

Enzyscreening an marinen Mikroorganismen

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Chem. Marc Laroche
geboren am 10.10.1973 in Bad Oeynhausen

Hannover, 2003

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: PD Dr. Roland Ulber

Tag der Promotion: 28.01.2003

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zu Hilfeleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere ferner, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, im Januar 2003

Abstract

Marc Laroche

Der marine Lebensraum zeichnet sich u.a. durch oftmals begrenzte Nährstoffangebote in engen ökologischen Nischen aus, an die sich Mikroorganismen im Laufe der Evolution angepasst haben. Aus diesen Organismen wurden in den letzten Jahren eine Reihe interessanter bioaktiver Naturstoffe isoliert, die in vielen Fällen z.B. pharmakologische Wirkungen aufweisen. Die in dieser Arbeit untersuchten Mikroorganismen wurden von Bryozoen aus der Nordsee isoliert. Der bisher unbeschriebene und erstmals charakterisierte Bakterienstamm *Paracoccus seriniphilus* wächst durch Produktion einer L-Serindehydratase auf L-Serin als einziger C- und N-Quelle. Nach Optimierung der Wachstumsbedingungen und Enzymproduktion wurde dieses Enzym stabilisiert, isoliert und charakterisiert. Es kann zur Entwicklung eines bioanalytischen Systems eingesetzt werden, um die L-Serin-Analytik der biotechnologischen Synthese von L-Tryptophan aus L-Serin und Indol zu optimieren.

Neben der L-Serindehydratase sind auch halogenierende Enzyme technisch interessant, da sie zur Synthese wichtiger bioaktiver Verbindungen eingesetzt werden können. Sie werden von Mikroorganismen oftmals in nur sehr geringen Mengen produziert, so dass empfindliche Nachweismethoden erforderlich sind. Solche wurden für Haloperoxidasen und Halogenasen auf Grundlage von spektroskopischen Methoden, wie der 2D-Fluoreszenzspektroskopie, entwickelt. Der unbeschriebener bryozoenassoziierte Bakterienstamm MBT-12 trägt ein Halogenase-codierendes Gen, was mittels PCR festgestellt wurde. Da eine exakte phylogenetische Zuordnung dieses Stammes auf genetischer Basis nicht möglich war, wurden seine charakteristischen Eigenschaften untersucht und mit denen der nächsten verwandten Gattungen *Yersinia* und *Serratia* verglichen.

Schlagworte: L-Serindehydratase, Haloperoxidase, Halogenase

Abstract

Marc Laroche

Because of often insufficient nutrient supply in the marine environment marine microorganisms have developed methods to live in ecological niches. In the last years a high number of interesting bioactive natural products has been isolated from marine microorganisms. They often show for example pharmacological activities. The microorganisms cultivated in this work were isolated from North Sea bryozoans. The former undescribed bacterial strain *Paracoccus seriniphilus* is able to grow on L-serine as the only C- and N-source by producing a L-serine dehydratase. After optimising the growth conditions and enzyme production the enzyme was stabilised, isolated and characterised. It can be used to develop a bioanalytical system to optimise the L-serine analytics of the biotransformation of L-serine und indole to L-tryptophane.

Aside from the L-serine dehydratase halogenating enzymes are also interesting for technical applications because they can be used to synthesise important bioactive compounds. They are often produced in very low concentration by microorganisms, so that sensitive detection methods are necessary. These were developed for haloperoxidases und halogenases using spectroscopic methods like 2D-fluorescence spectroscopy. The undescribed bryozoen associated bacterial strain MBT-12 has a halogenase-coding gen which has been detected by PCR. Because the exact phylogenetic classification of the strain was not possible, its characteristics were investigated and compared with those of the next phylogenetic related genes *Yersinia* and *Serratia*.

Keywords: L-serine dehydratase, haloperoxidase, halogenase

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von August 1999 bis August 2002 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Thomas Scheper durchgeführt. Für die interessante Themenstellung, für optimale Arbeitsmöglichkeiten, zahlreiche Hilfestellungen und uneingeschränkte Unterstützung möchte ich ihm an dieser Stelle danken.

Für die langjährige kompetente Betreuung meiner Arbeit, für kreative Anregungen und für die Koordination des Projektes „Marine Biotechnologie“ möchte ich weiterhin Herrn PD Dr. Roland Ulber danken. Ich danke ihm auch für die Übernahme des Korreferates.

Besonderer Dank gilt auch denjenigen, die durch ihre wissenschaftlichen Untersuchungen zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben: Patrick Schauer, George Budiyanto, Lalida Jamjumrus, Mike Turra

Ich möchte Dr. Rüdiger Pukall für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung von Bakterienstämmen und Bryozoenextrakten danken.

Bedanken möchte ich mich auch für die grenzenlose Hilfsbereitschaft und HPLC-Analytik von Martina Weiß. Mein Dank gilt ebenfalls den Werkstätten und der Verwaltung des Instituts, die für Fragen und Wünsche stets ein offenes Ohr hatten.

Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, angeregte Diskussionen und gute Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben. Besonders möchte ich mich bei meiner Freundin Laksmi Maria Peters und für ihre Liebe und Unterstützung bedanken.

Dem Land Niedersachsen möchte ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bryozoen.....	2
2	Isolierung einer L-Serindehydratase	7
2.1	L-Serin.....	9
2.2	Enzymscreening.....	10
2.2.1	L-Serindehydratase.....	12
2.3	Beschreibung von MBT-A4.....	14
2.3.1	Phylogenetische Zuordnung.....	14
2.3.2	Die Gattung <i>Paracoccus</i>	16
2.3.3	Morphologie und Biofilmbildung.....	17
2.3.4	Physiologische und biochemische Charakterisierung.....	21
2.3.4.1	KOH-Test auf Liposaccharide.....	21
2.3.4.2	Optimierung der Wachstumstemperatur.....	21
2.3.4.3	Optimierung des pH-Wertes.....	22
2.3.4.4	Optimierung des NaCl-Gehaltes.....	23
2.3.4.5	Biolog GN2.....	25
2.3.4.6	API 20 NE.....	26
2.4	Detektion der L-Serindehydratase.....	28
2.4.1	Bestimmung der L-Serindehydrataseaktivität - Stand der Technik.....	28
2.5	Optimierung der Biomasse- und L-Serindehydratase-Produktion von <i>Paracoccus seriniphilus</i>	31
2.5.1	Kultivierung im L-Serin-Minimalmedium.....	31
2.5.2	Enzyminduktion im L-Serin-Minimalmedium.....	32
2.5.2.1	Optimierung der Inkubationszeit im L-Serin-Minimalmedium.....	33
2.5.2.2	Vitalitätsuntersuchungen.....	34
2.5.3	Kultivierung im komplexen Medium mit L-Serin-Zusatz.....	35
2.5.4	Vergleich der Verfahren zur Biomasse- und Enzymproduktion.....	36
2.6	Charakterisierung des Wachstumsverhaltens von <i>Paracoccus seriniphilus</i>	37
2.6.1	Kultivierung im L-Serin-Minimalmedium.....	37
2.6.2	Kultivierung im komplexen Medium.....	43
2.7	Aktivierung und Stabilisierung der L-Serindehydratase.....	45
2.7.1	Methoden zur Stabilisierung und Aktivierung der L-Serindehydratase.....	45
2.7.1.1	Stabilisierung und Aktivierung der L-Serindehydratase mit Dithiothreitol.....	45
2.7.1.2	Stabilisierung und Aktivierung der L-Serindehydratase mit L-Cystein.....	47
2.7.1.3	Aktivierung mit Pyridoxalphosphat.....	48
2.7.1.4	Reaktivierung inaktiver L-Serindehydratase.....	48
2.7.2	Wahl des geeigneten Puffersystems.....	49
2.8	Isolierung der L-Serindehydratase.....	50
2.8.1	Ammoniumsulfatfällung.....	51
2.8.2	Hydroxylapatit-Chromatographie.....	52
2.8.3	Anionenaustausch-Chromatographie.....	55
2.8.4	Aufkonzentrierung der L-Serindehydratase.....	56

2.8.5	Gesamtübersicht der L-Serindehydratase-Isolierung	56
2.8.6	Einfluss des L-Cysteins im Elutionspuffer auf die Chromatographie	57
2.9	Enzymcharakterisierung	59
2.9.1	Cofaktor-Abhängigkeit der L-Serindehydratase	59
2.9.2	Molmassenbestimmung der L-Serindehydratase	61
2.9.3	pH-Wert und Temperaturoptimierung	67
2.9.4	Enzymkinetik	68
2.9.5	Inhibierung der L-Serindehydratase	72
2.10	Entwicklung eines bioanalytischen Systems zur L-Serin-Bestimmung	76
2.10.1	L-Serinbestimmung mittels nativer L-Serindehydratase	77
2.10.2	Immobilisierung der L-Serindehydratase	79
2.10.3	L-Serin-Bestimmungen mit VA-Epoxy-Immobilisaten	82
2.10.3.1	Stabilisierung der VA-Epoxy-Immobilisate	82
2.10.3.2	Kinetik	84
2.11	Zusammenfassung und Ausblick	84
3	Halogenierende Enzyme	87
3.1	Halogenierte Verbindungen	87
3.2	Halogenierende Enzyme	88
3.3	Aufgabenstellung	92
3.3.1	Haloperoxidasen	93
3.3.1.1	Aufbau eines Screeningsystems	93
3.3.1.2	Screeningexperimente an marinen Mikroorganismen	99
3.3.2	Halogenasen	100
3.3.2.1	Charakterisierung des Bakterienstammes MBT-12	100
3.3.2.2	Vergleich von MBT-12 mit den phylogenetisch verwandten Gattungen <i>Serratia</i> und <i>Yersinia</i>	106
3.3.2.3	Entwicklung eines effektiven Halogenasenachweises	108
3.3.2.4	Zusammenfassung und Ausblick	115
4	Schlussbetrachtung	116
5	Anhang	120
5.1	kultivierte Mikroorganismen	120
5.2	Wachstumsmedien	121
5.3	Stammhaltung auf Agarplatten	126
5.4	Gefrierkulturen in Glycerin	126
5.5	Optische Dichte	126
5.6	Bestimmung der Biotrockenmasse	127
5.7	Bestimmung der maximalen Wachstumsrate	127
5.8	Zellaufschluss	127
5.9	Bestimmung der L-Serindehydratase-Aktivität	129
5.10	Bestimmung der L-Threonindehydratase-Aktivität	130
5.11	Bestimmung der Pyruvatkonzentration	130
5.12	Bestimmung der Ammoniumkonzentration	131

5.13	Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen mittels HPLC	132
5.14	Bestimmung der Proteinkonzentration	133
5.15	KOH-Test auf Liposaccharide	133
5.16	Charakteristika der BioRad-Econo-Pac Cartridges	133
5.17	Vivaspin-Konzentratoren	134
5.18	Grundeinstellungen des 2D-Fluoreszenzspektrometers.....	135
5.19	Gelelektrophorese.....	135
5.20	Abkürzungsverzeichnis.....	136
5.21	Chemikalienverzeichnis	137
5.22	Geräteverzeichnis	139
6	<i>Abbildungsverzeichnis.....</i>	<i>140</i>
7	<i>Literaturverzeichnis.....</i>	<i>146</i>
	<i>Lebenslauf.....</i>	<i>159</i>

1 Einleitung

Als sich das Leben vor ca. 3,5 Mrd. Jahren auf der Erde entwickelte, fand dieses ausschließlich im Meer statt, und erst viel später erfolgte die Auftrennung in den terrestrischen und marinen Lebensraum [ZEECK, 2001]. Aufgrund der unterschiedlichen Entwicklung der marinen und terrestrischen Lebewesen und der Anpassung an ihren jeweiligen Lebensraum zeigen die Organismen heutzutage zum Teil unterschiedliche Stoffwechselwege und produzieren somit unterschiedliche Naturstoffe. Weiterhin gehen marine Lebewesen oft symbiotische Lebensgemeinschaften ein, wobei die Kommunikation über das Medium Wasser möglich ist. Deshalb, und weil marine Naturstoffe auch außerhalb des aquatischen Lebensraumes Wirkung zeigen, ist die Erforschung dieses Habitates in den letzten Jahren immer wichtiger geworden. Während der terrestrische Lebensraum seit vielen Jahren genau erforscht wird, steht die marine Forschung noch am Anfang, da Sekundärmetabolite oft nur in sehr geringen Konzentrationen gebildet werden und sich die überwiegende Zahl der marinen Organismen im Labor nicht oder nur sehr schwer kultivieren lässt. So gehen Schätzungen davon aus, dass erst 5 % der marinen Bakterien bekannt sind [ULBER, 2002]. Es ist daher zu erwarten, dass mit der Weiterentwicklung von Analyse- und Kultivierungsmethoden aus dem marinen Lebensraum interessante, bislang unbekannte Naturstoffe gewonnen werden können. Ein Beispiel dafür, das in den letzten Jahren Aufmerksamkeit erregt hat, ist das Bryostatin-1 (Abbildung 1.1) [KIRSCHNING, 2001].

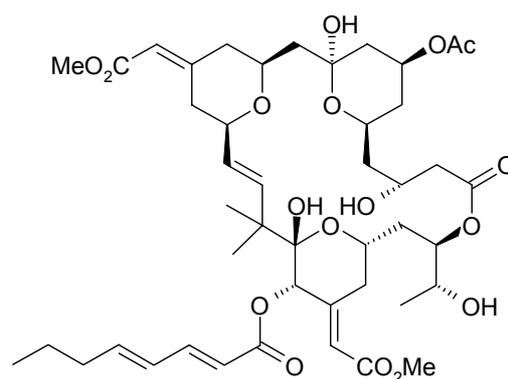


Abbildung 1.1: Struktur des Bryostatin 1

Bei Bryostatin handelt es sich um einen makrocyclischen Naturstoff, der aus der Bryozoe *Bugula neritina* isoliert wurde. Als Agonist der Proteinkinase C zeigt es Antitumorwirkung und stimuliert im Gegensatz zur herkömmlichen Chemotherapie die Produktion von roten

Blutkörperchen. Bryostatin-1 wird derzeit in einer Reihe von Studien der klinischen Phase II als Wirkstoff gegen Melanome, Non-Hodgkins Lymphome und Nierentumore getestet [RAMM, 2001, RATTEL *et al*, 2001]. Auch aus marinen Mikroorganismen wurden Verbindungen isoliert, die z.B. pharmakologische Wirkungen zeigen oder für die Entwicklung von bioanalytischen Systemen von Interesse sind [ARNDT, 2002]. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf der Optimierung der Biomasseproduktion der untersuchten Bakterienstämme unter dem Gesichtspunkt der Expression der Zielproteine. Weitere Schritte sind die Charakterisierung, Isolierung und technische Anwendung dieser Proteine. Das biotechnologische Potential der marinen Mikroorganismen wird in dieser Arbeit anhand von zwei Beispielen dargestellt.

- Für die Entwicklung eines bioanalytischen Systems zur Bestimmung von L-Serin-Konzentrationen sollte ein spezifisch L-Serin-umsetzendes Enzym bereitgestellt werden. Dieses wird von dem aus Bryozoenextrakten isolierten bisher unbeschriebenen Bakterienstamm *Paracoccus seriniphilus* produziert. Nach der Charakterisierung des Mikroorganismus erfolgte die Optimierung der Enzymproduktion und die Isolierung und Charakterisierung des Enzyms. Es wurde zur Bestimmung von L-Serin-Konzentrationen in Kultivierungsmedien und bei der enzymatischen Tryptophansynthese aus L-Serin und Indol eingesetzt (Kapitel 2).
- Halogenierte organische Verbindungen weisen in vielen Fällen pharmakologische Wirkungen auf oder können zur Optimierung von organischen Synthesen eingesetzt werden. Die enzymatische Synthese dieser Substanzen erfolgt in der Natur mittels Haloperoxidasen und Halogenasen für die in Kapitel 3 effektive Screeningsysteme vorgestellt werden. Weiterhin wird der aus Bryozoenextrakten isolierter unbeschriebener Bakterienstamm MBT-12, der ein Halogenasegen trägt, biochemisch charakterisiert.

1.1 Bryozoen

Bryozoen sind sessile, in Kolonien lebende Organismen, die mit ca. 4500 rezenten Arten zumeist in marinen Lebensräumen vorkommen. Die einzelnen Individuen weisen eine Größe von unter 1 mm auf und bilden ein gelatinöses oder festes Gehäuse aus Chitin, das teilweise mit Kalk versetzt ist. Die Kolonien der Bryozoen sind zumeist fest mit der Unterlage verbunden und besiedeln Steine, Muscheln, Algen und andere Oberflächen (Abbildung 1.2).

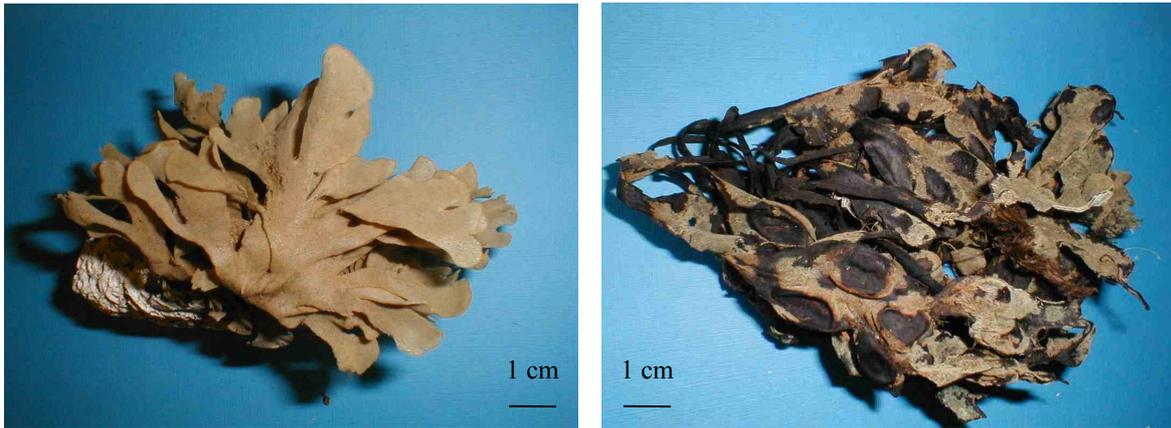


Abbildung 1.2: links oben: *Flustra foliacea* auf Stein; rechts oben: *Membranipora membranacea* auf *Laminaria* sp. (Braunalge); unten: *Bugula plumosa* [PICTON & COSTELLO, 2001]

Der Körper der Bryozoen ist in zwei Abschnitte gegliedert, von denen der vordere aus dem Gehäuse herausgestreckt werden kann und der hintere durch das Gehäuse geschützt wird und der Fortpflanzung dient (Abbildung 1.3) [WESTHEIDE, 1996].

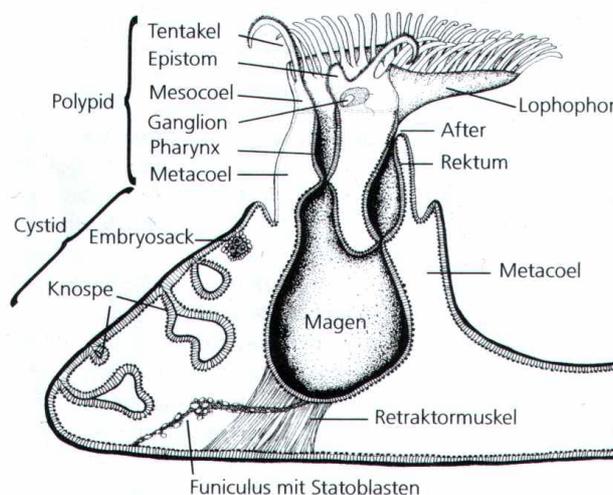


Abbildung 1.3: Organisationsschema eines Bryozoen-Einzeltiers [WESTHEIDE, 1996]

Die Oberfläche der Bryozoen ist mit einer Vielzahl von vergesellschafteten Mikroorganismen wie Pilzen, Cyanobakterien und andere Bakterien besiedelt. Abbildung 1.4 zeigt REM-Aufnahmen des mikrobiellen Bewuchses auf Flustrakolonien [ULBER, 2002].

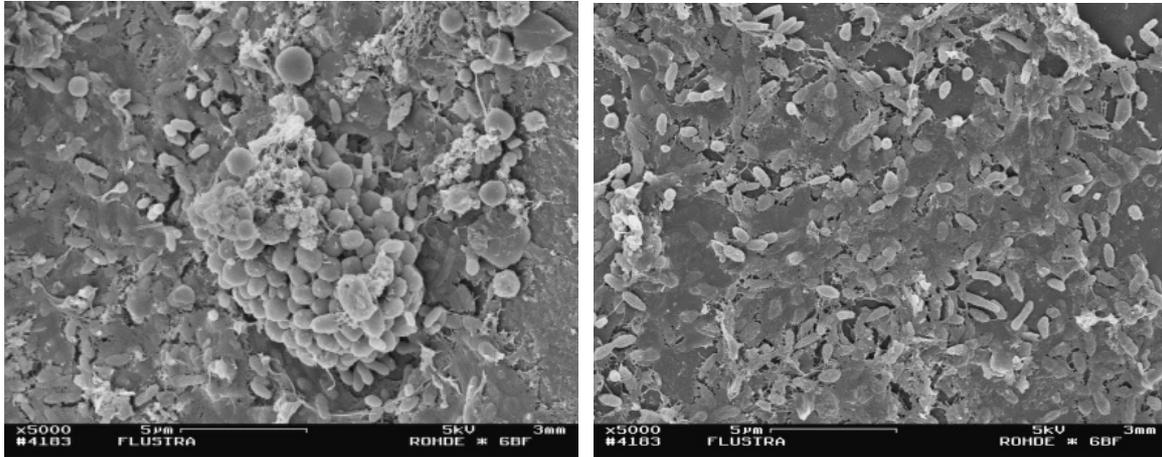


Abbildung 1.4: Mikrobieller Bewuchs auf Flustrakolonien (Aufnahmen: Dr. Manfred Rohde, GBF, Braunschweig) [ULBER, 2002]

Die Assoziationen stellen in vielen Fällen ein symbiotisches Zusammenleben dar. Die Moostierchen filtern Nahrungspartikel aus der Wassersäule und erzeugen dabei eine Strömung. Dieser Partikelstrom wirkt sich günstig auf Wuchs und Stoffwechsel der Mikroorganismen aus, welche die Bryozoenoberfläche vollständig bedecken und vor einer Besiedelung anderer z.T. parasitärer Mikroorganismen schützen [SCHOLZ, 1997]. Nur die äußeren Wachstumszonen der Kolonien werden kaum von Bakterien besiedelt, was mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen an *Flustra foliacea* gezeigt werden konnte (Abbildung 1.5).

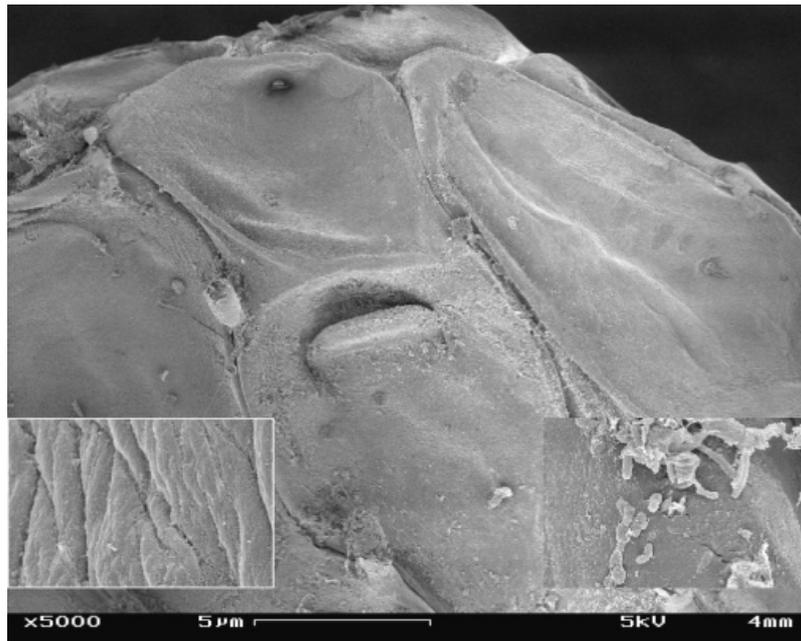


Abbildung 1.5: Unbesiedelte äußere Wachstumszonen bei *Flustra foliacea* (Aufnahmen: Dr. Manfred Rohde, GBF, Braunschweig) [ULBER, 2002]

Im Vergleich zu anderen untersuchten Bryozoen ist *Flustra foliacea* außer mit Bakterien nicht signifikant mit anderen Organismen, wie Diatomeen, Pilzen oder Algen bewachsen. Hinsichtlich dieser Organismen sind allerdings nur sehr wenige Untersuchungen durchgeführt worden. Die Assoziationen sind spezifisch für eine Bryozoen-Art und weniger für die individuelle Kolonie, doch wurden abhängig von der Probenahmestelle Besiedelungen unterschiedlicher Bakterien gefunden. Dies wurde nach Beprobung der Moostierchen an verschiedenen Standorten in der Nähe der Insel Helgoland in einer Tiefe von 7-8 m in der Nordsee festgestellt (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Mit *Flustra foliacea* vergesellschaftete Bakterienstämme [PUKALL, KRAMER, 2002]

Standort und Zeitpunkt der Probennahme	Helgoland (April 1998)	Steingrund (April 1999)
Identifizierte Bakterienstämme	Shewanella frigidimarina (40%)	Bacillus (45%)
	Pseudoalteromonas (30%)	Micrococcus (8%)
	Psychrobacter glacincola (17%)	Nocardioides (10%)
	Cytophaga/Flavobacterium (8%)	Roseobacter/Ruegeria (-)
	Pseudomonas (5%)	

Die Proben wurden von Tauchern direkt an der Entnahmestelle in sterile Polyethylengefäße mit Seewasser gegeben, um eine Kontamination von außen zu verhindern. Bevor die

bryozoenassoziierten Mikroorganismen für Untersuchungen eingesetzt werden konnten, mussten sie von den Moostierchen isolieren werden. Dazu wurden die gesammelten Bryozoen zunächst mit sterilem Meerwasser gewaschen, um Mikroorganismen aus der Wassersäule herauszuverdünnen. Die Isolation der Mikroorganismen erfolgte in zwei Schritten: Zunächst wurden mit oberflächenaktiven Substanzen assoziierte Mikroorganismen von der Oberfläche der Moostierchen abgelöst. In einem zweiten Schritt wurden die Proben mit einem Stomacher Lab Blender (Seward Medical, UK) für 2*120 s bei höchster Intensität homogenisiert, so dass ebenfalls die Organismen innerhalb den Bryozoen herausgelöst werden konnten. Diese Arbeiten wurden bei der DSMZ in Braunschweig durchgeführt und die Isolate für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

2 Isolierung einer L-Serindehydratase

Bioanalytische Systeme gewinnen eine immer größere Bedeutung in der Analytik chemischer Prozesse und Biotransformationen. Ihr Vorteil gegenüber klassischen Analysemethoden besteht in der Substratspezifität und der Möglichkeit einer schnellen und exakten online-Analytik in Form von bioanalytischen Systemen [ULBER *et al.*, 2001, VO-DINH & CULLURN, 2000]. Für solche Systeme sind möglichst spezifische Biokatalysatoren (z.B. Enzyme) notwendig. In der vorliegenden Arbeit soll daher das Screening, die Aufarbeitung und Charakterisierung einer L-Serindehydratase beschrieben werden, die für den Aufbau einer L-Serinanalytik eingesetzt werden kann. Ein solches Analysensystem hat z.B. bei der Gewinnung von L-Serin aus Zuckerrübenmelasse und der Biotransformation von L-Serin mit Indol zu L-Tryptophan große Bedeutung. Es soll daher im Folgenden kurz auf diese Prozesse eingegangen werden, bevor im Anschluss ausführlich die Arbeiten an der L-Serindehydratase dargestellt werden.

Bei der Amino GmbH erfolgt die Aufarbeitung von Zuckerrübenmelasse chromatographisch (HONISTO *et al.*, 1977, HEIKKILÄ, 1983), was neben der Abtrennung des ca. 50%igen Zuckeranteils ebenfalls eine Anreicherung von Nebenkomponenten, wie L-Serin erlaubt. Die Zuckerrübenmelasse wird mit 60 m³-Chromatographiesäulen fraktioniert, wobei eine maximal 10%ige Serinfraktion mit einer Zusammensetzung von 25% D- und 75% L-Serin gewonnen wird. Diese Lösung wird mittels Kationenaustauschchromatographie gereinigt, um nach Eindampfen und Umkristallisieren reines D,L-Serin zu erhalten (Abbildung 2.1). Die enzymatische Tryptophansynthese aus L-Serin und Indol erfolgt durch die L-Tryptophan-Synthetase (EC 4.2.1.20) aus der *Escherichia coli*-Mutante B10, einem Überexprimierer dieses Enzyms. [HANKE, 1999].

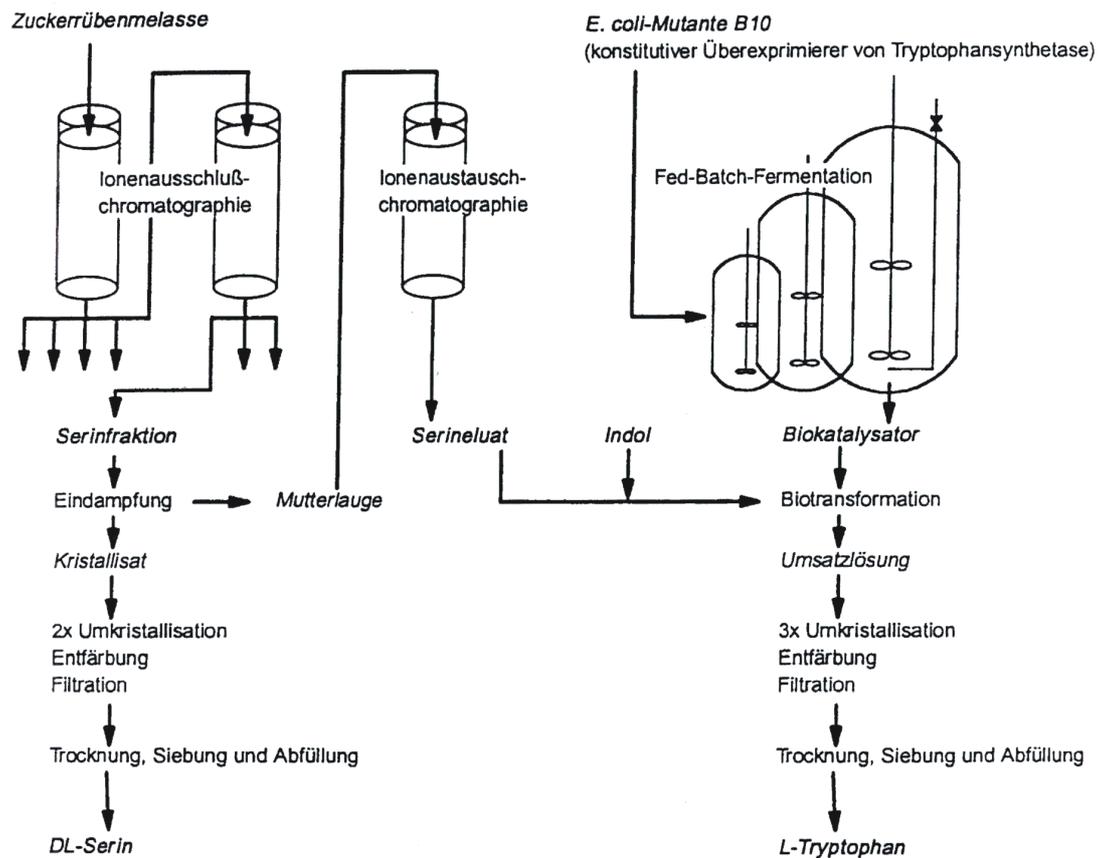


Abbildung 2.1: Biosynthetische Herstellung von Tryptophan aus Serin und Indol [HANKE, 1999]

Dieses dient als pharmazeutischer Wirkstoff u.a. in Sedativa. Die Prozesskontrolle der Biotransformation erfolgt über das Produkt-Edukt-Verhältnis mittels online HPLC mit einer Analysenfrequenz von drei Proben pro Stunde [SCHEPER *et al*, 1999]. Weiterhin ist eine aufwendige Vor- oder Nachsäulenderivatisierung der Probensubstanzen vor der spektroskopischen Analyse erforderlich. Daher werden zur L-Serin-Analytik in vielen Fällen Aminosäure-Analyser als Standardmethode eingesetzt, mit Hilfe derer die Aminosäuren unter Ausnutzung ihrer unterschiedlichen pK_a -Werte getrennt werden. Diese Methode ist mit einer Analysezeit von 30-120 min pro Probe allerdings zu langsam, um eine online-Analytik für L-Serin in schnellen technischen Prozessen zu ermöglichen [SOSNITZA, 1999]. Auch die elektrochemische Detektion von L-Serin oder der Einsatz der NIR-Spektroskopie sind dafür nicht geeignet. Eine Alternative bietet der Einsatz eines bioanalytischen Systems zur Bestimmung der L-Serin-Konzentration der Reaktionsmischung während des Prozesses. Ein solches System könnte als biologische Komponente ein spezifisch L-Serin umsetzendes Enzym enthalten, nach dem in dem vom Forschungsschwerpunkt „Marine Biotechnologie“ zur Verfügung gestellten biologischen Material gescreent wurde. Eine schematische Übersicht

der notwendigen Arbeitsschritte vom Enzymscreening bis zur L-Serinanalytik ist in Abbildung 2.2 aufgeführt.

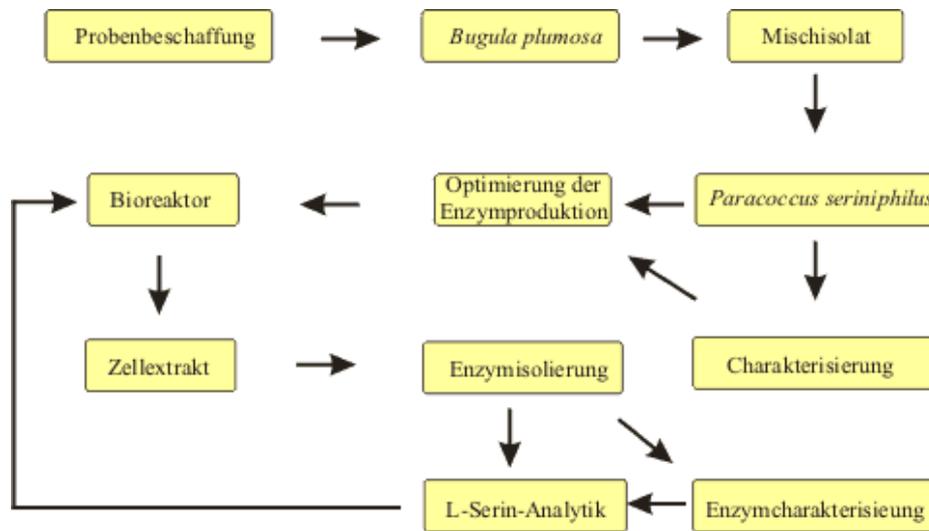


Abbildung 2.2: Übersicht über die Arbeitsvorgänge zur Etablierung einer L-Serin-Analytik

Diese Schritte umfassen die Charakterisierung des beim Screening isolierten Mikroorganismus, der das gesuchte Enzym produziert, die Optimierung der Enzymproduktion, die Isolierung und Charakterisierung des Enzyms und die Etablierung einer effizienten L-Serin-Analytik. Diese Schritte werden in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

2.1 L-Serin

L-Serin (Abbildung 2.3) ist eine nicht essentielle Aminosäure, die als D- und L-Isomer vorkommt. L-Serin ist in der Lage, Eisen zu binden und durch die Membranen der Zellen zu schleusen. Weiterhin hat sie als Phosphorsäure-Ester physiologische Bedeutung und kann sich durch die Hydroxylgruppe am Aufbau von Wasserstoffbrückenbindungen beteiligen [SOSNITZA, 1999].

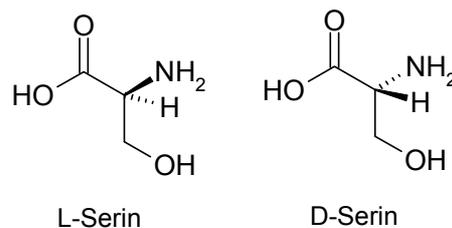


Abbildung 2.3: Strukturformeln von L-Serin (links) und D-Serin (rechts)

Technisch wird Serin unter anderem als Baustein für die Antibiotikasythese eingesetzt. Bei der Amino GmbH dient es zur enzymatischen Produktion der Aminosäure Tryptophan (Kapitel 2) [FAURIE, 2000].

2.2 Enzyscreening

Um ein effektives Screening nach einem L-Serin umsetzenden Bakterienstamm zu ermöglichen, wurden an das verwendete Verfahren folgende Anforderungen gestellt:

- geringer Verbrauch wertvoller Bryozoen-Extrakte
- Referenzuntersuchungen ohne Mehraufwand
- hoher Probendurchsatz
- geringer Chemikalienverbrauch
- geringer apparativer Aufwand
- geringer zeitlicher Aufwand
- schnelle Analytik

Als Standardverfahren werden zum Mikroorganismenscreening meistens Schüttelkolbenversuche im bis zu 150 ml- Maßstab durchgeführt [WURTZEL *et al.*, 1997]. Um die oben angegebenen Voraussetzungen zu erfüllen, erfolgten die Screeningversuche in dieser Arbeit auf 96er Mikrotiterplatten. Ursprünglich für analytische Zwecke entwickelt, bieten diese Platten die Möglichkeit, auf geringem Raum 96 Parallelkultivierungen in flüssigen Medien durchzuführen [DUETZ *et al.*, 2000; HERMANN *et al.*, 2000]. Dabei wurde eine gute Reproduzierbarkeit von Kultivierungen erreicht, wie Abbildung 2.4 zeigt. Es wurden Referenzkultivierungen auf Marine Broth 2216 bei $T = 37\text{ °C}$ und 900 rpm mit dem aus Extrakten der Bryozoe *Flustra foliacea* isolierten Teststamm F15 im Volumen von jeweils 200 μl durchgeführt. Eine nähere Charakterisierung des Stammes erfolgte nicht. Die Kultivierungen erfolgten mit einem Inokulum von 10^6 Zellen/ml in quer zur Mikrotiterplatte angeordneten Wells und zeigen eine gute Übereinstimmung zueinander.

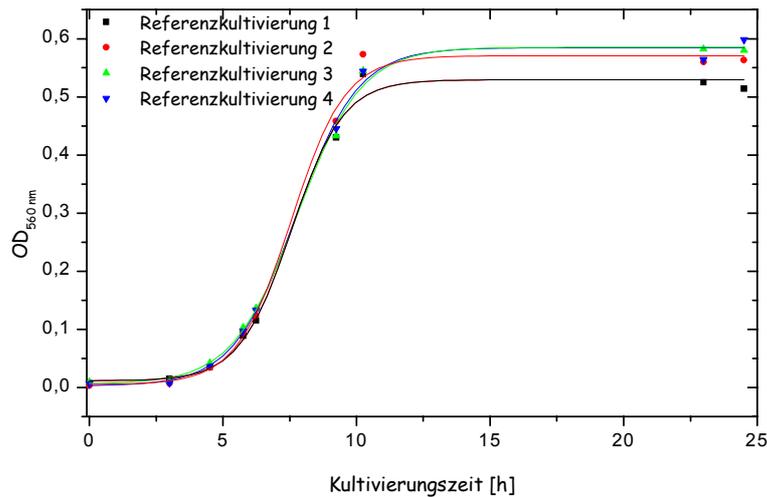


Abbildung 2.4: Reproduzierbarkeit von Kultivierungen des Teststammes F15 auf Mikrotiterplatten ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 900 rpm)

Das Screening nach einem L-Serin-umsetzenden Bakterienstamm erfolgte in einem Gesamtvolumen von $200\text{ }\mu\text{l}$ pro Well mit einem Inokulum von $4\text{ }\mu\text{l}$ der Bakterienisolate. Das Anreicherungsmedium (Anhang 5.2) enthielt L-Serin als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. Dieses Minimalmedium wurde gewählt, da es nur denjenigen Mikroorganismen eine Wachstumsmöglichkeit bietet, die durch Aufbau entsprechender Enzymsysteme in der Lage sind, ihren gesamten C- und N-Stoffwechsel auf L-Serin umzustellen. Um eine Kontamination des Mediums aus der Umgebungsluft und Nachbarwells und das Verdampfen größerer Flüssigkeitsmengen zu verhindern, wurden die Mikrotiterplatten mit Glasplatten (1 mm Dicke) abgedeckt. Die Inkubation erfolgte mit Hilfe eines temperierbaren Eppendorf-Schüttlers bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 900 rpm und Temperaturen von $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Analytik des Mikroorganismenwachstums konnte durch Messen der Optischen Dichte bei $\lambda = 560\text{ nm}$ mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (BioRad) durchgeführt werden. Nach einer Woche zeigte sich Wachstum in denjenigen Wells, die mit dem Isolat der homogenisierten Bryozoe *Bugula plumosa* (Abbildung 1.2) angeimpft wurden. Der Stamm wurde daraufhin auf Agarplatten mit L-Serin-Minimalmedium vereinzelt und erhielt bis zur genauen taxonomischen Einteilung (Kapitel 2.3.1) die Bezeichnung „MBT-A4“.

Das für den L-Serin-Umsatz von MBT-A4 produzierte Enzym ist, wie in Kapitel 2.9.1 beschrieben wird, eine L-Serin-spezifische eisenabhängige L-Serindehydratase. Im Gegensatz dazu sind Aminosäureoxidasen, die ebenfalls L-Serin umsetzen, nicht substratspezifisch, was

gegen ihre Anwendung in einem bioanalytischen System spricht. Weitere Eigenschaften und Charakteristika von L-Serindehydratase werden im Folgenden dargestellt.

2.2.1 L-Serindehydratase

Das Enzym L-Serindehydratase (EC 4.2.1.13) gehört zur Unterklasse der Lyasen [HOFMEISTER *et al*, 1993] und katalysiert die irreversible, nichtoxidative Desaminierung von L-Serin zu Pyruvat. L-Serindehydratase wurden aus Bakterien [ZINECKER *et al*, 1998], Hefen [RAMOS & WIAME, 1982], anderen Pilzen [EL-AWAMRY *et al*, 1990], Säugetierleber [SIMON *et al*, 1973] und Pflanzen [MADAN & NATH, 1983] isoliert. Eukaryontische L-Serindehydratase enthalten gewöhnlich Pyridoxalphosphat (PLP) als Cofaktor und desaminieren in einer Nebenreaktion ebenfalls L-Threonin. Bakterielle L-Serindehydratase sind pyridoxalunabhängig, eisenabhängig und setzen hochspezifisch L-Serin um. In der Natur sind neben L-Serindehydratase auch L-Threonindehydratase (EC 4.2.1.16) wichtig für den Metabolismus von L-Serin. L-Threonindehydratase katalysieren die Desaminierung von L-Threonin zu 2-Oxobutyrat. Auch L-Serin wird in einer Nebenreaktion zu Pyruvat umgesetzt [HOFMEISTER *et al*, 1993].

L-Serindehydratase sind empfindlich gegenüber Oxidation durch Luftsauerstoff und einige von ihnen können mit Fe^{2+} und Dithiothreitol oder Substrat stabilisiert und aktiviert werden [CARTER & SAGERS, 1972; FARIAS, 1991]. Die Untereinheitenstruktur von L-Serindehydratase bestehen gewöhnlich aus Monomeren [SU *et al*, 1993], Dimeren [HOFMEISTER *et al*, 1994], Tetrameren [FARIAS *et al*, 1991] oder Oktameren [GRABOWSKI & BUCKEL, 1991]. Die Untereinheiten sind an Fe-S-Cluster geknüpft, was Abbildung 2.5 verdeutlicht. Bei Kontakt mit Sauerstoff erfolgen eine Oxidation der Cluster und ein Verlust der enzymatischen Aktivität, was der Grund für die Sauerstoffempfindlichkeit von Enzymen mit Fe-S-Clustern ist.

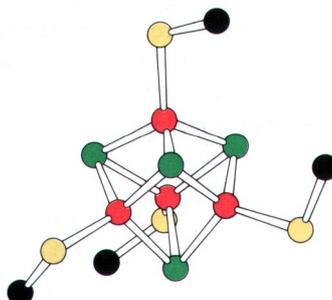


Abbildung 2.5: Fe-S-Cluster in L-Serindehydratase (rot: Eisen, grün: Schwefel, gelb: Cystein des Proteinrestes, schwarz: Proteinrest) [STRYER, 1999]

Eisen-Schwefel-Cluster sind in der evolutionären Entwicklung sehr früh entstanden, als die Erdatmosphäre noch wesentlich weniger Sauerstoff als heute enthielt, später aber in vielen Fällen durch effektivere Systeme ersetzt worden. Das ist verständlich, da die Verwendung von Eisen, das eines der häufigsten Elemente der Erdkruste ist, im Stoffwechsel problematisch sein kann. So liegt die Löslichkeit von nicht komplexiertem Fe^{3+} im Meerwasser in der Größenordnung von nur 10^{-12} M, wohingegen in Organismen normalerweise Konzentrationen von 10^{-6} M gefunden werden. Oft ist es daher Eisen, das die Biomasseproduktion in Meerwasser limitiert. Weiterhin kann es innerhalb der Zelle giftig sein, wenn es in Redoxsysteme eingreift. Aus diesen Gründen wird vermutet, dass die heutzutage entdeckten Eisen-Schwefel-Cluster evolutionäre Relikte darstellen, die essentielle Aufgaben erfüllen und nicht durch andere Systeme ersetzt werden konnten [FLINT & ALLEN, 1996]. Neben der Teilnahme an Ein-Elektronen-Reaktionen wirken sie als Stabilisatoren von Proteinstrukturen, Regulatoren in Metabolismenwegen, biologische Sensoren für Fe , O_2 und O_2^- und in der Produktion von proteingebundenen Radikalen. Die in dieser Arbeit relevante Funktion ist die eines Katalysators, indem das Eisen im Fe-S-Cluster als Lewis-Säure in Dehydratisierungsreaktionen fungiert [FLINT & ALLEN, 1996]. Das ist auch der Fall bei der Desaminierung von L-Serin, die mit einer solchen intermediären Dehydratisierung beginnt (Abbildung 2.6).

