16
1.3.6 Thermostabile Cellulasen und Xylanasen.....	18
1.4 Bakterien der Gattung <i>Thermus</i>	19
1.5 Ziele der Arbeit.....	21
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Mikrobiologische Arbeiten.....	23
2.1.1 Bakterienstämme und Vektoren	23
2.1.2 Medien und Zusätze	24
2.1.3 Antibiotika und Zusätze.....	27
2.1.4 Kultivierung von Mikroorganismen	28
2.1.5 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	29
2.1.6 Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	30
2.1.7 Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation.....	30
2.1.8 Stammerhaltung.....	30
2.2 Molekularbiologische Arbeiten	30
2.2.1 Isolierung von genomischer DNA	30
2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA	31
2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	31
2.2.4 Restriktion von DNA	32
2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA.....	32
2.2.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	32
2.2.7 Amplifizierung von DNA	32
2.2.8 Ligation von DNA.....	34
2.2.9 Erstellung von Phagemid-Genbanken	34

2.2.10	Erstellung einer Fosmid-Genbank	35
2.2.11	Erstellung einer „Shotgun“-Genbank	35
2.2.12	Durchmusterung von Genbanken	36
2.3	Biochemische Arbeiten	37
2.3.1	Herstellung von Rohextrakt.....	37
2.3.2	Proteinreinigung und Dialyse	38
2.3.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	38
2.3.4	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
2.3.5	Zymogramme	40
2.3.6	Ermittlung des Molekulargewichtes von nativen Proteinen.....	40
2.3.7	Bestimmung der Xylanase-Aktivität	41
2.3.8	Bestimmung der β -Glukosidase-Aktivität.....	42
2.3.9	Bestimmung des Substratspektrums.....	43
2.3.10	Bestimmung des Einflusses der Temperatur.....	43
2.3.11	Bestimmung des Einflusses des pH-Wertes	43
2.3.12	Bestimmung des Einflusses verschiedener Puffer.....	44
2.3.13	Bestimmung des Einflusses von Zusätzen	44
2.3.14	Bestimmung von kinetischen Parametern	44
2.3.15	Bestimmung der Produkthemmung.....	45
2.3.16	Test der Kohlenhydrat-bindenden Domäne von <i>TaBgl2A</i> auf Funktionalität	45
2.3.17	Bestimmung der Hydrolyseprodukte durch HPLC-Analysen.....	45
2.4	Bioinformatische Arbeiten	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Glykosidhydrolase-Aktivität von Spezies der Gattung <i>Thermus</i>	47
3.2	Durchmusterung von Genbanken.....	48
3.3	Charakterisierung einer Endoxylanase aus <i>Thermus brockianus</i> GE-1	50
3.3.1	Sequenzanalyse des xylanolytischen Genbankklons.....	50
3.3.2	Klonierung und Expression des Gens <i>xyn10a</i>	57
3.3.3	Reinigung der Xylanase <i>TbXyn10A</i>	58
3.3.4	Biochemische Charakterisierung der Xylanase <i>TbXyn10A</i>	60
3.3.4.1	Bestimmung des Substratspektrums von <i>TbXyn10A</i>	60
3.3.4.2	Bestimmung des Einflusses der Temperatur auf die Aktivität von <i>TbXyn10A</i>	61
3.3.4.3	Bestimmung des Einflusses des pH-Wertes auf die Aktivität von <i>TbXyn10A</i>	63
3.3.4.4	Bestimmung des Einflusses von Puffern auf die Aktivität von <i>TbXyn10A</i>	64
3.3.4.5	Bestimmung des Einflusses von Zusätzen auf die Aktivität von <i>TbXyn10A</i>	65
3.3.4.6	Bestimmung kinetischer Parameter von <i>TbXyn10A</i>	68
3.3.4.7	Bestimmung der Produkthemmung von <i>TbXyn10A</i>	68
3.3.4.8	Bestimmung der Hydrolyseprodukte von <i>TbXyn10A</i> durch HPLC-Analysen.....	69

3.4 Charakterisierung einer β -Glukosidase aus <i>Thermus antranikianii</i> EG-2.....	72
3.4.1 Sequenzanalyse des cellulolytischen Genbankklons.....	72
3.4.2 Klonierung und Expression des Gens <i>bgl2a</i>	79
3.4.3 Reinigung der putativen β -Galaktosidase <i>TaBgl2A</i>	80
3.4.4 Biochemische Charakterisierung der putativen β -Galaktosidase <i>TaBgl2A</i>	81
3.4.4.1 Bestimmung des Substratspektrums von <i>TaBgl2A</i>	82
3.4.4.2 Bestimmung des Einflusses der Temperatur auf die Aktivität von <i>TaBgl2A</i>	82
3.4.4.3 Bestimmung des Einflusses des pH-Wertes auf die Aktivität von <i>TaBgl2A</i>	84
3.4.4.4 Bestimmung des Einflusses von Puffern auf die Aktivität von <i>TaBgl2A</i>	86
3.4.4.5 Bestimmung des Einflusses von Zusätzen auf die Aktivität von <i>TaBgl2A</i>	86
3.4.4.6 Bestimmung kinetischer Parameter von <i>TaBgl2A</i>	89
3.4.4.7 Bestimmung der Produkthemmung von <i>TaBgl2A</i>	90
3.4.4.8 Test der Kohlenhydrat-bindenden Domäne von <i>TaBgl2A</i>	90
3.4.4.9 Bestimmung der Hydrolyseprodukte von <i>TaBgl2A</i> durch HPLC-Analysen.....	91
4 Diskussion.....	93
4.1 Detektion von Glykosidhydrolase-kodierenden Genen	93
4.2 Analyse der Nukleotid- und Aminosäuresequenz der identifizierten Glykosidhydrolasen	96
4.3 Heterologe Produktion, Reinigung und Bestimmung des Molekulargewichtes	101
4.4 Biochemische Charakterisierung der Proteine	102
4.4.1 Substratspezifität und Hydrolyseprodukte	102
4.4.2 Einfluss der Temperatur auf die katalytische Aktivität	103
4.4.3 Einfluss des pH-Wertes auf die katalytische Aktivität.....	104
4.4.4 Spezifische Aktivität und Kinetik der Enzyme	105
4.4.5 Einflüsse von Zusätzen auf die katalytische Aktivität.....	107
4.4.6 Produkthemmung.....	108
4.4.7 Test der Kohlenhydrat-bindenden Domäne von <i>TaBgl2A</i>	109
4.4.8 Industrielle Anwendbarkeit von <i>TbXyn10A</i> und <i>TaBgl2A</i>	110
5 Zusammenfassung.....	111
Literaturverzeichnis.....	113