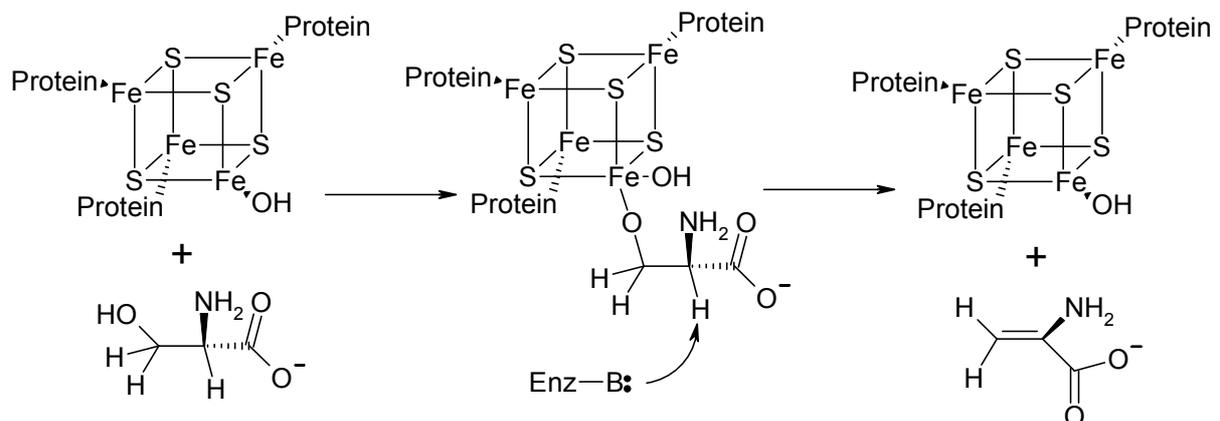


Abbildung 2.6: Erster Schritt der Dehydratisierung von L-Serin mittels L-Serindehydratase [FLINT & ALLEN, 1996]

Nachdem das Substrat am Enzym gebunden hat, laufen die Dehydratisierungsschritte am Eisen-Schwefel-Cluster katalysiert ab. Die Desaminierung selbst folgt der beschriebenen β -Eliminierung, indem zunächst eine Tautomerisierung des Aminoacrylates stattfindet.

Anschließend wird das entstandene Imin hydrolysiert, und das Endprodukt Pyruvat bildet sich nach der Abspaltung von Ammonium [GRABOWSKI & BUCKEL, 1991] (Abbildung 2.7).

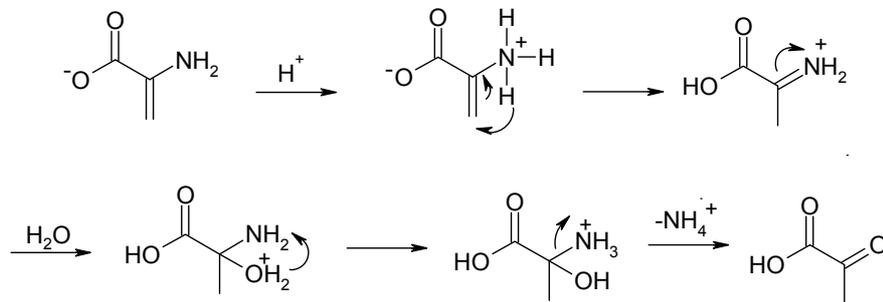


Abbildung 2.7: Folgeschritte der Dehydratisierung von L-Serin mittels L-Serindehydratase

Da die eigentlich katalysierte Reaktion eine Dehydratisierung ist, tragen diese Enzyme den Namen „L-Serindehydratase“.

Auch bei der in vorliegender Arbeit untersuchten L-Serindehydratase konnte dem Eisen-Schwefel-Cluster eine zentrale Rolle bei der Umsetzung von L-Serin zu Pyruvat zugeordnet werden (Kapitel 2.9.1). Dieses Enzym ist die erste L-Serindehydratase, die aus einem marinen Organismus isoliert werden konnte.

2.3 Beschreibung von MBT-A4

Der aus *Bugula plumosa*-Extrakten isolierte Bakterienstamm MBT-A4 wurde zur näheren Charakterisierung phylogenetisch und biochemisch untersucht und mit bekannten Arten und deren Eigenschaften verglichen. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

2.3.1 Phylogenetische Zuordnung

Zur genauen phylogenetischen Zuordnung eines Bakterienstammes werden die 16S-rDNA herangezogen. Da der Prozess der Proteinbiosynthese eine hohe Komplexität aufweist, ist er empfindlich gegenüber Mutationen. Daher findet eine Veränderung in gewissen Bereichen der rDNA nur sehr langsam statt. Eine Varianz von weniger als 2% der 16S-rDNA (weniger als 30 % der gesamten DNA) kennzeichnet daher eine Art. Man kennt mehr als 6000 Sequenzen der 16S-rDNA, mit deren Hilfe Stammbäume aufgestellt werden können [CYPIONKA, 2000]. Bei diesem Verfahren wird angenommen, dass der Verwandtschaftsgrad zweier Organismen proportional zur Ähnlichkeit ihrer DNA- oder Proteinsequenzen ist und Veränderungen dieser Sequenzen mit konstanter und kleiner Rate auftreten. Eine 16S-rDNA Sequenzanalyse des Stammes MBT-A4 wurde an der DSMZ in Braunschweig durchgeführt. Nach diesen

Untersuchungen ist dieser Stamm der Gattung *Paracoccus* zuzuordnen. Die nächsten Verwandten dieser Gattung sind mit 97,6%, 97,4% und 97,1% Übereinstimmung der 16S-rDNA *Paracoccus marcusii*, *Paracoccus carotinifaciens* und *Paracoccus alcaliphilus*. Die Tatsache, dass alle diese Werte unter 98% Übereinstimmung liegen, zeigt, dass es sich bei MBT-A4 wahrscheinlich um einen bisher unbeschriebenen Stamm handelt. Um diese Vermutung zu unterstützen und weitere Informationen über das Verwandtschaftsverhältnis zu erhalten, wurden DNA/DNA - Hybridisierungsexperimente mit dem nächsten Verwandten *Paracoccus marcusii* durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird der Anteil übereinstimmender Gensequenzen in DNA-Proben beider Organismen ermittelt. Im ersten Schritt wird die DNA beider Stämme durch Erhitzen zu Einzelsträngen denaturiert, die sich beim anschließenden Abkühlen erneut zu Doppelsträngen zusammenlagern. Dabei entstehen sowohl Doppelstränge aus DNA der einzelnen Stämme, als auch Hybrid-DNA beider Organismen [ESCARA & HUTTON, 1980; HUB *et al.*, 1983]. Je höher der Verwandtschaftsgrad der Testorganismen ist, umso stärker ist die Ausbildung von Wasserstoffbrücken in der Hybrid-DNA. Diese Untersuchung von MBT-12 ergab eine prozentuale Übereinstimmung von nur 32,6% beider *Paracoccus*-Stämme. Das Ergebnis zeigt eindeutig, dass es sich bei MBT-A4 um einen unbekanntes Stamm handelt. Eine genaue Übersicht über die phylogenetischen Nachbarn zeigt das Dendrogramm in Abbildung 2.8.

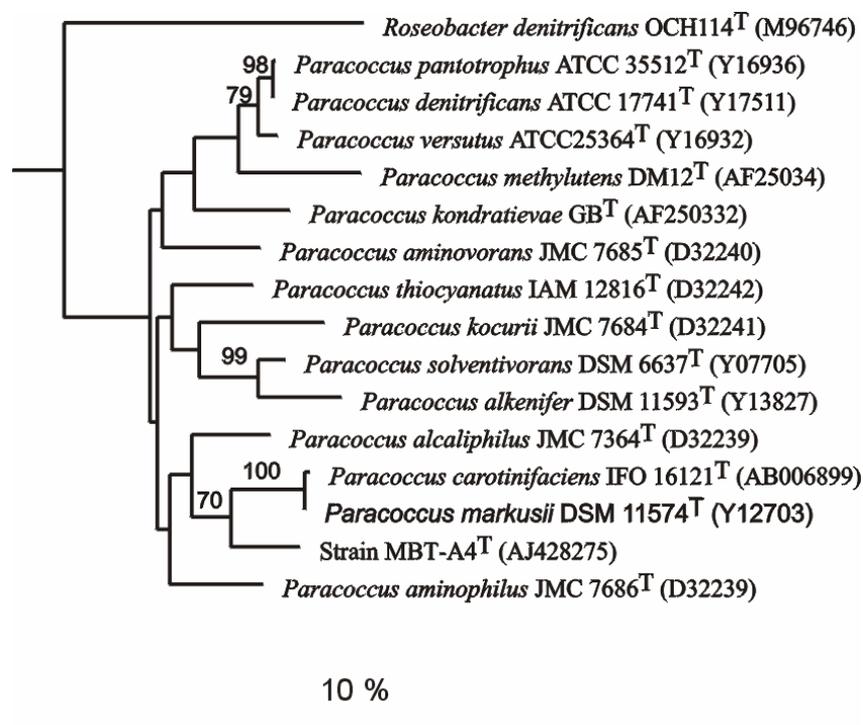


Abbildung 2.8: Dendrogramm der 16S-rDNA-Verwandschaft von MBT-A4. Die 10%-Skala stellt den Austausch von 10 Nucleotiden auf 100 Sequenzpositionen dar.

Die Tatsache, dass MBT-A4 in der Lage ist, auf einem Medium mit L-Serin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle zu wachsen, wurde ihm der Name *Paracoccus seriniphilus* (DSM 14827) gegeben. Im Folgenden werden spezifische Charakteristika der Gattung *Paracoccus* dargestellt.

2.3.2 Die Gattung *Paracoccus*

Die Gattung *Paracoccus* gehört zur α -3 Untergruppe der *Proteobacteria* [KELLY, D. P., 2000], wobei der Gattungsname *Paracoccus* das Aussehen der Kokkus-ähnlichen Zellen bezeichnet. Der erste Vertreter wurde von BEIJERINCK & MINKMAN (1910) als *Micrococcus denitrificans* beschrieben, und die Umbenennung in *Paracoccus denitrificans* erfolgte 1969 von DAVIS *et al.* Dieser Stamm war lange Zeit der einzige Vertreter seiner Gattung, bis 1984 *Paracoccus halodenitrificans* beschrieben wurde. In den letzten zehn Jahren fanden einige taxonomische Aktualisierungen in der *Paracoccus*-Gattung statt. So stellten URAKAMI *et al.* (1990) und OHARA *et al.* (1990) aufgrund von Fettsäureanalysen und DNA-DNA-Homologien fest, dass *Paracoccus halodenitrificans* wahrscheinlich nicht der Gattung *Paracoccus* zuzuordnen ist. MILLER *et al.* (1994) bestätigten die chemotaxonomischen Daten durch 16S-rDNA Analysen und schlugen vor, diesen Bakterienstamm in die Familie der *Halomonadaceae* in der γ -Untergruppe der *Proteobacteria* einzuordnen. Zurzeit umfaßt die Gattung *Paracoccus* 14 Gram-negative Vertreter, die Kokken oder kurze Stäbchen bilden [KELLY *et al.* 2000]. *Paracoccus alcaliphilus* [URAKAMI *et al.*, 1989]; *Paracoccus alkenifer* [LIPSKI *et al.*, 1998]; *Paracoccus aminophilus*, *Paracoccus aminovorans* [URAKAMI *et al.*, 1990]; *Paracoccus carotinifaciens* [Tsubokura *et al.*, 1999]; *Paracoccus denitrificans* [BEIJERINCK & MINKMAN, 1910; DAVIS *et al.*, 1969; RAINEY *et al.*, 1999]; *Paracoccus kocurii* [OHARA *et al.*, 1990]; *Paracoccus kondratievae* [DORONINA & TROTSSENKO, 2001]; *Paracoccus marcusii* [HARKER *et al.*, 1998]; *Paracoccus methylutens* [DORONINA *et al.*, 1998]; *Paracoccus pantotrophus* [RAINEY *et al.*, 1999]; *Paracoccus solventivorans* [SILLER *et al.*, 1996]; *Paracoccus thiocyanatus* and *Paracoccus versutus* [KATAYAMA *et al.*, 1996]. Zwei dieser Stämme, *Paracoccus carotinifaciens* und *Paracoccus marcusii*, produzieren wirtschaftlich interessante Carotinoide und unterliegen dem Patentschutz. Die überwiegende Zahl der oben beschriebenen Arten wurde aus terrestrischen Lebensräumen isoliert. *Paracoccus alkenifer* und *Paracoccus methylutens* weisen aber auch eine Salztoleranz von 3% NaCl auf [KELLY *et al.*, 2000]. In der Gattung *Paracoccus* tritt eine große metabolische Diversität auf. So wachsen einige Stämme aerob auf vielen verschiedenen Substraten, wie auch Aminen und Alkoholen,

oder mit Wasserstoff als Elektronendonator. Andere *Paracoccus*-Vertreter sind in der Lage, anaerob mit Nitrat als Elektronenakzeptor zu wachsen [BAKER *et al.*, 1998].

2.3.3 Morphologie und Biofilmbildung

Die Zellen von *Paracoccus seriniphilus* sind unbeweglich und bilden, wie die meisten anderen *Paracoccus*-Arten, auf Agar-Medium farblose Kolonien aus (Abbildung 2.9).



Abbildung 2.9: lichtmikroskopische Aufnahme von *Paracoccus seriniphilus*-Kolonien auf Marine Broth 2216

Um Einzelheiten der Zellmorphologie von *Paracoccus seriniphilus* zu erkennen und sie mit anderen *Paracoccus*-Arten zu vergleichen, wurde eine elektronenmikroskopische Aufnahme der bei $T = 30\text{ °C}$ in Marine Broth 2216-Medium (Anhang 5.2) exponentiell wachsenden Zellen gemacht. Dazu wurden die auf Filterpapier abgesaugten Zellen mit 3% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,2) für eine Stunde bei RT fixiert. Es folgte eine Dehydratisierung mit steigenden Konzentrationen an Ethanol und eine Kritisch-Punkt-Trocknung. Anschließend wurde die Probe mit Gold bedampft und mit einem Digital Scanning Mikroskop DSM 940 (Zeiss, Oberkochen) mikroskopiert [ROBINSON *et al.*, 1984]. Abbildung 2.10 (links) zeigt eine auf diese Weise erhaltene REM-Aufnahme von *Paracoccus seriniphilus*. Bei den 0,5-1 mal 0,7-1 μm großen Einzelzellen sind sehr gut sowohl die kokkusartige Zellform, als auch fadenförmige Verbindungen zwischen einzelnen Zellen zu erkennen. Diese Verbindungen sind charakteristisch für *Paracoccus seriniphilus* und bei nahen Verwandten, *Paracoccus marcusii* und *Paracoccus carotinifaciens*, nicht zu beobachten.

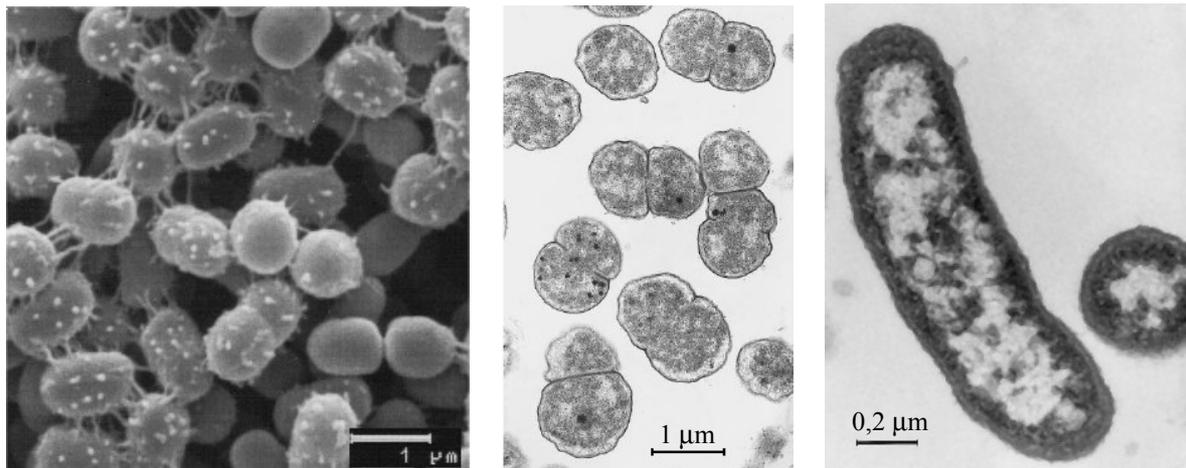


Abbildung 2.10: REM-Aufnahmen von *Paracoccus seriniphilus* kultiviert im Marine Broth (links), *Paracoccus marcusii* (mitte) [HARKER et al., 1998], *Paracoccus carotinifaciens* (rechts) [TSUBOKURA et al., 1999]

Die Verbindungen bestehen vermutlich aus Polysacchariden. Mit ihnen ist es den Zellen möglich, zu agglomerieren, um Kolonien und Biofilme auszubilden [FLEMMING & WINGENDER, 2001]. Biofilme sind bei vielen Mikroorganismen oft dann die bevorzugte Lebensform, wenn die äußeren Wachstumsbedingungen nicht optimal sind, um in Zellgemeinschaften Wachstumsvorteile zu erhalten. Auf diese Weise kann z.B. ein Schutz gegen ungünstige pH-Werte und Salzgehalte aufgebaut werden. Weiterhin haben Mikroorganismen in Form von Biofilmen die Möglichkeit, geeignete Oberflächen zu besiedeln, um den Kampf gegen andere Organismen Lebensraum für sich zu gewinnen. Solche Biofilme sind bislang nicht von den nächsten Verwandten von *Paracoccus seriniphilus* beschrieben worden. Sie werden aber oft bei Mikroorganismen aus marinen Habitaten beobachtet, aus dem auch das mit Bryozoen assoziierte Bakterium *Paracoccus seriniphilus* stammt. Ein weiterer wichtiger Grund für die Ausbildung von Biofilmen in marinen Habitaten ist der geringe Gehalt an Nährstoffen im Meerwasser. So sind für Mikroorganismen in solchen Mangelsituationen die besten Wachstumsvoraussetzungen in Zellgemeinschaften gegeben. Auch das Wachstum auf dem L-Serin-Minimalmedium stellt für *Paracoccus seriniphilus* eine Mangelsituation dar, weshalb es während der Kultivierung auf L-Serin-Minimalmedium Kolonien ausbildet. Diese sind als farblose Agglomerationen im klaren Medium des Schüttelkolbens erkennbar. Abbildung 2.11 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme dieser Kolonien in 1000facher Vergrößerung.

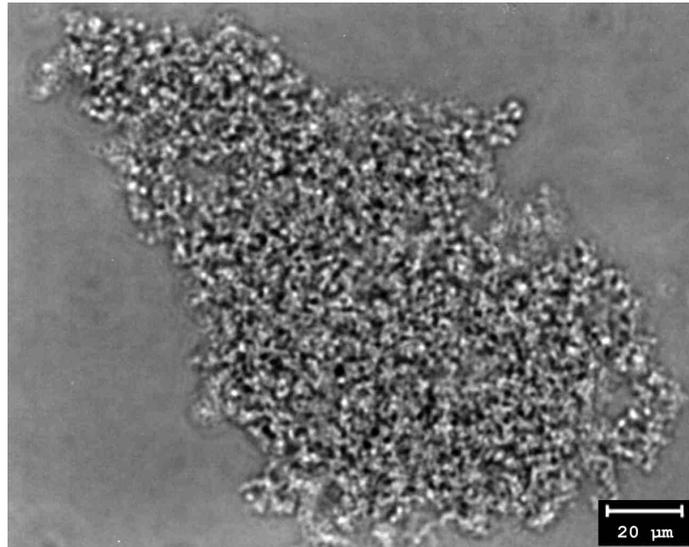


Abbildung 2.11: Agglomeratbildung von *Paracoccus seriniphilus* im L-Serin-Minimal-Medium

Sehr deutlich war eine Biofilmbildung in einer 300 ml-Fermenterkultivierung im L-Serin-Minimalmedium zu beobachten. Die Kultivierung wurde bei $T = 30^{\circ}\text{C}$, pH 7,5, einem NaCl-Gehalt von 3% und einer Rührgeschwindigkeit von 150 rpm durchgeführt. Dabei lag die Start-OD bei 2,5, wobei die Zellen in einer Vorkultur im Pepton-Hefeextrakt-Medium (Anhang 5.2) herangezogen wurden. Das hohe Inokulum wurde gewählt, um aufgrund des langsamen Zellwachstums im Minimalmedium einen deutlichen Substratumsatz zu erreichen (Kapitel 2.6.1). Anschließend wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen bei 4°C für 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und mit 20 ml auf 4°C gekühltem L-Serin-Minimalmedium gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in wenig Minimalmedium suspendiert und zum Start der Kultivierung in das vorgelegte und temperierte Medium des Bioreaktors gegeben. In der Wachstumsphase war zunächst eine Zellagglomeration zu erkennen, daraufhin die Ausbildung einer ca. 1-2 mm dicken Bakterenschicht sowohl an der Fermenterwand, als auch an den Elektrodenoberflächen (Abbildung 2.12).



Abbildung 2.12: Biofilmbildung von *Paracoccus seriniphilus* im L-Serin-Minimalmedium

Die Folge der Biofilmbildung während der Kultivierung war eine zunächst abnehmende optische Dichte im Medium. Diese stieg nach einigen Stunden wieder an, da sich aufgrund des Medienstromes im Fermenter Flocken des Biofilmes ablösten. Zum Ende des Wachstums löste sich der Bakterienverbund des Biofilms zum Großteil auf, was einen weiteren Anstieg der Optischen Dichte zur Folge hatte (Abbildung 2.13).

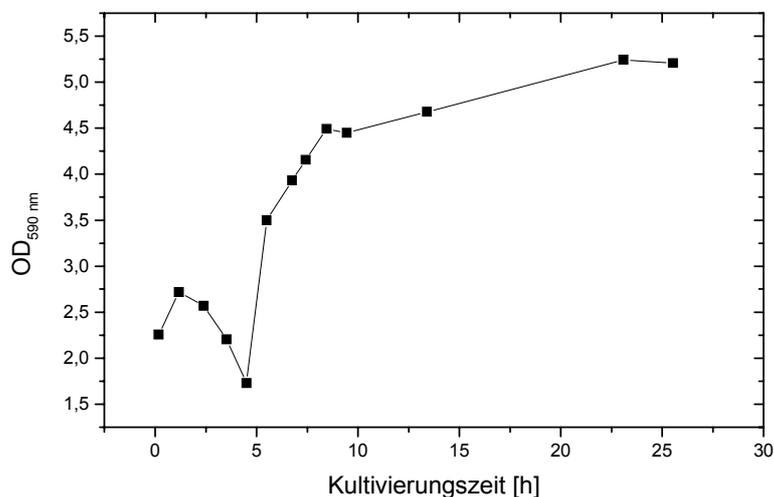


Abbildung 2.13: Verlauf der scheinbaren optischen Dichte während der Kultivierung im L-Serin Minimalmedium

Die Biofilmbildung konnte im L-Serin-Minimalmedium und unter ungünstigen Wachstumsbedingungen im komplexen Marine Broth - Medium bei NaCl-Konzentrationen unter 2 % beobachtet werden. Bei guten Wachstumsbedingungen lagen die Bakterien im Marine Broth-Medium als Einzelzellen bis Ketten von bis zu vier Zellen vor.

2.3.4 Physiologische und biochemische Charakterisierung

Wie in Kapitel 2.3.1 dargestellt wurde, handelt es sich bei *Paracoccus seriniphilus* als ersten Vertreter der Gattung *Paracoccus* aus dem marinen Lebensraum um einen bisher unbeschriebenen Bakterienstamm. Zur näheren Charakterisierung dieser Art und zum Vergleich mit bekannten terrestrischen *Paracoccus*-Arten war es erforderlich, seine physiologischen Charakteristika zu ermitteln. Diese umfassen das Gram-Verhalten, die optimale Wachstumstemperatur, den optimalen pH-Wert, sowie den optimalen Salzgehalt im Medium. Zusätzlich wurde die Verstoffwechslung von 96 verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht, wobei ein Test auf Mikrotiterplatten (Biolog GN2) eingesetzt wurde. Ein API 20 NE-Test (bioMérieux) diente zur Detektion diverser Enzyme und zur Überprüfung des Wachstums des Stammes auf verschiedenen Kohlenstoffquellen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, die in einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stackebrandt an der DSMZ gewonnen wurden, sind bei PUKALL *et al.*, (2002) zusammengefasst. Sie stellen die Grundlage für die in Kapitel 2.5 beschriebene Optimierung der L-Serindehydratase-Produktion von *Paracoccus seriniphilus* dar.

2.3.4.1 KOH-Test auf Liposaccharide

Mit einer Impföse wurde ein Tropfen 3 %ige KOH-Lösung auf einem Objektträger mit einer Bakterienkolonie von *Paracoccus seriniphilus* verrieben [HÜNERS, 1999]. Beim Hochziehen der Öse wurden Fäden beobachtet, da durch das KOH zähe, klebrige Liposaccharide aus der Zellwand gelöst werden. Dieses Verhalten tritt bei Gram negativen Bakterien auf. Auch die nächsten phylogenetischen Verwandten von *Paracoccus seriniphilus* sind Gram-negativ.

2.3.4.2 Optimierung der Wachstumstemperatur

Die Temperatur hat einen großen Einfluss auf das Wachstum von Mikroorganismen, wobei die Ansprüche der Arten sehr verschieden sind. Die meisten terrestrischen und marinen Bakterien weisen Wachstumsoptima im Temperaturbereich von 20 bis 42 °C auf [SCHLEGEL, 1992], aber es wurden auch Organismen isoliert, die unter extremen Bedingungen bei Temperaturen von 0 °C oder über 100 °C wachsen. Um die optimale Wachstumstemperatur von *Paracoccus seriniphilus* zu ermitteln, wurde der Stamm in Schüttelkolben bei Temperaturen zwischen 18 und 40 °C im Hefeextrakt-Pepton-Medium (Anhang 5.2) angezogen und das Wachstum durch Bestimmung der Optischen Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 590 \text{ nm}$ aufgezeichnet. Die Animpfdichte aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur betrug 10^6 Zellen/ml. Der Vergleich des Wachstums der unterschiedlichen Kulturen

erfolgte durch den Vergleich der maximalen Wachstumsraten μ_{\max} . Diese sind in Abbildung 2.14 in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur dargestellt und weisen bei $T = 30\text{ °C}$ ein Maximum auf, das darauf hinweist, dass der Stamm bei dieser Temperatur das schnellste Wachstum zeigt. Für weitere Kultivierungsversuche wurde daher diese Temperatur gewählt.

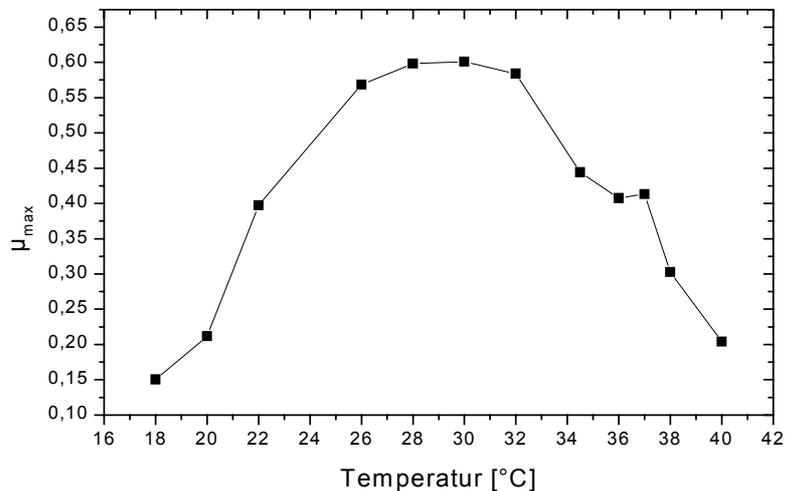


Abbildung 2.14: Optimierung der Wachstumstemperatur von *Paracoccus seriniphilus*

Die optimale Wachstumstemperatur von $T = 30\text{ °C}$ ist mit den Werten der nächsten phylogenetischen Nachbarn dieses Stammes vergleichbar. *Paracoccus marcusii* wächst optimal bei $T = 25\text{-}30\text{ °C}$ und *Paracoccus carotinifaciens* bei $T = 28\text{ °C}$.

2.3.4.3 Optimierung des pH-Wertes

Neben der Temperatur kommt auch dem pH-Wert eines Nährbodens eine große Bedeutung zu. Während Pilze pH-Werte im sauren Bereich bevorzugen, sind die meisten Bakterien neutrophil und wachsen optimal bei Werten um pH 7. Andere Bakterien bevorzugen ein alkalisches Milieu (Nitrifizierer, Rhizobien), und nur wenige sind säuretolerant (Lactobacilli) oder acidophil (*Thiobacillus*) [SCHLEGEL, 1992]. Bei der Kultivierung von *Paracoccus seriniphilus* im MB 50-Medium (Anhang 5.2) wurde Wachstum bei pH 5,2 bis pH 10 festgestellt, wobei ein maximaler Wert von μ_{\max} von 0,29-0,33 bei pH 6,5 bis 8,0 erreicht wurde (Abbildung 2.15). Daher wurden im weiteren Verlauf der Untersuchungen Kultivierungen des Stammes bei pH 7,0 durchgeführt.

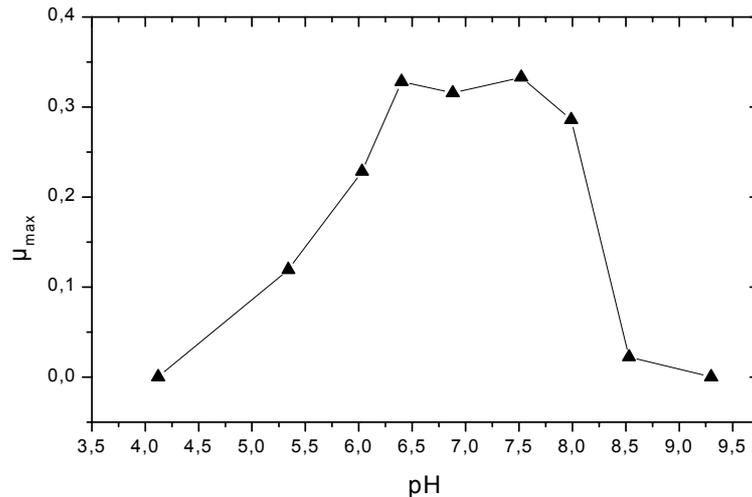


Abbildung 2.15: Optimierung des pH-Wertes im Wachstumsmedium von *Paracoccus seriniphilus*

Auch die nächsten phylogenetischen Nachbarn bevorzugen überwiegend den neutralen pH-Bereich [HARKER *et al.*, 1998; TSUBOKURA *et al.*, 1999]. Nur *Paracoccus alcaliphilus* zeigt ein Optimum bei pH 9 [URAKAMI *et al.*, 1989].

2.3.4.4 Optimierung des NaCl-Gehaltes

Die Salzkonzentration eines Wachstumsmediums hat einen großen Einfluss auf die osmotischen Effekte zwischen den Zellen und dem umgebenen Medium. Da *Paracoccus seriniphilus* im Gegensatz zu allen anderen Vertretern der Gattung *Paracoccus* marinen Ursprungs ist, ist besonders in diesem Fall der Salzgehalt des Mediums von besonderer Bedeutung. Die Optimierung der NaCl-Konzentration erfolgte unter Verwendung des Pepton-Hefeextrakt-Mediums (Anhang 5.2). In der Regel wurde bei Verwendung dieses Mediums Sea Salts zur Einstellung des pH-Wertes eingesetzt, da es ein komplexes Gemisch von Salzen enthält, die wachstumsfördernden Einfluss auf *Paracoccus seriniphilus* haben. Dies zeigt sich in einem Kultivierungsvergleich des Stammes unter Verwendung von Sea Salts und NaCl (Abbildung 2.16).

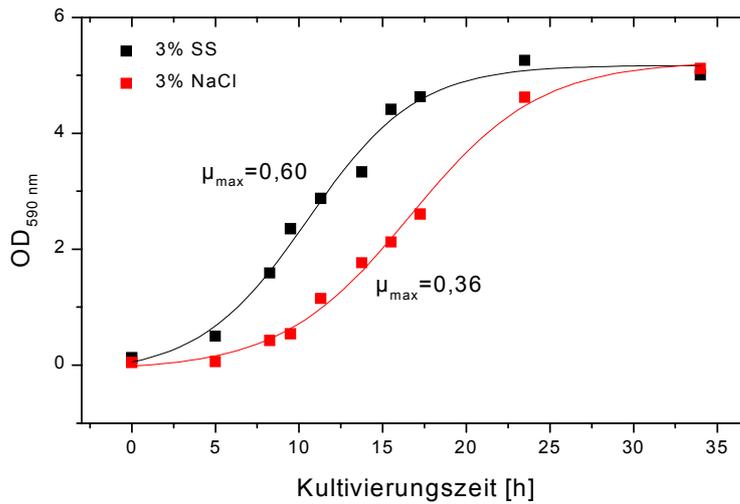


Abbildung 2.16: Vergleich von Kultivierungen mit Sea Salts- und NaCl-Zusatz

Zur Ermittlung des NaCl-Optimums wurde im komplexen Medium zunächst ein NaCl-Gehalt von 1 % mit Sea Salts eingestellt (Tabelle 5.4). Höhere NaCl-Konzentrationen wurden durch Zugabe von reinem NaCl erhalten. Auf diese Weise wurde das Wachstum von *Paracoccus seriniphilus* bei NaCl-Konzentrationen von bis 10 % überprüft. Die Bestimmung des optimalen NaCl-Gehaltes erfolgte durch Vergleich der maximalen Wachstumsraten und ergab sich zu 3 % (Abbildung 2.17). Für weitere Kultivierungen von *Paracoccus seriniphilus* wurde daher eine NaCl-Konzentration von 3 % gewählt. Für die nächsten phylogenetischen Nachbarn von *Paracoccus seriniphilus*, die terrestrischen Ursprungs sind, sind in der Literatur für diese Konzentration keine Angaben gemacht. Es wird beschrieben, dass bei einer NaCl-Konzentration von 6 % nur geringes (*P. marcusii*, *P. carotinifaciens*) oder kein Wachstum (*P. alcaliphilus*) auftritt [HARKER *et al.*, 1998].

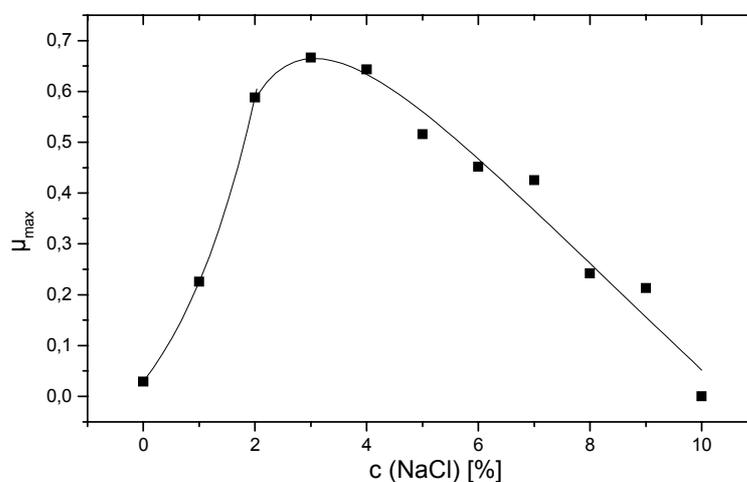


Abbildung 2.17: Optimierung der NaCl-Konzentration im Wachstumsmedium von *Paracoccus seriniphilus*

Der marine Stamm *Paracoccus seriniphilus* zeigt unter diesen Bedingungen Wachstum mit einem μ_{\max} -Wert von 67 % des Maximums und ist salztolerant bis 9 % NaCl (2,25 M).

2.3.4.5 Biolog GN2

Die Wahl der Kohlenstoffquelle ist entscheidend für den Erfolg der Kultivierung von Bakterienstämmen. Für *Paracoccus seriniphilus* konnte bereits gezeigt werden, dass L-Serin während des Wachstums verstoffwechselt wird. Mit Hilfe des BioLog-Tests (Biolog Inc., Hayward, CA) ist es möglich, die Oxidation von weiteren 95 verschiedenen Kohlenstoffquellen zu überprüfen. Durch Erstellung eines katabolischen Fingerprints kann dadurch bei bekannten Stämmen unter Verwendung einer Datenbank eine Identifizierung erfolgen. Die parallele Auswertung von 95 unterschiedlichen Reaktionen ermöglicht dabei mit $4 \cdot 10^{28}$ unterschiedlichen Mustern ein hohes Differenzierungsvermögen. Da es sich bei *Paracoccus seriniphilus* um einen unbeschriebenen Organismus handelt, dient dieser Test zur näheren Charakterisierung des Bakterienstammes, so dass der Stamm mit Hilfe des erstellten Fingerprints zukünftig leicht identifiziert werden kann. Als Indikator dient bei dem Biolog-Test der Redoxfarbstoff Tetrazoliumviolett, der im oxidierten Zustand farblos und im reduzierten Zustand purpurfarben ist. So ist 24 h nach Zugabe von 150 μ l Bakteriensuspension ($3 \cdot 10^8$ Zellen/ml in 34,3 g/l Sea Salts) zu den getrockneten Kohlenstoffquellen eine visuelle Ablesung des Tests möglich. Da die einzelnen Kohlenstoffquellen auf Mikrotiterplatten angeordnet sind, kann die Auswertung auch photometrisch erfolgen. Für *Paracoccus seriniphilus* wurde festgestellt, dass die folgenden Kohlenstoffquellen oxidiert werden können:

N-Acetyl-D-galactosamin, cis-Aconitsäure, Adonitol, D-Alanin, L-Alanin, Ameisensäure, γ -Aminobuttersäure, D-Arabitol, L-Asparagin, L-Aspartat, 2,3-Butandiol, D,L-Carnitin, I-Erythritol, Essigsäure, D-Fruktose, D-Galactonsäure-lacton, D-Galaktose, D-Gluconsäure, D-Glucuronsäure, α -D-Glucose, L-Glutamat, Glycerin, L-Histidin, α -Hydroxy-buttersäure, β -Hydroxy-buttersäure, p-Hydroxyphenylelessigsäure, m-Inositol, α -Ketobuttersäure, L-Leucin, D-Mannitol, D-Mellobiose, Methylpyruvat, D,L-Milchsäure, L-Ornithin, L-Prolin, Propionsäure, L-Pyroglutaminsäure, L-Serin, D-Sorbitol, Tween 40, Tween 80, Urocansäure, Xylitol.

Folgende Kohlenstoffquellen sind nicht oxidierbar:

Alanimid, L-Alanyl-glycin, 2-Aminoethanol, L-Arabinose, N-Acetyl-D-Glucosamin, Bromosuccinsäure, Cellobiose, α -Cyclodextrin, Dextrin, L-Fuktose, Furanose, D-Galacturonsäure, Gentiobiose, Glucoronamid, D-Glucosaminsäure, Glucose-1-phosphat, Glucose-6-phosphat, D,L- α -Glycerolphosphat, Glycogen, Glycyl-L-aspartat, Glycyl-L-glutamat, γ -Hydroxybuttersäure, Hydroxy-L-prolin, Inosin, Itaconsäure, α -Ketobuttersäure, α -Ketoglutarsäure, α -Keto Valeriansäure, α -D-Lactose, Lactulose, Malonsäure, Maltose, D-Mannose, β -Methyl-D-Glucose, D,L-Milchsäure, Monomethylsuccinat, Phenylethylamin, L-Phenylalanin, D-Psicose, Putrescin, Quininsäure, D-Raffinose, L-Rhamnose, D-Saccharin, Sebacinsäure, D-Serin, Succinimid, Succinsäure, Sucrose, L-Threonin, Thymidin, D-Trehalose, Uridin, Urocansäure.

2.3.4.6 API 20 NE

Ein weiteres Identifikationssystem für nicht anspruchsvolle, Gram-negative Stäbchen ist der API 20 NE-Test (bioMérieux). Wie auch der Biolog-Test wird er zur Beschreibung von *Paracoccus seriniphilus* eingesetzt und erlaubt die Detektion von acht konventionellen und zwölf Assimilationsreaktionen. Der Test besteht aus 20 Mikroröhrchen, die dehydrierte Medien und/oder Substrate enthalten. Die Röhrchen für die konventionellen Tests werden mit der zu untersuchenden Bakteriensuspension beimpft, wodurch die Substrate gelöst werden. Die bei der Inkubation entstehenden Stoffwechselprodukte bewirkten Farbumschläge, die direkt oder nach Zugabe entsprechender Reagenzien abgelesen werden. Zur Untersuchung von *Paracoccus seriniphilus* wurden die Röhrchen für die Assimilationsreaktionen nach der Arbeitsanweisung beimpft, wobei zur Suspension der Zellen eine Sea Salts-Lösung (34,3 g/l) ohne zusätzliche Kohlenstoffquellen verwendet wurde. Die Bakterien konnten daher nur dann wachsen, wenn sie das in diesen Röhrchen enthaltene Substrat verstoffwechseln konnten. Tabelle 2.1 zeigt die erhaltenen Ergebnisse im Vergleich zu den nächsten phylogenetischen Nachbarn von *Paracoccus seriniphilus* [HARKER *et al.*, 1998]. Wie auch beim Biolog-Test, so ergaben sich auch bei diesen Untersuchungen deutliche Unterschiede zu diesen Stämmen, so dass eine einfache Unterscheidung möglich ist. So hat *Paracoccus seriniphilus* die Möglichkeit, Nitrat zu reduzieren und auf L-Serin zu wachsen, bildet aber im Gegensatz zu *P. marcusii* und *P. carotinifaciens* keine β -Glucosidase. Außerdem wird Glucose nicht fermentiert. In überwiegender Übereinstimmung mit den oben genannten Stämmen bildet *Paracoccus seriniphilus* eine Cytochromoxidase und β -Galactosidase und wächst auf

Formiat, Glycerin, Mannitol und Inositol, bildet aber keine Urease, Protease, Arginindihydrolase und baut auch kein Tryptophan unter Indolfreisetzung ab.

Tabelle 2.1: Vergleich der API-Test - Ergebnisse des Stammes *Paracoccus seriniphilus* mit denen der nächsten phylogenetischen Nachbarn der Gattung *Paracoccus*; 1. *P. seriniphilus*; 2. *P. marcusii* [HARKER *et al.*, 1998]; 3. *P. carotinifaciens* [HARKER *et al.*, 1998]; 4. *P. alcaliphilus* [HARKER *et al.*, 1998] (+: positiv; -: negativ; +/-: schlecht; k.A.: keine Angabe)

Charakteristik	Substrat	1	2	3	4
Urease	Harnsäure	-	-	-	+
Cytochromoxidase	Tetramethyl-p-phenylendiamin	+	+	k.A.	k.A.
β -Galactosidase	p-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid	+	+	+	k.A.
Hydrolyse (Protease)	Gelatine	-	-	-	k.A.
Arginindihydrolase	Arginin	-	-	-	k.A.
Fermentierung	Glucose	-	-	+	k.A.
Indol-Produktion	Tryptophan	-	-	-	k.A.
Nitratreduktion	KNO ₃	+	-	-	+
β -Glucosidase	Esculin	-	+	+	k.A.
Wachstum auf:					
	Format	+	+	k.A.	-
	Sucrose	-	+	k.A.	-
	Glycerin	+	+	k.A.	+/-
	Mannitol	+	+	k.A.	+
	Inositol	+	+	k.A.	+

Die physiologischen Charakteristika von *Paracoccus seriniphilus* sind in einer Übersicht in Tabelle 2.2 im Vergleich zu *P. marcusii*, *P. carotinifaciens* und *P. alcaliphilus* dargestellt [HARKER *et al.*, 1998].

Tabelle 2.2: Übersicht der Charakteristika von *Paracoccus seriniphilus* und seiner nächsten phylogenetischen Verwandten (+: positiv; -: negativ; k.A.: keine Angabe)

Charakteristik	<i>P. seriniphilus</i>	<i>P. marcusii</i> [HARKER <i>et al.</i> , 1998]	<i>P. carotinifaciens</i> [HARKER <i>et al.</i> , 1998]	<i>P. alcaliphilus</i> [HARKER <i>et al.</i> , 1998]
Gram-Verhalten	negativ	negativ	negativ	negativ
Beweglichkeit	-	-	+	-
Pigmentierung	-	+	+	-
pH	6,5-8	neutral	6,5-7,5	9
T [°C]	30	25-30	28	30
Wachstum auf L-Serin	+	-	k.A.	k.A.
Wachstum bei				
3% NaCl	3 (Optimum)	k.A.	k.A.	k.A.
6% NaCl	+	+-	+-	-
9% NaCl	+-	-	-	-

Es zeigt sich eine überwiegende Übereinstimmung der Charakteristika der *Paracoccus*-Stämme insbesondere im Gram-Verhalten und der optimalen Wachstumstemperatur. Die deutlichsten Unterschiede ergeben sich in der Beweglichkeit von *P. carotinifaciens*, der Pigmentierung von *P. marcusii* und *P. carotinifaciens*, dem hohen optimalen pH-Wert von *P. alcaliphilus* und der hohen optimalen NaCl-Konzentration von *P. seriniphilus*.

2.4 Detektion der L-Serindehydratase

Um ein empfindliches Detektionssystem für die L-Serindehydratase aufbauen zu können, wurde zunächst nach einem geeigneten Enzymassay gesucht. Daraufhin erfolgte die Optimierung des Zellaufschlusses, um die intrazelluläre L-Serindehydratase aus den Bakterienzellen unter Erhalt der enzymatischen Aktivität vollständig in den Aufschlusspuffer zu überführen und die Isolierung und Charakterisierung des Enzyms zu ermöglichen.

2.4.1 Bestimmung der L-Serindehydrataseaktivität - Stand der Technik

Zur Bestimmung der Aktivität von L-Serindehydratase sind im Prinzip zwei Verfahren denkbar: zum einen die Bestimmung der Konzentration des Substrates L-Serin, zum anderen die des Produktes Pyruvat. Die Analytik des bei der enzymatischen Umsetzung gebildeten

Ammoniums hat sich als unpraktikabel und ungenau herausgestellt [SOSNITZA, 1999]. Während die Serinanalytik mittels HPLC sehr zeit- und arbeitsaufwendig ist, lassen sich Pyruvatkonzentrationen schnell und genau ermitteln. Zwar hat sich der Einsatz einer Pyruvatoxidase in Verbindung einer amperometrischen Sauerstoffelektrode als sehr unempfindlich herausgestellt [SOSNITZA, 1999], aber es sind in der Literatur zwei praktikable Verfahren beschrieben:

1. Weit verbreitet ist die Detektion von Pyruvat mittels einer gekoppelten zweiten enzymatischen Reaktion. Das Enzym L-Lactatdehydrogenase (LDH) (EC 1.1.1.27) setzt Pyruvat zu L-Lactat um, wobei $\text{NADH} + \text{H}^+$ als Cofaktor eingesetzt und zu NAD^+ oxidiert wird. Das Prinzip der Wasserstoffübertragung bei der Pyruvatumsetzung besteht in der Hydridübertragung von der C4-Position des Pyridinringes des NADH auf die C2-Position des Pyruvates (Abbildung 2.18) [VARSANYI, 2002].

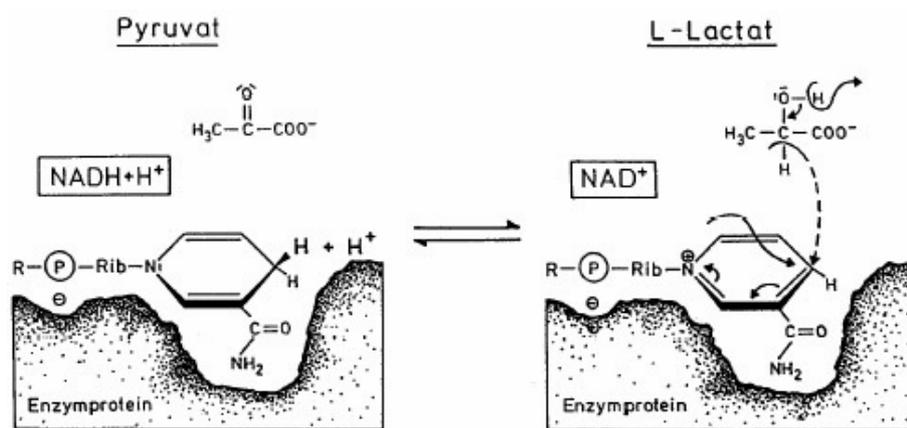


Abbildung 2.18: Umsetzung von Pyruvat zu L-Lactat mittels L-Lactatdehydrogenase [VARSANYI, 2002]

Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt mit

$$K_{(25^\circ\text{C})} = \frac{[\text{Pyruvat}][\text{NADH}][\text{H}^+]}{[\text{Lactat}][\text{NAD}^+]} = 2,7 \cdot 10^{-12} \text{ M}$$

Gleichung 2.1

auf der Seite des Lactats. Bei einem großen NADH-Überschuss liegt das Enzym in Form eines LDH/NADH-Komplexes vor, so dass die Michaelis-Konstante für Pyruvat die Wechselwirkung zwischen Pyruvat und diesem Komplex beschreibt [VARSANYI, 2002]. Die Enzymaktivität der LDH wird aufgrund des Absorptionsunterschiedes der NADH- und NAD⁺-Absorption bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ photometrisch gemessen, wobei die Absorptionsabnahme bei NADH-Verbrauch proportional zur L-Serinkonzentration ist [SOSNITZA, 1999]. Bei diesem Test ist die kontinuierliche Ermittlung der NADH-Absorption und damit die kontinuierliche

Ermittlung der L-Serinkonzentration des Enzymassays möglich. Zur Ermittlung von kinetischen Daten werden die Steigungen der erhaltenen Kurven zum Zeitpunkt $t = 0$ min bestimmt.

2. Die zweite in der Literatur beschriebene Methode zur Pyruvatanalytik ist auch mit nicht isolierter L-Serindehydratase möglich und wurde, wenn nicht anders angegeben, in dieser Arbeit zur Aktivitätsbestimmung der L-Serindehydratase eingesetzt. Die Methode beruht auf der Bildung des Hydrazons [(2,4-Dinitrophenyl)-hydrazono]-propionsäure aus Pyruvat und Dinitrophenylhydrazin (DNPH). Unter basischen Bedingungen erfolgt eine Rotfärbung des Hydrazons, was eine photometrische Detektion bei $\lambda = 550$ nm ermöglicht [HÖRNER, 1997] (Abbildung 2.19).

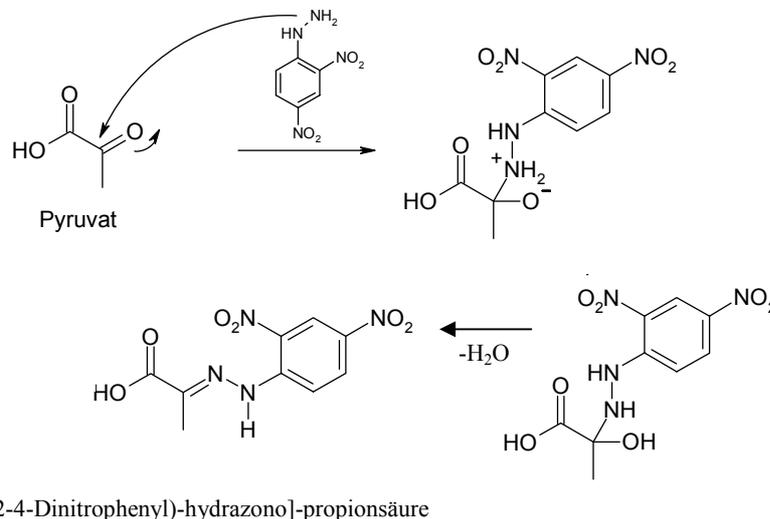


Abbildung 2.19: Bildung des Hydrazons [(2,4-Dinitrophenyl)-hydrazono]-propionsäure aus Pyruvat und DNPH

Die Abhängigkeit der Lichtabsorption von der Konzentration des Hydrazons wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben [LOTTSPREICH, 1998]:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Gleichung 2.2

A = Absorption, I_0 = Intensität des eintretenden Lichtes, I = Intensität des austretenden Lichtes, c = Konzentration der absorbierenden Substanz (M), d = Schichtdicke (cm)

Der molare Extinktionskoeffizient von [(2,4-Dinitrophenyl)-hydrazono]-propionsäure aus Pyruvat und DNPH berechnete sich nach dieser Gleichung zu 8,989 ml/(μ mol*cm).

Der gekoppelte Enzymtest unter Verwendung von LDH setzt voraus, dass die eingesetzte L-Serindehydratase frei von anderen NADH-abhängigen Proteinen ist, die den Enzymtest durch Umsetzung von NADH stören würden. Diese Voraussetzung ist bei der Verwendung von nicht aufgereinigter L-Serindehydratase aus *Paracoccus seriniphilus* nicht erfüllt, da die Zugabe von Rohextrakt des Stammes zu einer NADH-Lösung zu einer Oxidation des NADH führt. Daher wurde der zweite beschriebene Ansatz zur Pyruvatanalytik gewählt. Die Aktivitätsbestimmung der nativen L-Serindehydratase in Rohextrakten (Anhang 5.8) und verdünnter Enzymlösungen, die nach der chromatographischen Aufreinigung erhalten wurden, erfolgte nach Anhang 5.9.

2.5 Optimierung der Biomasse- und L-Serindehydratase-Produktion von *Paracoccus seriniphilus*

Zur Isolierung und Charakterisierung der von *Paracoccus seriniphilus* produzierten L-Serindehydratase war eine Optimierung der Wachstumsbedingungen des Stammes und der Enzyminduktion notwendig, um eine möglichst hohe Biomasse- und Enzymausbeute zu erreichen. Dazu wurden drei verschiedene Ansätze gewählt:

1. Kultivierung im L-Serin-Minimalmedium mit und ohne Zusatz von Kohlenstoffquellen
2. Kultivierung im komplexen Medium; Enzyminduktion im L-Serin-Minimalmedium
3. Kultivierung im komplexen Medium mit L-Serin-Zusatz zur Enzyminduktion

Die Beschreibung dieser Ansätze und der Vergleich ihrer Effektivität sind im Folgenden dargestellt.

2.5.1 Kultivierung im L-Serin-Minimalmedium

Da im L-Serin-Minimalmedium (Anhang 5.2) neben L-Serin keine weitere Kohlenstoff- und Stickstoffquelle vorhanden ist, muss der Stamm zum Wachsen die zuvor beschriebene L-Serindehydratase produzieren. Das Wachstum in diesem Medium ist sehr langsam, wobei eine maximale optische Dichte von 0,08 nach einer Kultivierungszeit von sechs Tagen erreicht wird. Dies verdeutlicht, dass so gut wie kein Wachstum stattfindet. Der Grund dafür liegt in der in Kapitel 2.3.3 beschriebene Ausbildung von Agglomeraten, wodurch die Versorgung der einzelnen Zellen mit Nährstoffen durch Diffusionsprozesse limitiert ist. Durch Zugabe des Tensids Tween 80 (Abbildung 2.20) zum Wachstumsmedium, das Auswirkungen auf die Oberflächeneigenschaften der Zellmembranen hat, konnte die Ausbildung der Agglomerate

verhindert werden. Die Tween 80-Konzentration lag mit 2 μM unterhalb der kritischen Micellbildungskonzentration von 0,012 mM [BLACK, 1998].

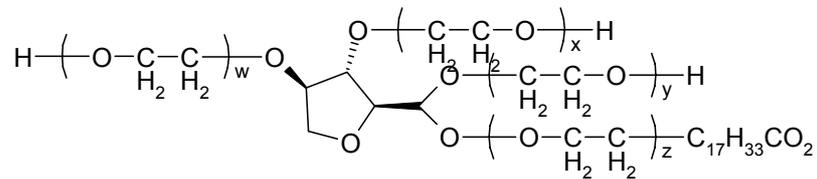


Abbildung 2.20: Strukturformel von Tween 80 [BLACK, 1998]

Auf diese Weise wurde eine Erhöhung der maximalen Wachstumsrate auf 0,08 und der optischen Dichte auf 0,57 erreicht. Die L-Serindehydratase-Aktivität (Anhang 5.9) ergab sich zu 33,3 nkat/g Biotrockenmasse.

Um die Biomasseausbeute zu erhöhen und das Wachstum zu beschleunigen, wurden dem Kultivierungsmedium verschiedene Kohlenstoffquellen zugesetzt. Dabei fiel die Wahl zum einen auf das Produkt der L-Serin-Umsetzung Pyruvat, zum anderen auf Lactat, das *Paracoccus seriniphilus* aus Pyruvat mittels einer L-Lactatdehydrogenase produzieren kann. Allerdings hatten diese Verbindungen, ebenso wie Glucose, in einer Konzentration von 1 g/l keinen wachstumsfördernden Einfluss auf *Paracoccus seriniphilus*. Daher wurden zur Erhöhung der Biomasseausbeute komplexe Medien herangezogen, deren Verwendung im nächsten Kapitel beschrieben ist.

2.5.2 Enzyminduktion im L-Serin-Minimalmedium

Der zweite Ansatz zur Optimierung der Biomasse und L-Serindehydratase-Produktion basiert auf der Kultivierung von *Paracoccus seriniphilus* im komplexen Medium und der anschließenden Enzyminduktion im L-Serin-Minimalmedium. Als komplexes Medium wurde dabei sowohl MB100- (Anhang 5.2), als auch Pepton-Hefeextrakt-Medium (Anhang 5.2) verwendet. Diese wurden mit 10^6 Zellen/ml aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur angeimpft und bei 30 °C bis zum Ende der exponentiellen Phase aerob inkubiert. Dabei wurden maximale Optische Dichten von 2,7 (MB 100-Medium) und 6,26 (Pepton-Hefeextrakt-Medium) innerhalb einer Kultivierungszeit von 20 h bzw. 18 h erreicht. Somit ist durch die Verwendung von komplexen Medien im Vergleich zum Minimalmedium eine wesentlich höhere Biomasseausbeute in kürzerer Zeit möglich. Da die in diesen Medien kultivierten Zellen in der Mitte der Phase nur eine L-Serindehydratase-Aktivität von 21,7 nkat/g BTM aufweisen, war eine Enzyminduktion erforderlich. Dazu wurden die Zellen

in der exponentiellen Wachstumsphase bei 4 °C für 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und mit 20 ml auf 4 °C gekühltem L-Serin-Minimalmedium mit 1 g/l L-Serin gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in auf 30 °C temperiertes L-Serin-Minimalmedium mit 1 g/l L-Serin für eine Stunde aerob inkubiert. Das dafür verwendete Volumen entsprach dem des zur Biomasseproduktion eingesetzten komplexen Mediums. Nach der Inkubation wurden die Zellen wiederum durch Zentrifugieren geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Es ergaben sich enzymatische Aktivitäten von 267 nkat/g BTM (MB 100-Medium) bzw. 700 nkat/g BTM (Pepton-Hefeextrakt-Medium). Die Verwendung eines Induktionsmediums ohne L-Serin führt zu einer Abnahme der ursprünglichen L-Serindehydratase-Aktivität um 56 %.

2.5.2.1 Optimierung der Inkubationszeit im L-Serin-Minimalmedium

Die Inkubationsdauer der Zellen im Minimalmedium hat, wie Abbildung 2.21 zeigt, einen Einfluss auf die Enzymaktivität. Während dieser Zeit stellen die Zellen durch Produktion der L-Serindehydratase ihren Stoffwechsel um. Als Optimum hat sich eine Inkubation von einer Stunde herausgestellt, bei längeren Zeiten geht die enzymatische Aktivität wieder zurück.

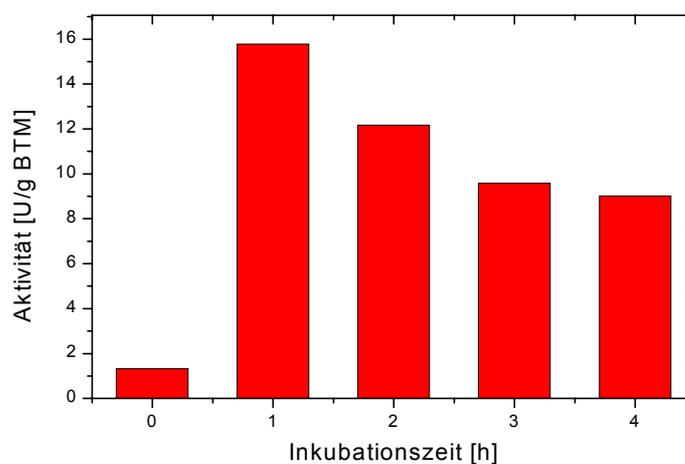


Abbildung 2.21: Einfluss der Inkubationszeit der vorkultivierten Zellen im L-Serin-Minimalmedium zur Induktion der L-Serindehydratase

Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei der Ornithincarbamoyltransferase (OCTase) in *Escherichia coli* beobachtet. In Anwesenheit von Arginin wird die Bildung dieses Enzyms reprimiert. Werden die Zellen gewaschen und in ein Arginin-freies Minimalmedium gegeben, wird eine Steigerung der enzymatischen Aktivität auf ein Vielfaches der Ausgangsaktivität beobachtet. Erst im weiteren Verlauf des Wachstums geht die Aktivität mit zunehmender Argininproduktion wieder auf die ursprüngliche zurück [SCHLEGEL, 1992]. Auch die

gesteigerte Aktivität der L-Serindehydratase ist durch den Medienwechsel verursacht worden. Die sinkende Aktivität bei einer Inkubationszeit von $t > 1$ h wäre durch eine Repression durch ein Stoffwechselprodukt zu erklären. Untersuchungen zur Inhibierung der L-Serindehydratase sind in Kapitel 2.9.5 dargestellt.

2.5.2.2 Vitalitätsuntersuchungen

Das Verfahren zur Enzyminduktion im Minimalmedium ist mit mehreren Stressfaktoren für die Bakterien verbunden. Zum einen wirkt der Scherstress bei den zwei Zentrifugationsvorgängen auf die Zellen ein, zum anderen müssen die auf einem komplexen Medium gewachsenen Bakterien ihren Stoffwechsel auf L-Serin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle im Minimalmedium umstellen. Wie sich diese Umstellung auf die Vitalität der Zellen auswirkt, wurde mit Hilfe der Durchflusscytometrie überprüft, mit der sich vitale von toten Zellen unterscheiden lassen. Der Ausschlussfarbstoff Propidiumiodid kann durch defekte Membranen in tote Zellen eindringen und in doppelsträngige DNA/RNA interkalieren. Durch die Reaktion mit Nukleinsäuren erfolgt weiterhin eine Verstärkung der Fluoreszenz bei $Ex:Em = 488\text{ nm}:580\text{ nm}$ [RIESEBERG, 2000]. Vitale Zellen zeigen diese Eigenschaft nicht. Daher ist Propidiumiodid zur Vitalitätsbestimmung von Zellen geeignet. Die Propidiumiodid-Lösungen mit einer Konzentration von $7,5 \cdot 10^{-2}$ mM in PBS (phosphate buffered saline) können direkt zur Zellsuspension gegeben werden. Nach einer Inkubationszeit von 30 s bei RT erfolgt die Messung im Cytometer. In Abbildung 2.22 (links) sind Cytometerspektren von *Paracoccus seriniphilus* in der Absterbephase einer Kultivierung in MB 100-Mediums abgebildet. Sie zeigen zwei Peaks, von denen der linke bei niedrigen Fluoreszenzintensitäten vitalen Zellen, der bei hohen Fluoreszenzintensitäten toten Zellen zuzuordnen ist. Die Verschiebung der Vergleichsspektren ist auf gerätetechnische Gründe zurückzuführen. In Abbildung 2.22 (rechts) ist die Fluoreszenz der Bakterienzellen in der exponentiellen Phase im komplexen Medium (rot), unmittelbar nach Umsetzen der Zellen ins L-Serin-Minimalmedium (grün) und eine Stunde nach Umsetzen der Zellen ins Minimalmedium (blau) dargestellt.

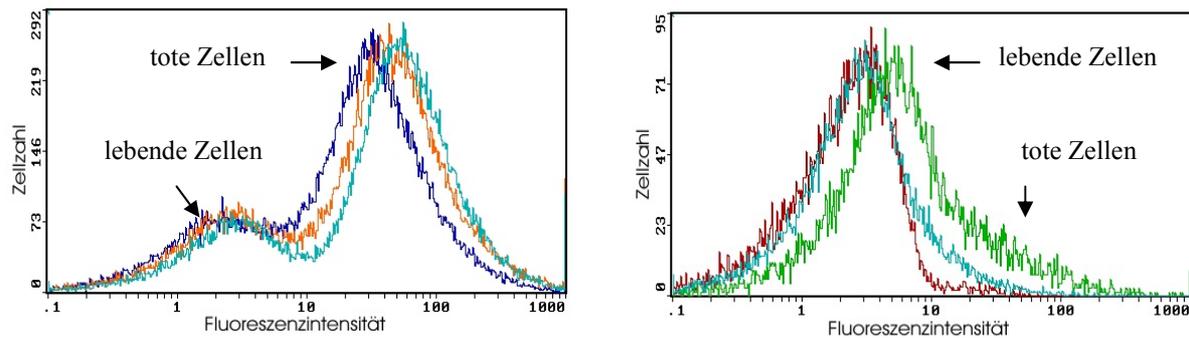


Abbildung 2.22: links: durchflusszytometrische Referenzmessungen in der stationären Wachstumsphase zur Differenzierung lebender (linker Peak) und toter (rechter Peak) Zellen; rechts: Vitalitätsuntersuchungen von in MB 100-Medium angezogener *Paracoccus seriniphilus*-Zellen in exponentieller Phase im MB-Medium (rot), nach Umsetzen in L-Serin-Minimalmedium (grün), nach 1 h im L-Serin-Minimalmedium (blau)

Aufgrund des fehlenden Peaks bei hohen Fluoreszenzintensitäten ergab sich aus diesen Daten in allen Fällen eine Vitalität der Zellen zu 98 % [RIESEBERG, 2000]. Der Scherstress beim Zentrifugieren der Zellen und der Wechsel des Kultivierungsmediums hat daher keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der Bakterienzellen.

2.5.3 Kultivierung im komplexen Medium mit L-Serin-Zusatz

Wie im letzten Kapitel gezeigt werden konnte, ist die Produktion der L-Serindehydratase durch Kultivierung von *Paracoccus seriniphilus* im komplexen Medium und anschließender Enzyminduktion im L-Serin-Minimalmedium möglich. Insbesondere hat sich der Einsatz des Pepton-Hefeextrakt-Mediums als geeignet herausgestellt, um eine hohe Enzymausbeute zu erreichen. Da dieses Verfahren durch die zusätzlich zur Biomasseproduktion erforderliche Enzyminduktion sehr zeit- und arbeitsaufwendig ist, sollte ein schnelleres und einfacheres Verfahren zur Produktion der L-Serindehydratase entwickelt werden. Im vorhergehenden Kapitel wurde auch gezeigt, dass L-Serin zur Enzyminduktion erforderlich ist und die Kultivierung des Bakterienstammes im reinen komplexen Medium nur zu einer geringen Enzymaktivität führt. Durch einen Zusatz von 1 g/l L-Serin zum Wachstumsmedium war es möglich, ohne weitere Enzyminduktion enzymaktive Biomasse bereitzustellen, wobei eine maximale enzymatische Aktivität in der Mitte der exponentiellen Phase des Zellwachstums erreicht wurde (Abbildung 2.23). Eine darauf folgende Abnahme der enzymatischen Aktivität ist durch eine Abnahme der L-Serinkonzentration im Kultivierungsmedium zu erklären, was in Kapitel 2.5.3 verdeutlicht wird. Die Zellen wurden zur Biomasseproduktion in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet.

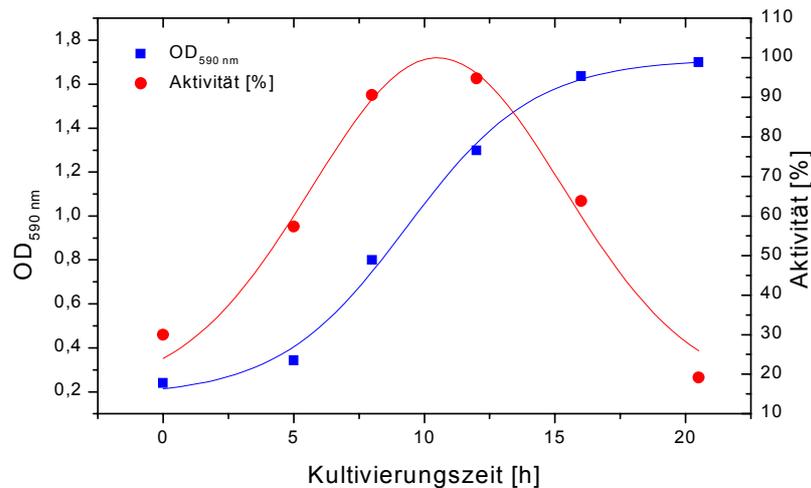


Abbildung 2.23: Ermittlung des Erntezeitpunktes von *Paracoccus seriniphilus* zur Optimierung der L-Serindehydratase-Aktivität

Insgesamt war die enzymatische Aktivität der auf diese Weise erhaltenen Zellen mit denen der im L-Serin-Minimalmedium inkubierten Zellen vergleichbar. Dies trifft sowohl auf das MB 100-Medium (267 nkat/g BTM), als auch das Pepton-Hefeextrakt-Medium (700 nkat/g BTM) zu.

2.5.4 Vergleich der Verfahren zur Biomasse- und Enzymproduktion

In den letzten Kapiteln wurden verschiedene Verfahren zur Optimierung der Produktion von *Paracoccus seriniphilus*-Biomasse mit höchstmöglicher L-Serindehydratase-Aktivität vorgestellt. In allen Fällen lag das Prinzip der Enzyminduktion darin, das Substrat der L-Serindehydratase L-Serin als Substrat bei der Kultivierung einzusetzen. Wie die Kultivierungen im Minimalmedium zeigten, reichte es als alleiniges Substrat allerdings nicht aus, um ein schnelles Wachstum mit hoher Biomasseausbeute zu gewährleisten. Mit einem Zusatz von Tween 80 konnte eine Agglomeratbildung der Zellen erfolgreich verhindert und die Wachstumsrate gesteigert werden. Um ausreichend Biomasse für die Isolierung und Charakterisierung der L-Serindehydratase bereitstellen zu können, war daher eine weitere Optimierung erforderlich. Dazu wurde *Paracoccus seriniphilus* auf einem komplexen Medium herangezogen, um anschließend die enzymatische Aktivität im L-Serin-Minimalmedium zu induzieren. Auf diese Weise konnte eine gute Biomasseausbeute erzielt werden (Tabelle 2.3). Der Zeitfaktor wurde durch Kultivierung im komplexen Medium mit L-Serin-Zusatz optimiert. Nach Abschluss der Optimierungsversuche konnte die maximale

optische Dichte von 0,08 auf 6,25 erhöht und die enzymatische Aktivität von einem nicht messbaren Wert auf 700 nkat/g BTM gesteigert. Die Kultivierungszeit zur Biomasseproduktion verringerte sich dabei von sechs Tagen auf 16 h (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Optimierung der Wachstumsmedien und L-Serindehydratase-Aktivität von *Paracoccus seriniphilus* [LAROUCHE *et al.*, 2002]

Medium	BTM [g/l]	μ_{\max}	nkat/g _{BTM}	OD _{max}	Effizienz
L-Serin-Minimalmedium (ohne Tween 80)	-	-	-	0,08	-
L-Serin-Minimalmedium (mit Tween 80)	0,5	0,03	33	0,57	1
MB 100, Induktion in L-Serin- Minimalmedium	1,62	0,23	267	2,70	22
MB 100 + L-Serin	1,62	0,23	300	2,7	26
Sea Salt + Pepton + Hefeextrakt + L-Serin	3,25	0,25	700	6,25	120

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Kultivierungen von *Paracoccus seriniphilus* zur Biomasse- und Enzymproduktion im Pepton-Hefeextrakt-Medium mit einem Zusatz an L-Serin zur Enzyminduktion eingesetzt.

2.6 Charakterisierung des Wachstumsverhaltens von *Paracoccus seriniphilus*

Zur Charakterisierung des Wachstumsverhaltens von *Paracoccus seriniphilus* in Anwesenheit von L-Serin wurden Kultivierungen im L-Serin-Minimalmedium und im komplexen Pepton-Hefeextrakt-Medium durchgeführt. Diese erfolgten im Bioreaktor, wodurch die Aufnahme von online-Parametern zur Prozesskontrolle und zur Korrelation mit offline-Daten möglich war.

2.6.1 Kultivierung im L-Serin-Minimalmedium

Für die Kultivierung von *Paracoccus seriniphilus* wurde das Biostat Q-System der Firma Braun eingesetzt. Es bietet die Möglichkeit, bis zu vier Bioreaktoren gleichzeitig zu betreiben,

um vergleichende Untersuchungen im 300 ml-Maßstab durchzuführen. Es wurden die Konzentrationsverläufe des Substrates L-Serin und die der enzymatischen L-Serinumsetzung Pyruvat und Ammonium betrachtet. Als Medium für vergleichende Kultivierungen mit und ohne Zusatz von Tween 80 diente das L-Serin-Minimalmediums mit einem Zusatz von Desmophen 3900 (1:10000) zur Schaumunterdrückung. In Kapitel 2.5.1 wurde festgestellt, dass *Paracoccus seriniphilus* mit einem kleinen Inokulum von 10^6 Zellen/ml im Minimalmedium nur ein sehr schlechtes Wachstum zeigt, das zur Untersuchung des L-Serinstoffwechsels nicht geeignet ist. Daher wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.5.2 dargestellt, im Pepton-Hefeextrakt-Medium herangezogenen, in der exponentiellen Wachstumsphase abzentrifugiert und mit Minimalmedium gewaschen. Anschließend wurden die Kultivierungen in den Bioreaktoren mit einem Inokulum von $OD = 2,25$ gestartet. Dem Wachstumsoptimum entsprechend wurden die an dieser Stelle vorgestellten Kultivierungen bei $T = 30\text{ °C}$, $pH\ 7$ und einem NaCl-Gehalt im Medium von 3 % durchgeführt. Die weiteren Kultivierungsbedingungen wurden wie folgt gewählt:

Medienvolumen:	300 ml
Temperatur:	30 °C
pH-Wert:	7,0 (keine pH-Wert-Korrektur)
Rührergeschwindigkeit:	300 rpm
Begasungsrate:	1 l Luft /min

Zur online-und offline-Kontrolle der Kultivierungen wurden die in Tabelle 2.4 angegebenen Daten aufgezeichnet.

Tabelle 2.4: ermittelte Parameter bei Bioreaktor-Kultivierung im L-Serin-Minimalmedium

online-Parameter
pH-Wert
Temperatur
Rührergeschwindigkeit
Sauerstoffpartialdruck (pO_2) im Medium
offline-Parameter
$OD_{590\text{ nm}}$
Biotrockenmasse (BTM)
Ammoniumkonzentration (wenn angegeben)
L-Serin-Konzentration

In Kapitel 2.3.3 wurde festgestellt, dass *Paracoccus seriniphilus* beim Wachstum im L-Serin-Minimalmedium ohne Tween 80-Zusatz Zellagglomerate und Biofilme ausbildet. Dieses Verhalten wurde auch bei der hier vorgestellten Kultivierung des Bakterienstammes beobachtet. Die scheinbare optische Dichte des Mediums nahm bis zu einer Kultivierungszeit von vier Stunden um 0,3 und die damit gut korrelierende BTM um 0,25 g/l ab (Abbildung 2.24). Währenddessen bildete sich an den Oberflächen innerhalb des Reaktors ein Biofilm aus (Abbildung 2.12). Unmittelbar nach dem Start der Kultivierung beginnend nahm die L-Serin-Konzentration innerhalb dieser ersten 4 h ohne erkennbare Lag-Phase auf ca. 30 % ab.

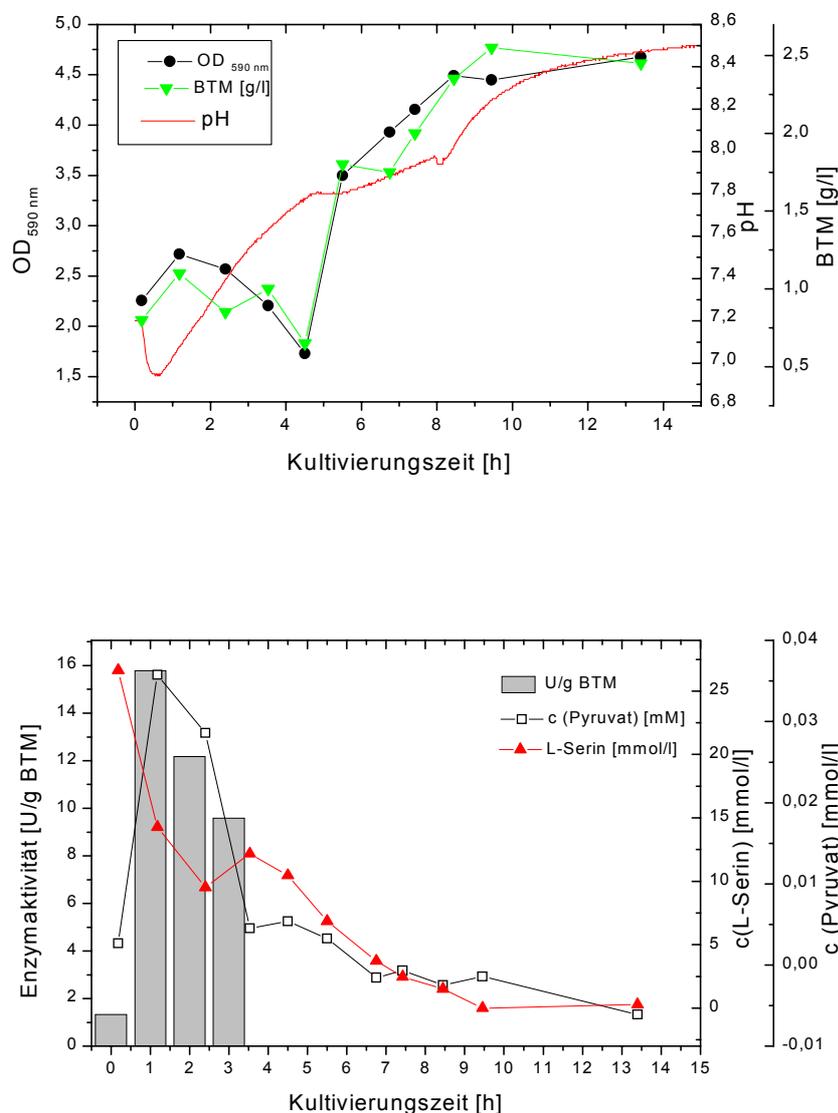


Abbildung 2.24: Kultivierung von *Paracoccus seriniphilus* im L-Serin-Minimalmedium ohne Tween 80-Zusatz

Pyruvat kann auch im Wachstumsmedium nachgewiesen werden. Da nach Kapitel 2.5.2.2 der Wechsel des Wachstumsmediums zu keinem Vitalitätsverlust der Zellen führt, wird vermutet, dass das Pyruvat aus den Zellen ins Medium abgegeben wird. Es kann nach Anhang 5.10 detektiert und quantifiziert werden. Während der Kultivierung wurde auf diese Weise zunächst eine ansteigende Pyruvatkonzentration beobachtet, die ab einer Kultivierungszeit von $t > 1$ h wieder abnahm. Die Zunahme spricht dafür, dass zunächst mehr Pyruvat gebildet, als verbraucht wurde, was auch bei der Optimierung der Kultivierungsbedingungen zur Enzymproduktion in Kapitel 2.5.2 festgestellt wurde. An dieser Stelle wurde eine maximale enzymatische Aktivität nach einer Stunde gefunden, was gut mit der maximalen Pyruvatkonzentration zu diesem Zeitpunkt korreliert. Die sich anschließende Abnahme weist auf eine stetige Verstoffwechselung dieser Substanz hin, die durch eine Intensivierung der Biofilmbildung erkennbar ist. Innerhalb der Kultivierungszeit von 4,5 bis 9 Stunden wurde eine stetige Zunahme der Optischen Dichte auf 4,5 und der BTM auf 2,5 g/l festgestellt, korreliert mit einer Abnahme der L-Serin- und Pyruvatkonzentration im Medium. Im weiteren Verlauf blieben die Optische Dichte und BTM konstant, da im Medium kein Substrat mehr nachgewiesen werden konnte und daher kein Wachstum mehr möglich war. Der pH-Wert, der zur Charakterisierung des Wachstumsverhaltens im Verlaufe der Kultivierung nicht angeglichen wurde, stieg von pH 7 auf pH 8,5, was mit der Freisetzung von Ammonium aus der L-Serin-Umsetzung zu erklären ist.

Wenn eine Kultivierung unter den oben beschriebenen Bedingungen mit einem kleineren Inokulum von $OD = 0,2$ durchgeführt wurde, verlängerte sich die Kultivierungszeit bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase von 9 auf 80 Stunden (Abbildung 2.25). Die Biofilmbildung verlief in diesem Fall zunächst über die Ausbildung von frei im Medium schwimmenden Agglomeraten, so dass zunächst ein Anstieg der Optischen Dichte auf 0,8 zu beobachten war. Daraufhin war eine Biofilmbildung an den Bioreaktorwänden zu erkennen, was mit der Abnahme der Optischen Dichte verbunden war. Während des gesamten Wachstums war eine stetige Abnahme des Gelöstsauerstoff-Gehaltes im Medium zu erkennen, die auch bei einem erneuten Ansteigen der Optischen Dichte nach 25 h anhielt. Zu diesem Zeitpunkt begannen sich Teile des Biofilms in Form von Flocken aus dem Gesamtverband zu lösen. Nach einer Kultivierungszeit von ca. 40 h stiegen der pH-Wert und die Sauerstoffkonzentration sprunghaft an, was mit einem Stopp des Zellwachstums korreliert. Weiterhin erreichte die Konzentration des durch die L-Serin-Umsetzung gebildeten Ammoniums im Medium ein Maximum, und die L-Serinkonzentration ging in ein Minimum

über. Dennoch war ein weiterer Anstieg der Optischen Dichte zu beobachten, der aus dem Loslösen der Zellen aus dem Biofilmverband während der Absterbephase resultierte. Zu diesem Zeitpunkt war es möglich, durch erneute Zugabe von L-Serin eine wiederholte Abnahme der Optischen Dichte durch Agglomeratbildung der Zellen zu erreichen.

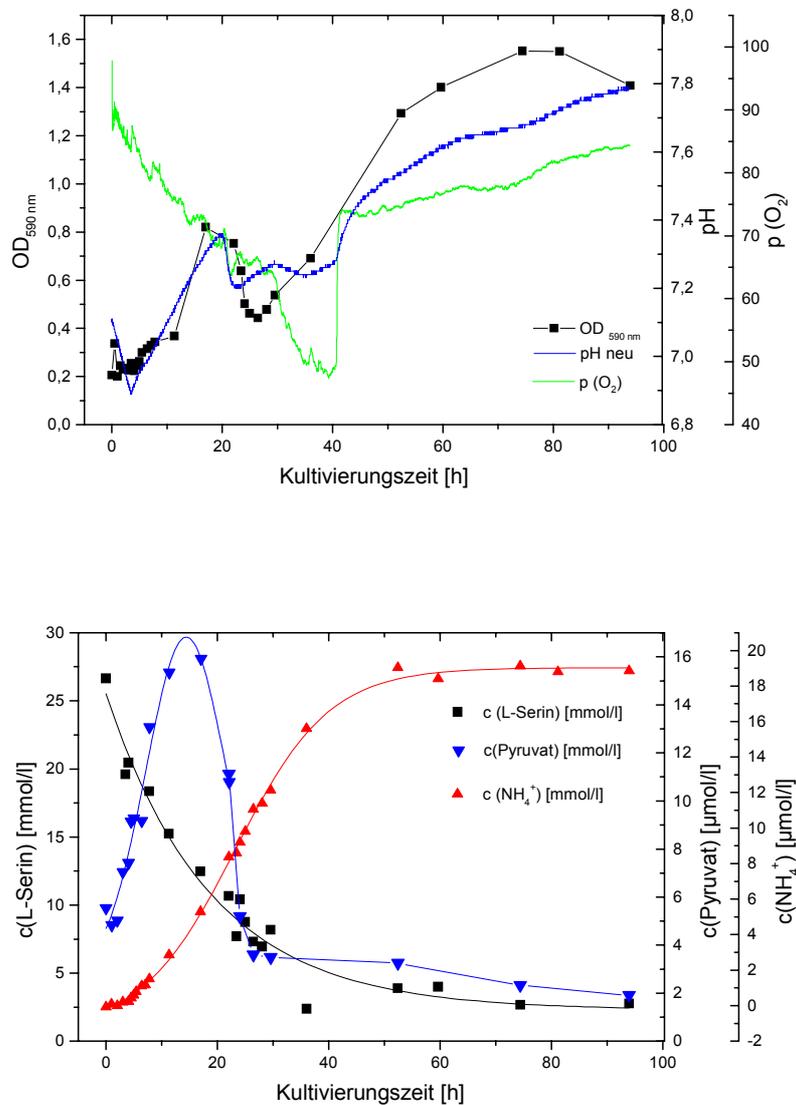


Abbildung 2.25: Kultivierung von *Paracoccus seriniphilus* im L-Serin-Minimalmedium ohne Tween 80-Zusatz mit Inokulum von $OD_{590\text{ nm}} = 0,2$

Zur Vermeidung der Zellagglomerat-Bildung und des damit verbundenen diffusionslimitierten Nährstofftransports können, wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, 2 μM Tween 80 zum Minimalmedium gegeben werden. Dies führte zu einer homogenen Zellverteilung im Medium und einem deutlichen Anstieg der Biomasse nach dem Animpfen (Abbildung 2.26). Auch die Umsetzung des Substrates erfolgte unmittelbar nach dem Start

der Kultivierung. Eine Lag-Phase wurde auch hier nicht beobachtet. Die Konzentration des ins Medium abgegebenen Pyruvates erreichte nach einer Stunde die maximale Konzentration von $58 \mu\text{M}$ und nahm im weiteren Verlauf der Kultivierung wieder ab.

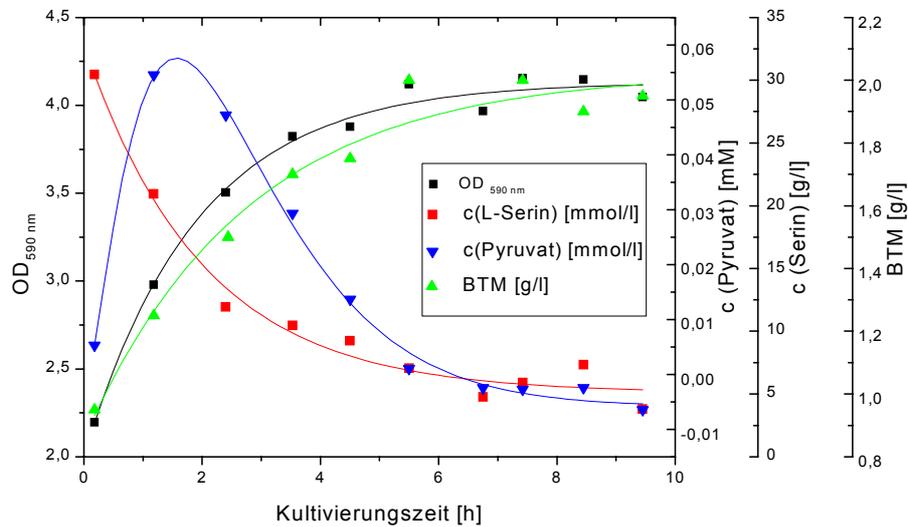


Abbildung 2.26: Kultivierung von *Paracoccus seriniphilus* im L-Serin-Minimalmedium mit Tween 80-Zusatz

Nach sechs Stunden war kein Pyruvat mehr nachweisbar, und auch die L-Serinkonzentration erreichte ein Minimum. Zu diesem Zeitpunkt gingen auch die optische Dichte und BTM in die stationäre Phase über ($OD = 4,25$; $BTM = 2 \text{ g/l}$). Verglichen mit der Kultivierung ohne Tween 80 führt ein Zusatz dieses Tensids aufgrund des fehlenden diffusionslimitierten Nährstofftransportes zu einer Verkürzung der Kultivierungszeit um zwei Stunden. Ein Vergleich der Verläufe der optischen Dichten von Kultivierungen mit und ohne Tween 80-Zusatz sind in Abbildung 2.27 dargestellt.

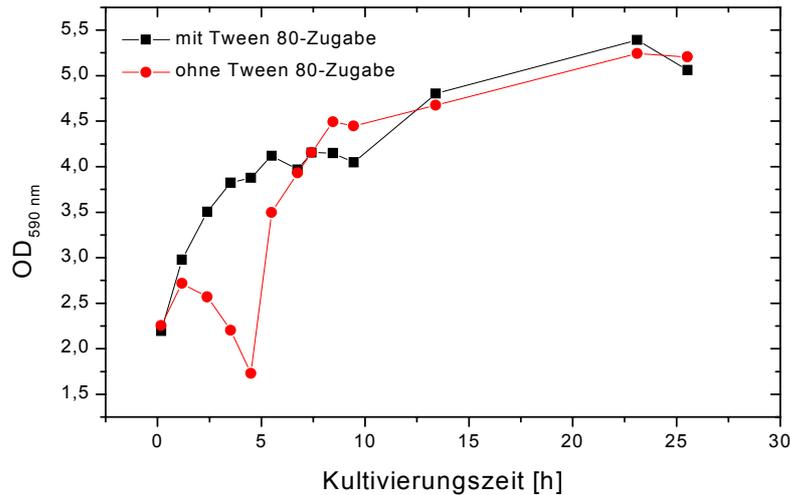


Abbildung 2.27: Vergleich der Optischen Dichten von Kultivierungen im L-Serin-Minimalmedium mit und ohne Zusatz von Tween 80

Mit einem Inokulum von $OD = 2,25$ wurden zum Ende des Wachstums in beiden Fällen vergleichbare Optischen Dichten von ca. 5,1 erreicht.

2.6.2 Kultivierung im komplexen Medium

Die Kultivierung von *Paracoccus seriniphilus* im komplexen Pepton-Hefeextrakt-Medium (Anhang 5.2) mit einem Zusatz von Desmophen 3900 (1:10000) zur Schaumunterdrückung erfolgte im 2,5-l-Maßstab unter Verwendung des Biostat B-Systems der Firma Braun. Mit L-Serin als Induktor der L-Serindehydratase war es das Ziel, Biomasse zur Isolierung und Charakterisierung des Enzyms bereitzustellen. Das Animpfinokulum betrug 10^6 Zellen/ml aus einer in der exponentiellen Phase befindlichen Vorkultur im Pepton-Hefeextrakt-Medium. Die weiteren Kultivierungsparameter wurden wie folgt gewählt:

Temperatur:	30 °C
pH-Wert :	7,0; Regelung mit 10% HCl und 10% NaOH
Rührergeschwindigkeit:	300 rpm
Begasungsrate (Luft):	1 l/min (0,4 vvm)

Die Prozesskontrolle erfolgte durch Aufnahme der in Tabelle 2.5 dargestellten online- und offline-Parameter. Der Verlauf der Ammoniumkonzentration wurde nicht aufgezeichnet. Aufgrund der Vielzahl an Ammoniumquellen im komplexen Medium war eine spezifische Detektion des aus der L-Serin-Umsetzung gebildeten Ammoniums nicht möglich.

Tabelle 2.5: Bei der Bioreaktor-Kultivierung bestimmte Parameter

online-Parameter
pH-Wert
Temperatur
Rührergeschwindigkeit
Sauerstoffpartialdruck (pO ₂) im Medium
Abgas-O ₂ -Konzentration
Abgas-CO ₂ -Konzentration
offline-Parameter
OD _{590 nm}
L-Serin-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung des L-Serins erfolgte mittels HPLC (Anhang 5.13). Es wurde festgestellt, dass die extrazelluläre L-Serin-Konzentration zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase zunächst anstieg. Dieser resultierte wahrscheinlich aus dem Umsatz der komplexen Nährmedienbestandteile (Abbildung 2.28).

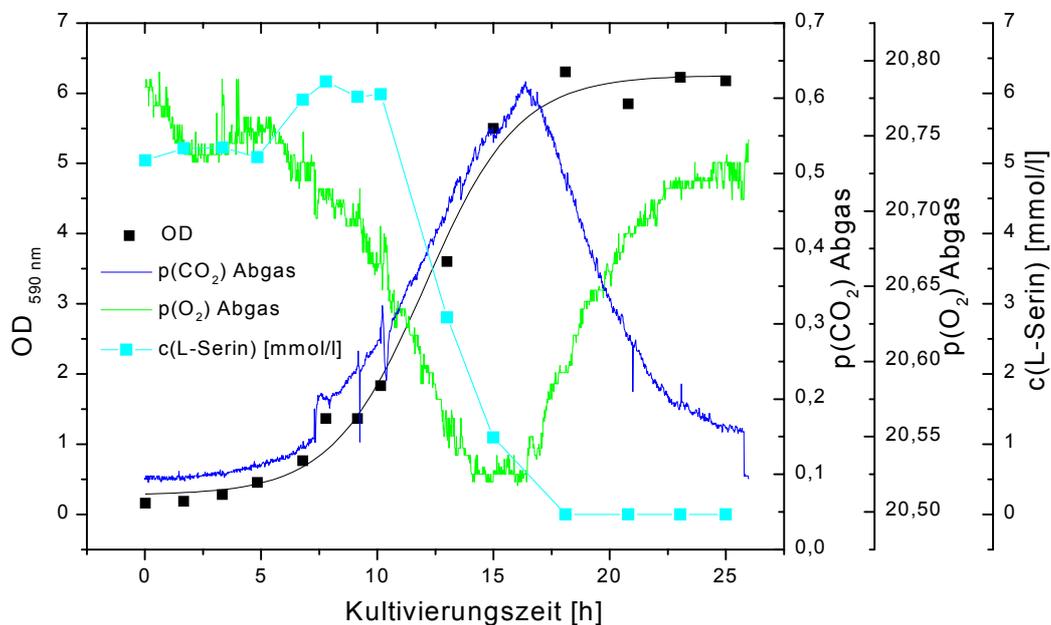


Abbildung 2.28: Kultivierung von *Paracoccus seriniphilus* im komplexen Medium

Eine Abnahme dieser Konzentration wurde in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase beobachtet, wenn die Zellen die maximale L-Serindehydratase-Aktivität aufweisen

(Kapitel 2.5.3). Beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase konnte kein L-Serin mehr nachgewiesen werden. Das Maximum der Optische Dichte von $OD = 6$ wurde nach einer Kultivierungszeit von 17 h erreicht, was gut mit dem Minimum der O_2 - und dem Maximum der CO_2 -Konzentration im Abgas zu diesem Zeitpunkt übereinstimmt (Abbildung 2.28).

2.7 Aktivierung und Stabilisierung der L-Serindehydratase

Wie bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben, besteht das katalytische Zentrum bakterieller L-Serindehydratase aus Eisen-Schwefel-Clustern. In diesen liegt das Eisen als Fe^{2+} vor und kann von Luftsauerstoff leicht oxidiert werden, worin die generelle Sauerstoffempfindlichkeit bakterieller pyridoxalphosphat-unabhängiger L-Serindehydratase begründet ist. Eine Lagerung des aktiven Enzyms ist ohne aktivitätserhaltende Maßnahmen daher nur unter anaeroben Bedingungen möglich [GRABOWSKI & BUCKEL, 1991]. So verliert ein unbehandelter Rohextrakt von *Paracoccus seriniphilus* die L-Serindehydratase-Aktivität innerhalb von einer Stunde (Abbildung 2.34). Ein Vergleich der Lagertemperaturen von $4^\circ C$ und $25^\circ C$ ergab keinen Unterschied im Verlauf des Aktivitätsverlustes.

2.7.1 Methoden zur Stabilisierung und Aktivierung der L-Serindehydratase

In der Literatur ist für einige L-Serindehydratase eine Aktivierung und Stabilisierung der enzymatischen Aktivität mit Hilfe von $FeSO_4$ und eines Reduktionsmittels (Dithiothreitol (DTT) oder L-Cystein) beschrieben [CARTER & SAGERS, 1972; FARIAS, 1991]. Das $FeSO_4$ ersetzt dabei wahrscheinlich aus dem Cluster ausgetretene oxidierte Eisenatome und das Reduktionsmittel reduziert oxidierte Cluster. Die L-Serindehydratase aus dem Bakterium *Clostridium acidi-urici* ist im Rohextrakt sogar vollkommen inaktiv und muss vor der Verwendung aktiviert werden [CARTER & SAGERS, 1972]. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass einige Enzyme in Form inaktiver Vorstufen vom Organismus produziert und erst am physiologisch geeigneten Ort zum Einsatzzeitpunkt aktiviert werden.

2.7.1.1 Stabilisierung und Aktivierung der L-Serindehydratase mit Dithiothreitol

DTT ist ein sehr häufig eingesetztes Reduktionsmittel, um die Oxidation von Cystein-Thiolgruppen von Proteinen zu verhindern (Abbildung 2.29).

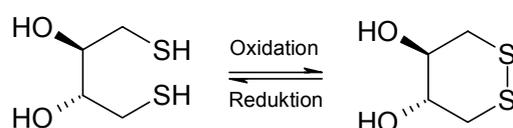


Abbildung 2.29: Redoxsystem DTT

Es hat bei der Stabilisierung der L-Serindehydratase die Aufgabe, oxidierte Eisen-Schwefel-Cluster wieder zu reduzieren. Die Konzentrationen der Aktivierungssubstanzen FeSO_4 und DTT haben einen großen Einfluss auf das Ausmaß der Stabilisierung. Um einen größtmöglichen Effekt zu erreichen, war daher eine Optimierung dieser Konzentrationen erforderlich. Diese ist in Abbildung 2.30 dargestellt und zeigt die Abhängigkeit der Enzymaktivität von den Konzentrationen der Aktivierungssubstanzen im Rohextrakt.

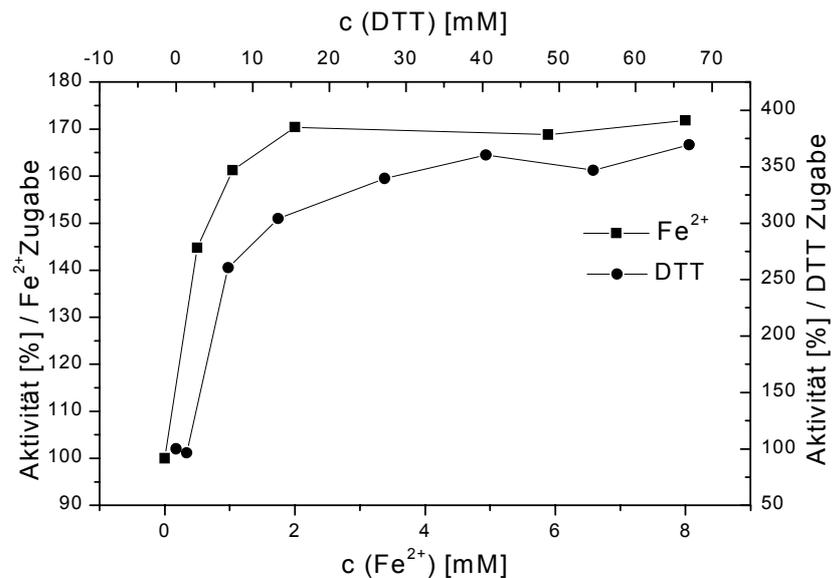


Abbildung 2.30: Optimierung der FeSO_4 und DTT-Konzentrationen zur Aktivierung der L-Serindehydratase; Optimierung der FeSO_4 -Konzentration bei $c(\text{DTT}) = 18 \text{ mM}$; Optimierung der DTT-Konzentration bei $c(\text{FeSO}_4) = 1,8 \text{ mM}$

DTT wurde bei einer konstanten Fe^{2+} -Konzentration von 1,8 mM in den angegebenen Konzentrationen hinzugefügt. Die optimale Fe^{2+} -Konzentration wurde bei einer konstanten DTT-Konzentration von 18 mM ermittelt. Nach Zugabe der Aktivierungssubstanzen zu den Rohextrakten und einer Inkubation für $t = 30 \text{ min}$ bei $T = 0 \text{ }^\circ\text{C}$ erfolgte die Bestimmung der Enzymaktivitäten wie oben beschrieben. Die maximale Aktivität der L-Serindehydratase wurde demnach bei einer FeSO_4 -Konzentration von 2 mM und einer DTT-Konzentration von 30 mM erreicht. Weiterhin konnte eine Steigerung der Enzymaktivität auf 350 bis 400 % der des nichtaktivierten Enzyms erreicht werden. Auch die Langzeitstabilität des Enzyms wurde durch Zugabe dieser Verbindungen gesteigert. Während das nichtaktivierte Enzym nach 25 min 50 % der Aktivität verliert, ist nach der Aktivierung nach 18 h noch eine Restaktivität von 50 % zu messen, wobei die Proben zwischen den Messungen bei RT gelagert wurden. Durch die Optimierung konnte die Langzeitstabilität um den Faktor 43

gesteigert werden (Abbildung 2.34, Tabelle 2.6). Eine weitere Optimierung war durch Wahl des optimalen Puffersystems möglich. Diese Untersuchungen sind in Kapitel 2.7.2 dargestellt.

2.7.1.2 Stabilisierung und Aktivierung der L-Serindehydratase mit L-Cystein

Neben DTT wurde auch die Eignung von L-Cystein, ein in der Natur weit verbreitetes Reduktionsmittel, zur Stabilisierung der L-Serindehydratase-Aktivität überprüft [FARIAS, 1991]. L-Cystein ist ein biochemisch sehr wichtiges Thiol, das unter Ausbildung einer Disulfidbrücke oxidativ zum schwerlöslichen Cystin dimerisiert und auch wieder reduziert werden kann (Abbildung 2.31). Solche Disulfidbrücken sind oft an der Stabilität und räumlichen Struktur von Proteinen beteiligt [KAZMAIER, 2001].

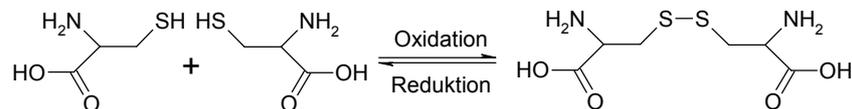


Abbildung 2.31: Redoxsystem Cystein – Cystin

Unter Zugabe von L-Cystein zu einer eisenhaltigen Lösung bilden sich Komplexe aus, wie in Abbildung 2.32 dargestellt ist. Das Eisen wird oktaedrisch von zwei Cysteinmolekülen koordiniert, wobei jeweils die Thio- die Carboxyl- und die Aminogruppe als Liganden fungieren. Die daraus resultierenden Ringsysteme sind relativ stabil, weil sie mit jeweils fünf oder sechs Atomen eine geringe Ringspannung aufweisen. Die Fe^{3+} -Komplexe weisen eine tiefblaue Färbung auf, während nach der Reduktion des Fe^{3+} zu Fe^{2+} durch L-Cystein farblose Komplexe vorliegen [MOST, 1999].

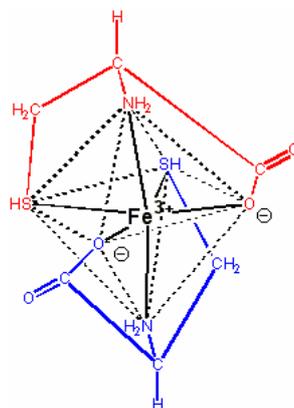


Abbildung 2.32: Oktaedrischer Eisen-Cystein-Komplex [MOST, 1999]

Zur Aktivierung der L-Serindehydratase wurde die oben ermittelte optimale Konzentration an FeSO_4 von 2 mM und die in der Literatur [FARIAS, 1991] angegebene Konzentration von 1 mM Cystein gewählt. Eine höhere Konzentration an Cystein ist inhibierend und wirkt sich negativ auf die Enzymaktivität aus. Unter aktivierenden Bedingungen zeigte das Enzym eine Aktivität von 350 % des nichtaktivierten Enzyms und eine Langzeitaktivität, die der des mit DTT aktivierten Enzyms vergleichbar ist (Abbildung 2.34, Tabelle 2.6). Da ein guter stabilisierender Effekt bei einer L-Cystein-Konzentration von 1 mM im Gegensatz zu den ermittelten 30 mM DTT zu beobachten war, wurde in dieser Arbeit, wenn nicht anders angegeben, L-Cystein zur Stabilisierung der L-Serindehydratase eingesetzt.

2.7.1.3 Aktivierung mit Pyridoxalphosphat

Wie oben dargestellt sind L-Serindehydratasen in der Vergangenheit aus verschiedensten Organismen isoliert worden. Diejenigen aus Eukaryonten wurden als pyridoxalphosphatabhängig, diejenigen aus Prokaryonten als eisenabhängig beschrieben. Da die in dieser Arbeit untersuchte L-Serindehydratase aus dem Bakterium *Paracoccus seriniphilus* die erste marinen Ursprungs ist, sollte geklärt werden, ob auch in diesem Fall eine Pyridoxalphosphatunabhängigkeit vorliegt. Dazu wurde Rohextrakt mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Pyridoxalphosphat versetzt und nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4 °C die enzymatische Aktivität gemessen. Es zeigte sich im Vergleich zu einer nichtaktivierten Probe eine erhöhte Aktivität von 250 %, deren Ursache in Kapitel 2.9.1 näher untersucht wird.

2.7.1.4 Reaktivierung inaktiver L-Serindehydratase

In vielen Fällen sind inaktive L-Serindehydratasen durch Zugabe von Fe^{2+} und eines Reduktionsmittels reaktivierbar [GRABOWSKI & BUCKEL, 1991]. Es konnte festgestellt werden, dass auch eine teilweise Reaktivierung von durch Lagerung inaktivierter L-Serindehydratase von *Paracoccus seriniphilus* möglich ist. Dazu wurde Rohextrakt, der für eine Stunde bis zur völligen Inaktivität bei 4 °C gelagert wurde, mit den oben angegebenen Konzentrationen an FeSO_4 und DTT oder L-Cystein versetzt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Ein nachfolgender Enzymtest ergab eine 40 %ige Aktivität im Vergleich zu der des nicht aktivierten Enzyms. Wahrscheinlich konnte eine vollkommene Reaktivierung nicht erreicht werden, da nach dem Zerfall der katalytisch aktiven Fe-S-Cluster eine enzymatische Aktivität nicht wiederhergestellt werden kann.

2.7.2 Wahl des geeigneten Puffersystems

Das verwendete Puffersystem hat einen großen Einfluss auf die Aktivität von Enzymen, was auch bei der L-Serindehydratase aus *Paracoccus seriniphilus* beobachtet werden konnte. In der Literatur wird die Untersuchung von L-Serindehydratase in den meisten Fällen unter Verwendung von Kaliumphosphatpuffer beschrieben [ZINECKER *et al.*, 1998], der im neutralen pH-Bereich in technischen Anwendungen weite Verbreitung findet. Für die in dieser Arbeit untersuchte L-Serindehydratase hat sich allerdings der Einsatz von HEPES-Puffer (20 mM, pH 7,6) (Abbildung 2.33) als günstig herausgestellt [BEYNON & EASTERBY, 1996].

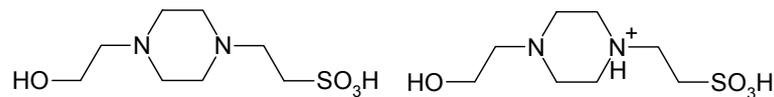


Abbildung 2.33: Struktur von HEPES (links: unprotonierte, rechts: protonierte Form)

Im Vergleich zu KPP-Puffer war mit HEPES-Puffer eine Steigerung der Enzymaktivität auf 290 % zu erreichen. Auch auf die Langzeitstabilität des Enzyms wirkt sich die Verwendung des HEPES-Puffers positiv gegenüber dem Phosphatpuffer aus, was in Abbildung 2.34 dargestellt ist.

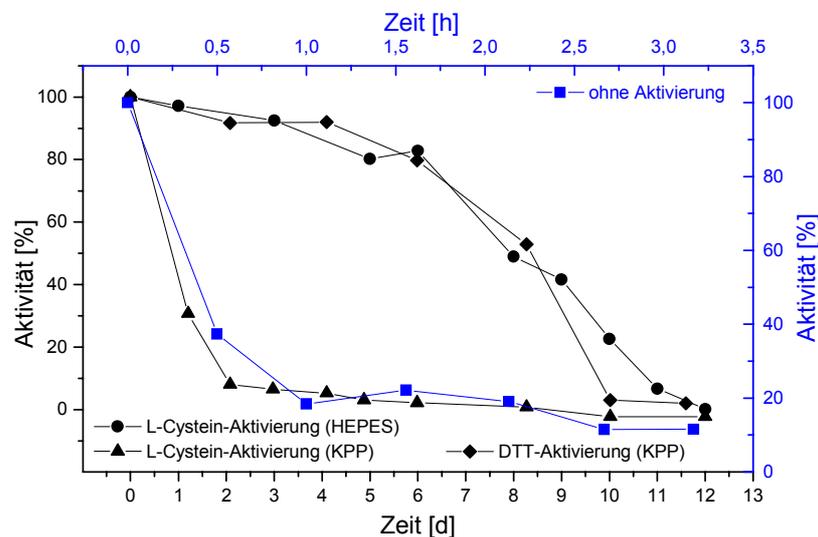


Abbildung 2.34: Langzeitstabilität der stabilisierten und nicht stabilisierten L-Serindehydratase

Während das Enzym ohne stabilisierende Maßnahmen in KPP-Puffer nach 25 min 50 % der Aktivität verliert, konnten nach einer Stabilisierung mit FeSO_4 und DTT in HEPES-Puffer nach 8,5 d noch 50 % Restaktivität gemessen werden (Tabelle 2.6). Die Proben wurden zwischen den Messungen bei RT gelagert.

Tabelle 2.6: Langzeitstabilität aktivierter und nicht aktivierter L-Serindehydratase

Aktivierung	Halbwertszeit der Enzymaktivität
Ohne	25 min
FeSO ₄ , DTT in KPP-Puffer	18 h
FeSO ₄ , DTT in HEPES-Puffer	8,5 d
FeSO ₄ , L-Cystein in HEPES-Puffer	8,5 d

Durch die Optimierungsversuche konnte die Aktivitätszeit der L-Serindehydratase um den Faktor 490 verlängert werden. Dieses war eine Voraussetzung für den Einsatz des Enzyms in bioanalytischen Systemen.

2.8 Isolierung der L-Serindehydratase

Neben der L-Serindehydratase wird von *Paracoccus seriniphilus* eine Vielzahl von Proteinen gebildet. Da in dieser Arbeit auch eine Charakterisierung und Immobilisierung der L-Serindehydratase durchgeführt werden sollte, die durch Fremdproteine behindert würde, war es erforderlich, eine reine Enzymfraktion bereitzustellen. Die Isolierung des Enzyms sollte unter Erhalt der enzymatischen Aktivität mit wenigen effektiven Isolierungsschritten erfolgen. Eine allgemeine Übersicht über die Verfahrensschritte ist in Abbildung 2.35 dargestellt.

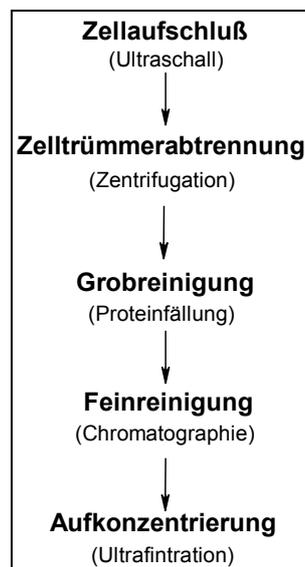


Abbildung 2.35: Übersicht über die Isolierung der L-Serindehydratase

Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben ist der zentrale Eisen-Schwefel-Cluster der L-Serindehydratase sauerstoffempfindlich. Daher wurden sämtliche Puffer zur Enzymisolierung

mit L-Cystein als Reduktionsmittel versetzt und vor der Verwendung in einem Ultraschallbad (Bandelin) für 10 min entgast.

2.8.1 Ammoniumsulfatfällung

Das Ausfällen von Proteinen aus einer Lösung wird in vielen Fällen als erster Schritt zur Aufreinigung von Proteinen eingesetzt [LOTTSPREICH, 1998]. Die Löslichkeit von Proteinen ist insbesondere von den Wechselwirkungen zwischen den Oberflächenresten der Proteine und den Molekülen des Lösungsmittels abhängig. Durch die Zugabe von organischen Lösungsmitteln, Salzen und Polymeren können die Solvatisierungseigenschaften des Lösemittels verändert werden. Es bindet eine große Menge an Wassermolekülen an gelöste Sulfationen, so dass die Anzahl der zur Proteinsolvatisierung zur Verfügung stehenden Wassermoleküle verringert wird. Die Folge ist eine Verstärkung der hydrophoben Wechselwirkungen der Proteinmoleküle untereinander. Sie agglomerieren und fallen aus der Lösung aus [GABLER, 1999]. Die Wahl der jeweiligen präzipitierenden Agenzien richtet sich nach den Fragestellungen, unter welchen Bedingungen das Fällungsmittel wieder entfernt werden kann und welchen Einfluss es auf die biologische Aktivität des Zielproteins hat. Ein sehr schonendes Fällungsmittel ist Ammoniumsulfat, das in Konzentrationen über 0,5 M die biologische Aktivität auch empfindlicher Proteine schützt [LOTTSPREICH, 1998]. Da es mittels Dialyse oder Ionenaustausch leicht abzutrennen ist und zudem preiswert ist, kann es auch für Fällungen aus größeren Volumina eingesetzt werden. Zur Anreicherung des Zielproteins in Form der fraktionierten Fällung wird es in der Regel portionsweise und unter kontrollierten Bedingungen (T, pH) zur Proteinlösung gegeben. Eine Schwierigkeit tritt bei Calcium-abhängigen Enzymen auf, da Calciumsulfat schwer löslich ist. Die L-Serindehydratase aus *Paracoccus seriniphilus* ist nicht Calcium-abhängig, und die Abtrennung des Präzipitates ist gut mittels Zentrifugation möglich (4 °C, 20000 rpm, 15 min).

Aus den oben genannten Gründen wurde auch der erste Schritt der L-Serindehydratase-Isolierung mit Hilfe der Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Das Salz wurde pulverisiert, um eine schnelle Löslichkeit in der Proteinlösung zu erreichen und örtlich hohe Ammoniumsulfat-Konzentrationen zu vermeiden. Dies würde zu einer unspezifischen Proteinfällung führen. Das Ammoniumsulfat wurde fraktioniert zur mit Eis gekühlten und gerührten Proteinlösung aus 10 ml Rohextrakt gegeben, und definierte Sättigungsgrade des Salzes eingestellt (Abbildung 2.36). Nach jedem Fällungsschritt und einer Wartezeit von 30 min zur Gleichgewichtseinstellung zwischen gelösten und ungelösten Proteinen wurde das Präzipitat abzentrifugiert (4 °C, 20000 rpm, 15 min), in 2 ml KPP-Puffer (20 mM, pH 7,6)

gelöst und der Überstand für die weiteren Fällungsschritte eingesetzt. Der Test auf L-Serindehydratase-Aktivität erfolgte nach Anhang 5.9. Eine Entsalzung dieser Proteinlösungen war mittels Ultrafiltration in Vivaspin 20-Konzentratoren (Vivascience) mit einer 10 kDa-Membran möglich (Anhang 5.17). Die Aktivitäten der Fraktionen mit ansteigender Ammoniumsulfatsättigung sind als Anteil an der Gesamtaktivität in Abbildung 2.36 dargestellt.

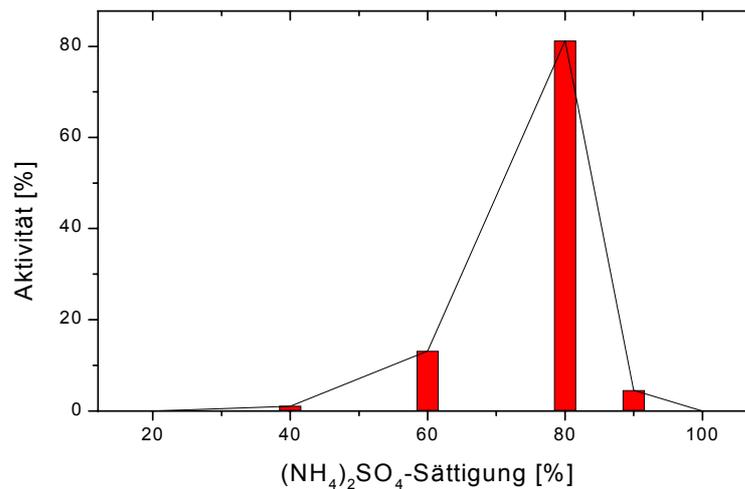


Abbildung 2.36: Anteil der L-Serindehydratase-Aktivität der Fraktionen der Ammoniumsulfatfällung als Anteil der Gesamtaktivität

Bei einer Ammoniumsulfatsättigung zwischen 60-80% wurden über 80% der Gesamtzymaktivität mit einer Aktivität von 30 nkat/mg Protein gefunden. Verglichen mit dem Rohextrakt (7 nkat/mg Protein) konnte eine Aufreinigungsfaktor von 4,3 erreicht werden. Die auf diese Weise erhaltenen Proteinpräzipitate wurden für weitere Aufreinigungsschritte eingesetzt und konnten bei einer Temperatur von -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

2.8.2 Hydroxylapatit-Chromatographie

Für die Isolierung von Proteinen wird oft die Hydroxylapatit-Chromatographie eingesetzt. Hydroxylapatit ist eine kristallisierte Form des Calciumphosphates $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]_2$, an die sowohl saure, als auch basische Proteine adsorbieren können. Für die Proteintrennung werden die unterschiedlichen Molmassen, Ladungsdichten und isoelektrischen Punkte der Proteine ausgenutzt. Die positiv geladenen Aminogruppen wechselwirken mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Kristalle, während Carboxygruppen einerseits elektrostatisch

abgestoßen, andererseits von den Calciumionen komplexiert werden [LOTTSPREICH, 1998]. Die Proteinlösung wird in einem gering konzentrierten Puffer mit niedriger Ionenstärke und neutralem pH-Wert gelöst und auf die stationäre Phase aufgetragen. Die Elution erfolgt über einen Gradienten zu einer ansteigenden Pufferkonzentration hin. Je höher diese Konzentration ist, desto schwächer werden die adsorbierten Proteine gebunden. Diese Methode wurde als zweiter Schritt zur Isolierung der L-Serindehydratase unter Verwendung einer 5 ml-CHT II-Säule (BioRad) eingesetzt. Eine Beschreibung der Säule und des Säulenmaterials befindet sich in Anhang 5.16. Eine optimale Konzentration des Äquilibriumspuffers ist entscheidend für eine gute Trennwirkung auf der Säule. Um diese zu erreichen, wurde die Phosphatkonzentration im Puffer zwischen 1 und 10 mM bei einem konstanten pH-Wert von 7,6 optimiert, wobei zur Stabilisierung der L-Serindehydratase 1 mM L-Cystein hinzugegeben wurde. Zur Elution der Proteine von der Säule diente ein Gradient zu einem 400 mM KPP-Puffer mit pH 6,8, der ebenfalls 1 mM L-Cystein enthielt [KASPER, 2001]. Mit dieser hohen Salzkonzentration konnte eine vollständige Desorption der Proteine von der Säule gewährleistet werden.

Eine Übersicht der Chromatographiebedingungen ist im Folgenden dargestellt:

Puffer A: KPP-Puffer (1-10 mM, pH 7,6) + 1 mM L-Cystein

Puffer B: KPP-Puffer (400 mM, pH 6,8) + 1 mM L-Cystein

Elutionsgradient:

0-15 min: Puffer A

15-55 min: linearer Gradient Puffer A – Puffer B

55-65 min: Puffer B

$\dot{v} = 0,5 \text{ ml/min}$

T = RT

Zur Analytik wurden nach der säulenchromatographischen Trennung zunächst die relativen Lichtabsorptionen der Proteine im Eluat mit einem Durchflussphotometer bei der Summe der relativen Absorptionen bei $\lambda = 254$ und 280 nm bestimmt. Zusätzlich wurde das Eluat nach der Chromatographie zur Bestimmung der L-Serindehydratase-Aktivitäten in 1 ml-Schritten fraktioniert. Die enzymatischen Aktivitäten dieser Fraktionen wurden nach Anhang 5.9

gemessen. Zur photometrischen Analyse der Hydrazone wurden 200 μl der Reaktionslösungen in 96er Mikrotiterplatten gegeben und mit Hilfe eines Mikrotiterplattenlesegerätes bei $\lambda = 550 \text{ nm}$ vermessen.

Die Elution der L-Serindehydratase erfolgte nach einer Retentionszeit von $t = 15 \text{ min}$, wobei die gewünschte Enzymaktivität bei Phosphatkonzentrationen von 5 und 10 mM im ersten Proteinpeak gefunden werden konnte. Bei einer geringeren Pufferkonzentration von 1 mM war dieser Proteinpeak in zwei Peaks aufgespalten (Abbildung 2.37), und die Enzymaktivität konnte im zweiten Peak bei $t = 18 \text{ min}$ detektiert werden. Daher ist bei dieser geringen Pufferkonzentration die beste Trennwirkung zu erreichen. Nach den oben erhaltenen Ergebnissen wurde für weitere Untersuchungen (Puffer A) ein KPP-Puffer (pH 7,6, 1 mM, 1 mM L-Cystein) als Äquilibrierungspuffer gewählt. Die nach dem Chromatographielauf erhaltenen Fraktionen mit den höchsten Enzymaktivitäten wurden gepoolt und für den nächsten Aufarbeitungsschritt eingesetzt.

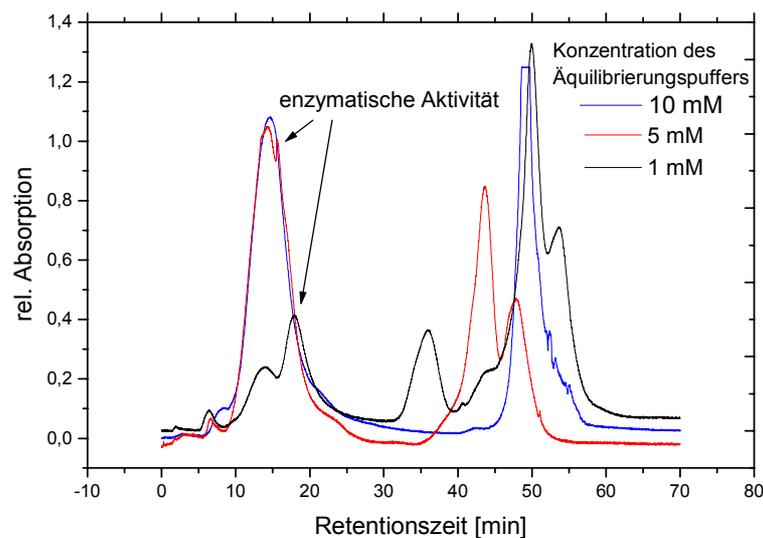


Abbildung 2.37: Optimierung der Konzentration des Äquilibrierungspuffers der Hydroxylapatit-Chromatographie

Insgesamt konnte nach der Optimierung der Hydroxylapatit-Chromatographie ein Aufreinigungsfaktor von 11 erreicht werden. Die spezifische Enzymaktivität ergab sich zu 75 nkat/mg Protein.

2.8.3 Anionenaustausch-Chromatographie

Charakteristisch für Proteine ist ihr amphoterer Charakter. Im sauren pH-Bereich liegen die Aminogruppen, überwiegend Lys, Arg und His, protoniert vor, so dass sich das Protein kationisch verhält. Im basischen pH-Bereich liegt anionisches Verhalten durch negative Ladungen an den Seitenketten von Asp und Glu vor [LOTTSPREICH, 1998], so dass der Gesamtladungszustand von dem pH-Wert der umgebenden Lösung abhängig ist. Diese Eigenschaft lässt sich in Form der Ionenaustausch-Chromatographie zur Isolierung von Proteinen ausnutzen. Im zweiten Schritt zur Aufreinigung der L-Serindehydratase wurde die Anionenaustauschchromatographie eingesetzt. Nachdem das Protein im ersten Schritt an die stationäre Phase bindet, erfolgt die Elution durch eine steigende NaCl-Konzentration in der mobilen Phase, indem das Protein von der Säule verdrängt wird. Bei der stationären Phase (5 ml-High Q-Säule, BioRad) handelt es sich um einen starken Anionenaustauscher mit Trimethylaminoethyl-Gruppen, einer quaternären Ammoniumverbindung (Anhang 5.16). Als Äquilibrierungspuffer wurde ein Phosphatpuffer mit dem optimalen pH-Wert der L-Serindehydratase von 7,6 gewählt. Die Konzentration des Puffers lag bei 20 mM, wie sie üblicherweise bei Ionenaustauschchromatographien gewählt wird [LOTTSPREICH, 1998]. Zur Stabilisierung der enzymatischen Aktivität enthielt der Elutionspuffer zusätzlich 1 mM L-Cystein, und zur vollständigen Elution der Proteine von der stationären Phase wurde ein linearer Gradient bis zu einem NaCl-Gehalt von 1 M eingesetzt. Im Folgenden ist eine Übersicht der Chromatographiebedingungen dargestellt:

Puffer A: KPP-Puffer, 20 mM, pH 7,6 + 1 mM L-Cystein

Puffer B: KPP-Puffer, 20 mM, pH 7,6 + 1 M NaCl + 1 mM L-Cystein

Elutionsgradient:

0-10 min: Puffer A

10-50 min: linearer Gradient Puffer A – Puffer B

50-60 min: Puffer B

$\dot{v} = 2 \text{ ml/min}$

T = RT

Wie Abbildung 2.38 zeigt, wurde die L-Serindehydratase nach einer Retentionszeit von $t = 25 \text{ min}$ von der Säule eluiert.

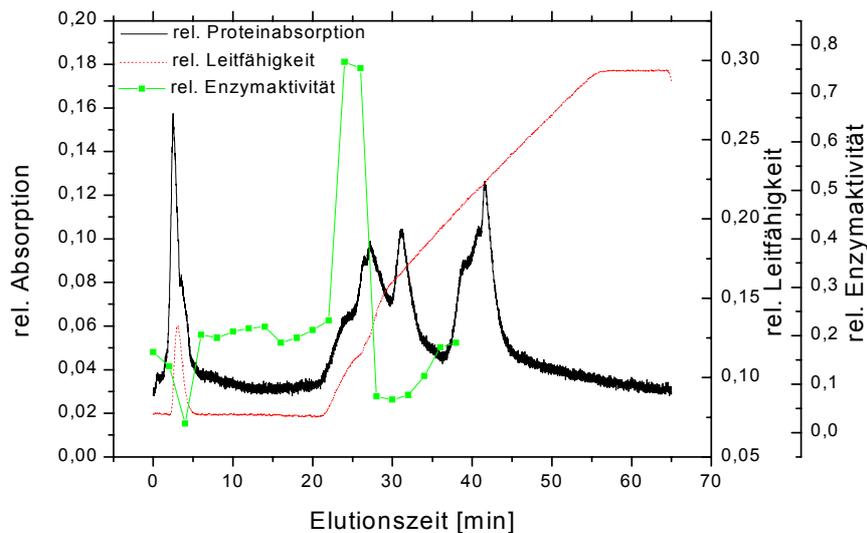


Abbildung 2.38: Elutionsprofil der L-Serindehydratase nach Anionenaustausch auf High Q-Säule

Mit Hilfe eines Probensammlers wurde das Eluat in 4 ml-Schritten fraktioniert und deren jeweilige enzymatische Aktivität nach Kapitel 2.8.2 untersucht. Die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden gepoolt und zur weiteren Aufarbeitung eingesetzt.

2.8.4 Aufkonzentrierung der L-Serindehydratase

Die Proteinkonzentration der nach Kapitel 2.8.3 erhaltenen gepoolten Fraktionen lag bei 35 $\mu\text{g/ml}$, und es wurde für weitere Untersuchungen eine Aufkonzentrierung durchgeführt. Um dieses schnell und effektiv zu erreichen, wurden Vivaspin 20 - Konzentratoren mit einem cut-off von 30 kDa eingesetzt (Anhang 5.17). Auf diese Weise wurde ein Aufkonzentrierungsfaktor der L-Serindehydratase-Fractionen des vorhergehenden Isolierungsschrittes von 50 erreicht. Ein zusätzlicher Effekt dieses Schrittes war die Abtrennung von Verunreinigungen mit einer Molmasse von ≤ 30 kDa.

2.8.5 Gesamtübersicht der L-Serindehydratase-Isolierung

Insgesamt konnte nach den beschriebenen Isolierungsschritten eine Aufkonzentrierung der L-Serindehydratase um den Faktor 72 erreicht werden, wobei die spezifische Aktivität bei 502 nkat/mg Protein lag. Eine Übersicht über die einzelnen Schritte zeigt Tabelle 2.7.

Tabelle 2.7: Aufreinigungsschritte der L-Serindehydratase

Isolierungsschritt	Protein [mg]	nkat	Aktivität [nkat/mg]	Aufreinigungsfaktor
Rohextrakt	140	934	7	1
Ammoniumsulfat-fällung	21	633	30	4
Hydroxylapatit-Chromatographie	1,41	107	75	11
Anionenaustausch-Chromatographie	0,01	6	502	72

Die Gesamtausbeute ist aufgrund der Instabilität des Enzyms gering. Dennoch konnte aufgrund der enzymstabilisierenden Maßnahmen unter aeroben Bedingungen eine vollständige Isolierung der L-Serindehydratase erreicht werden, wie mittels Gelelektrophorese im nächsten Abschnitt gezeigt wird. In der Literatur sind Isolierungen von bakteriellen L-Serindehydratase beschrieben, die unter anaeroben Bedingungen durchgeführt wurden und dennoch in vielen Fällen nur teilweise möglich waren [ZINECKER *et al.*, 1998]. Dies zeigt, dass das in dieser Arbeit untersuchte Enzym stabiler gegen Luftsauerstoff ist, als die oben genannten in der Literatur beschriebenen L-Serindehydratase obwohl es ebenfalls einen Eisen-Schwefel-Cluster als katalytisches Zentrum aufweist. Die spezifische Aktivität des isolierten Enzyms von 502 nkat/mg Protein ist vergleichbar mit den Aktivitäten der L-Serindehydratase von *Clostridium sticklandii* (537 nkat/mg) [ZINECKER, 1998], *Arthrobacter globiformis* (660 nkat/mg) [GANNON *et al.*, 1977] und *Lactobacillus fermentum* (649 nkat/mg) [FARIAS *et al.*, 1991].

2.8.6 Einfluss des L-Cysteins im Elutionspuffer auf die Chromatographie

Die Isolierung der L-Serindehydratase wurde unter stabilisierenden Bedingungen durch Zugabe von L-Cystein zu den Pufferlösungen durchgeführt. Ohne diese Maßnahme konnte die Stabilität des Enzyms während der Chromatographieschritte nicht gewährleistet werden. So zeigt Abbildung 2.39 das Elutionsprofil und den Aktivitätsverlauf der Anionenaustausch-Chromatographie unter Einsatz von 2 ml Rohextrakt ohne Zugabe von L-Cystein. Die Aktivitäten wurden nach Reaktivierung der enzymatischen Aktivität (Kapitel 2.7) in den fraktionierten Proben gemessen.

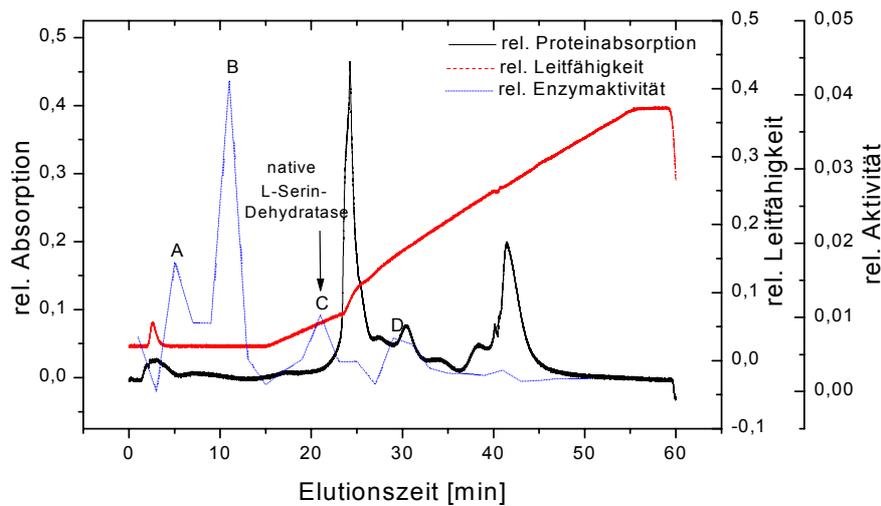


Abbildung 2.39: Elutionsprofil der L-Serindehydratase ohne Aktivierung mit L-Cystein; A-D: Aktivitätspeaks; C: Aktivitätspeak der reinen nativen L-Serindehydratase (Kapitel 2.8.3)

In diesem Profil sind anstatt eines Aktivitätspeaks (vgl. Kapitel 2.8.3) vier Peaks erkennbar, von denen nach Vergleich mit Abbildung 2.38 die native L-Serindehydratase in Peak C dargestellt ist. Dieser Peak ist verhältnismäßig klein, während Peak B die höchste Aktivität aufweist. Da ohne Zugabe eines Reduktionsmittels zum Elutionspuffer eine Reduktion oxidierter Eisen-Schwefel-Cluster im Enzym nicht möglich ist, wird vermutet, dass es sich bei den vier erhaltenen Peaks um unterschiedlich oxidierte Formen der L-Serindehydratase handelt. Diese würden auf der Anionenaustauschsäule verschiedene Bindungsstärken zeigen und somit zu unterschiedlichen Retentionszeiten eluieren. Nach Reaktivierung des Enzyms konnte die katalytische Aktivität des zentralen Clusters wiederhergestellt werden. Zur Unterstützung dieser Vermutung wurde eine gelelektrophoretische Untersuchung (SDS-PAGE) der Eluatfraktionen mit der höchsten enzymatischen Aktivität (Peak B) durchgeführt. Auf dem erhaltenen Gel (12% Polyacrylamid) in Abbildung 2.40 ist die Bande eines Protein mit einer Molmasse von 40 kDa zu erkennen, was exakt der Größe der α -Untereinheit der L-Serindehydratase entspricht (Kapitel 2.9.2). Die β -Untereinheit mit einer Molmasse von 14,5 kDa ist aufgrund der geringen Größe auf diesem Gel nicht sichtbar.

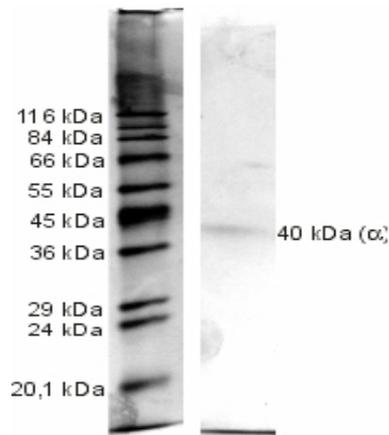


Abbildung 2.40: SDS-PAGE-Analyse des Isolates von Peak B

Die untersuchte Enzymfraktion ist abgesehen von einer kleinen Verunreinigung bei einer Molmasse von ca. 62 kDa nach der Anionenaustausch-Chromatographie als einzigem Isolierungsschritt sehr rein. Dennoch eignet sich das hier durchgeführte Verfahren ohne Enzymstabilisierung nicht als Aufreinigungsschritt für die L-Serindehydratase, da die erhaltenen Enzymaktivitäten im Vergleich zur Aufreinigung unter stabilisierenden Bedingungen nur bei 5,5 % lagen.

2.9 Enzymcharakterisierung

Um eine effiziente L-Serin-Analytik aufbauen zu können wurden die Charakteristika der L-Serindehydratase aus *Paracoccus seriniphilus* untersucht und die erhaltenen Ergebnisse mit denen bekannter L-Serindehydratase verglichen. Die Untersuchungen umfassten die Cofaktorabhängigkeit, Molmassenbestimmung, pH-Wert und Temperaturoptimierung, Enzymkinetik und Experimente zur Enzyminhibierung.

2.9.1 Cofaktor-Abhängigkeit der L-Serindehydratase

Bei Untersuchungen zur Stabilisierung der enzymatischen Aktivität in Kapitel 2.7 konnte gezeigt werden, dass sowohl Fe^{2+} /DTT oder Fe^{2+} /L-Cystein, als auch Pyridoxalphosphat einen stabilisierenden Effekt auf die L-Serin-umsetzende Enzymaktivität des *Paracoccus seriniphilus* – Rohextraktes aufweisen. Bakterielle L-Serindehydratase sind gewöhnlich von Pyridoxalphosphat unabhängig, aber es ist bekannt, dass von Pyridoxalphosphat abhängige L-Threonindehydratase in einer Nebenreaktion L-Serin zu Pyruvat umsetzen [HOFMEISTER, 1993]. Daher wurde das Auftreten eines solchen Enzyms in *Paracoccus seriniphilus* überprüft. Dazu wurde eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt und das Eluat in 4 ml-Schritten fraktioniert. Diese Fraktionen wurden, wie in Kapitel 2.7 beschrieben ist, zur

Aktivierung Pyridoxalphosphat-abhängiger Enzyme mit Pyridoxalphosphat versetzt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der L-Serin-umsetzenden Enzymaktivitäten (Kapitel 5.9, 5.10), deren Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit von der Elutionszeit in Abbildung 2.41 dargestellt ist.

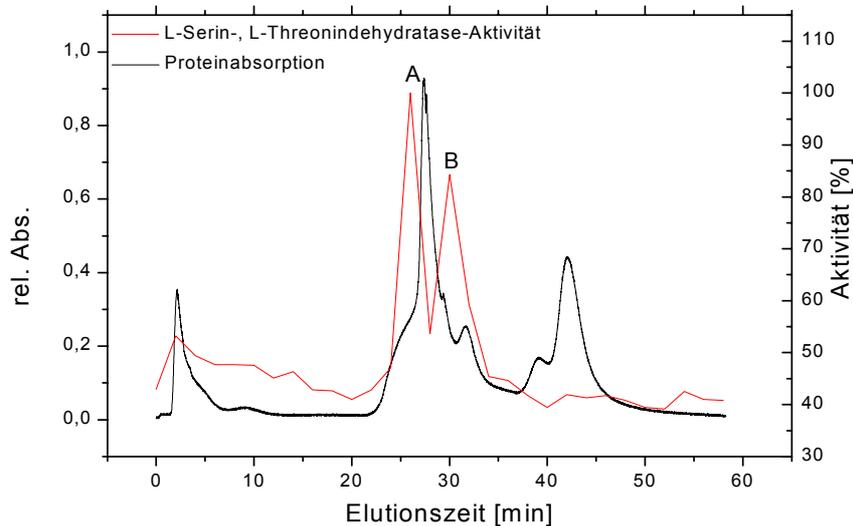


Abbildung 2.41: L-Serin- (Peak A) und L-Threonindehydratase-Aktivität (Peak B) nach Anionenaustausch-Chromatographie und Aktivierung der Fraktionen mit FeSO_4 /L-Cystein und PLP

Es sind zwei Aktivitätspeaks (A und B) erkennbar, von denen der Peak B nur nach Aktivierung mit PLP Aktivität aufzeigte und sowohl mit L-Serin, als auch mit L-Threonin als Substrat erhalten wurde. Dieses zeigt, dass das PLP-abhängige Enzym beide Verbindungen umzusetzen vermag, was eine Eigenschaft von L-Threonindehydratase ist. Diese Enzyme (EC 4.2.1.16) setzen L-Threonin zu α -Ketobutyrat und Ammonium um und wurden aus Säugetierzellen, Pilzen, Algen und Bakterien isoliert (BRENDA-Datenbank). Im Gegensatz zu L-Serindehydratase sind sie in den meisten Fällen Eisen-unabhängig und Pyridoxalphosphat-abhängig. Aufgrund der fehlenden Substratspezifität sind sie für technische Anwendungen in bioanalytischen Systemen wenig geeignet, spielen aber in der Natur zusammen mit den L-Serindehydratase eine wichtige Rolle beim L-Threonin- und L-Serin-Metabolismus. Peak A in Abbildung 2.41 wies ausschließlich Aktivität gegen L-Serin als Substrat auf (vgl. Kapitel 2.8.3) und stellt die spezifisch L-Serin umsetzende L-Serindehydratase dar. Eine Zusammenfassung der Versuchsergebnisse ist in Tabelle 2.8 aufgeführt.

Tabelle 2.8: Einfluss von Enzymaktivierungen auf L-Serin- und L-Threonindehydratase-Aktivität

Aktivierung	Substrat	L-Serindehydratase-Aktivität (Peak A)	L-Threonindehydratase-Aktivität (Peak B)
FeSO ₄ /DTT	L-Serin	+	-
PLP	L-Serin	+	+
PLP	L-Threonin	-	+

Die eisenabhängige L-Serindehydratase in Peak A sollte durch Pyridoxalphosphat-inhibierende Substanzen nicht inhibiert werden, zu denen die nucleophilen Verbindungen NaBH₄ und Phenylhydrazin gehören [ZINECKER *et al.*, 1998]. Diese Substanzen wurden in Konzentrationen von 5 mM zur mittels Anionenaustauschchromatographie von der L-Threonindehydratase getrennten L-Serindehydratase gegeben. Nach einer Inkubation für $t = 10$ min bei $T = 4$ °C zeigte sich im Vergleich zur Referenzprobe ohne Zugabe dieser nucleophilen Verbindungen keine Inhibierung. Dieses Ergebnis weist eindeutig darauf hin, dass die L-Serindehydratase in Peak A der in Abbildung 2.41 kein Pyridoxalphosphat als Cofaktor benötigt.

Es zeigte sich, dass mit Hilfe der Anionenaustausch-Chromatographie (Kapitel 2.8.3) die L-Threonindehydratase von der L-Serindehydratase abgetrennt werden kann. Auf diese Weise kann sichergestellt werden, dass bei Untersuchungen mit der isolierten L-Serindehydratase keine Verfälschung der Versuchsergebnisse durch die L-Serin - umsetzende Nebenreaktion der L-Threonindehydratase erfolgt.

2.9.2 Molmassenbestimmung der L-Serindehydratase

Zur Überprüfung der Reinheit von Proteinen und Molmassenbestimmung von Proteinen hat sich die Gelelektrophorese als Standardmethode etabliert. Hier wandern geladene Teilchen in einem elektrischen Feld in einem Gel, wobei die Ladung und Größe der Teilchen einen Einfluss auf die elektrophoretische Beweglichkeit haben. Das Probengemisch wird daher in Zonen aufgetrennt, die angefärbt werden und als Banden sichtbar sind. Mit Hilfe eines Kalibrierungsgemisches aus bekannten Proteinen kann eine Größenordnung der Zielproteine durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurden Fertiggele (20 % Polyacrylamid) und das Phast-System der Firma Pharmacia verwendet. Die Durchführung erfolgte nach der Methode von WEBER & OSBORN (1969), wobei die zu untersuchenden Enzymproben zunächst 1:1 mit SDS-Puffer (Anhang 5.19) versetzt und für 5 min bei 100 °C inkubiert wurden. Nach anschließender Zentrifugation für 3 min bei 10000 g wurden die Proben gelelektrophoretisch

untersucht und die Proteinbanden mittels Silberfärbung nach BLUM *et al.* (1987) angefärbt. Abbildung 2.42 zeigt die gelelektrophoretische Analyse der Aufreinigungsschritte der L-Serindehydratase.

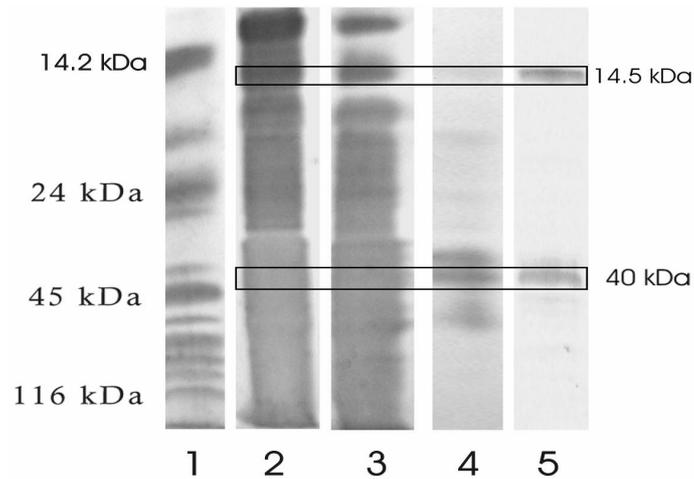


Abbildung 2.42: SDS-PAGE-Analyse (20% Polyacrylamid) der Aufreinigungsschritte der L-Serindehydratase (1: Größenstandard; 2: Rohextrakt (1:20), 3: Ammoniumsulfatfällung, 4: Hydroxylapatit-Chromatographie, 5: Anionenaustausch-Chromatographie (nach 50facher Aufkonzentrierung); Silberfärbung [LAROCHE *et al.*, 2002].

In Abbildung 2.43 ist die Größenkalibration des Molmassenstandards abgebildet.

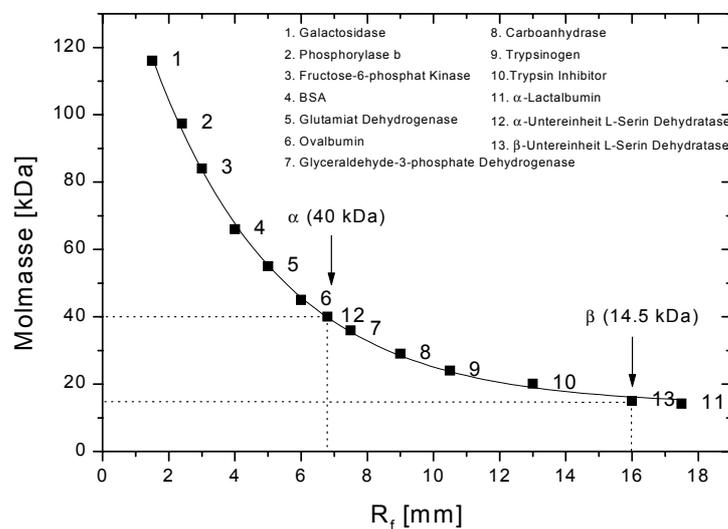


Abbildung 2.43: Kalibrationskurve des Größenstandards der Gelelektrophorese in Abbildung 2.42

Das isolierte Enzym weist zwei Proteinbanden der Molmassen 14,5 und 40 kDa auf. Da der letzte Schritt der Enzymisolierung eine Ultrafiltration mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa war, stellt das 14,5 kDa-Protein ein Fragment der L-Serindehydratase dar. Bestätigt wird diese Vermutung durch Literaturangaben, nach denen Enzyme mit Eisen-Schwefel-Clustern durch

die Einwirkung des SDS bei der Probenvorbereitung zur Gelelektrophorese in ihre Untereinheiten aufgespalten werden [ZINECKER, *et al.*, 1998]. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass es sich bei den beiden Proteinbanden des isolierten Enzyms um zwei Untereinheiten handelt. Eine quantitative Aussage über die Zusammensetzung des nativen Enzyms aus den Untereinheiten kann mit Hilfe der Gelelektrophorese nicht gemacht werden. Um die Gesamtmolmasse zu bestimmen, wurde daher eine Gelfiltration mit Sephacryl S-100 HR durchgeführt (Kapitel 2.9.2). Dieses hydrophile Gel (Abbildung 2.44) mit einer hohen mechanischen Stabilität wird durch kovalentes Crosslinking von Allyldextran mit N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt. [AMERSHAM, 1998]. Das Prinzip der Proteintrennung beruht darauf, dass kleine Proteine leichter in die Poren des Säulenmaterials eindringen als große und ihnen daher ein verhältnismäßig größeres Volumen zur Verfügung steht. Die Folge ist, dass kleine Proteine längere Retentionszeiten aufweisen als große.

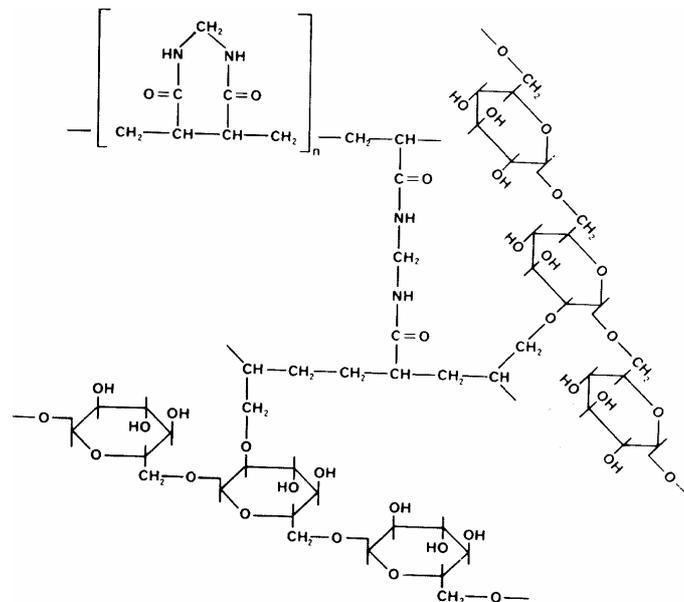


Abbildung 2.44: Hypothetische Teilstruktur von Sephacryl HR [AMERSHAM, 1998]

Zur Molmassen-Analytik der L-Serindehydratase kam eine Säule der Größe 70 * 2,5 cm zum Einsatz, wobei die stationäre Phase aus Sephacryl S-100 HR bestand. Dieses Material zeichnet sich dadurch aus, dass eine Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molmasse zwischen 1 kDa und 100 kDa möglich ist [AMERSHAM, 1998]. Die Detektion der Proteine erfolgte photometrisch bei der Summe der relativen Absorptionen bei $\lambda = 254$ und 280 nm mit einem Messintervall von 2 min. Zur Kalibrierung dienten 2 ml eines Gemisches UV-aktiver Proteine bekannter Molmassen, die in Tabelle 2.9 mit den jeweils eingesetzten

Konzentrationen aufgeführt sind. Als Äquilibrierungs- und Elutionspuffer wurde ein KPP-Puffer (100 mM, pH 7,5) eingesetzt.

Tabelle 2.9: UV-aktive Proteine zur Kalibration der Gelfiltrationssäule

Protein	Molmasse [kDa]	Konzentration [mg/l]
Lactoferrin	80	0,40
BSA	67	0,40
Dextran	39,1	0,40
α -Lactalbumin	14,4	0,50
Vitamin B ₁₂	1,3	0,02

Die Kalibrationskurve in Abbildung 2.45 stellt die Molmassen der Referenzproteine gegen die Retentionszeiten dar und weist einen linearen Zusammenhang im betrachteten Molmassenbereich von 80 kDa bis 1,3 kDa auf.

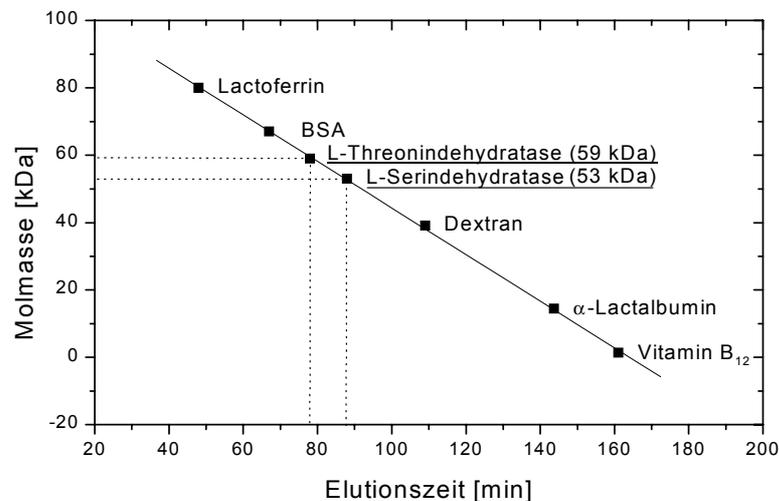


Abbildung 2.45: Kalibrationskurve UV-aktiver Substanzen zur Molmassenbestimmung der nativen L-Serindehydratase mittels Sephacryl S-100 Gelelektrophorese

Zur chromatographischen Detektion der Molmasse wurden 2 ml Rohextrakt bei RT auf die Säule aufgetragen und die enzymatische Aktivität des in 4 ml-Schritten fraktionierten Eluates nach Kapitel 2.8.2 bestimmt (Abbildung 2.46). Mit L-Threonin als Substrat wies die native L-Threonindehydratase ein Aktivitätsmaximum bei einer Retentionszeit von 78 min auf, was nach der Kalibration in Abbildung 2.45 einer Molmasse von 59 kDa entspricht. Damit liegt

dieser Wert deutlich über der Molmasse der mit L-Serin als Substrat detektierten L-Serindehydratase. Diese weist ein Aktivitätsmaximum bei einer Retentionszeit von 87 min auf, so dass sich die Molmasse zu 53 kDa ergibt.

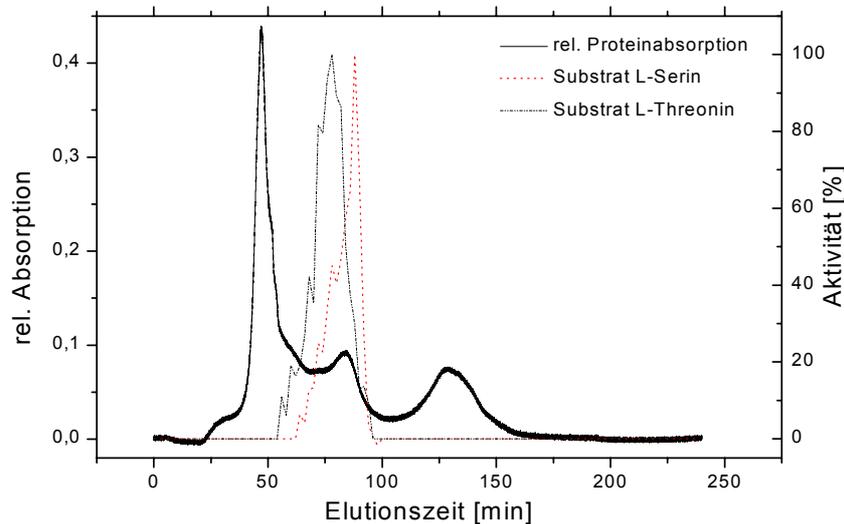


Abbildung 2.46: Elutionsprofil der L-Serindehydratase bei Sephacryl S-100 Gelfiltration. Darstellung der L-Serindehydratase- und L-Threonindehydratase-Aktivität

Dieser Wert stimmt gut mit der Summe der Molmassen der mittels Gelelektrophorese detektierten Untereinheiten von 14,5 und 40 kDa überein. Die native L-Serindehydratase besteht daher aus einem Heterodimer dieser Untereinheiten. Ein Vergleich der Untereinheitenstruktur mit isolierten L-Serindehydratasen aus anderen Organismen ist in Tabelle 2.10 dargestellt. Mit einer Molmasse von 53 kDa liegt das in dieser Arbeit untersuchte Enzym im unteren Größenbereich der bekannten L-Serindehydratasen. Vergleichbar sind diejenigen aus *Escherichia coli* mit 50 kDa [SU *et al.*, 1993] und *Pseudomonas cepacia* mit 60 kDa [WONG & LESSIE, 1979]. Auch aus der Ratte ist eine L-Serindehydratase mit einer Molmasse zwischen 60 und 68 kDa bestehend aus einem Dimer von Untereinheiten isoliert worden [SIMON *et al.*, 1973]. Andere L-Serindehydratasen weisen höhere Molmassen von bis zu 250 kDa auf (*Clostridium sticklandii*) [BRENDA-Datenbank].

Tabelle 2.10: Vergleich der Molmassen und Struktur der Untereinheiten verschiedener L-Serindehydratasen;
k.A.: keine Angabe

Organismus	Molmasse [kDa]	Untereinheiten [kDa]	Referenz
<i>Paracoccus seriniphilus</i>	53	1*40, 1*14,5 Heterodimer	
<i>Clostridium sticklandii</i>	250	4*27, 4*30 Heterooctamer	[BRENDA-Datenbank]
<i>Clostridium propionicum</i>	230	4*26, 4*30 Heterodimer oder Heterooctamer	[HOFMEISTER <i>et al.</i> , 1993]
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	200	4*25, 4*30 Heterodimer bis Heterooctamer	[GRABOWSKI & BUCKEL, 1993]
<i>Lactobacillus fermentum</i>	150	4*40 Tetramer	[FARIAS <i>et al.</i> , 1991]
<i>Corynebacterium glycinophilum</i>	130	k.A.	[BRENDA-Datenbank]
<i>Clostridium acidi-urici</i>	72	k.A.	[CARTER & SAGERS, 1972]
Ratte	68, 64, 60	2*35 Dimer	[SIMON <i>et al.</i> , 1973]
<i>Pseudomonas cepacia</i>	60	k.A.	[WONG & LESSIE, 1979]
<i>Escherichia coli</i>	50	k.A.	[SU <i>et al.</i> , 1993]

Die Massendifferenz der oben ermittelten Molmasse des nativen Enzyms (53 kDa) und der Summe der Massen der Untereinheiten (54,5 kDa) beträgt 1,5 kDa, was mit Ungenauigkeiten bei der Molmassenbestimmung zu erklären ist. So ist der Aktivitätspeak der L-Serindehydratase sehr breit, da beim Chromatographievorgang Rückvermischungen auf der Gelfiltrationssäule auftreten, die zu einer Peakverbreiterung führen. Weiterhin können Ungenauigkeiten bei der Größenbestimmung der Untereinheiten mittels Gelfiltration auftreten.

2.9.3 pH-Wert und Temperaturoptimierung

Der pH-Wert einer Proteinlösung hat einen Einfluss auf den Ladungszustand ionisierbarer Aminosäureseitenketten der Proteine und somit auf die Aktivität von Enzymen und die Substratbindung. Die Aktivität jedes Enzyms weist ein Optimum bei einem bestimmten pH-Wert bzw. pH-Bereich auf, bei dem in der Regel die Enzymaktivität gemessen wird. Um das pH-Optimum über einen weiten pH-Bereich zu bestimmen, ist die Wahl eines geeigneten Puffersystems von Bedeutung, das im betreffenden pH-Bereich eine ausreichende Pufferwirkung aufweist [LOTTSPREICH, 1998]. Die pH-Optimierung der L-Serindehydratase erfolgte im Bereich zwischen pH 5,8 und pH 9,1, wobei von pH 5,8 bis pH 8,2 ein Phosphatpuffer (20 mM), und bei höheren Werten ein Tris-Puffer (20 mM) eingesetzt wurde. Der Übergangspunkt zwischen beiden Puffersystemen wurde bei pH 8,2 mit beiden Puffern gemessen, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. Das resultierende Ergebnis ist in Abbildung 2.47 (links) dargestellt und zeigt ein Aktivitätsoptimum der L-Serindehydratase bei pH 7,6. Bei diesem Wert wurden alle Aktivitätsbestimmungen des Enzyms in dieser Arbeit durchgeführt.

Neben dem pH-Wert ist auch die Temperatur von entscheidender Bedeutung für die Aktivität von Enzymen, da, wie bei allen chemischen Reaktionen, die Geschwindigkeit der enzymatischen Umsetzung nach der Arrhenius-Gleichung mit steigender Temperatur ansteigt. Wie alle Proteine sind Enzyme thermolabil. Sie werden in der Hitze denaturiert und verlieren ihre Aktivität. Daher setzt sich die temperaturabhängige Aktivität eines Enzyms aus der Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Temperaturerhöhung und der Thermolabilität zusammen. Das Temperaturoptimum der L-Serindehydrataseaktivität wurde unter Verwendung von KPP-Puffer (20 mM) unmittelbar nach Einstellung der Messtemperatur gemessen (Abbildung 2.47 (rechts)).

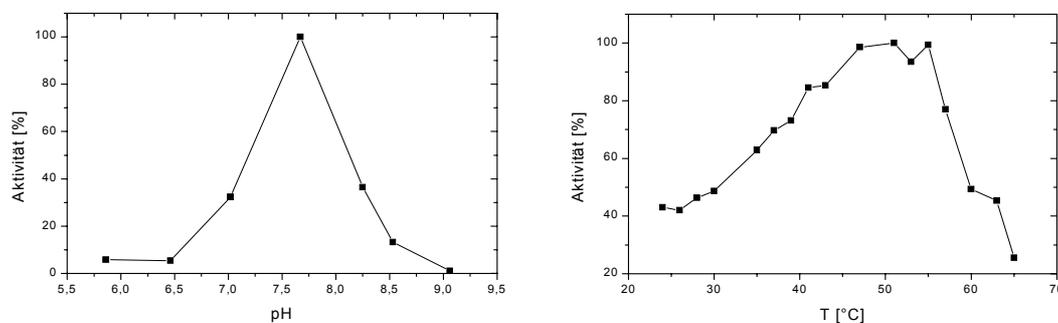


Abbildung 2.47: Optimierung des pH-Wert (links) und Temperatur (rechts) der L-Serindehydratase

Als optimale Temperatur wurde $T = 51\text{ °C}$ gefunden. Sie wurde, wenn nicht anders angegeben, bei den Enzymtests in dieser Arbeit eingesetzt.

2.9.4 Enzymkinetik

Zur Ermittlung kinetischer Daten einer enzymatischen Reaktion wird die Reaktionsgeschwindigkeit V zum Zeitpunkt $t = 0$ für verschiedene Substratkonzentrationen $[S]$ bei konstanter Gesamtzymkonzentration $[E_0]$ ermittelt. Diese Werte ergeben in einer direkten Auftragung V gegen $[S]$ einen in Abbildung 2.48 dargestellten Verlauf, deren obere Asymptote der maximalen Geschwindigkeit V_{\max} entspricht. K_M bezeichnet die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit.

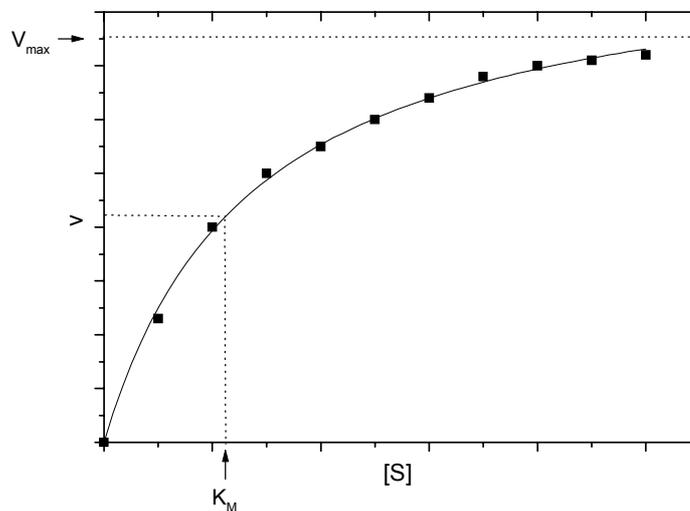


Abbildung 2.48: Enzymkinetik, direkte Auftragung V gegen $[S]$

Da die Asymptotenbildung sehr ungenau ist, erfolgt die Datenauswertung mittels linearisierter Beziehungen. Von diesen ist die Lineweaver-Burk-Darstellung nach Gleichung 2.3 die am weitesten verbreitete.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Gleichung 2.3

V : Reaktionsgeschwindigkeit, V_{\max} : maximale Reaktionsgeschwindigkeit, $[S]$: Substratkonzentration, K_M : Michaelis-Konstante

Die Steigung dieser Geraden entspricht dem Quotienten K_M / V_{\max} und der Y-Achsen-Abschnitt $1 / V_{\max}$ (Abbildung 2.49).

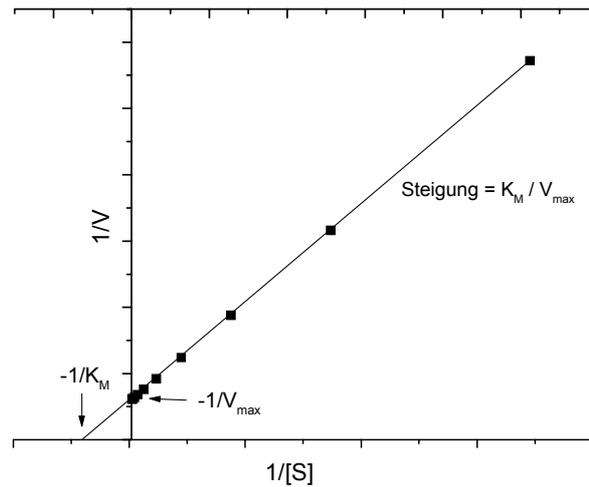


Abbildung 2.49: Enzymkinetik, Auftragung nach Lineweaver-Burk [WIEMANN, 2000]

Ein Nachteil dieser Auftragung ist die hohe Gewichtung kleiner Substratkonzentrationen, deren Messpunkte weit auseinander liegen. Daher haben Messfehler in diesem Bereich einen großen Einfluss auf die berechneten kinetischen Daten. Dieses kann verhindert werden, wenn Gleichung 2.3 nach Hanes mit der Substratkonzentration multipliziert wird (Gleichung 2.4).

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

Gleichung 2.4

Die Auftragung von $[S]/V$ gegen $[S]$ liefert als Steigung $1/V_{\max}$, als y-Achsenabschnitt K_M/V_{\max} und als x-Achsenabschnitt $-K_M$ (Abbildung 2.50).

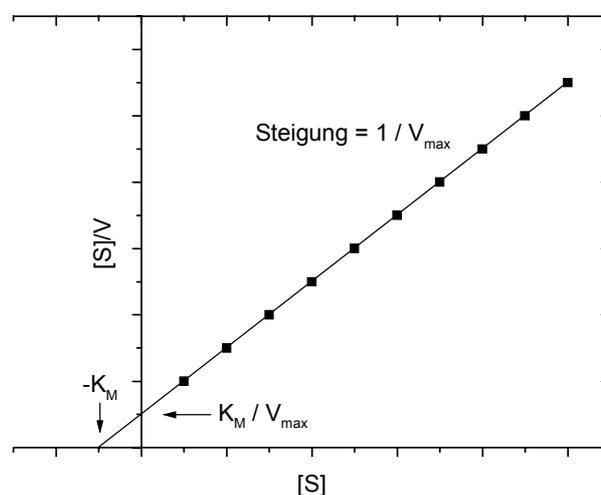


Abbildung 2.50: Enzymkinetik, Auftragung nach Hanes [WIEMANN, 2000]

Diese Auftragung hat den Nachteil, dass $[S]$ einen Einfluss auf beide Achsen hat. Da allerdings in der Regel $[S]$ genauer bestimmt ist als V kann dieser Faktor meistens vernachlässigt werden.

Die dritte Methode zur Bestimmung der kinetischen Daten ergibt sich nach Eadie-Hofstee nach Multiplikation von Gleichung 2.3 mit $V \cdot V_{\max}$ (Gleichung 2.5).

$$V = -\frac{K_M \cdot V}{[S]} + V_{\max} \quad \text{Gleichung 2.5}$$

Die Geradenauftragung von V gegen $V/[S]$ liefert $-K_M$ als Steigung, V_{\max} als Y-Achsenabschnitt und V_{\max}/K_M als x-Achsenabschnitt (Abbildung 2.51).

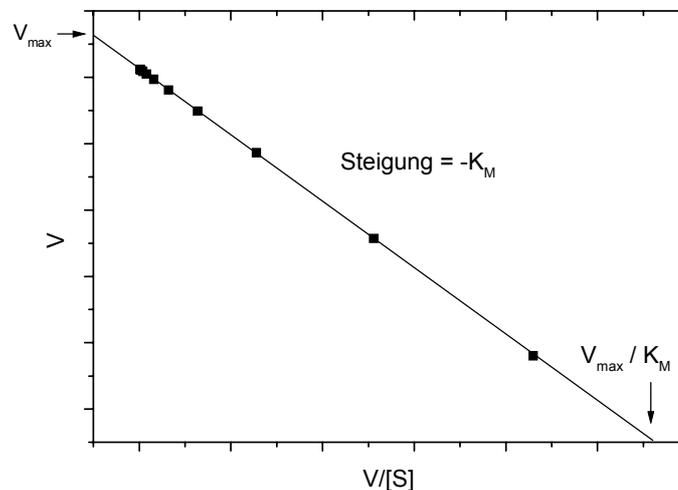


Abbildung 2.51: Enzymkinetik, Auftragung nach Eadie-Hofstee [WIEMANN, 2000]

Bei der Auftragung nach Eadie-Hofstee geht V in beide Koordinaten ein, so dass die erhaltenen kinetischen Daten weniger genau als die nach Hanes sind.

Zur Beschreibung der Kinetik der L-Serindehydratase aus *Paracoccus seriniphilus* wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten der enzymatischen L-Serinumsetzung gegen die Substratkonzentration zwischen 0 und 25 mmol/l aufgetragen (Abbildung 2.52).

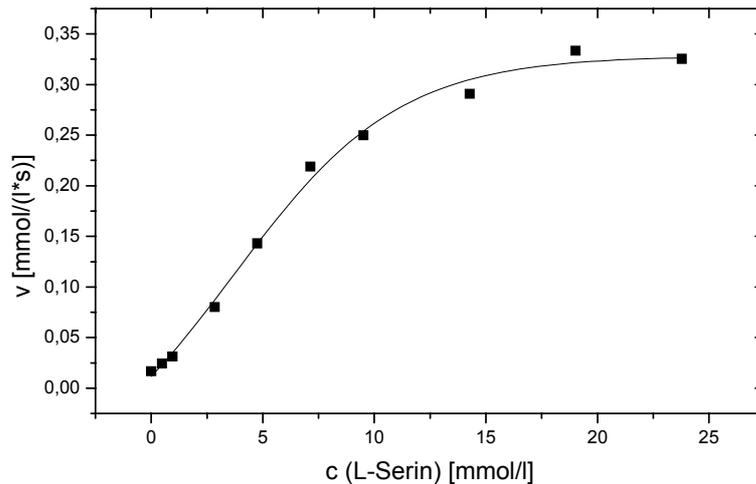


Abbildung 2.52: Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen L-Serinumsetzung gegen [S]

Der resultierende Graph zeigt einen sigmoiden Verlauf, was im Gegensatz zum Michaelis-Menten-Modell steht, dem die meisten Enzyme zuzuordnen sind. Eine Erklärung für den Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit der L-Serindehydratase konnte bisher nicht gefunden werden. Eine Diffusionshemmung wird allerdings ausgeschlossen, da der gemessene Verlauf sowohl unter Einsatz von Rohextrakten, als auch des isolierten Enzyms beobachtet werden konnte. Daher wurden zur weiteren Berechnung der kinetischen Daten nur die Reaktionsgeschwindigkeiten für $c(\text{L-Serin}) \geq 7 \text{ mM}$ aufwärts herangezogen. Während nichtbakterielle L-Serindehydratasen in der Regel K_M -Werte von 70 bis 100 mM (Ratte) aufweisen [BRENDA-Datenbank], liegen die K_M -Werte bakterieller L-Serindehydratasen überwiegend zwischen 5 und 8 mM [BRENDA-Datenbank]. Der niedrigste Wert wurde mit 0,8 mM für die L-Serindehydratase aus *Peptostreptococcus asaccharolyticus* ermittelt [BRENDA-Datenbank]. Aufgrund des sigmoiden Verlaufes der Reaktionsgeschwindigkeiten ist der K_M -Wert für die L-Serindehydratase aus *Paracoccus seriniphilus* nur näherungsweise zu bestimmen. Er ergibt sich zu 5,1 bis 7,1 mM. V_{\max} berechnet sich zu ca. 0,43 $\mu\text{mol}/(\text{l*s})$. Auch nach Hanes und Hofstee sind die kinetischen Daten nur unter ausschließlicher Berücksichtigung der Reaktionsgeschwindigkeiten von $c(\text{L-Serin}) \geq 7 \text{ mM}$ (Tabelle 2.11) zu ermitteln.

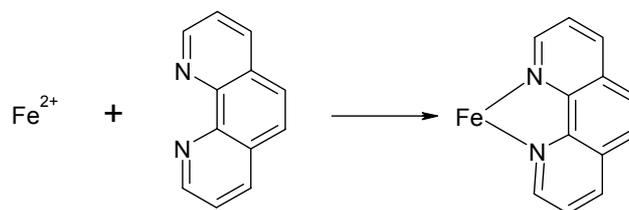
Tabelle 2.11: kinetische Daten der nicht gehemmten L-Serindehydratase berechnet nach Hanes, Lineweaver-Burk und Hofstee

	Hanes	Lineweaver-Burk	Hofstee
K_M [mM]	6,62	7,15	6,97
V_{max} [$\mu\text{mol}/(\text{l}\cdot\text{s})$]	0,43	0,44	0,44
R	0,99	0,99	0,97

Die kinetischen Daten der drei Linearisierungsmöglichkeiten liegen im gleichen Wertebereich. Unterschiede sind durch die verschiedene Genauigkeiten der Rechenverfahren bedingt.

2.9.5 Inhibierung der L-Serindehydratase

Die Hemmung der Aktivität von Enzymen durch kleine Moleküle und Ionen stellt in biologischen Systemen einen wichtigen Kontrollmechanismus dar [STRYER, 1999]. Außerdem lassen Hemmungen Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus von Enzymen zu. So konnte in Kapitel 2.9.1 gezeigt werden, dass die L-Serindehydratase kein Pyridoxalphosphat als Cofaktor benötigt, da dieses durch die nucleophilen Substanzen NaBH_4 und Phenylhydrazin inaktiviert wird [ZINECKER, 1998] und dieser Effekt bei der L-Serindehydratase nicht beobachtet werden konnte. Dagegen lässt sich das Enzym mit Fe^{2+} aktivieren und stabilisieren, da es im katalytischen Zentrum einen Eisen-Schwefel-Cluster enthält. Das in diesen enthaltene Eisen wird durch Zugabe von 1 mM EDTA oder Phenanthrolin zum Enzymassay chelatisiert (Abbildung 2.53), was in einer Enzymhemmung resultiert.

Abbildung 2.53: Chelatisierung von Fe^{2+} mit o-Phenanthrolin

Dagegen hat das Kupfer-chelatisierende Agens Neocuproin keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der L-Serindehydratase (Abbildung 2.54). Diese Einflüsse von EDTA und Neocuproin bestätigen die oben dargestellten Ergebnisse (Kapitel 2.2.1), nach denen die enzymatische Umsetzung von L-Serin zu Pyruvat am enzymgebundenen Eisen-Schwefel-Cluster der L-Serindehydratase stattfindet. Phenylhydrazin und Ammoniumsulfat haben

keinen inhibierenden Einfluss auf die enzymatische Aktivität. DNPH und Ethanolamin üben einen geringen aktivierenden Effekt aus (Abbildung 2.54).

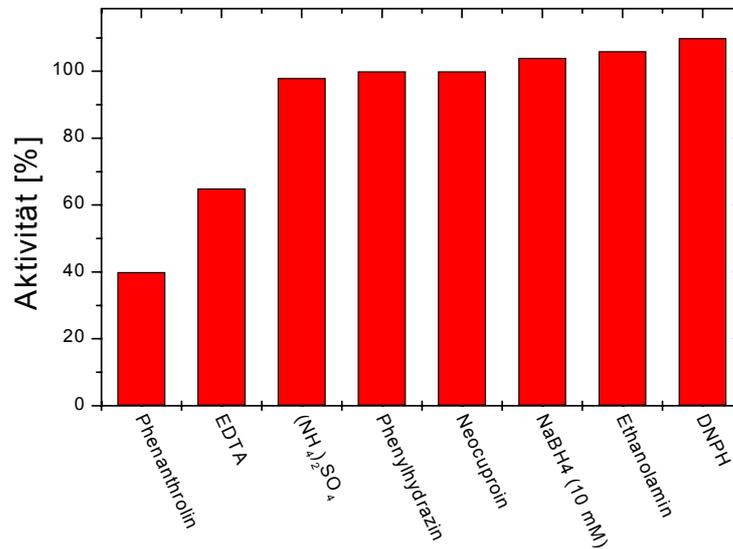


Abbildung 2.54: Inhibitionseigenschaften verschiedener chemischer Verbindungen (1 mM) auf die L-Serindehydratase-Aktivität

Von den getesteten Metallsalzen (Abbildung 2.55) ist Cu^{2+} der beste Inhibitor. In einer Konzentration von 1 mM im Enzymassay wurde eine Restenzymaktivität von nur 33% gefunden. Dieser Effekt könnte durch eine Oxidation des Fe-S-Clusters hervorgerufen werden. Aufgrund des geringeren Standardpotentials weisen Kationen wie Mn^{2+} und Mg^{2+} in Konzentration von 1 mM einen geringeren inhibierenden Effekt auf, während Al^{3+} , Co^{2+} , NH_4^+ , Na^+ und Zn^{2+} nur einen sehr geringen Einfluss haben.

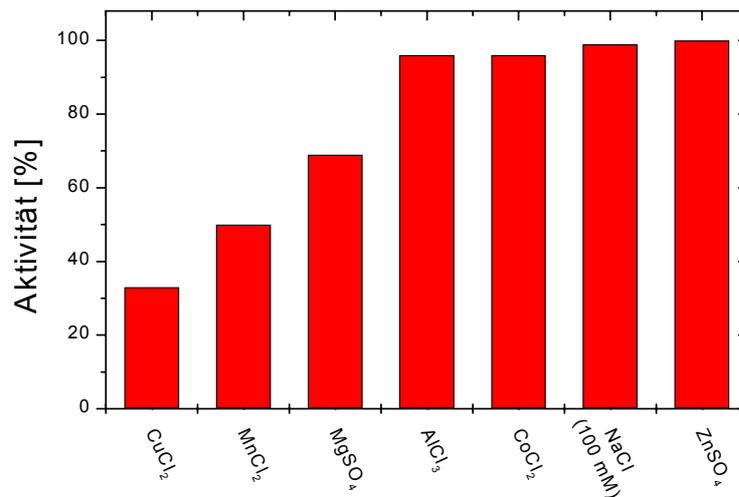


Abbildung 2.55: Inhibitionseigenschaften von Metallsalzen auf die L-Serindehydratase-Aktivität

Aminosäuren weisen überwiegend Inhibitionen zwischen 0 und 20 % der enzymatischen Aktivität bei einer Konzentration von 10 mM im Enzymassay auf (Abbildung 2.56). Eine Ausnahme bildet das L-Cystein, das in dieser Konzentration nur eine Enzymaktivität von 10 % zur Folge hat. Dieses Ergebnis ist überraschend, da diese Aminosäure in einer niedrigen Konzentration von 1 mM die enzymatische Aktivität stabilisiert. Sie scheint daher einen stabilisierenden und einen inhibierenden Effekt auszuüben, wobei erstere bei niedrigen und letztere bei höheren Konzentrationen überwiegt.

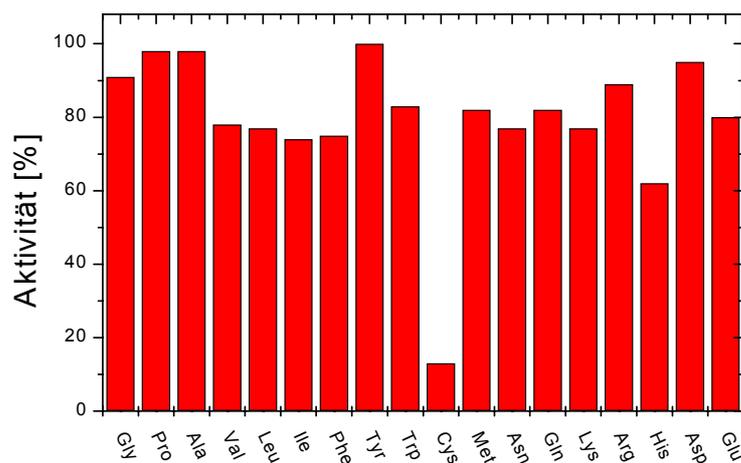


Abbildung 2.56: Inhibitionseigenschaften von L-Aminosäuren (c = 10 mM) auf die L-Serindehydratase-Aktivität

Zur Untersuchung der Spezifität der L-Serindehydratase wurden die enzymatischen Aktivitätstests des isolierten Enzyms unter Einsatz verschiedener Substrate durchgeführt.

Während L-Serin zu Pyruvat umgesetzt wird, erfolgt mit D-Serin keine Reaktion. Dagegen zeigt sich allerdings ein inhibierender Effekt dieser Aminosäure auf die L-Serin-Umsetzung, die auch in der Literatur bereits für andere L-Serindehydratasen als kompetitive Hemmung beschrieben wurde [GANNON *et al.*, 1977]. Bei dieser Art der Enzymhemmung bindet das D-Serin am katalytischen Zentrum, wird aber nicht umgesetzt. Da die Bindungsstelle besetzt ist, kann das eigentliche Substrat L-Serin nicht binden. Bei sehr hohen Substratkonzentrationen kann das D-Serin vom L-Serin wieder verdrängt werden, so dass die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion erreicht wird. Bei dieser Hemmung wird der K_M -Wert, verglichen mit dem nicht inhibierten Enzym, erhöht. Daher wurde zunächst der Einfluss von D-Serin in verschiedenen Konzentrationen auf die L-Serindehydratase untersucht, wobei die Konzentration des Substrates L-Serin konstant bei 2,5 g/l lag. Es ergab sich bei einem racemischen Gemisch von L-Serin und D-Serin eine Enzymaktivität von 84 % (Abbildung 2.57).

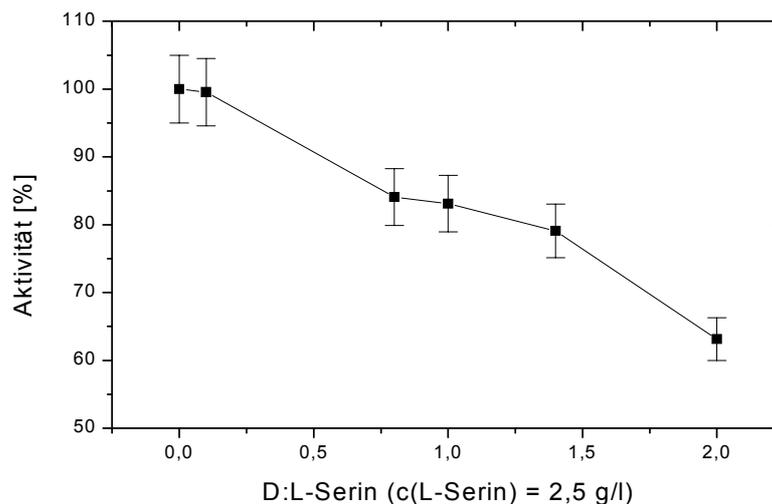


Abbildung 2.57: Inhibierender Einfluss von D-Serin auf die L-Serindehydratase-Aktivität

Zur kinetischen Betrachtung dieser Hemmung nach Michaelis-Menten wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten der enzymatischen L-Serinumsetzung im Konzentrationsbereich von $c(\text{L-Serin}) = 0 - 23,8 \text{ mM}$ mit und ohne D-Serin-Zusatz ($23,8 \text{ mM}$) zur Reaktionsmischung bestimmt. Es ergab sich der in Abbildung 2.58 (links) dargestellte Verlauf, in dem beide Kurven einen sigmoiden Verlauf aufzeigen. Aus diesem Grund wurden zur Darstellung nach Lineweaver-Burk, wie oben beschrieben, die den L-Serinkonzentrationen von $\geq 7 \text{ mM}$ entsprechenden Reaktionsgeschwindigkeiten herangezogen (Abbildung 2.58, rechts). Die mit Hilfe der Regressionsgeraden ermittelten V_{\max} -Werte für

das inhibierte und nicht inhibierte Enzym liegen bei 0,42 $\mu\text{mol}/(\text{l}^*\text{s})$ (mit Hemmung) bzw. 0,43 $\mu\text{mol}/(\text{l}^*\text{s})$ (ohne Hemmung) und weisen eine gute Übereinstimmung auf.

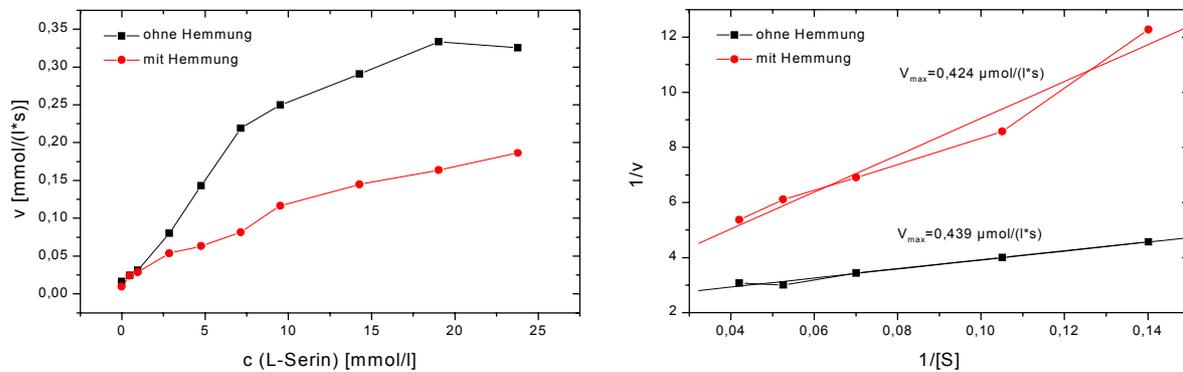


Abbildung 2.58: Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen Substratkonzentration für mit D-Serin inhibierte und nicht inhibierte L-Serindehydratase (links) und entsprechende Lineweaver-Burk-Darstellung (rechts).

Der K_M -Wert für das inhibierte Enzym liegt mit 28,34 mM vier- bis fünfmal so hoch der Wert für das nicht inhibierte Enzym. Daher wirkt D-Serin auf die L-Serindehydratase aus *Paracoccus seriniphilus* als kompetitiver Inhibitor, was mit Literaturdaten anderer L-Serindehydratase übereinstimmt [GANNON *et al.*, 1977]. Die kinetischen Daten wurden auch nach Hanes und Hofstee berechnet und in Tabelle 2.11 und Tabelle 2.12 dargestellt.

Tabelle 2.12: kinetische Daten der mit D-Serin gehemmten L-Serindehydratase berechnet nach Hanes, Lineweaver-Burk und Hofstee

	Hanes	Lineweaver-Burk	Hofstee
K_M [mM]	22,44	28,29	19,50
V_{max} [$\mu\text{mol}/(\text{l}^*\text{s})$]	0,36	0,42	0,34
R	0,97	0,98	0,88

Es ist ersichtlich, dass die nach Hanes und Hofstee berechneten V_{max} -Werte, unter D-Serin-Hemmung denen nach Menten bestimmten ähnlich sind.

2.10 Entwicklung eines bioanalytischen Systems zur L-Serin-Bestimmung

Die L-Serindehydratase aus *Paracoccus seriniphilus* ist spezifisch für L-Serin und lässt sich durch Zugabe von Fe^{2+} und einem reduzierenden Reagenz wie Dithiothreitol oder L-Cystein stabilisieren. Daher kann dieses Enzym für bioanalytische Anwendungen eingesetzt werden,

um L-Serinkonzentrationen in wässrigen Lösungen zu bestimmen. Mit Hilfe eines solchen Meßsystems könnte eine kontinuierliche Regelung der L-Serinkonzentration im Kultivierungsmedium von *Paracoccus seriniphilus* aufgebaut werden, um die L-Serindehydratase-Produktion zu optimieren. Weiterhin wäre, wie oben beschrieben, ein bioanalytisches System für L-Serin für die schnelle Analytik der L-Serin-Gewinnung und L-Tryptophansynthese aus L-Serin und Indol sinnvoll.

2.10.1 L-Serinbestimmung mittels nativer L-Serindehydratase

Zur Bestimmung von L-Serin-Konzentrationen in wässrigen Lösungen wurde der in Tabelle 5.6 vorgestellte Enzymtest eingesetzt, wobei die Reaktionszeit zwischen Enzym und Substrat bei 10 min lag. Die Kalibrationskurve im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 27 mM L-Serin (Abbildung 2.59) weist einen sigmoiden Verlauf mit einem linearen Bereich zwischen 10 und 20 mM auf. Mit Hilfe von Mehrfachmessungen wurde eine Messwertstreuung von 5 % ermittelt.

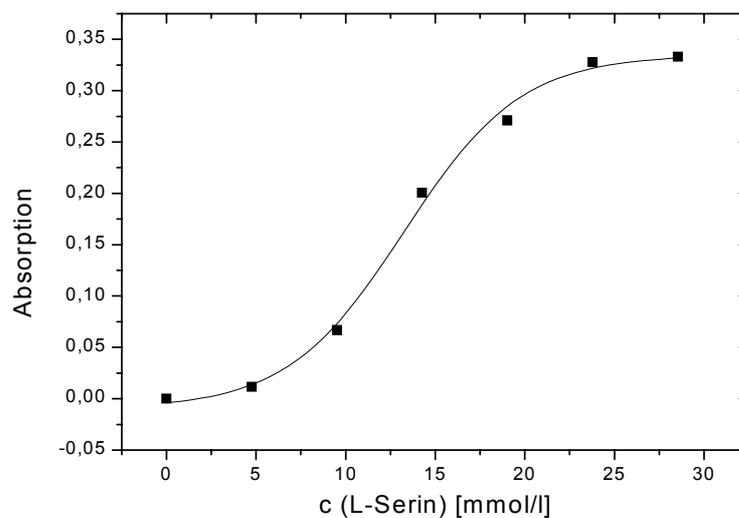


Abbildung 2.59: Kalibrationskurve zur L-Serin-Bestimmung

Zur Optimierung der enzymatischen L-Serin-Bestimmung kann die photometrische Analytik auf Mikrotiterplatten mit Hilfe eines Elisa-Readers durchgeführt werden. Auf diese Weise lassen sich innerhalb von 30 Minuten 96 Messungen gleichzeitig durchführen. Auch eine Automation dieser Analytik kann durchgeführt werden.

Die Eignung dieses Messverfahren für L-Serin für die Kontrolle biotechnologischer Prozesse wurde anhand von zwei Anwendungsbeispielen überprüft. Zum einen wurde die Substratkonzentration einer *Paracoccus seriniphilus* - Kultivierung im L-Serin-Minimalmedium (Kapitel 2.6.1) enzymatisch bestimmt. Mit der HPLC als Referenzmethode wurden gut übereinstimmende Ergebnisse erhalten (Abbildung 2.60, links).

In Zusammenarbeit mit Dipl.-Chem. Carsten Protsch (Universität Hannover) wurde weiterhin die L-Serinkonzentrationen der oben beschriebenen enzymatischen Tryptophansynthese aus L-Serin und Indol mit Hilfe der L-Serindehydratase verfolgt. Dafür wurden offline-Proben des technischen Prozesses untersucht. Bei diesen Analysen, bei denen die HPLC als Referenzmethode diente (Abbildung 2.60, rechts), wurden gute Korrelationen der erhaltenen Verläufe erhalten. Es wurden um ca. 20 mM geringere L-Serinkonzentrationen der enzymatisch gegenüber den mit HPLC gemessenen Werten ermittelt. Diese Parallelverschiebung der beiden Kurvenverläufe lässt sich mit hemmenden Effekten von Indol und Tryptophan auf das Enzym erklären (Abbildung 2.60, rechts).

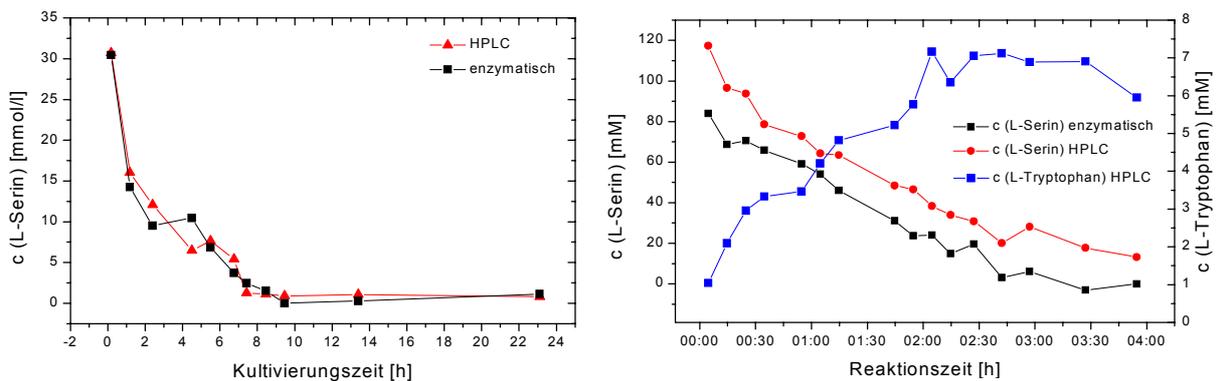


Abbildung 2.60: Vergleich der L-Serin-Bestimmung mittels L-Serindehydratase und HPLC bei *Paracoccus seriniphilus*-Kultivierung (links), Vergleich der L-Serin-Bestimmung mittels HPLC und L-Serindehydratase zur Kontrolle der enzymatischen Tryptophansynthese (rechts)

Die obigen Untersuchungen zeigen, dass die L-Serindehydratase aus *Paracoccus seriniphilus* für die L-Serin-Analytik biotechnologischer Prozesse geeignet ist. Für einen technischen Einsatz ist es erforderlich, online-Proben unter Einsatz eines bioanalytischen Systems zu untersuchen. Dafür wurde die L-Serindehydratase immobilisiert, was im nachfolgenden Kapitel dargestellt wird.

2.10.2 Immobilisierung der L-Serindehydratase

Die Anwendung von immobilisierten Enzymen ist oftmals durch die unzureichende Stabilität der entsprechenden biologischen Systeme begrenzt. Bei der Immobilisierung auf Trägermaterialien tritt aufgrund von Veränderungen in der räumlichen Struktur und des Aufbrechens von Wasserstoffbrückenbindungen in vielen Fällen zu einer Inaktivierung des Katalysators auf. Für jedes Enzym müssen daher die Immobilisierungsbedingungen speziell angepasst und optimiert werden [GRÜNDIG, 1999]. Wenn eine Immobilisierung des Enzyms unter Erhalt der Aktivität möglich ist, ergeben sich im Vergleich zur nativen Form des Enzyms Vorteile. Immobilisierte Biokatalysatoren lassen sich leicht vom Reaktionsgemisch abtrennen und wiederholt einsetzen, so dass eine ökonomische Verwendung der oft teuren Enzyme möglich ist. Weitere Eigenschaften des Biokatalysators, wie Stabilität, Selektivität, Reaktionsgeschwindigkeit, pH- und Temperatur-Empfindlichkeit, lassen sich durch die Immobilisierungstechnik beeinflussen, so dass geeignete Verfahren zum effektiven Einsatz von Enzymen in technischen Prozessen entwickelt werden können. Weiterhin gewährleistet die Immobilisierung die Gewinnung von reinen Reaktionsprodukten bei Syntheseprozessen, da keine Verunreinigungen durch das verwendete native Enzym auftreten.

Es lassen sich zwei grundsätzliche Methoden zur Enzymimmobilisierung unterscheiden, die beide zur Immobilisierung der L-Serindehydratase getestet wurden: Einschluss und Kupplung.

Der Einschluss des nativen Enzyms in eine polymere Matrix konnte mit dem LentiKat-System (Genialab, Braunschweig) nicht erfolgreich durchgeführt werden, da das Enzym aufgrund der geringen Größe durch die Poren des Polymers herausdiffundieren konnte. Crosslinkingversuche führten zu einer Inaktivierung des Enzyms.

Kupplungsversuche konzentrierten sich auf die Knüpfung von chemischen Bindungen zwischen Enzym und ausgewählten Substraten, da adsorptiv und ionisch gebundene Enzyme nur schwach gebunden sind und oft leicht ausgewaschen werden. Während Immobilisierungen auf Eupergit und epoxyfunktionalisierten Celluloseacetatmembranen keine Aktivität zeigten, war es möglich, die L-Serindehydratase chemisch an VA-Epoxy zu binden. Dieses makroporöse Polymer aus Vinylacetat und N,N'-Divinylethylenharnstoff ist mit Epoxy-Gruppen durch gezielte Hydrolyse voraktiviert. Die Oxirangruppen reagieren mit den freien Aminogruppen des Enzyms und bilden eine kovalente Bindung. Der Mechanismus dieser Reaktion ist in Abbildung 2.61 [SOSNITZA, 1999] dargestellt.

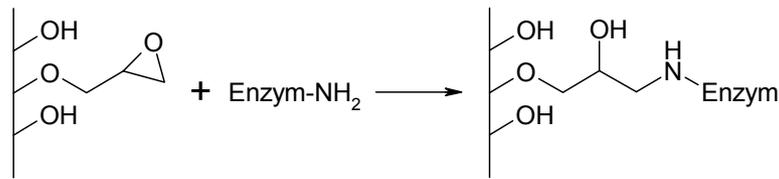


Abbildung 2.61: Mechanismus der Enzymbindung an VA-Epoxy [SOSNITZA, 1999]

Aufgrund der Instabilität der L-Serindehydratase (Kapitel 2.8) wurde für die Immobilisierung auf VA-Epoxy mittels Anionenaustausch (Kapitel 2.8.3) teilaufgereinigte L-Serindehydratase (47 nkat/mg Protein) aus 400 mg Biofeuchtmasse eingesetzt. Die Inkubation mit 200 mg VA-Epoxy erfolgte für 16 h bei RT in HEPES-Puffer (20 mM, pH 7,6). Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität des mit Elutionspuffer (KPP-Puffer, 20 mM, pH 7,6, 1 mM L-Cystein, 2 mM FeSO_4) gewaschenen Immobilisates wurde in einer Enzymkartusche wie folgt durchgeführt:

- Spülen des Immobilisates in Enzymkartusche mit L-Serin-Lösung (2,5 g/l in Elutionspuffer)
- Inkubation für 10 min (stop flow) bei $T = 51\text{ }^\circ\text{C}$
- Elution mit Puffer (2,4 ml/min)
- Fraktionierung des Eluates in 1,2 ml-Schritten
- Zugabe von 150 μl DNPH (1 g/l in 2 M HCl) zu 300 μl Eluatprobe
- Inkubation für 10 min bei RT
- Zugabe von 550 μl NaOH (3 M)
- Inkubation für 10 min bei RT
- Absorptionsmessung bei $\lambda = 550\text{ nm}$ in Mikrotiterplatte

Um Messsignale mit hoher Intensität zu erhalten, hat sich bei Untersuchungen von Enzymimmobilisaten das Stop-flow-Verfahren mit einer Inkubationszeit zwischen Substrat und Enzym von 10 min als geeignet herausgestellt. Im Vergleich zum Durchflussverfahren konnte auf diese Weise eine um 155 % höhere Signalintensität erhalten werden, was in Abbildung 2.62 verdeutlicht ist ($c(\text{L-Serin}) = 2,5\text{ g/l}$, $\dot{v} = 2,4\text{ ml/min}$). Die spezifische Enzymaktivität berechnete sich zu 136,3 nkat/g VA-Epoxy.

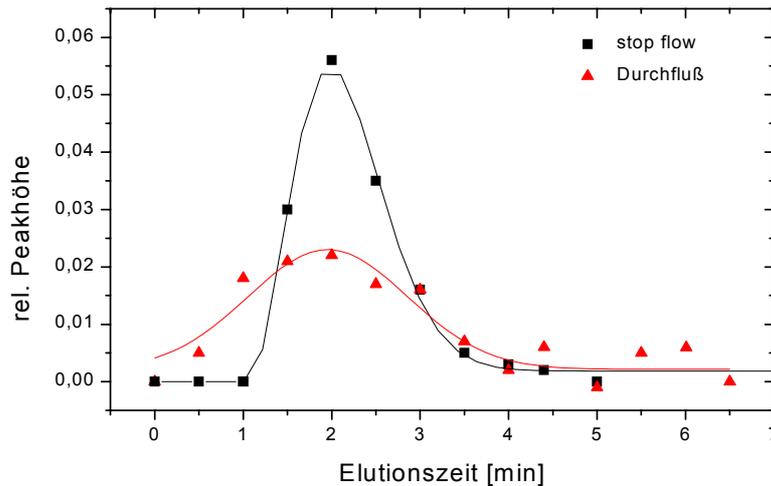


Abbildung 2.62: Vergleich zwischen Durchflussverfahren und Stop-flow zur enzymatischen L-Serin-Bestimmung, $c(\text{L-Serin}) = 2,5 \text{ g/l}$, $v = 2,4 \text{ ml/min}$

Aufgrund dieses Vergleiches wurde das Stop-flow-Verfahren für die weiteren Versuche dieser Arbeit eingesetzt.

Die Intensität der gemessenen Signale ist von der Konzentration des Substrates abhängig (Abbildung 2.63, links). Die entsprechende Kalibrationskurve im Konzentrationsbereich von 0 bis 32 mM L-Serin ist in Abbildung 2.63 (rechts) dargestellt.

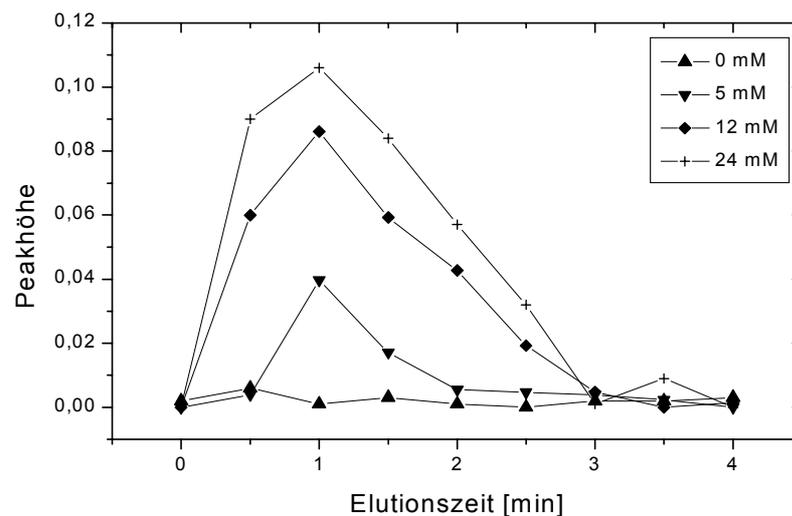


Abbildung 2.63: Elutionspeaks zur Ermittlung von L-Serinkonzentrationen mittels immobilisierter L-Serindehydratase

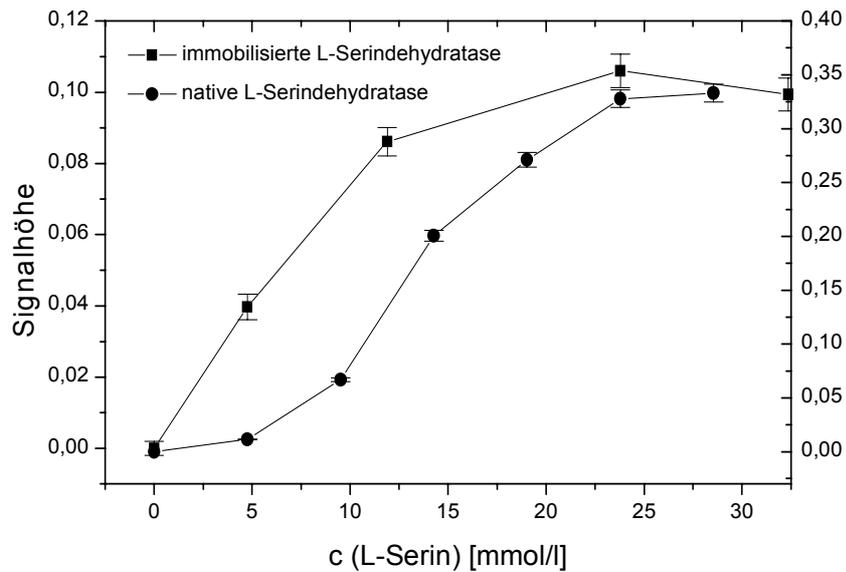


Abbildung 2.64: Kalibrationskurven zur L-Serin-Bestimmung mittels nativer und immobilisierter L-Serindehydratase

Während eine entsprechende Kalibration mit nativer L-Serindehydratase einen deutlich sigmoide Verlauf aufzeigt (Abbildung 2.58), ist dieser bei der Untersuchung des immobilisierten Enzyms nicht zu beobachten. Es können daher L-Serinkonzentrationen im Bereich von 0 bis 15 mM mit der immobilisierten L-Serindehydratase gemessen werden.

2.10.3 L-Serin-Bestimmungen mit VA-Epoxy-Immobilisaten

Um verlässlich und reproduzierbar L-Serinkonzentrationen mit der immobilisierten L-Serindehydratase durchführen zu können, wurden Charakteristika der Immobilisate wie Langzeitstabilität und Kinetik untersucht und mit denen des nativen Enzyms verglichen.

2.10.3.1 Stabilisierung der VA-Epoxy-Immobilisate

Es wurde festgestellt, dass das Enzymimmobilisat aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit des Fe-S-Clusters ohne stabilisierende Maßnahmen nach der sechsten Messung die Aktivität verliert (Abbildung 2.65, links).

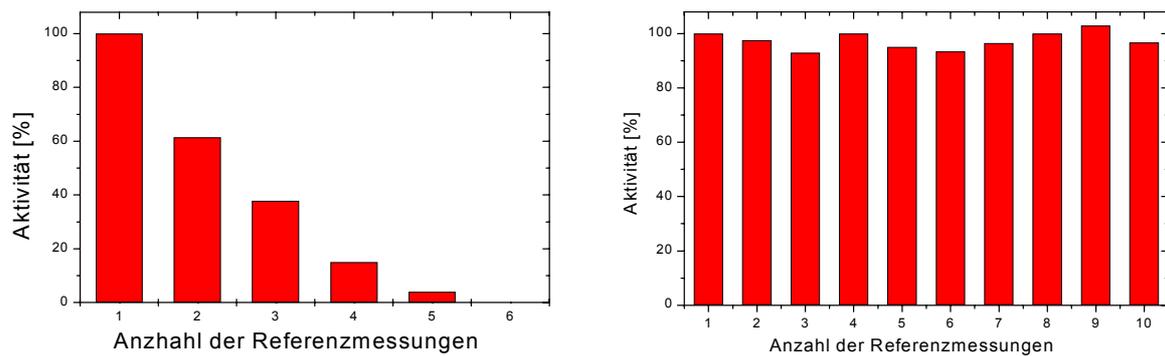


Abbildung 2.65: Stabilität des Enzymimmobilisates ohne (links) und mit (rechts) enzymstabilisierenden Bedingungen

Eine Stabilisierung konnte, wie auch bei der nativen L-Serindehydratase (Kapitel 2.7), mit FeSO_4 und L-Cystein erreicht werden (Abbildung 2.65, rechts). Auf diese Weise wurde nach 5,3 Tagen noch 50% der ursprünglichen Enzymaktivität und nach 9 Tagen ein kompletter Aktivitätsverlust beobachtet werden (Abbildung 2.66).

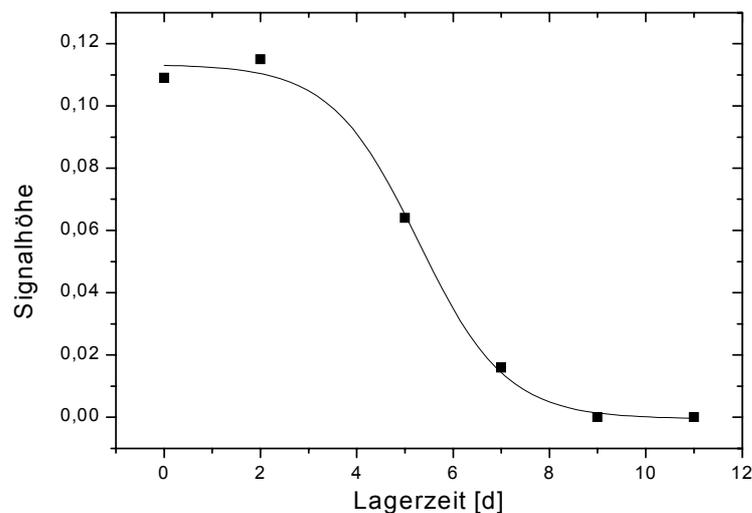


Abbildung 2.66: Langzeitstabilität des Immobilisates

Diese Werte liegen etwas niedriger als die der nativen L-Serindehydratase (Tabelle 2.13).

Tabelle 2.13: Vergleich der Langzeitstabilität der stabilisierten und nicht stabilisierten L-Serindehydratase

Enzymform	Halbwertszeit der Aktivität	Aktivitätsverlust nach
nativ (nicht stabilisiert)	25 min	1 h
nativ (stabilisiert)	8,5 d	10 d
immobilisiert (stabilisiert)	5,3 d	9 d

Durch Mehrfachmessungen ergab sich eine Streubreite der Messwerte von 9,3 %. Es konnte gezeigt werden, dass die Immobilisate für mehrere Tage zur Bestimmung von L-Serinkonzentrationen eingesetzt werden können. Aufgrund der abnehmenden Enzymaktivität sind regelmäßige Kalibrationen notwendig.

2.10.3.2 Kinetik

Zum Vergleich mit der nativen L-Serindehydratase wurde die L-Serinumsetzung mit dem Enzymimmobilisat auch kinetisch untersucht. Es ergab sich ein K_M -Wert von 14,42 mM im Vergleich zu 7,15 für das native Enzym, was mit Konformationsveränderungen des Enzyms bei der Immobilisierung zu erklären ist (Tabelle 2.14).

Tabelle 2.14: Kinetische Daten der VA-Epoxy-Immobilisate

	Hanes	Lineweaver-Burk	Hofstee
K_M [mM]	9,76	14,42	11,57
V_{max} [$\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{sec})$]	0,10	0,12	0,11
R	0,98	0,99	0,91

Auch nach Hanes und Hofstee wurde eine Erhöhung des K_M -Wertes bei der Immobilisierung des Enzyms berechnet, was mit den Ergebnissen nach Lineweaver-Burk übereinstimmt. Die unterschiedlichen Werte beruhen auf den unterschiedlichen graphischen Auftragungen nach Hanes, Lineweaver-Burk und Hofstee. Nach Kapitel 2.9.4 fließen V und $[S]$ unterschiedlich in die Berechnung der Werte ein.

2.11 Zusammenfassung und Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden beispielhaft die Arbeitsschritte vom Enzymscreening zum bioanalytischen System zur Prozesskontrolle technischer Anwendungen aufgezeigt. Es war das Ziel, ein spezifisch L-Serin-umsetzendes Enzym bereitzustellen, das in einem bioanalytischen System als Alternative zur HPLC zur Bestimmung von L-

Serinkonzentrationen eingesetzt werden kann. Nach der Entwicklung eines Screeningsystems unter Verwendung von Mikrotiterplatten wurde der bislang unbekannte Bakterienstamm *Paracoccus seriniphilus* aus Extrakten der Bryozoe *Bugula plumosa* isoliert. Er weist die Fähigkeit auf, durch Produktion einer L-Serindehydratase auf einem Minimalmedium mit L-Serin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu wachsen. Dieser Stamm wurde physiologisch und biochemisch charakterisiert. Mittels der bei diesen Untersuchungen erhaltenen Wachstumsparameter wurde die Enzymproduktion optimiert. Die L-Serindehydratase wurde nach erfolgreicher Stabilisierung der Aktivität des oxidationsempfindlichen Enzyms isoliert und charakterisiert. Dieses ist aus einem Heterodimer zweier Untereinheiten mit Molmassen von 14,5 und 40 kDa aufgebaut und setzt spezifisch L-Serin zu Pyruvat um. Daher wurde ein bioanalytisches System zur enzymatischen Bestimmung von L-Serinkonzentrationen entwickelt, das zur Kontrolle biotechnologischer Prozesse eingesetzt werden kann. So wurde die Kultivierung von *Paracoccus seriniphilus* enzymatisch durch Aufzeichnung der L-Serinkonzentration verfolgt. Weiterhin konnte der industrielle Prozess der enzymatischen Tryptophansynthese aus L-Serin und Indol mit der L-Serindehydratase verfolgt werden. Diese Synthese wird bei der Amino GmbH im großtechnischen Maßstab durchgeführt. Die L-Serinkonzentrationen werden durch die Bestimmung der Konzentrationen des Umsetzungsproduktes Pyruvat gemessen. Zur Zeit wird dieses nach einer definierten Reaktionszeit des L-Serins mit der L-Serindehydratase mit DNPH versetzt. Das dabei gebildete Hydrazon ist aufgrund der roten Färbung photometrisch messbar. Eine andere Möglichkeit ist die Umsetzung des Pyruvates zu L-Lactat mit dem Enzym Lactatdehydrogenase. Bei dieser Biotransformation wird NADH oxidiert, so dass eine photometrische Detektion möglich ist. Der Vorteil dieses Assay ist, dass er kontinuierlich durchgeführt werden kann. Er soll in Zukunft für L-Serinbestimmungen eingesetzt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die in vorliegender Arbeit untersuchte L-Serindehydratase in bioanalytischen Systemen eingesetzt werden kann. Dies ist mit den in der Literatur beschriebenen L-Serindehydratasen nicht möglich, da sich die enzymatischen Aktivitäten nicht ausreichend stabilisieren ließen. Mit dem entwickelten bioanalytischen System ist es möglich, die Kontrolle industrieller biotechnologischer Prozesse zu optimieren, da die bisher eingesetzten Verfahren zur Bestimmung von L-Serinkonzentrationen wie HPLC oder Aminosäureanalyser arbeits- und/oder zeitaufwendig sind. Die bisher beschriebenen Aktivitätsbestimmungen des Immobilisates wurden offline und anhand von fraktionierten Eluatproben durchgeführt. Für die online Bestimmung von L-Serin-Konzentrationen ist ein

kontinuierlicher Enzymassay erforderlich, wofür der in Abbildung 2.67 schematisch dargestellte Aufbau eingesetzt werden kann.

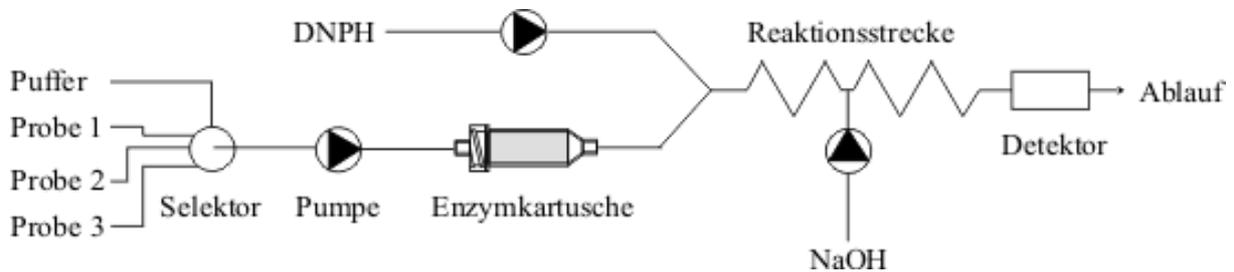


Abbildung 2.67: Schematischer Aufbau zur online-Bestimmung von L-Serinkonzentrationen [LAROCHE *et al.*, 2002]

Die über einen Selektor ausgewählte zu untersuchende Probe wird mit einer Pumpe mit dem Immobilisat in der Kartusche in Kontakt gebracht, woraufhin die Umsetzung des L-Serins erfolgt. Das sich bei der Elution im Pufferstrom befindliche Reaktionsprodukt Pyruvat wird nach Zufuhr von DNPH und NaOH und jeweiliger Reaktion für 10 min auf einer Reaktionsstrecke durch eine photometrische Messung bei $\lambda = 550$ nm detektiert. Wie bei offline-Messungen sind die erhaltenen Messwerte proportional zur L-Serin-Konzentration. Zukünftig muss dieses kontinuierliche Messsystem an den technischen Prozess der enzymatischen Tryptophansynthese adaptiert werden, um die Analytik dieser Biotransformation zu optimieren.

3 Halogenierende Enzyme

Meerwasser enthält mit durchschnittlich 0,5 M Chlorid, 1 mM Bromid und 1 mM Iodid große Mengen an Halogeniden. Diese werden von marinen Organismen für ihre Stoffwechselwege genutzt, um mit halogenierenden Enzymen halogenierte organische Verbindungen zu synthetisieren [MASEFIELD, 2001]. Die Forschung auf dem Gebiet der Halogenierungen hat sich entwickelt, nachdem vor 100 Jahren mit 3-Diiodtyrosin (Abbildung 3.1) aus der Koralle *Gorgonia cavolonii* die erste natürliche halogenorganische Verbindung isoliert wurde [SCHÖLER & NIEDAN, 2000].

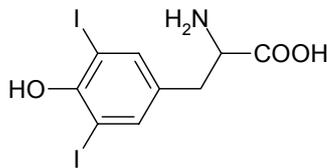


Abbildung 3.1: Strukturformel von 3-Diiodtyrosin

Es ist zu erwarten, dass der marine Lebensraum ein großes, bisher unbekanntes Potential an halogenorganischen Substanzen und halogenierenden Enzymen birgt, da heutzutage erst ca. 5 % der Mikroorganismen dieses Ökosystems kultivierbar sind und beschrieben wurden.

Halogenierende Enzyme werden von den in vielen Fällen unbekannten Mikroorganismen oft in nur sehr geringen Konzentrationen gebildet, so dass neben der Charakterisierung der Stämme empfindliche und schnelle Screeningverfahren für halogenierende Enzyme entwickelt werden müssen.

3.1 Halogenierte Verbindungen

Halogenierende Enzyme spielen in der Natur eine bedeutende Rolle für die Produktion halogener organischer Verbindungen. spielen eine große Rolle im täglichen Leben und finden Verwendung in Kunststoffen (z.B. PVC, Teflon), Lösungsmitteln (z.B. CCl_4 , CH_2Cl_2) und Antibiotika (z.B. Tetracyclin) [HÖLZER, 2000]. Sie werden sowohl künstlich hergestellt, als auch in großer Menge natürlich synthetisiert. So sind 70 % der jährlich in die Atmosphäre abgegebenen 5 Mio. t Methylenchlorids marinen Ursprungs, und nur 30000 t werden industriell hergestellt. Ebenso gehen Schätzungen davon aus, dass 2 Mio. Jahrestonnen CCl_4 aus natürlichen Quellen verglichen mit ca. 20000 t CCl_4 aus der Industrieproduktion in die Atmosphäre gelangen [HÖNIG, 2001]. Zur Zeit sind über 3000 natürliche halogenierte Verbindungen bekannt. Viele von ihnen werden von Bakterien produziert (Abbildung 3.2) [VAN PEE, 1996]. Die meisten dieser Substanzen weisen aromatische Strukturen auf, in denen

der Phenylring mit einem Heterocyclus kondensiert ist. Wenige, wie Pyrrolomycin A enthalten einfach halogenierte Pyrrolringe.

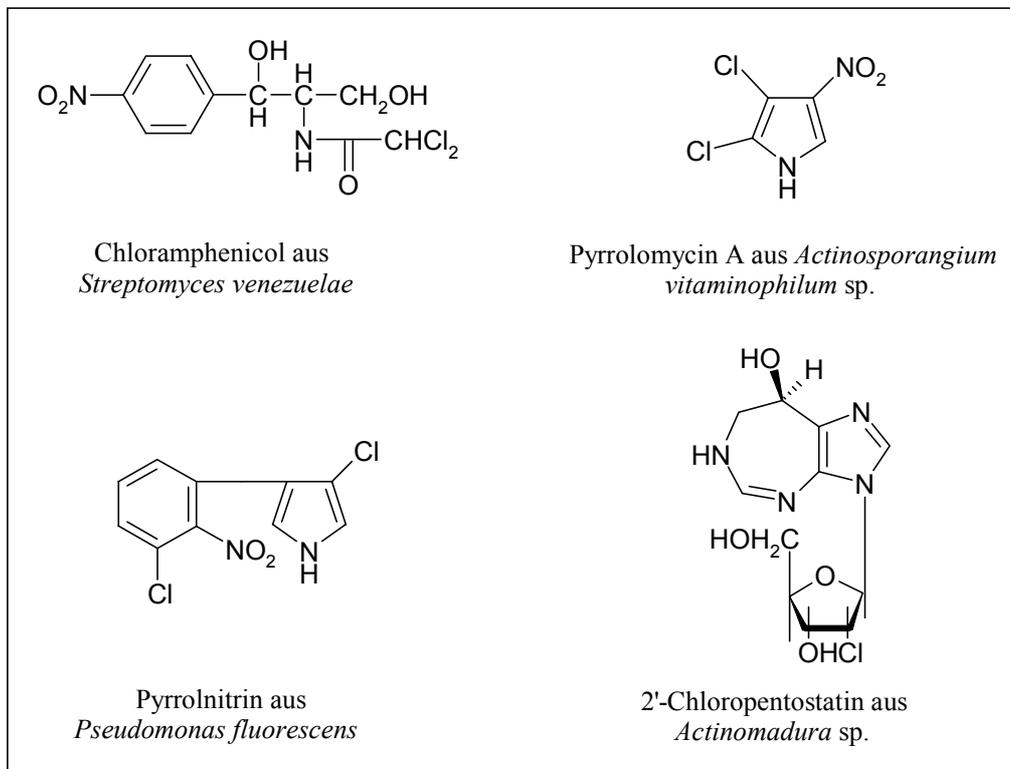
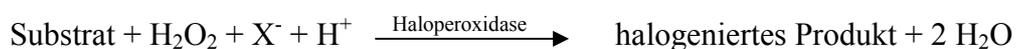


Abbildung 3.2: Strukturen einiger Halometabolite und ihre Produzenten

Halogenierte organische Verbindungen zeigen oftmals u.a. antifungale, antibakterielle, antivirale, antiinflammatorische Wirkungen [BUTLER, 1999; BUTLER & WALKER, 1993]. Sie spielen u.a. eine wichtige Rolle im Abwehrmechanismus dieser Organismen und sind auch technisch sowie pharmakologisch von großem Interesse.

3.2 Halogenierende Enzyme

Auf der Suche nach natürlichen Synthesemöglichkeiten von organischen Halogenverbindungen wurde in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts die Gruppe der Haloperoxidasen entdeckt. Diese extrazellulären Enzyme sind in der Lage, eine Vielzahl organischer Substrate zu halogenieren:



Diese Umsetzung verläuft in mehreren Schritten. Zunächst erfolgt mittels H_2O_2 eine Umwandlung des in der Reaktionslösung vorliegenden Acetats zur Persäure. Diese kann Halogenidionen X^- zum Hypohalogenit oxidieren, das schließlich elektronenreiche Zentren des Substratmoleküls halogeniert. Nach ihrem Oxidationsvermögen werden Haloperoxidasen in eine der drei folgenden Gruppen (Tabelle 3.1) eingeteilt [NEIDLEMANN & GEIGERT, 1986]:

Tabelle 3.1: Einteilung von Haloperoxidasen

oxidierbare Halogenide	Gruppenname
Cl^- , Br^- , I^-	Chloroperoxidase
Br^- , I^-	Bromoperoxidase
I^-	Iodoperoxidase

Haloperoxidasen werden von vielen verschiedenen Lebewesen, sowohl Eukaryonten, als auch Prokaryonten, produziert. Die erste und am besten untersuchte wurde aus dem Pilz *Caldariomyces fumago* isoliert, weitere u.a. aus menschlichen weißen Blutkörperchen, marinen Schnecken und Algen. Nach ihrem Aufbau lassen sich drei Haloperoxidasentypen unterscheiden:

1. Vanadium-Haloperoxidasen
2. FeHeme-Haloperoxidasen
3. Häm- und Metallionenunabhängige Enzyme, bei denen es sich nach neueren Untersuchungen aber um α/β -Hydrolasen handelt

Vanadium-Haloperoxidasen werden überwiegend aus marinen Algen gewonnen. Bei dieser Gruppe von Enzymen handelt es sich um saure Proteine mit einer ähnlichen Untereinheitengröße von 65 kDa. Das Vanadium-haltige katalytisch aktive Zentrum der Chloroperoxidase aus *Curvularia inaequalis* weist einen pentagonal bipyramidalen Aufbau auf und ist über Histidin an einen zylindrischen Proteinabschnitt geknüpft (Abbildung 3.3). Der N_3 -Ligand stammt aus dem Azid-haltigen Kristallisationspuffer und ist im nativen Enzym durch einen Hydroxid-Liganden ersetzt. Die Vanadat-Koordinierung zum Protein wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Vanadat-Sauerstoffatomen und den Aminosäuren Lys-353, Arg-360, Arg-490, Ser-402 und Gly-403 stabilisiert. Es wird vermutet, dass Trp-350 und Phe-397 im hydrophoben Proteinabschnitt mit His-404 Chlorid-Bindungen

aufbauen. Für eine Bindung von H_2O_2 am Enzym ist eine Deprotonierung von His-404 erforderlich.

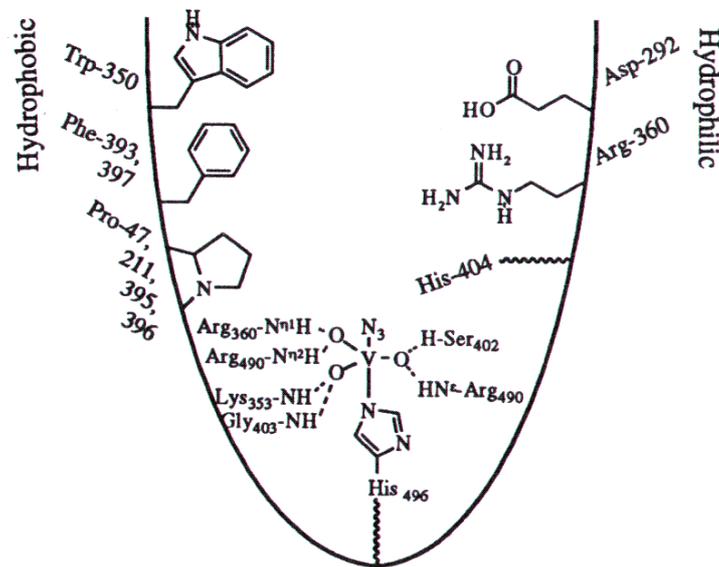


Abbildung 3.3: Katalytisches Zentrum Vanadium-haltiger Haloperoxidasen.

Auch FeHeme-Haloperoxidasen wurden aus vielen marinen Organismen isoliert. Das der Grünalge *Penicillus capitatus* besteht aus einem Dimer zweier Untereinheiten mit einer Größe von 55 kDa, die jeweils eine Ferriprotoporphyrineinheit IX enthalten. Die Aminosäurezusammensetzung des Enzyms zeigt, dass es sich, um ein saures Protein handelt. Der Reaktionsmechanismus der enzymatischen Halogenierung ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

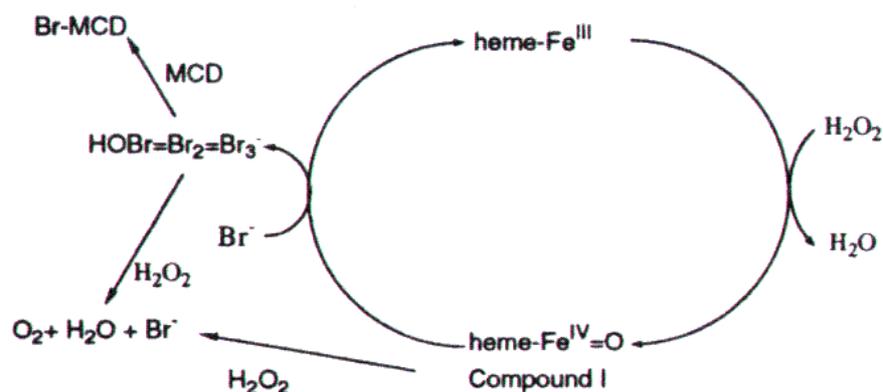


Abbildung 3.4: Reaktionsmechanismus der enzymatischen Halogenierung mittels FeHeme-Haloperoxidase (MCD: Monochlordimedon)

Heme-Fe^{III} wird von H₂O₂ zu Heme-Fe^{IV}=O oxidiert. Nach Oxidation eines Halogenids wird Heme-Fe^{III} zurückgebildet.

Aufgrund dieser Reaktionsmechanismen sind Halogenierungen mittels Haloperoxidasen sehr unspezifisch. Es handelt sich um extrazelluläre Enzyme, deren Reaktionsprodukte, die hypohalogenige Säuren, eine stark antibakterielle Wirkung aufweisen. Daher spielen Haloperoxidasen eine große Rolle im Abwehrmechanismus der Organismen [BUTLER & WALKER, 1993]. Haloperoxidasen wurden nicht zur gezielten Synthese komplexer halogener Naturstoffe entwickelt. Bei der Untersuchung der Biosynthese von Pyrrolnitrin ist herausgefunden worden, dass bei dieser keine Haloperoxidasen, sondern eine andere Gruppe von halogenierenden Enzymen, die Halogenasen, beteiligt sind. Eines dieser Enzyme, die Tryptophan-7-Halogenase (Trp-7-Hal; prnA), katalysiert die regioselektive Chlorierung von Tryptophan zu 7-Cl-Tryptophan, was der erste Schritt der in Abbildung 3.5 dargestellten Pyrrolnitrinsynthese ist [HÖLZER, 2000]. Nach der Umwandlung des 7-Cl-Tryptophans zum Monodechloraminopyrrolnitrin erfolgt eine weitere Halogenierung am Heterocyclus. Pyrrolnitrin bildet sich nach der Oxidation der Aminogruppe am Benzolring zur Nitrogruppe.

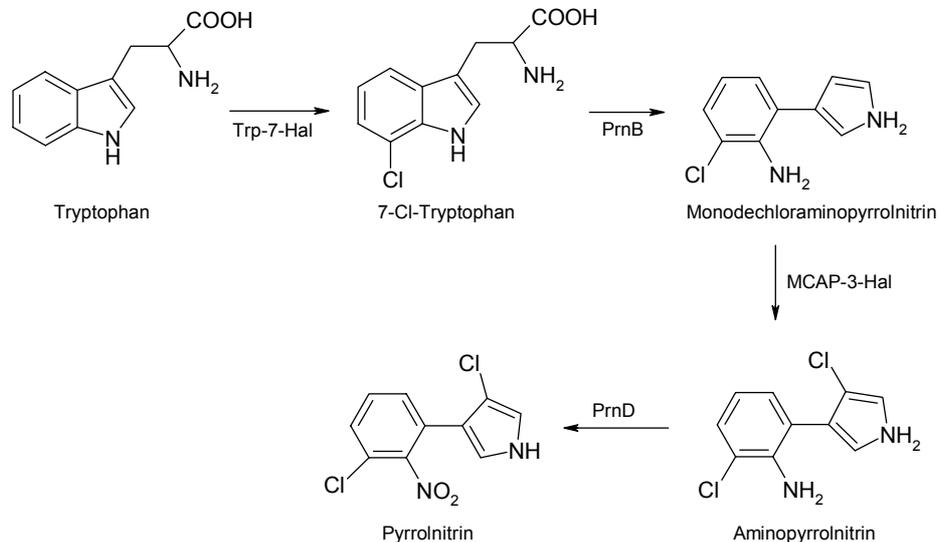


Abbildung 3.5: Biosynthese von Pyrrolnitrin über die Produktion von 7-Cl-Tryptophan [HÖLZER, 2000]

Die 7-Cl-Tryptophan-Bildung in Abbildung 3.6 ist der erste wichtige Schritt dieser Synthesekette, in der ein Epoxid ein intramolekulares Zwischenprodukt darstellt.

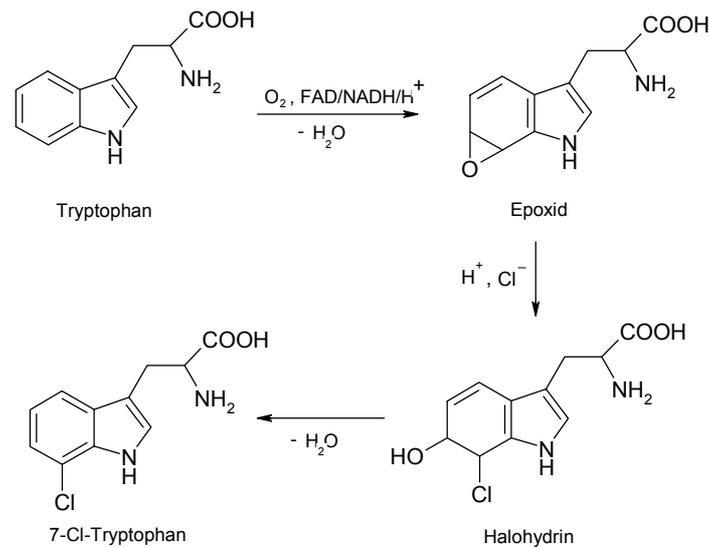


Abbildung 3.6: Durch Tryptophan-7-Halogenase katalysierte regioselektive Chlorierung von Tryptophan zu 7-Cl-Tryptophan [HÖLZER, 2000]

Die *prnA*-Halogenase ist $FADH_2$ -abhängig. In vivo wird dieses durch eine assoziierte Flavinreduktase bereitgestellt. Halogenierte Tryptophane stellen eine interessante Gruppe von Verbindungen dar, die zur Produktion von biologisch wirksamen Derivaten eingesetzt werden können [MASEFIELD, 2001]. So wäre durch die bisher noch nicht gefundene Trp-5-Halogenase 5-Br-Tryptophan zugänglich, aus dem 5-Hydroxytryptophan (Oxitriptan), ein Antidepressivum, gewonnen werden. Das Produkt einer nachfolgenden Decarboxylierung wäre 5-Hydroxytryptamin (Serotonin), das schmerzstillend und entzündungshemmend wirkt. Da Serotonin selbst nicht aktiv transportiert wird, müssen für pharmazeutische Anwendungen Serotonin-Vorläufer eingesetzt werden, um die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden [ULBER, 2002].

Bisher sind Halogenasen erst in wenigen Mikroorganismen (*Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Myxococcus fulvus* und *Streptomyces albogriesolus*) nachgewiesen worden. Aufgrund der oben beschriebenen Besonderheiten des marinen Habitates ist es für die Gewinnung neuer Erkenntnisse über die bisher wenig erforschte Gruppe der Halogenasen wichtig, auch die Organismen dieses Lebensraumes für ein Halogenasescreening heranzuziehen.

3.3 Aufgabenstellung

Wie oben gezeigt wurde, können halogenierende Enzyme in einem weiten Feld biotechnologischer Anwendungen eingesetzt werden. Dabei spielen Haloperoxidasen eine Rolle bei Halogenierungen deren Produkte durch den Molekülaufbau vorgegeben sind. Um

Haloperoxidasen nachzuweisen, hat sich seit den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts für die Halogenierung von Monochlordimedon als Standardtest durchgesetzt, der photometrisch zu messen ist. In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob eine Optimierung des Haloperoxidasenachweises durch Entwicklung eines empfindlichen Testsystems möglich ist. Dieses sollte zudem in der Lage sein, innerhalb kurzer Zeit viele Analyseproben gleichzeitig zu untersuchen. Dieser Test sollte schließlich für ein Haloperoxidasescreening an vom „Forschungsschwerpunkt Marine Biotechnologie“ zur Verfügung gestellten Mikroorganismenisolaten eingesetzt werden.

Halogenasen sind in den letzten Jahren erst in wenigen Mikroorganismen nachgewiesen worden. Da aufgrund der geringen Enzymaktivitäten der Nachweis der Proteine in Wildstämmen schwierig ist, wurde überwiegend die PCR eingesetzt. Auch in dem mit *Flustra foliacea* assoziierten unbeschriebenen Bakterium MBT-12 wurde auf diese Weise ein Halogenasegen identifiziert. Zum Nachweis des Enzyms in Rohextrakten sollte zunächst eine Optimierung des Wachstums von MBT-12 durchgeführt werden, um Biomasse zur Verfügung zu stellen. Außerdem sollten zur Beschreibung des Stammes biochemische und morphologische Charakteristika des Stammes ermittelt werden. Für eine schnelle Aktivitätsbestimmung von Halogenasen und die Erforschung ihres Potentials ist es erforderlich, bestehende Enzymtests zu optimieren und neue Methoden zu entwickeln. Dies sollte im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung moderner Analysemethoden, wie der HPLC und der 2D-Fluoreszenzspektroskopie erfolgen.

3.3.1 Haloperoxidasen

3.3.1.1 Aufbau eines Screeningsystems

Für ein wirkungsvolles Screening nach Haloperoxidasen ist ein sehr empfindlicher Enzymtest mit idealerweise optischer Auswertung erforderlich. Weiterhin sollte bei einem hohen Probendurchsatz die Ermittlung quantitativer Ergebnisse möglich sein. Es wurden daher unter Verwendung der Chloroperoxidase aus dem Pilz *Caldariomyces fumago* als Testsystem verschiedene Enzymassays und Detektionsmethoden miteinander verglichen.

Dieser älteste Nachweis für Haloperoxidasen wurde bei der Untersuchung der Biosynthese von Caldaryomycin aus dem Pilz *Caldariomyces fumago* entwickelt. Das dabei verwendete Substrat Monochlordimedon weist eine strukturelle Ähnlichkeit zum Caldaryomycin auf und zeigt aufgrund der Keto-Enol-Tautomerie mit $\epsilon = 20000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda = 290 \text{ nm}$ [WIESNER, 1987]. Eine Enolbildung ist nach einer

Halogenierung nicht mehr möglich, was in einer Absorptionsabnahme resultiert (Abbildung 3.7).

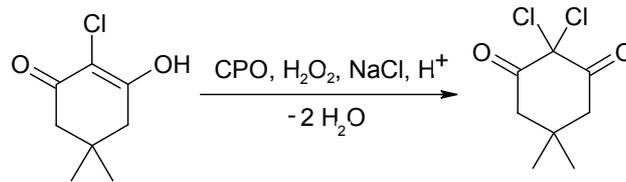


Abbildung 3.7: Haloperoxidasenachweis mittels Halogenierung von Monochlordimedon

Die Durchführung des Enzymtests erfolgt mit den in Tabelle 3.2 angegebenen Assaykomponenten bei pH 4,8 in acetatgepufferter Lösung.

Tabelle 3.2: Assay zur Aktivitätsbestimmung von Haloperoxidasen mittels Monochlordimedon

Assaykomponente	Menge
Acetatpuffer, 0,1 M, pH 5,4	500 μ l
KCl oder KBr, 1 M	100 μ l
Monochlordimedon, 2 mM	100 μ l
H ₂ O ₂ , 88 mM	100 μ l
Enzymprobe	200 μ l

Nach Zugabe der Enzymprobe zum Start des Assays erfolgt die Aufzeichnung der Absorptionsabnahme bei $\lambda = 290$ nm.

Screeningversuche nach Haloperoxidasen können ebenfalls mit Phenolrot als Substrat, das enzymatisch zu Bromphenolblau bromiert wird, durchgeführt werden. [NEIDLEMANN & GEIGERT, 1986] (Abbildung 3.8).

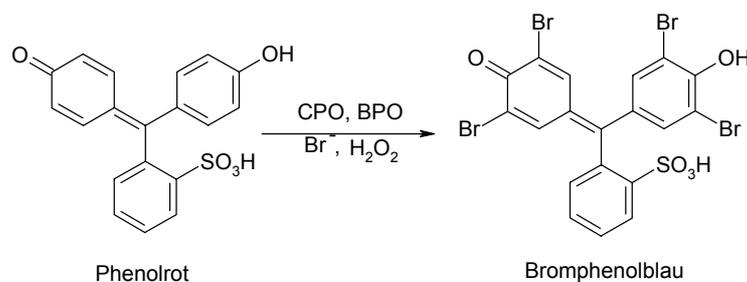


Abbildung 3.8: Haloperoxidasenachweis mittels Bromierung von Phenolrot zu Bromphenolblau

Die Durchführung des Assays erfolgt mit den in Tabelle 3.2 angegebenen Assaykomponenten, wobei anstatt Monochlordimedon Phenolrot in gleicher Konzentration eingesetzt wird. Eine Haloperoxidaseaktivität zeigt sich durch die blaue Färbung des Produktes Bromphenolblau. Dieses kann photometrisch neben dem Substrat Phenolrot ($\lambda = 433 \text{ nm}$) bei $\lambda = 592 \text{ nm}$ detektiert werden. Der Verlauf des Enzymtests ist in anhand der von dem Pilz *Caldariomyces fumago* produzierten Chloroperoxidase dargestellt. Dieser Pilzstamm wurde bei $T = 26 \text{ }^\circ\text{C}$ in Glucose-Malzextrakt-Medium (Anhang 5.2) bis zur exponentiellen Phase herangezogen und die halogenierende Aktivität des Medienüberstandes untersucht. Die erhaltenen zeitabhängigen Wellenlängenscans der Reaktionszeiten von 0-7 min sind in Abbildung 3.9 (oben links) dargestellt, wobei deutlich die abnehmende Phenolrot- und zunehmende Bromphenolblau-Absorption zu erkennen sind (Abbildung 3.9, unten). Weiterhin ist eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Reaktionsproduktes von $\lambda = 578 \text{ nm}$ zu $\lambda = 592 \text{ nm}$ zu beobachten (Abbildung 3.9, oben rechts). Die Ursache dafür ist die Bildung von Zwischenprodukten bei der vierfachen Bromierung von Phenolrot zu Bromphenolblau, von denen das zweifach bromierte Substrat, Bromphenolrot, ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 578 \text{ nm}$ aufweist [SHAH, 2000]. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um ein wichtiges Zwischenprodukt, das im weiteren Reaktionsverlauf zu Bromphenolblau mit einem Absorptionsmaximum von $\lambda = 592 \text{ nm}$ [SHAH, 2000] umgesetzt wird.

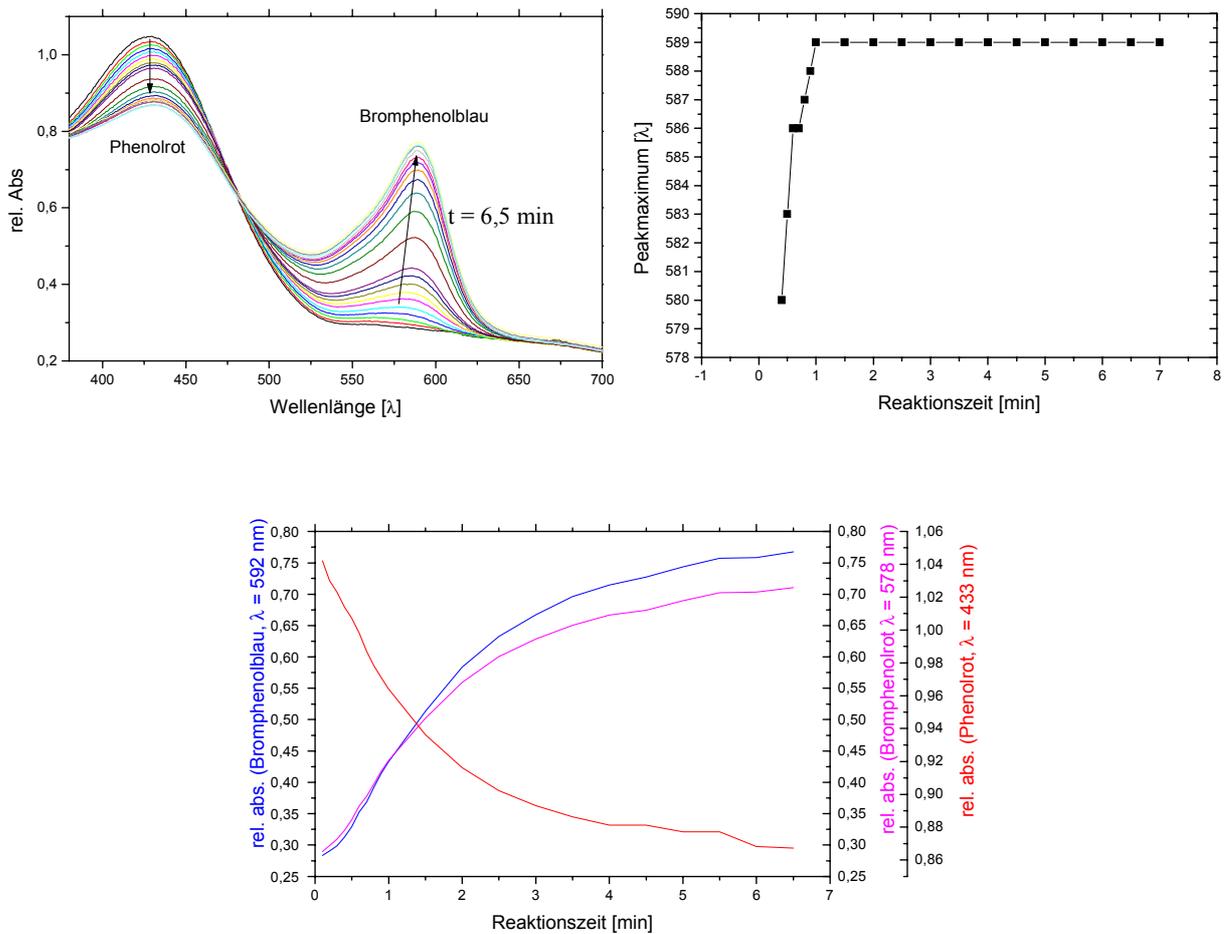


Abbildung 3.9: oben links: Wellenlängenscanverlauf während der Phenolrot-Bromierung (Reaktionszeit 6,5 min); oben rechts: Verschiebung des Absorptionsmaximums des Produktes der Halogenierung; unten: Verläufe der Absorptionsintensitäten der Edukte und Produkte der Phenolrot-Bromierung.

Zur online-Detektion der enzymatischen Bromierung von Phenolrot ist neben der Absorptionsspektroskopie auch die 2D-Fluoreszenzspektroskopie geeignet, da sich das Fluoreszenzmaximum des Eduktes Phenolrot (Ex:Em = 360 nm:530 nm) deutlich von dem des Produktes Bromphenolblau (Ex:Em = 583 nm:615 nm) unterscheidet (Abbildung 3.10).

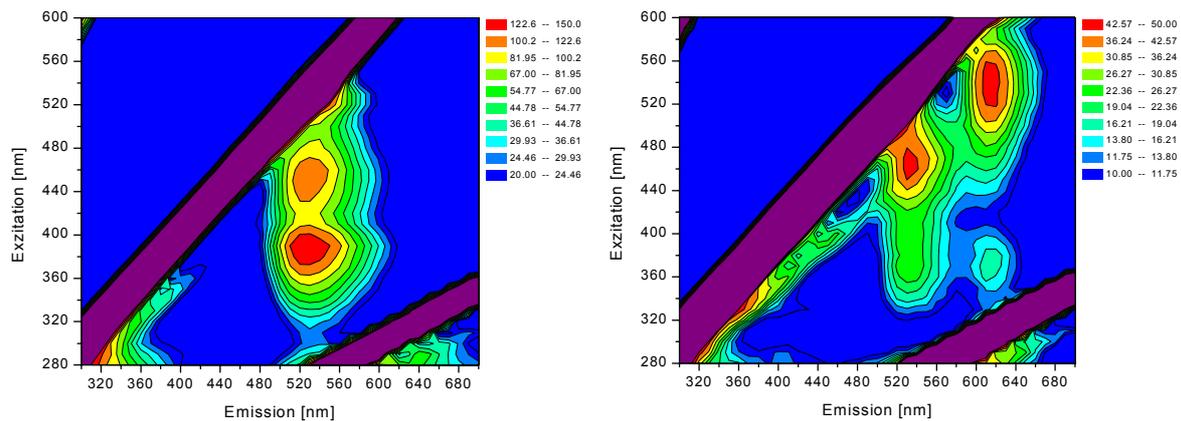


Abbildung 3.10: 2D-Fluoreszenzspektrum von Phenolrot (links) und Bromphenolblau (rechts)

Da die Fluoreszenzintensität im Bereich von pH 5-10 nahezu konstant ist, können auch quantitative Messungen durchgeführt werden. Mit der Chlorperoxidase aus *Caldariomyces fumago* wurde dieses System erfolgreich getestet.

Der Vorteil des Phenolrot-Assays liegt in seiner hohen Empfindlichkeit gegenüber dem Monochlordimedon-Test. Dies zeigt ein direkter Vergleich beider Tests in Form der Absorptionsverläufe von Monochlordimedon und Phenolrot unter Verwendung der Haloperoxidase aus *Caldariomyces fumago* (Abbildung 3.11).

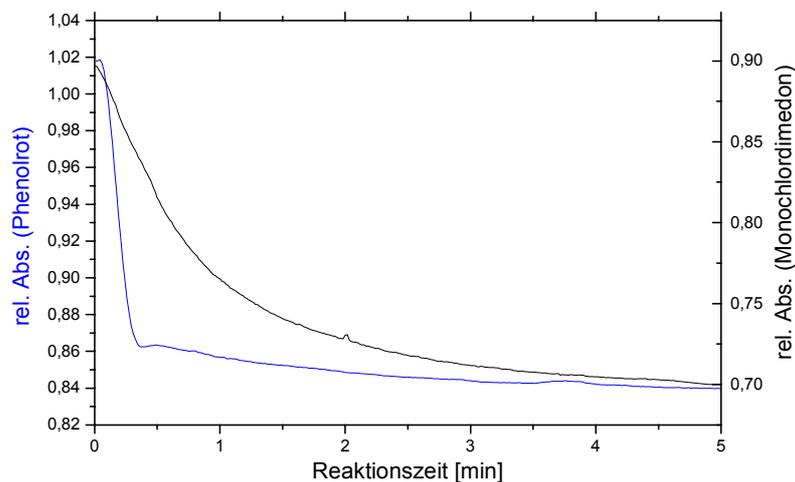


Abbildung 3.11: Vergleich der CPO-Aktivitätsbestimmung mittels Monochlordimedon- (schwarz) und Phenolrot-Bromierung (blau)

Deutlich ist die schnelle Phenolrotumsetzung im Vergleich zur Monochlordimedon-Halogenierung zu erkennen. Daher wurde für Screeningversuche nach Haloperoxidasen der

Phenolrot-Assay eingesetzt, mit dem insbesondere bei geringen Enzymaktivitäten positive Screeningergebnisse zu erwarten sind.

Wie oben beschrieben ist für ein effektives Haloperoxidascreening ein hoher Probendurchsatz erforderlich. Dafür hat sich der Einsatz von Mikrotiterplatten als geeignet herausgestellt, mit denen gleichzeitig 95 Tests durchgeführt werden können. Die Analytik erfolgt mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät. Eine Optimierung der Probenvorbereitungszeit und Empfindlichkeit konnte zusätzlich dadurch erreicht werden, dass die Assaykomponenten mit Ausnahme des H_2O_2 in fester Form in den Wells der Mikrotiterplatte vorgelegt wurden. Dazu wurden zunächst jeweils 150 μl der Vorlage mit Ausnahme des H_2O_2 in die Wells der Mikrotiterplatte gegeben und bei 30 °C getrocknet. Die auf diese Weise vorbereiteten Platten konnten bis zur Durchführung der Enzymtests gelagert werden. Zur Durchführung der Enzymtests wurden zunächst 20 μl H_2O_2 (88 mM) in die Wells gegeben, um die getrockneten Assaykomponenten zu lösen. Der Test wurde durch Zugabe von 180 μl zu der zu messenden Probe gestartet und mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät verfolgt. Die Empfindlichkeitssteigerung resultierte aus dem Einsatz von 90 % (v/v) Enzymlösung am Gesamtvolumen des Assays gegenüber 20 % (v/v) bei der Messung in Küvetten. Die Konzentrationen der Assaykomponenten waren dabei jeweils gleich. Die mit Hilfe der Mikrotiterplatten-Messungen erhaltenen Messergebnisse sind mit denen aus Küvettenmessungen vergleichbar (Abbildung 3.12) und stellen daher eine gute Möglichkeit des Enzymscreenings dar.

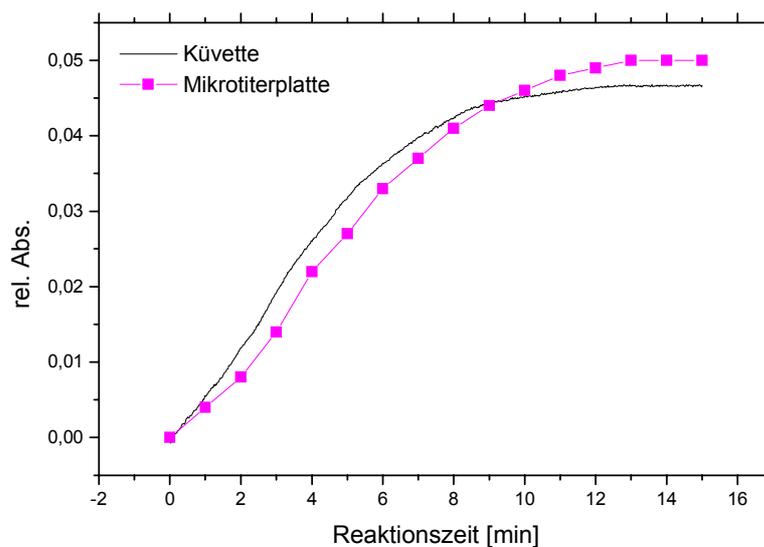


Abbildung 3.12: Vergleich der Aktivitätsbestimmung der Haloperoxidase aus *Caldariomyces fumago* in der Küvette und in Mikrotiterplatte

Um einen direkten Vergleich zwischen den Versuchsergebnissen in Abbildung 3.12 zu ermöglichen, wurden bei diesen Versuchen jeweils 20 % (v/v) Enzymlösung eingesetzt.

Der auf diese Weise optimierte Enzymtest wurde für Screeningexperimente an marinen Mikroorganismen eingesetzt, was im Folgenden dargestellt wird.

3.3.1.2 Screeningexperimente an marinen Mikroorganismen

Ein Haloperoxidascreening wurde an den in Tabelle 5.1 und Tabelle 5.2 aufgeführten bryzoenassoziierten Mikroorganismen durchgeführt, wobei für die Kultivierungen bei $T = 26\text{ °C}$ die jeweils angegebenen Wachstumsmedien eingesetzt wurden. Für die phototrophen Cyanobakterien war zusätzlich eine Bestrahlung mit einer Lichtintensität von 1000 Lux (2 Pflanzenlampen „Flora“, Osram) erforderlich. Mit dem optimierten Phenolrotassay konnte die bisher erste von einem Cyanobakterium produzierte Haloperoxidase im Überstand der *Anabaena flos-aqua*-Kultivierung im BG-11-Medium (Anhang 5.2) nachgewiesen werden. Die Wachstumskurve ist in Abbildung 3.13 dargestellt.

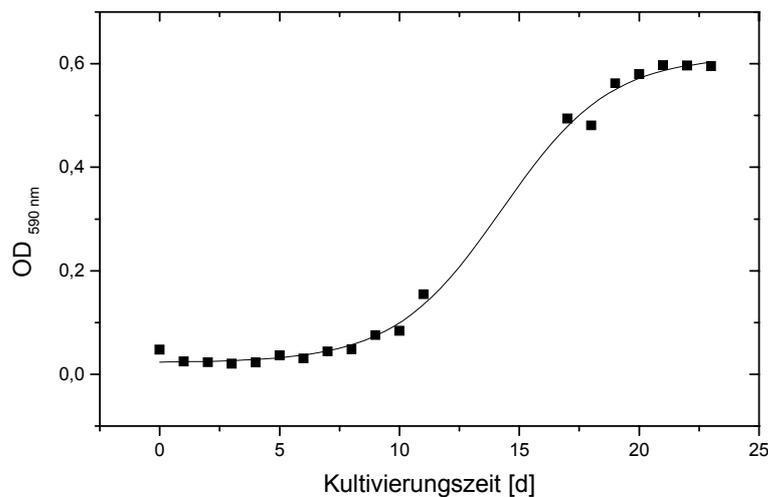


Abbildung 3.13: OD-Verlauf der *Anabaena*-Kultivierung in BG-11-Medium

Der in der Literatur vielfach beschriebene Monochlordimedon-Test führte aufgrund der geringen Enzymaktivität zu einem negativen Testergebnis. Mit dem optimierten Phenolrot-Assay wurde in der exponentiellen Wachstumsphase eine Haloperoxidaseaktivität von 0,37 nkat/ml im Medienüberstand gemessen. Dieses Ergebnis verdeutlicht die Bedeutung der Optimierung bestehender und Entwicklung neuer empfindlicher Nachweismethoden für bioaktive Verbindungen. Auf diese Weise kann eine effektive Nutzung dieser Substanzen für die Biotechnologie gewährleistet werden.

3.3.2 Halogenasen

Ein wirkungsvolles Screening nach den spezifisch und regioselektiv halogenierenden Halogenasen ist mit Hilfe der PCR möglich. Durch die Entwicklung von Primersystemen für bekannte Halogenasegene kann ein Screening auf der genetischen Ebene erfolgen. Die Voraussetzung dafür ist die Kenntnis einer Halogenase-Gensequenz. Diese dient als Zielsequenz für ein korrespondierendes synthetisches Nucleotid, dessen Sequenz eine weitgehend komplementäre Struktur aufweisen muss. An Bakterienisolaten der Bryozoe *Flustra foliacea* (Kapitel 1.1) wurden diese Untersuchungen in Kooperation mit der DSMZ in Braunschweig durchgeführt. Der Stamm MBT-12 ergab mit *prnA* Primern ein positives Amplifikat. Nach der kompletten Sequenzierung des *prnA*-Gens zeigten Vergleiche eine Ähnlichkeit von 90% zu bekannten *prnA* Genen der Gattungen *Pseudomonas* und *Burkholderia*. Der Halogenasenachweis der Wildstämme dieser Gattungen stellte sich aufgrund der geringen Aktivitäten als schwierig heraus. Daher war es für nähere Untersuchungen der Halogenase aus MBT-12 erforderlich, ausreichend Biomasse zur Verfügung zu stellen. Dies erfolgte durch eine biochemische Charakterisierung des Stammes, bei dem es sich um eine nicht beschriebene Bakterienart handelt. Sie weist nach DNA/DNA-Hybridisierungsuntersuchungen die größten Ähnlichkeiten zu den Gattungen *Serratia* und *Yersinia* auf. Für einen Vergleich zu diesen Gattungen wurden neben den biochemischen auch morphologische Charakteristika ermittelt. Diese Untersuchungen sind im Folgenden dargestellt.

3.3.2.1 Charakterisierung des Bakterienstammes MBT-12

Nach der REM-Aufnahme von MBT-12 in Abbildung 2.10 (links) weisen die Einzelzellen eine Größe von ca. $0,5 \mu\text{m} * 1,5 \mu\text{m}$ auf. Die Aufnahmen wurden, wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, mit exponentiell in CASO-Medium (Anhang 5.2) wachsenden Zellen durchgeführt. Auf CASO-Agar bildet der Stamm farblose Kolonien (Abbildung 2.10 (rechts)).

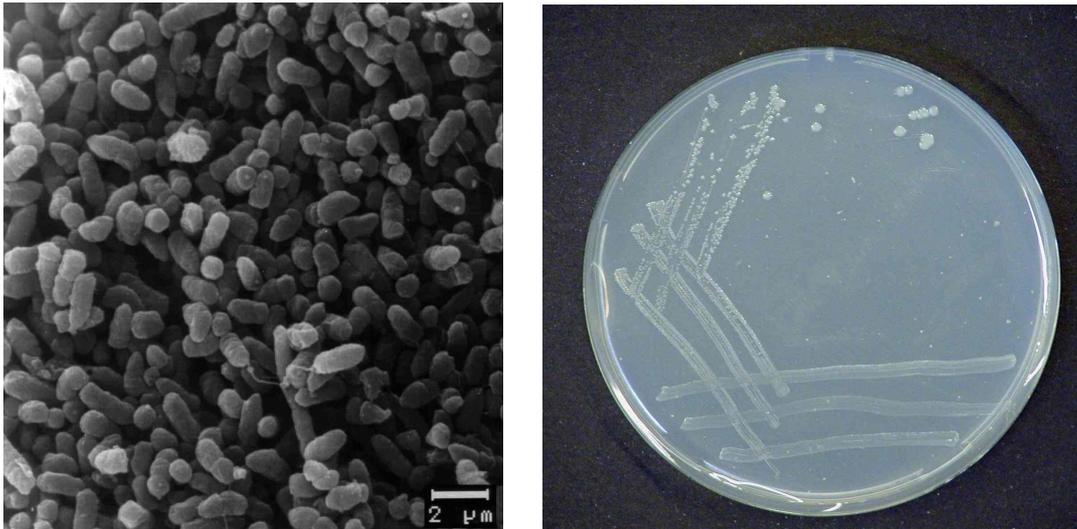


Abbildung 3.14: REM-Aufnahmen vom Stamm MBT-12 in der exponentiellen Wachstumsphase im CASO-Medium (links); lichtmikroskopische Aufnahme von MBT-12-Kolonien auf CASO-Medium (rechts)

Vergleich von Wachstumsmedien

Wie oben dargestellt, werden Halogenasen nur in geringen Konzentrationen gebildet. Zu ihrem Nachweis muss folglich viel Biomasse eingesetzt werden. Daher wurde eine Optimierung der Biomasseproduktion von MBT-12 durchgeführt, wofür zunächst verschiedene Wachstumsmedien miteinander verglichen wurden.

Mit einem Tryptophan-Minimalmedium (Anhang 5.2, $T = 30\text{ °C}$) konnte eine maximale Optische Dichte von 0,04 erreicht werden ($\mu_{\max} = 0,02\text{ 1/h}$). Während die Zugabe weiterer Kohlenstoffquellen (Citronensäure, Galactose, Glucose, Lactose) in einer Konzentration von 2 g/l mit $OD_{\max} = 0,09$ und $\mu_{\max} = 0,22\text{ 1/h}$ zu einer geringen Verbesserung des Wachstums führte, konnte mit dem komplexen Medium Marine Broth eine Optische Dichte von 2,0 ($\mu_{\max} = 0,42\text{ 1/h}$) erreicht werden. Dagegen wurden mit MB50 und MB20 (Anhang 5.2) Substratlimitierungen beobachtet, die in einer verringerten maximalen Optischen Dichte resultierten (Abbildung 3.15).

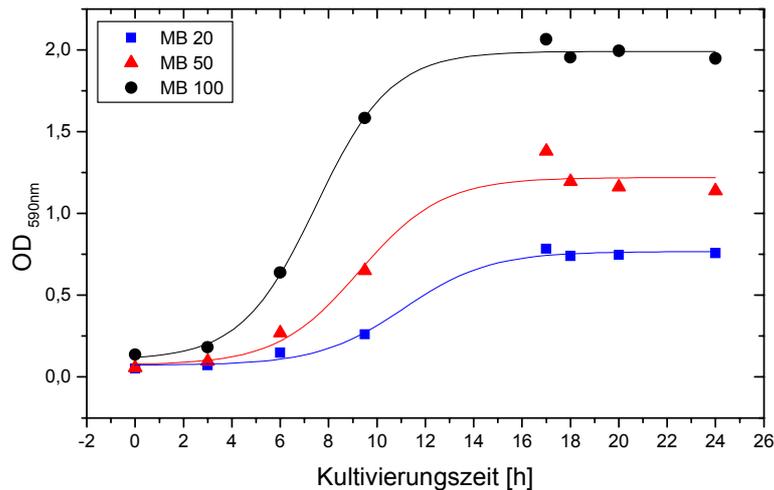


Abbildung 3.15: Wachstum von MBT-12 auf MB100, MB50, MB20

In der Literatur [DSMZ, 2001] ist CASO-Medium (Anhang 5.2) als Wachstumsmedium für Stämme der mit MBT-12 nahe verwandten Gattung *Yersinia* beschrieben. Für MBT-12 wurde mit diesem Medium eine maximale OD von 6,5 und $\mu_{\max} = 1,0$ 1/h erreicht und daher für weitere Charakterisierungsversuche ausgewählt. Eine Übersicht über den Vergleich des Wachstums auf den getesteten Medien zeigt Tabelle 3.3.

Tabelle 3.3: Vergleich des Wachstums von MBT-12 auf verschiedenen Medien (T = 30 °C)

Medium	μ_{\max} [1/h]	OD _{max}
Marine Broth	0,42	2,0
Tryptophan-Minimalmedium	0,02	0,04
Tryptophan-Minimalmedium + C-Quelle	0,22	0,09
CASO	1,0	6,5
CASO + Tryptophan	1,0	6,5

Optimierung der Wachstumsparameter

Zur weiteren Charakterisierung des Stammes MBT-12 wurden sowohl das Gram-Verhalten, als auch die optimale Wachstumstemperatur und -pH-Wert und der optimale Salzgehalt im CASO-Medium ermittelt.

Zur Bestimmung des optimalen Wachstums-pH-Wertes wurden Kultivierungen im Bereich zwischen pH 3,6 und 10,1 durchgeführt. Nach Abbildung 3.16 (links) stellte sich pH 6,5 als Optimum heraus, wobei Wachstum zwischen pH 6 und pH 8,8 beobachtet wurde ($T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $c(\text{NaCl}) = 0,5\%$). Abbildung 3.16 (rechts) zeigt ein Optimum der NaCl-Konzentration im Wachstumsmedium von 1%. Wachstum war zwischen von 0 g/l und 5 g/l NaCl möglich ($\text{pH } 7$, $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$).

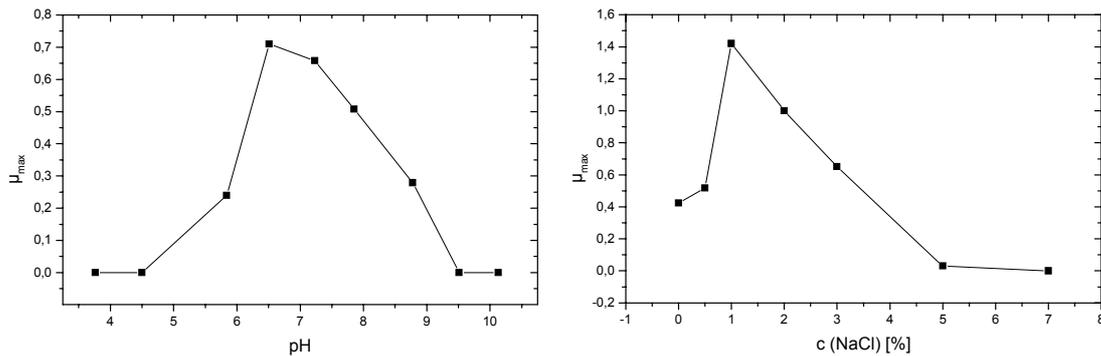


Abbildung 3.16: Optimaler pH-Wert und NaCl-Konzentration im Wachstumsmedium von MBT-12

Nach Abbildung 3.17 (links) liegt das Optimum der Wachstumstemperatur bei $T = 31\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\text{pH } 7$, $c(\text{NaCl}) = 0,5\%$). Während die Wachstumsrate mit abnehmender Temperatur abnimmt, konnte ein Ansteigen der maximalen Optischen Dichte gemessen werden (Abbildung 3.17, rechts).

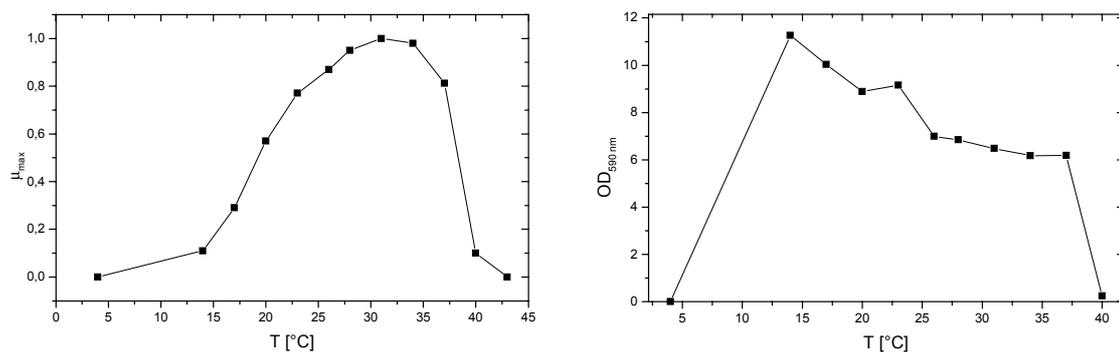


Abbildung 3.17: links: Optimierung der Wachstumstemperatur von MBT-12 in CASO-Medium; rechts: entsprechende maximalen Optischen Dichten

Diese Beobachtung ist mit einem langsameren Stoffwechsel, aber effizienterer Biomasseproduktion bei niedrigeren Temperaturen zu erklären. Ein Wachstum von MBT-12 konnte zwischen 14 und 40 $^{\circ}\text{C}$ beobachtet werden.

Verhalten zu Sauerstoff

Die Gattungen *Serratia* und *Yersinia* sind als die nächsten Verwandten von MBT-12 fakultativ anaerob, weshalb auch das Verhältnis von MBT-12 zu Sauerstoff untersucht wurde. Dies erfolgte mit Hochschichtröhrchen, die zu $\frac{3}{4}$ ihres Fassungsvermögens mit Nährlösung gefüllt waren. Das Medium enthielt 0,5 g/l Agar, um Konvektionsströme zu verhindern, und 1 mg/l Resazurin als Redoxindikator, um die aeroben von den anaeroben Bereichen des Mediums optisch unterscheiden zu können. Die Reduktion von Resazurin erfolgt in zwei Schritten. Der erste vom blauen Resazurin zum blassroten Resorufin ($E = -110$ mV bei pH 7, 30 °C) ist irreversibel; erst der zweite, reversible Reduktionsschritt zum farblosen Dihydroresorufin ($E = -110$ mV bei pH 7, 30 °C) lässt sich zur Kontrolle des Redoxpotentials nutzen. Die Farbintensität gibt ein Maß für die Konzentration der oxidierten Form des Indikators und einen groben Wert für das Redoxpotential im Milieu an. Zum Animpfen der Hochschichtröhrchen wird eine Impfnadel verwendet, die tief in das Medium eingestochen wird.

Bei der Untersuchung von MBT-12 in CASO-Medium konnte Wachstum im aeroben und anaeroben Bereich des Mediums festgestellt werden (Abbildung 3.18).

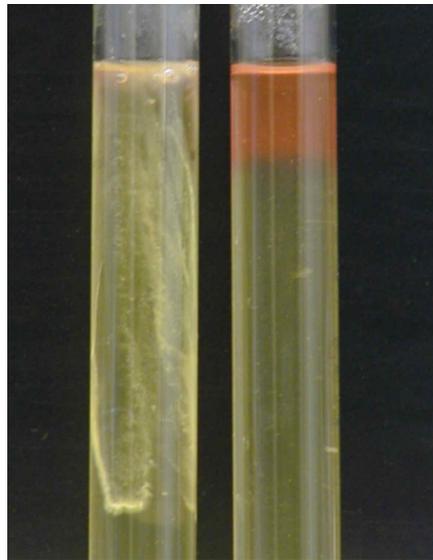


Abbildung 3.18: links: fakultativ anaerobes Wachstum von MBT-12 im Hochschichtröhrchen; rechts: unbeimpftes Vergleichsröhrchen mit rotfarbigem aeroben Bereich

Diese Beobachtung zeigt, dass MBT-12, wie auch die nächsten verwandten Gattungen *Serratia* und *Yersinia*, fakultativ anaerob wächst.

Untersuchung von Stoffwechseleigenschaften

Wie in Kapitel 2.3.4.5 beschrieben dient der GN MicroPlate-Test zur Untersuchung der Verstoffwechslung von 95 verschiedenen Kohlenstoffquellen von Gram-negativen Bakterien. Die Untersuchung von MBT-12 mit diesem Test ergab, dass die folgenden Kohlenstoffquellen verstoffwechselt werden: N-Acetyl-D-glucosamin, cis-Aconitinsäure, Adonitol, L-Alanin, Ameisensäure, γ -Aminobutyrsäure, L-Arabinose, L-Asparagin, L-Aspartat, D-Arabitol, Bromosuccinsäure, Cellobiose, Citronensäure, Dextrin, Essigsäure, D-Fructose, D-Galactose, D-Galacturonsäure, Gentiobiose, D-Gluconsäure, D-Glucosaminsäure, D-Glucuronsäure, α -D-Glucose, Glucose-1-phosphat, Glucose-6-phosphat, Glucuronamid, L-Glutamat, Glycerin, D,L α -Glycerinphosphat, p-Hydroxyphenylelessigsäure, Inosin, m-Inositol, α -D-Lactose, Lactulose, D-Mannitol, D-Mannose, D-Mellobiose, β -Methyl D-glucose, Methylpyruvate, Mono-methylsuccinat, L-Prolin, D-Psicose, Putrescin, D-Raffinose, D-Sorbitol, Succinsäure, Sucrose, Thymidin, D-Trehalose, Turanose, Tween 40, Tween 80, Uridin, Urocansäure, Xylitol,

Eine Verstoffwechslung der nachfolgenden Kohlenstoffquellen von MBT-12 konnte nicht beobachtet werden: N-Acetyl-D-galactosamin, D-Alanin, Alaninamid, L-Alanyl-glycin, 2-Aminoethanol, 2,3-Butandiol, D,L-Carnitin, α -Cyclodextrin, D-Fructose, D-Galactonsäurelactone, Glycyl-L-aspartat, Glycogen, Glycyl-L-glutaminsäure, L-Histidin, α -Hydroxybutyrsäure, β -Hydroxybutyrsäure, γ -Hydroxybutyrsäure, Hydroxy-L-prolin, Itaconsäure, α -Ketobutyrsäure, α -Ketoglutarsäure, α -Ketovalerinsäure, L-Leucin, Malonsäure, D,L-Milchsäure, L-Ornithin, L-Phenylalanin, Phenylethylamin, Propionsäure, L-Pyroglutaminsäure, Quininsäure, L-Rhamnose, D-Saccharin, Sebacinsäure, D-Serin, L-Serin, Succinamid, L-Threonin

Ein API 20 NE-Test (Kapitel 2.3.4.6) diente durch Überprüfung der Fähigkeiten von MBT-12, ausgewählte Enzyme zu synthetisieren und auf bestimmten Kohlenstoffquellen zu wachsen, zur Erstellung eines für MBT-12 spezifischen Fingerprints (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4 : API 20 NE-Test zur Charakterisierung von MBT-A12

Reaktion / Enzym	Substrat	Ergebnis
Urease	Harnsäure	-
Cytochromoxidase	Tetramethyl-p-phenylendiamin	+
β-Galactosidase	p-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid	+/-
Protease	Gelatine + Tusche	+
Arginindihydrolase	Arginin	-
Fermentation	Glucose	+
Indol-Produktion	Tryptophan	-
Nitratreduktion	KNO ₃	+
β-Glucosidase	Esculin	+
Glucose	Assimilation	+
Arabinose	Assimilation	+
Mannose	Assimilation	+
Mannit	Assimilation	+
N-Acetylglucosamin	Assimilation	+
Maltose	Assimilation	-
Gluconat	Assimilation	+
Caprat	Assimilation	+/-
Adipat	Assimilation	-
Malat	Assimilation	+
Citrat	Assimilation	+
Phenylacetat	Assimilation	-

Mit Hilfe dieser biochemischen Charakterisierung ist es möglich, MBT-12 spezifisch im Biofilm von *Flustra foliacea*, aus dem er isoliert worden ist, zu identifizieren.

3.3.2.2 Vergleich von MBT-12 mit den phylogenetisch verwandten Gattungen *Serratia* und *Yersinia*

Der Stamm MBT-12 zeigt nach bei der DSMZ in Braunschweig durchgeführten DNA/DNA-Hybridisierungsexperimenten die größten phylogenetischen Übereinstimmungen zu den Gattungen *Serratia* und *Yersinia*. Diese nahe Verwandtschaft konnte auch durch einen

Vergleich der morphologischen und biochemischen Eigenschaften der Stämme bestätigt werden (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Vergleich der morphologischen und biochemischen Eigenschaften von MBT-12 mit charakteristischen Eigenschaften der Gattungen *Serratia* und *Yersinia* [HOLT *et al*, 1994] (+: positiv; -: negativ; k.A.: keine Angabe)

	MBT-12	<i>Serratia</i>	<i>Yersinia</i>
Form	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen
Sporenbildung	-	-	k.A.
Verhältnis zu Sauerstoff	fakultativ anaerob	fakultativ anaerob	fakultativ anaerob
Vorkommen	Nordsee, <i>Flustra foliacea</i>	Boden, Wasser, Pflanzen, Insekten	Mensch, Tiere, Wasser, Nahrungsmittel
Pigmentierung	-	teilweise rote Färbung	-
Beweglichkeit	-	+	unterschiedlich
Gram-Färbung	negativ	negativ	negativ
Größe	0,5 * 1 µm	0,5-0,8 * 0,9-2 µm	0,5-0,8 * 1-3 µm
optimaler pH	6,5	9	
optimale T	31 °C	30-37 °C	28-30 °C
Reduktion von Nitrat	+	+	+
Indol aus Tryptophan	-	überwiegend negativ	unterschiedlich
Hydrolyse von Gelatine	+	+	k.A.
Arginindihydrolase	-	-	-
Urease	-	-	überwiegend positiv
Verstoffwechslung von			
Malonat	-	unterschiedlich	-
Lactose	+	unterschiedlich	k.A.
D-Glucose	+	+	+
Maltose	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+
D-Mannose	+	+	+
Sucrose	+	+	k.A.
Trehalose	+	+	+
L-Arabinose	+	k.A.	+

Sie zeigt sich einerseits in der Morphologie der Gram-negativen Stäbchen. Weiterhin liegen die optimalen Wachstumstemperaturen jeweils bei ca. 30 °C und auch in der Bildung verschiedener Enzyme und der Verstoffwechslung von C-Quellen wurden Gemeinsamkeiten gefunden. Dagegen wächst MBT-12 optimal bei einem NaCl-Gehalt von 2 %, im Gegensatz

zu den Vergleichsgattungen, die aufgrund des terrestrischen Ursprungs NaCl-Konzentrationen von ca. 0,5 % bevorzugen. Alle Stämme sind fakultativ anaerob.

3.3.2.3 Entwicklung eines effektiven Halogenasenachweises

Nach der Optimierung der Biomasseproduktion von MBT-12 ist es erforderlich, ein effektives Nachweissystem für die Halogenase in Rohextrakten zu entwickeln, um eine Charakterisierung des Enzyms zu ermöglichen. Da es mit Hilfe der PCR nur möglich ist, Gene für bekannte Halogenasen nachzuweisen, können Enzymtests weiterhin genutzt werden, um neue Strukturen dieser Enzyme zu entdecken. Weiterhin sind diese Tests für eine genauere gefundener Halogenasen erforderlich.

Das Substrat der *prnA*-Halogenase ist Tryptophan (Abbildung 3.5). Daher erfolgte die Entwicklung des Screeningsystems auf Grundlage der Detektion von Reaktionsprodukten der Tryptophanhalogenierung. Dafür war es erforderlich, Referenzsubstanzen bereitzustellen, wofür 5-Bromtryptophan, 6-Bromtryptophan und 7-Bromtryptophan als wichtige bromierte Tryptophanderivate gewählt wurden (Abbildung 3.19).

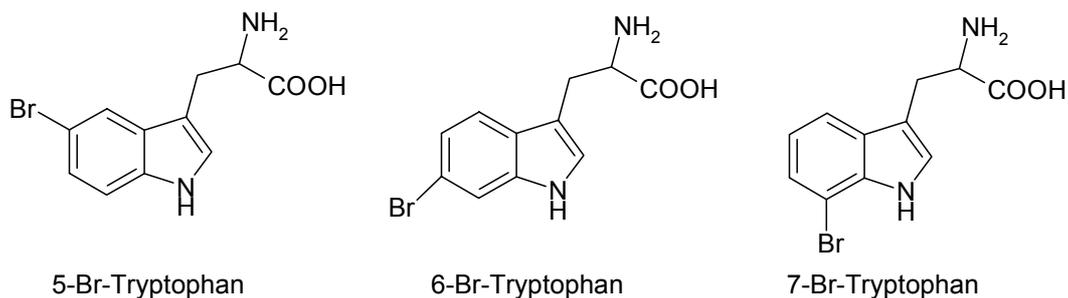


Abbildung 3.19: Strukturformeln von 5-Bromtryptophan, 6-Bromtryptophan und 7-Bromtryptophan

Da nur 5-Bromtryptophan käuflich erhältlich ist, wurden 6-Bromtryptophan und 7-Bromtryptophan enzymatisch aus 6-Brom-Indol bzw. 7-Brom-Indol und L-Serin synthetisiert. Dafür wurde die L-Tryptophansynthase (EC 4.2.1.20) aus der *Escherichia coli*-Mutante B10, bei der es sich um einen Überexprimierer dieses Enzyms handelt [SETO, 1999], eingesetzt (Abbildung 3.20).

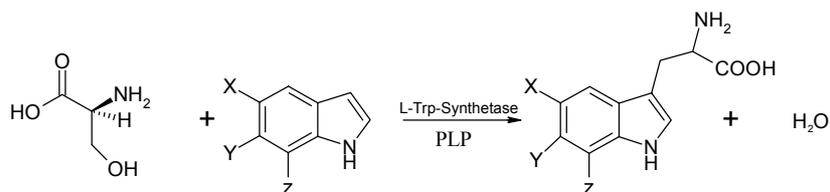


Abbildung 3.20: Enzymatische Umsetzung von L-Serin mit Indol (X=Br, Y,Z=H: 5-Br-Indol; Y=Br, X,Z=H: 6-Br-Indol; Z=Br, X,Y=H: 7-Br-Indol) zu L-Tryptophan (X=Br, Y,Z=H: 5-Br-Trp; Y=Br, X,Z=H: 6-Br-Trp; Z=Br, X,Y=H: 7-Br-Trp)

Die Kultivierung des Stammes erfolgte auf Trypton-Hefeextrakt-Medium (Anhang 5.2) bei $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$. 150 ml Wachstumsmedium wurden mit 10^6 Z/ml einer exponentiell wachsenden Vorkultur angeimpft und für 16 h bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase aerob inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (4000 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) und Waschen der Zellen mit 0,9 % NaCl wurden 0,5 g BFM für einen Tryptophansyntheseansatz eingesetzt. Die Biomasse wurde zu einer Vorlage aus 0,2 g L-Serin, 0,1 g Bromindol, 1 ml Pyridoxal-5-Phosphat-Lösung (1 g/l) und 100 ml Phosphatpuffer (0,1 M, pH 8) gegeben und bei $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 2,5 h inkubiert [PROTSCH, 2002]. Aufgrund der Sauerstoff- und Lichtempfindlichkeit von 7-Br-Indol wurde die 7-Br-Tryptophan-Synthese unter einer Argon-Schutzgasatmosphäre und Lichtabschluss durchgeführt. Die Analytik der Reaktionsprodukte erfolgte mittels HPLC und spektroskopischer Untersuchungen, wie im Folgenden dargestellt.

Zur Detektion von Halogenasen sollte eine schnelle und verlässliche Analytik der halogenierten Tryptophanderivate entwickelt werden. Dafür werden verschiedene spektroskopische und chromatographische Verfahren vorgestellt.

Indol und Bromindolderivate sowie die aus ihnen synthetisierten Tryptophane weisen unterschiedliche Absorptionsmaxima auf (Tabelle 3.6), so dass diese reinen Verbindungen photometrisch identifiziert werden können.

Tabelle 3.6: Absorptionsmaxima von Indol- und Tryptophanderivaten

Substanz	Absorptionsmaximum [λ]
Indol	215 / 268
6-Br-Indol	219 / 278
7-Br-Indol	214 / 270
Trp	218 / 277
5-Br-Trp	224 / 287
6-Br-Trp	224 / 256
7-Br-Trp	214 / 266

In Gemischen verschiedener Indol- und Tryptophanderivate ist aufgrund von Peaküberlagerungen ein spezifischer Nachweis nicht möglich. Dies verdeutlicht Abbildung 3.21, die das Spektrum eines Gemisches von Tryptophan und 5-Br-Tryptophan in Konzentrationen von jeweils 6,25 mg/l zeigt.

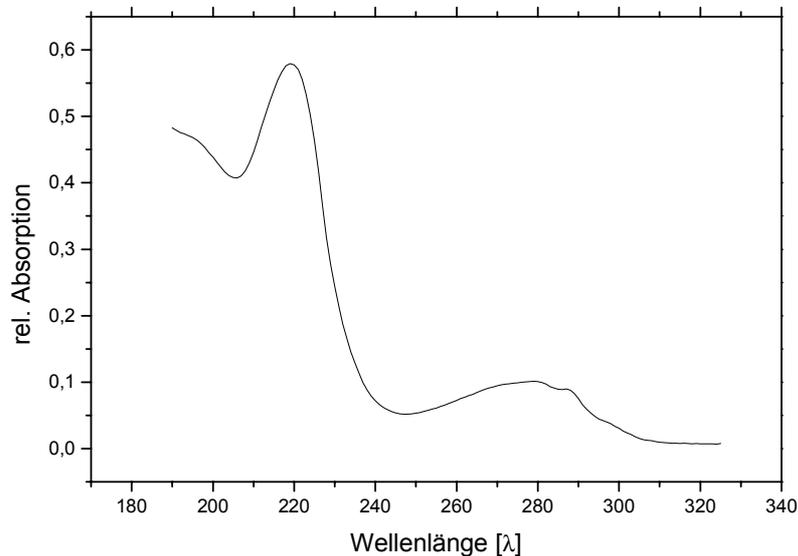


Abbildung 3.21: UV-Spektrum von Tryptophan und 5-Br-Tryptophan in Konzentrationen von jeweils 6,25 mg/l

Die Absorptionsmaxima bei $\lambda = 219$ und 279 nm liegen zwischen denen von Tryptophan und 5-Br-Tryptophan. Daher müssen für die Analyse von komplexen Lösungen wie z.B. Enzymassays Methoden wie HPLC oder 2D-Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt werden. Die HPLC (Anhang 5.13) ist die in der Literatur zur Analytik von Aminosäuren eingesetzte Standardmethode, mit der neben einer verlässlichen Identifizierung der Probenkomponenten ebenfalls eine Quantifizierung möglich ist. Die HPLC-Spektren der enzymatisch synthetisierten bromierten Tryptophanderivate sind in Abbildung 3.22 dargestellt. Es zeigt sich, dass sich diese Verbindungen aufgrund ihrer Lage im Spektrum spezifisch nachweisen lassen.

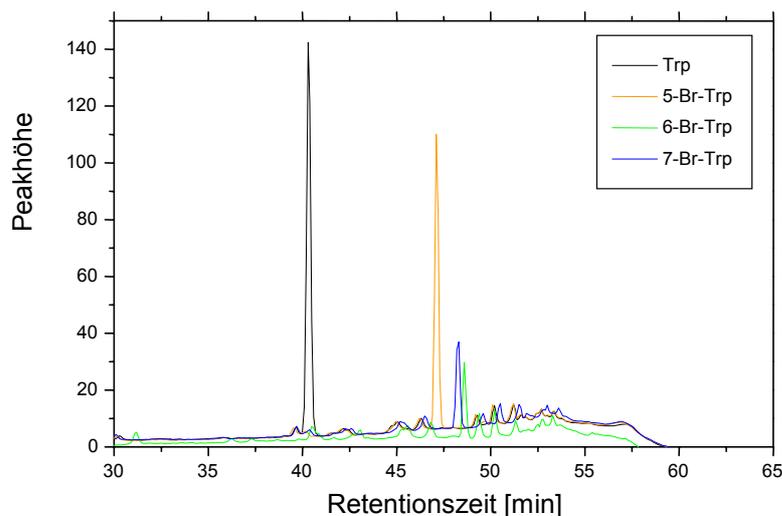


Abbildung 3.22: HPLC-Spektren bromierter Tryptophanderivate

Auch die Aufzeichnung des Reaktionsverlaufes der enzymatischen Bildung der halogenierten Tryptophanderivate ist möglich, was in Abbildung 3.23 am Beispiel der 6-Br-Tryptophan-Synthese gezeigt wird. L-Serin wurde im Verlauf der Reaktion kontinuierlich umgesetzt und das Reaktionsprodukt 6-Br-Tryptophan gebildet. Dieses erreichte nach $t = 2$ h die maximale Konzentration, die in Abbildung 3.23 als relative Peakhöhe angegeben ist.

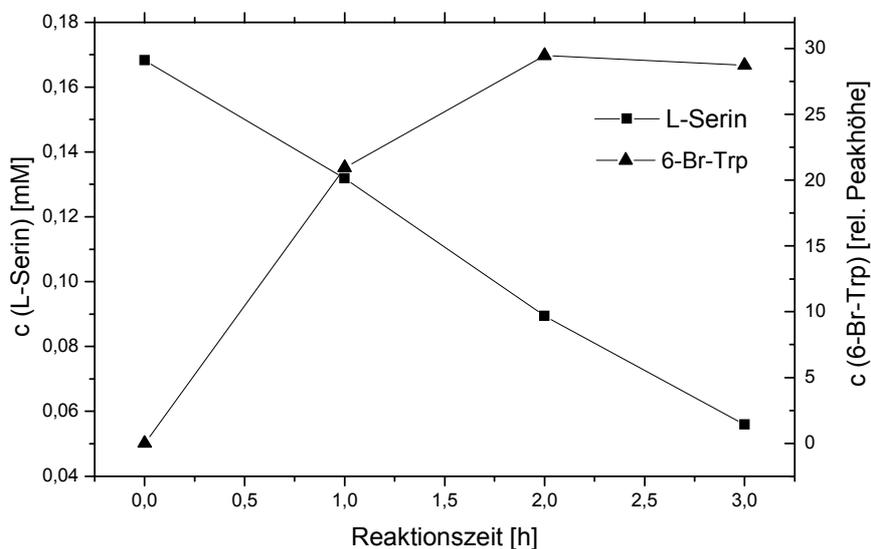


Abbildung 3.23: Verläufe der mittels HPLC gemessenen L-Serin- und 6-Br-Tryptophan-Konzentrationen bei der enzymatischen 6-Br-Tryptophan-Synthese

Mittels HPLC können auch in komplexen Reaktionsgemischen halogenierte Tryptophanderivate detektiert werden. Daher ist der Einsatz der HPLC geeignet, um diese

Verbindungen in einem Screening nach Halogenasen nachzuweisen. Aufgrund der langen Analysezeiten und der erforderlichen Vor- oder Nachsäulenderivatisierung wurde eine Nachweismethode für halogenierte Tryptophanderivate unter Verwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie entwickelt. Tryptophan weist ein Fluoreszenzmaximum bei Ex:Em = 280 nm:350 nm auf. Diese Lage wird durch Substituenten am aromatischen Ring verändert, so dass für halogenierte Tryptophanderivate die in Abbildung 3.24 dargestellte Spektren erhalten wurden.

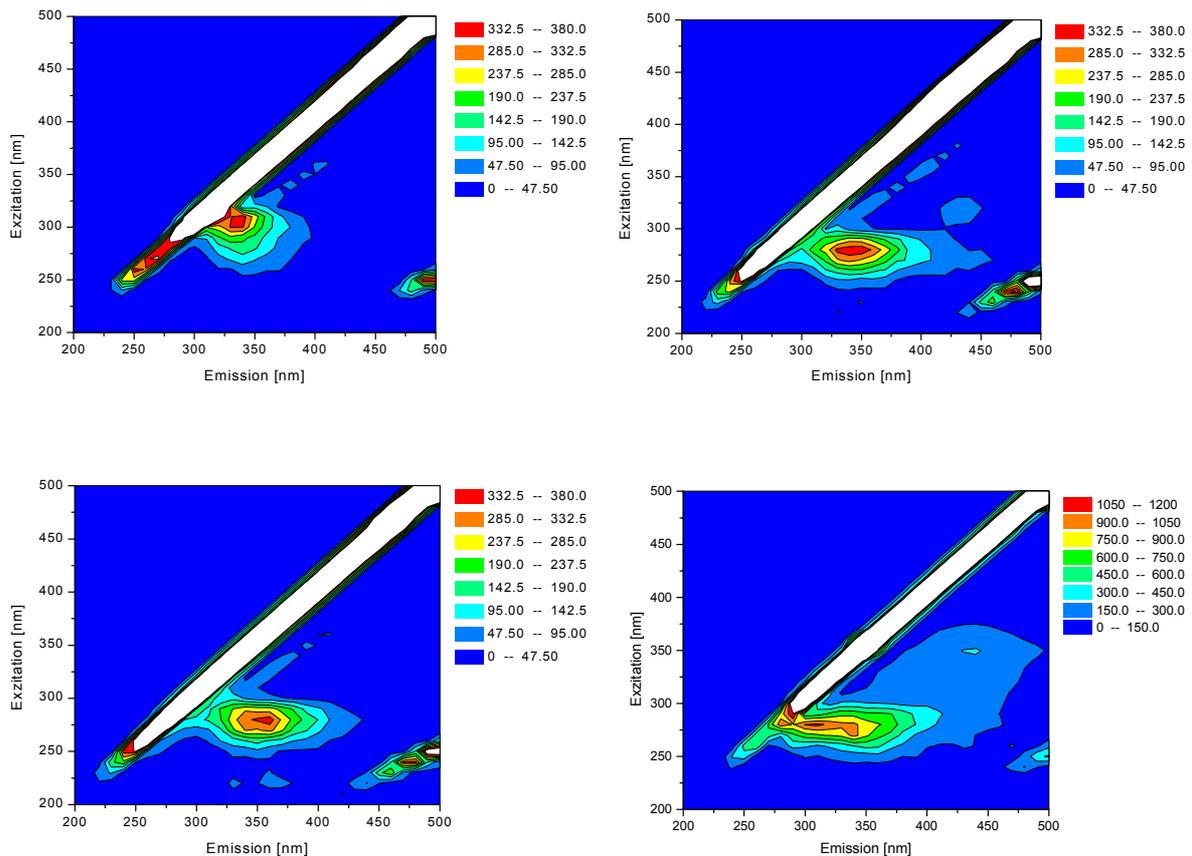


Abbildung 3.24: 2D-Fluoreszenzspektren von 5-Bromtryptophan, 167 mg/l (oben links); 7-Bromtryptophan, 16,5 mg/l (oben rechts); Tryptophan, 5,7 µg/l (unten links); 6-Bromtryptophan, 16,5 mg/l (unten rechts)

Die Fluoreszenzmaxima sind für jedes Derivat spezifisch (Tabelle 3.7), so dass ihre Detektion und Identifizierung mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie möglich ist.

Tabelle 3.7: Vergleich der Fluoreszenzmaxima halogenierter Tryptophanderivate

Trp-Derivat	Fluoreszenzmaximum Ex:Em
Trp	280 nm : 350 nm
5-Br-Trp	310 nm : 340 nm
6-Br-Trp	280 nm : 310 nm
7-Br-Trp	280 nm : 340 nm

Neben der qualitativen Detektion kann auch eine Quantifizierung der Tryptophanderivate erfolgen. Während der lineare Bereich der 5-Br-Tryptophan-Kalibration bis zu einer Konzentration von 50 mg/l verläuft, lassen sich Tryptophan-Konzentrationen im $\mu\text{g/l}$ -Bereich messen (Abbildung 3.25). Höhere Konzentrationen sind aufgrund der hohen Fluoreszenzaktivität von Tryptophan nicht messbar. Die im Vergleich zu Tryptophan geringe Fluoreszenzintensität des 5-Br-Tryptophans ist in der Veränderung der Elektronendichteverteilung durch den Br-Liganden am aromatischen Ring begründet.

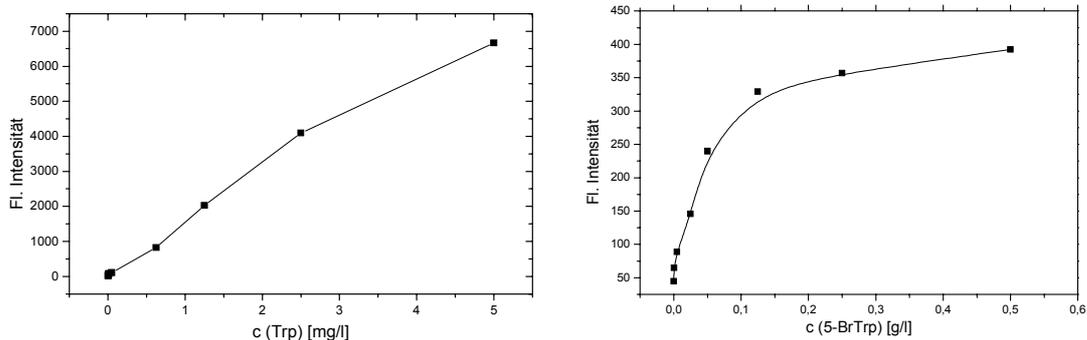


Abbildung 3.25: Kalibrationskurven zur Detektion von Tryptophan (links) und 5-Br-Tryptophan (rechts) mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie

Zur Analyse der Reaktionsprodukte der enzymatischen Halogenierung von Tryptophan ist die Detektion der verhältnismäßig wenig fluoreszenzaktiven halogenierten Tryptophanderivate neben dem stark fluoreszenzaktiven Tryptophan erforderlich. Wird das Spektrum von reinem Tryptophan von dem eines Gemisches aus Tryptophan, 5-Br-Tryptophan und 7-Br-Tryptophan (Abbildung 3.26, links) abgezogen, ergibt sich das Spektrum in Abbildung 3.26 (rechts). Auf diese Weise wird die im Vergleich zu den bromierten Tryptophanen hohe Fluoreszenz des Tryptophans herausgerechnet, so dass 5-Br-Tryptophan und 7-Br-Tryptophan spezifisch im Reaktionsgemisch detektiert werden können.

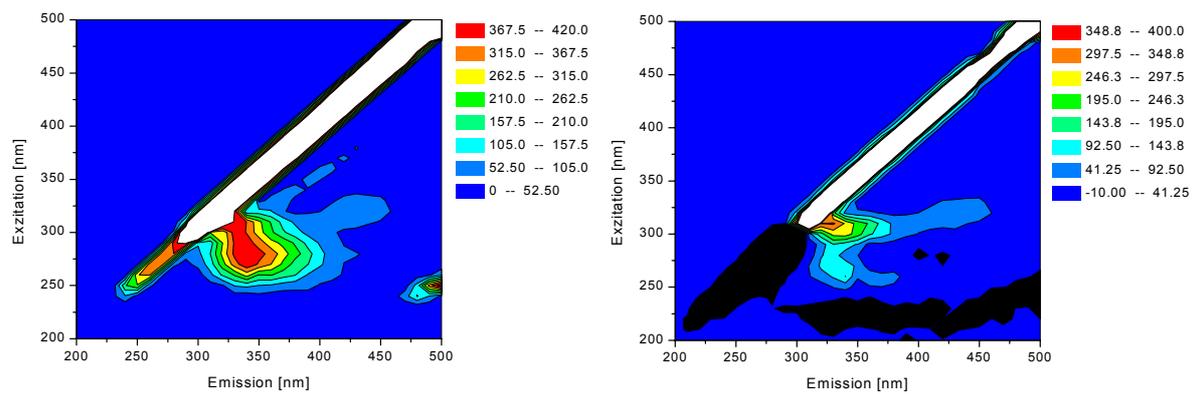


Abbildung 3.26: 2D-Fluoreszenzspektrum eines Gemisches aus von Tryptophan, 5-Br-Tryptophan, 7-Br-Tryptophan (links); Differenz des Spektrums links und dem von reinem Tryptophan (rechts)

Neben der HPLC oder dem Screening nach Halogenase codierenden Genen mittels PCR stellt die 2D-Fluoreszenz ein schnelles und einfaches Hilfsmittel zum Halogenasescreening dar.

3.3.2.4 Zusammenfassung und Ausblick

Nachdem vor 100 Jahren die erste natürliche Halogenverbindung gefunden wurde hat sich eine intensive Forschung auf dem Gebiet der enzymatischen Halogenierung entwickelt. Halogenierte Naturstoffe spielen in vielen Fällen eine wichtige Rolle im Abwehrmechanismus von Mikroorganismen und sind auch technisch und pharmakologisch von hohem Interesse. So zeigen sie oft antifungale, antibakterielle, antivirale, antiinflammatorische oder weitere Wirkungen. Mit Hilfe von halogenierenden Enzymen lassen sich organische Synthesen optimieren, da halogenierte Zwischenprodukte die Grundlage für neuartige Reaktionswege sind. Nachdem bis in die 90er Jahre des letzten Jahrhunderts nur Haloperoxidasen als unspezifisch halogenierende Enzyme bekannt waren, stehen heutzutage insbesondere die spezifisch und regioselektiv arbeitenden Halogenasen im Interesse der Forschung. Für beide Gruppen von Enzymen wurden im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit effektive Screening- und Detektionssysteme entwickelt. Haloperoxidasen lassen sich durch die Bromierung von Phenolrot zu Bromphenolblau auf Mikrotiterplatten detektieren. Mit Hilfe der PCR lässt sich ein effektives Screening nach Halogenasen auf der genetischen Ebene durchführen. Ein chemisches Screening ist mit Hilfe der HPLC und der 2D-Fluoreszenzspektroskopie möglich. Bei diesen Methoden werden die Reaktionsprodukte der enzymatischen Halogenierung detektiert, bei denen es sich im Fall der *prnA*-Halogenase um halogeniertes Tryprophan handelt. Die für das Screening notwendigen Referenzsubstanzen lassen sich durch enzymatische Synthese aus L-Serin und halogeniertem Indol synthetisieren.

Beim Halogenase-Screening mit stark degenerierten *prnA*-Primern an Bryozoen-assoziierten Bakterien ergab der Stamm MBT-12 ein positives Amplifikat. Dieses unbeschriebene Bakterium weist die größte phylogenetische Verwandtschaft zu den Gattungen *Serratia* und *Yersinia* auf, was durch einen Vergleich der physiologischen und biochemischen Charakteristika bestätigt wurde. Für zukünftige Arbeiten ist die Charakterisierung der Halogenase unter Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie geplant. Weiterhin soll aufgrund der in der Literatur beschriebenen geringen Enzymaktivität bekannter Halogenasen das *prnA*-Gen aus MBT-12 in Stämme wie *E. coli* kloniert werden. Auf diese Weise kann ausreichend Enzym für weitere Untersuchungen bereitgestellt werden.

4 Schlussbetrachtung

Das Leben auf der Erde entwickelte sich vor ca. 3,5 Mrd. Jahren im Meer. Dieser Lebensraum birgt eine Vielzahl ökologischer Nischen, in denen sich speziell angepasste Mikroorganismen entwickelt haben (Kapitel 1). Seit Beginn der modernen Biotechnologie wurden überwiegend terrestrische Mikroorganismen erforscht. Erst in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde begonnen, das Potential des nahezu unbekanntes marinen Lebensraumes zu erforschen. Dies und der Einsatz der dadurch erhaltenen Kenntnisse in der biotechnologischen Entwicklung ist Ziel der marinen Biotechnologie. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die Beschreibung der bisher unbekanntes Bakterienstämme *Paracoccus seriniphilus* und MBT-12 tragen dazu bei, das Potential des marinen Ökosystems zu erforschen und zu nutzen. Aufgrund der langen Entwicklungsgeschichte dieses Lebensraumes und des intensiven Konkurrenzkampfes um limitierte Nährstoffe konnten marine Mikroorganismen ihren Metabolismus speziell an ihren Lebensraum anpassen. Im Laufe der Evolution wurden ineffektive und anfällige Stoffwechselwege, wenn möglich, durch bessere ersetzt. Wenn dies aufgrund besonderer Anforderungen nicht möglich war, erfolgte eine bestmögliche Optimierung dieser Systeme. Ein Beispiel dafür ist die L-Serindehydratase aus dem zuvor unbeschriebenen Bakterium *Paracoccus seriniphilus*, mittels derer erstmals ein bioanalytisches System zur Bestimmung von L-Serinkonzentrationen entwickelt werden konnte. Ein solches System soll zur Optimierung der Prozesskontrolle der L-Serinegewinnung aus Zuckerrübenmelasse und der enzymatischen L-Tryptophansynthese aus L-Serin und Indol dienen (Kapitel 2). Eine Onlineanalytik ist mittels HPLC und Aminosäureanalyser aufgrund der zu langen Analysezeiten nicht optimal möglich, könnte aber mit einem bioanalytischen System durchgeführt werden. Ein solches System könnte als biologische Komponente ein spezifisch L-Serin umsetzendes Enzym enthalten, nach dem in dem vom Forschungsschwerpunkt „Marine Biotechnologie“ zur Verfügung gestellten biologischen Material untersucht wurde. Das Screening nach einem solchen Enzym erfolgte mit einem optimierten Mikrotiterplattenscreening unter Verwendung von L-Serin-Minimalmedien. Mit diesem Verfahren im 200 µl-Maßstab können zeitgleich 96 Untersuchungen durchgeführt werden, was einen hohen Probendurchsatz gewährleistet und den Einsatz von nur 5 µl wertvoller Bryozoenextrakte / Screeningversuch erfordert (Kapitel 2.2). Auf diese Weise wurde aus Extrakten der Nordsee-Bryozoe *Bugula plumosa* der zuvor unbeschriebene Bakterienstamm *Paracoccus seriniphilus* isoliert, der zur Stammbeschreibung zunächst physiologisch und biochemisch charakterisiert worden ist. Dabei konnte gezeigt werden, dass

sich die Eigenschaften dieses Bakteriums teilweise deutlich von denen der nächsten phylogenetischen Verwandten *Paracoccus marcusii* und *Paracoccus carotinifaciens* unterscheiden (Kapitel 2.3). Diese sind terrestrischen Ursprungs und weisen Wachstumsoptima bei einem NaCl-Gehalt von 0,5 % auf. Weiterhin sind sie für die technische Carotinoid-Produktion von Interesse. Dagegen wächst *Paracoccus seriniphilus* optimal bei $c(\text{NaCl}) = 3 \%$ und bildet auf Agar in farblosen Kolonien. Die Produktion der L-Serindehydratase erfolgte mittels Kultivierung des Bakteriums im komplexen Medium unter optimalen Wachstumsbedingungen. Ein Zusatz von L-Serin diente zur Induktion der Enzymproduktion. Im Vergleich zu den meisten bekannten L-Serindehydrataseen ließ sich die in vorliegender Arbeit untersuchte Enzymkomplett isolieren, was nach Stabilisierung des Enzyms unter Einsatz chromatographischer Verfahren erfolgte (Kapitel 2.8). Die Untereinheitenstruktur wurde mittels Gelelektrophorese aufgeklärt, wobei gezeigt wurde, dass die L-Serindehydratase aus einem Heterodimer zweier Untereinheiten mit Molmassen von 14,5 und 40 kDa besteht. Damit liegt die Größe des Enzyms im unteren Größenbereich bekannter L-Serindehydrataseen (Kapitel 2.9.2). Die Isolierung des Enzyms war die Voraussetzung für eine bioanalytische Anwendung, die zunächst erfolgreich mit dem nativen Enzym entwickelt wurde. Es war möglich, die Konzentration des Substrates L-Serin einer Kultivierung von *Paracoccus seriniphilus* aufzuzeichnen. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten eine sehr gute Übereinstimmung mit den mittels HPLC gewonnenen Daten. Weiterhin war es möglich, den Verlauf der Biotransformation von L-Serin und Indol zu L-Tryptophan mittels enzymatischer L-Serinbestimmung in offline-Proben des technischen Prozesses zu verfolgen. Ein Vergleich mit Referenzdaten der HPLC ergab geringere Werte der enzymatischen Messung, was mit einer Hemmung der L-Serindehydratase zu erklären ist (Kapitel 2.10.1). Mit diesen Ergebnissen wurde gezeigt, dass die verwendete L-Serindehydratase dafür geeignet ist, zur Prozesskontrolle der Tryptophansynthese eingesetzt zu werden. Um online-Messungen zu ermöglichen, wurde das Enzym immobilisiert, wofür sich VA-Epoxy als geeignetes Trägermaterial herausgestellt hat (Kapitel 2.10.3). Unter Verwendung enzymstabilisierender Pufferlösungen konnte eine Halbwertszeit der Aktivität von 5,3 Tagen erreicht werden, und auch Bestimmungen von L-Serinkonzentrationen waren reproduzierbar möglich. Für die Etablierung der entwickelten Analytik im technischen Prozess wurde ein kontinuierliches Messsystem vorgeschlagen, mit dem online-Bestimmung von L-Serinkonzentrationen durchgeführt werden können. Somit sollte es möglich sein, die Analytik der enzymatischen L-Tryptophansynthese und somit den gesamten Prozess zu optimieren und damit die Produktivität zu steigern (Kapitel 2.11).

Eine besondere Eigenschaft des Meerwassers ist der hohe Gehalt an gelösten Halogeniden. Zudem wurde in den letzten Jahren festgestellt, dass marine Organismen eine Reihe verschiedener bisher unbekannter halogenierter, insbesondere bromierter Verbindungen produzieren, die teilweise interessante biologische Aktivitäten aufweisen. Demnach haben diese Lebewesen Methoden entwickelt, die ihnen in relativ hohen Konzentrationen zur Verfügung stehenden Halogenide für ihren Stoffwechsel zu nutzen. Im Abwehrmechanismus der sie produzierenden Mikroorganismen spielen halogenierte Produkte von Haloperoxidasen in vielen Fällen eine große Rolle. Es handelt sich dabei um hypohalogenige Säuren, die extrazellulär gebildet werden, und elektronenreiche Zentren organischer Verbindungen unspezifisch halogenieren. Oftmals stellen halogenierte Verbindungen auch Zwischenprodukte in Syntheseketten dar und werden mittels spezifischer und regioselektiver Synthesen produziert, wofür Halogenasen geeignet sind. Oftmals handelt es sich bei den Reaktionsprodukten um Derivate des Tryptophans. Technisch stellen sie interessante Vorstufen zur Produktion von Pharmazeutika dar. Insbesondere könnte aus 5-Br-Tryptophan 5-Hydroxytryptophan (Oxitriptan) hergestellt werden, das ein wichtiger Vorläufer des Serotonins ist und selbst gute antidepressive Wirkung zeigt. Derzeit sind halogenierte Tryptophane zu teuer, um sie großtechnisch zur wirtschaftlichen Synthese von Pharmazeutika einsetzen zu können. Dies könnte sich mit der Verwendung von Halogenasen ändern, in der Lage sind, Tryptophan regioselektiv zu halogenieren. In den letzten Jahren hat sich eine intensive Forschung auf dem Gebiet der Halogenasen entwickelt, und insbesondere der marine Lebensraum könnte aufgrund der oben dargestellten Gründe ein interessantes Potential auf diesem Gebiet aufweisen. Die Entwicklung effektiver Screeningverfahren für Halogenasen und Haloperoxidasen ist daher von großer Bedeutung, auch deshalb, weil diese Enzyme oftmals in sehr geringen Konzentrationen von Wildstämmen produziert werden. Für beide Gruppen von Enzymen wurden in vorliegender Arbeit effektive Screening- und Detektionssysteme entwickelt oder bestehende optimiert. Für Haloperoxidasen wurde in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts ein spektroskopischer Assay entwickelt, der auf der Halogenierung von Monochlordimedon beruht. In vorliegender Arbeit konnte festgestellt werden, dass ein empfindlicherer Test möglich ist, indem Phenolrot als Substrat eingesetzt wird, das zu Bromphenolblau bromiert wird. Auf Mikrotiterplatten durchgeführt konnte eine weitere Empfindlichkeitssteigerung im Vergleich zu Messungen in Küvetten erreicht werden (Kapitel 3.3.1.1). Diese resultiert aus der Möglichkeit, ein relativ großes Volumen an Probelösung zu verwenden, die zu den in den Wells vorgelegten und getrockneten Essaykomponenten gegeben wird. Weiterhin können mit Hilfe von Mikrotiterplatten

zeitgleich 96 Assays durchgeführt werden. Mit diesem Test wurde eine Haloperoxidase in dem Cyanobakterium *Anabaena flos-aqua* nachgewiesen, die mit dem ursprünglichen Monochlordimedon-Test nicht detektiert werden konnte. Auch der Einsatz moderner Analysesysteme ist für ein Haloperoxidascreening möglich, wie in Kapitel 3.3.1.1 anhand der 2D-Fluoreszenzspektroskopie dargestellt wurde.

Ein Screening nach den spezifisch und regioselektiv halogenierenden Halogenasen ist auf der genetischen Ebene sehr effektiv mit Hilfe der PCR möglich, wobei von bekannten Halogenasen abgeleitete Primersysteme eingesetzt werden. Beim Screening an Bakterienextrakten der Bryozoe *Flustra foliacea* in Kooperation mit der DSMZ ergab der Stamm MBT-12 mit *prnA* Primern ein positives Amplifikat. Nach der kompletten Sequenzierung des Gens zeigten Vergleiche eine Ähnlichkeit von 90% zu bekannten *prnA* Genen der Gattungen *Pseudomonas* und *Burkholderia*. Der unbeschriebene Stamm MBT-12 weist die größte phylogenetische Verwandtschaft zu den Gattungen *Serratia* und *Yersinia* auf, was durch einen Vergleich der physiologischen und biochemischen Charakteristika bestätigt wurde (Kapitel 3.3.2.2). Diese Untersuchungen erfolgten zur Beschreibung des Stammes und zur Bereitstellung von ausreichend Biomasse für eine Untersuchung der Halogenase. Für diese Untersuchungen war die Entwicklung effektiver Nachweismethoden für die Reaktionsprodukte der enzymatischen Halogenierung erforderlich, bei denen es sich im Fall der *prnA*-Halogenase um halogenierte Tryprophanderivate handelt. Zu deren Nachweis wurde ein in der Literatur beschriebener Assay auf Basis der HPLC optimiert und die Referenzsubstanzen durch enzymatische Synthese aus L-Serin und halogeniertem Indol synthetisiert (Kapitel 3.3.2.3). Unter Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie wurde ein effektives und schnelles Nachweisverfahren für diese Verbindungen entwickelt, das für zukünftige Untersuchungen von Halogenasen eingesetzt werden kann.

Für zukünftige Arbeiten ist es nach der Optimierung der Expression der Halogenase in MBT-12 geplant, dieses Enzym zu isolieren und unter Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zu charakterisieren. Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann schließlich ein Screening nach bisher unbekanntem Strukturen von Halogenasen erfolgen.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit anhand von zwei Beispielen, der L-Serindehydratase aus *Paracoccus seriniphilus* und der Halogenase aus MBT-12, gezeigt werden, dass die Mikroorganismen des marinen Lebensraumes ein großes Potential für die biotechnologische Forschung haben. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Erforschung des marinen Lebensraumes in Zukunft einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der Biotechnologie haben wird.

5 Anhang

5.1 kultivierte Mikroorganismen

Tabelle 5.1: kultivierte Pilze und jeweilige Wachstumsmedien

Pilze	Wachstumsmedien (Anh. 5.2)	Quelle
<i>Caldariomyces fumago</i> (DSM 1256)	Glucose-Malzextrakt-Medium	DSMZ, Braunschweig
steriles Mycel	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Alcyonidium gelatinosum</i> (Matthias Hain, Universität Oldenburg)
<i>Aspergillus</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Alcyonidium gelatinosum</i> (s.o.)
Hefe	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Alcyonidium gelatinosum</i> (s.o.)
steriles Mycel	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Alcyonidium gelatinosum</i> (s.o.)
<i>Fusarium</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Alcyonidium gelatinosum</i> (s.o.)
<i>Chrysosporium</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Alcyonidium gelatinosum</i> (s.o.)
<i>Penicillium</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Bugula plumosa</i> (s.o.)
<i>Penicillium</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Bugula plumosa</i> (s.o.)
steriles Mycel	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Electra pilosa</i> (s.o.)
<i>Cladosporium</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Electra pilosa</i> (s.o.)
<i>Phialophora</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Electra pilosa</i> (s.o.)
<i>Candida</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Electra pilosa</i> (s.o.)
<i>Penicillium</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Electra pilosa</i> (s.o.)
<i>Phoma</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Electra pilosa</i> (s.o.)
<i>Phoma</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Electra pilosa</i> (s.o.)
<i>Chaetomium</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Electra pilosa</i> (s.o.)
<i>Aspergillus</i> (nicht <i>flavus</i> Gruppe)	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Electra pilosa</i> (s.o.)
<i>Acremonium murorum</i> Serie	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Flustra foliacea</i> (s.o.)
<i>Metarrhizium</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Flustra foliacea</i> (s.o.)
Coelomycetes (Ordnung)	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Flustra foliacea</i> (s.o.)
<i>Trichoderma</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Flustra foliacea</i> (s.o.)
Zygomycota	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Flustra foliacea</i> (s.o.)
steriles Mycel	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Flustra foliacea</i> (s.o.)
<i>Trichoderma</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Flustra foliacea</i> (s.o.)
<i>Trichoderma</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Flustra foliacea</i> (s.o.)
<i>Cladosporium</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Membranipora membranacea</i> (s.o.)
<i>Paecilomyces</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Membranipora membranacea</i> (s.o.)
<i>Acremonium</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Membranipora membranacea</i> (s.o.)
Hefe	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Membranipora membranacea</i> (s.o.)
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Membranipora membranacea</i> (s.o.)
Hefe	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Tubulipora liliacea</i> (s.o.)
Schwarze Hefe	Malzextrakt-Medium	Bryozoe <i>Tubulipora liliacea</i> (s.o.)

Tabelle 5.2: kultivierte Cyanobakterien und jeweilige Wachstumsmedien

Cyanobakterien	Wachstumsmedien (Anh. 5.2)	Quelle
<i>Anabaena flos-aqua</i>	BG-11-Medium	Palinska, Universität Oldenburg
<i>Synechococcus</i>	BG-11 / ASN-III = 1:2	Palinska, Universität Oldenburg

Tabelle 5.3: kultivierte Bakterien und jeweilige Wachstumsmedien

Bakterien	Wachstumsmedien (Anh. 5.2)	Quelle
<i>Paracoccus seriniphilus</i> , MBT-A4 (DSM 14827)	L-Serin-Minimalmedium, Pepton-Hefeextrakt-Medium	Bakterienisolat von <i>Bugula plumosa</i> , (Pukall, DSMZ Braunschweig)
MBT-12	CASO-Medium	Pukall, DSMZ Braunschweig
<i>Escherichia coli</i> B10	Trypton-Hefeextrakt-Medium	Protsch, Universität Hannover
FL5	MB 50	isoliert von <i>Flustra foliacea</i> , (Pukall, DSMZ Braunschweig)

5.2 Wachstumsmedien

Alle Nährmedien wurden für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurden 18 g/l Bacto Agar hinzugegeben.

L-Serin-Minimalmedium

SeaSalts	34,3 g/l
Vitamin-Lösung (s.u.)	1 ml/l
Spurenelementlösung SL-6	1 ml/l
L-Serin	3 g/l (nach dem Autoklavieren sterilfiltriert hinzugegeben)

Spurenelementlösung SL-6 [DSMZ, 2001]

ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ *4H ₂ O	0,03 g
H ₃ BO ₃	0,3 g
CoCl ₂ *2H ₂ O	0,2 g
CuCl ₂ *2H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ *6H ₂ O	0,02 g
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,03 g
Wasser	1 l

Zusammensetzung von Sea Salts [Sigma, Produktinformation]

Cl ⁻	8,788 ppm
Na ⁺	0,424 ppm
SO ₄ ²⁻	0,577 ppm
Mg ²⁺	0,265 ppm
Ca ²⁺	0,398 ppm
K ⁺	0,371 ppm
HCO ₃ ⁻	0,145 ppm
BO ₃ ³⁻	0,028 ppm
Sr ²⁺	0,0062 ppm
PO ₄ ³⁻	0,0014 ppm
SiO ₃ ⁻	0,0030 ppm
Mn	0,0012 ppm
F	0,0010 ppm
MoO ₄	0,0006 ppm
Li	0,0002 ppm

Tabelle 5.4: Salzgehalt des Mediums in Abhängigkeit von der Sea Salts-Konzentration [Sigma, Produktinformation]

Salzgehalt ‰	g/l
5	5,0
10	11,1
15	16,9
20	22,7
25	28,4
30	34,3
34 (durchschnittliche Salinität von Seewasser)	38
35	40,1
40	48
45	51,9
59	57,9
55	64

Vitaminlösung

m-Inosit	6,0 g
Ca-Pantothenat	3,0 g
Thiamin*HCl (B1)	0,6 g
Pyridoxol*HCl (B6)	0,15 g
Biotin	3 mg
Wasser	100 ml

Marine Broth 2216

MB 100: Marine Broth	37,40 g
Wasser	1 l
MB 50: Marine Broth	18,70 g
SeaSalts	15,43 g
Wasser	1 l
MB 20: Marine Broth	7,48 g
SeaSalts	6,17 g
Wasser	1 l

Zusammensetzung von Marine Broth 2216 [ATLAS, 1995]

NaCl	19,45 g
MgCl ₂	8,8 g
Pepton	5,0 g
Na ₂ SO ₃	3,24 g
CaCl ₂	1,8 g
Hefeextrakt	1,0 g
KCl	0,55 g
NaHCO ₃	0,16 g
Eisencitrat	0,1 g
KBr	0,08 g
SrCl ₂	0,03 g
H ₃ BO ₃	0,02 g
Na ₂ HPO ₄	8,0 mg
Na ₂ SiO ₃	4,0 mg
NH ₄ NO ₃	1,6 mg
Wasser	1 l

Pepton-Hefeextrakt-Medium

Bactopepton	5 g
Hefeextrakt	5 g
Sea Salts	34,3 g
L-Serin	1 g
Wasser	1 l

CASO-Medium

Caseinpepton	17 g
Sojamehlpepton	3 g
Glucose	5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Wasser	1 l

BG-11-Medium [PALINSKA, 2000]

NaNO ₃	1,5 g
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	40 mg
MgSO ₄ *7H ₂ O	75 mg
CaCl ₂ *2H ₂ O	36 mg
Zitronensäure	6 mg
Eisen-Ammonium-Citrat	6 mg
EDTA	1 mg
Na ₂ CO ₃	2 mg
Spurenelementlösung A5	1 ml
Wasser	1 l

pH 7,4

Malzextrakt-Medium [nach BAST, 1999]

Malzextrakt	30 g
Pepton aus Sojamehl	3 g
NaCl	5 g
Waser	1 l

pH 5,6

ASN-III-Medium [PALINSKA, 2000]

NaCl	25 g
MgCl ₂ *6H ₂ O	2,0 g
KCl	0,5
NaNO ₃	0,75
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	20 mg
MgSO ₄ *7H ₂ O	3,5 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,5 g
Zitronensäure	3 mg
Eisen-Ammonium-Citrat	3 mg
EDTA	0,5 mg
Na ₂ CO ₃	20 mg
Spurenelementlösung A5	1 ml
Wasser	1 l

pH 7,5

Spurenelementlösung A5 [PALINSKA, 2000]

H ₃ BO ₃	2,860
MnCl ₂ *4H ₂ O	1,810
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,222
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,390
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,079
Co(NO ₃) ₂ *6H ₂ O	0,049
Wasser	1l

Glucose-Malzextrakt-Medium [PICKARD, 1981]

Glucose	40 g
Malzextrakt	20 g
NaNO ₃	2 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	1 g
FeSO ₄ *7H ₂ O	20 mg

Trypton-Hefeextrakt-Medium [PROTSCH, 2002]

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Wasser	1 l
pH 7	

Tryptophan-Minimalmedium

Tryptophan	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
SeaSalts	22,7 g
Spurenelementlösung SL-6	1 ml
Vitaminlösung (s.o.)	1 ml
Wasser	1 l

5.3 Stammhaltung auf Agarplatten

Zur Stammhaltung auf Agarplatten wurden die Nährmedien mit 18 g/l Agar mit den jeweiligen Bakterienstämmen beimpft und im Brutschrank inkubiert. Nach der Ausbildung von Kolonien wurden sie für 4 Wochen bei 4 °C gelagert.

5.4 Gefrierkulturen in Glycerin

Zur Langzeitstammhaltung der Mikroorganismen wurden diese bis zur exponentiellen Phase in den Wachstumsmedien herangezogen. Anschließend wurden Portionen von 250 µl Kulturüberstand mit 750 µl steriler Glycerinlösung (75%) versetzt und über eine stufenweise Abkühlung über -4 °C und -20 °C bei -80 °C bis zu einem Jahr gelagert.

5.5 Optische Dichte

Die optische Dichte (OD_{590 nm}) der Kulturlösung ist ein Maß für die Zelldichte einer Kultivierungsbrühe. Sie wird als Extinktion bei einer Wellenlänge von 590 nm in einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Uvicon 940, Fa. Kontron, Neufahrn) gemessen. Die Kulturprobe wurde vor der Messung mit NaCl-Lösung (0,9 %) bis zu einer maximalen Absorption von 0,8 verdünnt. In einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke wurde dann bei RT die Extinktion gegen NaCl-Lösung (0,9 %) gemessen. Die NaCl-Lösung konnte als Referenz verwendet werden, da entsprechend verdünntes, zellfreies Kulturmedium bei der eingestellten

Wellenlänge eine zu vernachlässigende Absorption besitzt. Es wurden jeweils zwei Parallelbestimmungen durchgeführt, um Verdünnungsfehler zu minimieren.

5.6 Bestimmung der Biotrockenmasse

Jeweils 2 ml jeder Kultivierungsprobe wurden in zuvor ausgewogene Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben, und 10 min bei 16000 rpm zentrifugiert. Nach Abdekantieren der Überstände wurden die Reaktionsgefäße 24 h bei 100 °C getrocknet und nach Abkühlen im Exsikkator ausgewogen. Die Biotrockenmasse ergab sich aus der Differenz dieser Masse und der Masse der zuvor ausgewogenen leeren Reaktionsgefäße.

5.7 Bestimmung der maximalen Wachstumsrate

Für eine sich exponentiell vermehrende Kultur gilt die folgende Differentialgleichung:

$$dx/dt = \mu x \quad \text{Gleichung 5.1}$$

Bei unlimitiertem Wachstum ist die Wachstumsrate maximal und konstant $\mu = \mu_{\max}$. Die Gleichung kann integriert und nach aufgelöst werden:

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{(t_2 - t_1)} \cdot h^{-1} \quad \text{Gleichung 5.2}$$

x: Biomasse, t: Wachstumszeit [h] (Weide, H., Páca, J., Knorre, W.A., Biotechnologie, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1991, 2. Auflage)

5.8 Zellaufschluss

Der Aufschluss der Bakterienzellen mittels Ultraschall diente dazu, die L-Serindehydratase für Aktivitätstests und zur Isolierung und Charakterisierung in eine gepufferte Lösung zu überführen. Dabei werden die Zellen in der Suspension durch intensive Schallwellen in einem Frequenzbereich von 10-40 kHz zerstört. Die Wellen werden über eine Ultraschallsonde (Braun) in der Flüssigkeit erzeugt und führen zu Strömungen und zur Bildung von Mikroblasen. Wenn diese implodieren, erzeugen sie Druckwellen, die ausreichend Energie besitzen, die Zellen zu zerstören [LOTTSPREICH, 1998].

Als Aufschlusspuffer diente ein 20 mM Kaliumphosphatpuffer [ROSENBERG, 1996] mit einem pH-Wert von 7,6, der dem pH-Optimum des Enzyms entspricht (Kapitel 2.9.3). Zum Aufschluss von *Paracoccus seriniphilus* wurden 100 mg Biofeuchtmasse in 900 µl KPP-Puffer suspendiert. Da bei einem Zellaufschluss mit Hilfe von Ultraschall Wärme erzeugt wird, war eine Eiskühlung des Probengefäßes notwendig. Um zusätzlich eine Erwärmung und

damit die Gefahr der Proteindenaturierung zu verhindern, erfolgte die Aussendung der Ultraschallwellen auf die Probe nicht kontinuierlich, sondern in 0,3 s-Pulsen, gefolgt von jeweils einer 0,7 s-Pause zum Kühlen. Nach erfolgtem Aufschluss lagen die unlöslichen Zelltrümmer in der Proteinlösung suspendiert vor und mussten vor der weiteren Verwendung der L-Serindehydratase abgetrennt werden. Dazu wurde die Probelösung für eine Zeit von 10 min mit einer Geschwindigkeit von 20000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Die so erhaltene leicht gelblich gefärbte Lösung hatte einen Gesamtproteingehalt von 6,2 g/l (Anhang 5.14) und wurde für weitere Untersuchungen eingesetzt. Die L-Serindehydratase-Aktivität lag ausschließlich im Überstand vor, was dafür spricht, dass dieses Enzym nicht membrangebunden oder in Organellen vorliegt.

Wie Abbildung 5.1 (links) zeigt, hat eine Variation der Ultraschallstärke einen deutlichen Einfluss auf die Aufschlussrate. Wie bei ungenügender Kühlung, so wird das Enzym durch zu starke Kräfte denaturiert, während zu geringe Kräfte einen unvollständigen Aufschluss zur Folge haben. Nach dieser Optimierung bei einer Aufschlusszeit von 5 min wurde eine Geräteeinstellung von 60 W für alle weiteren Versuche gewählt.

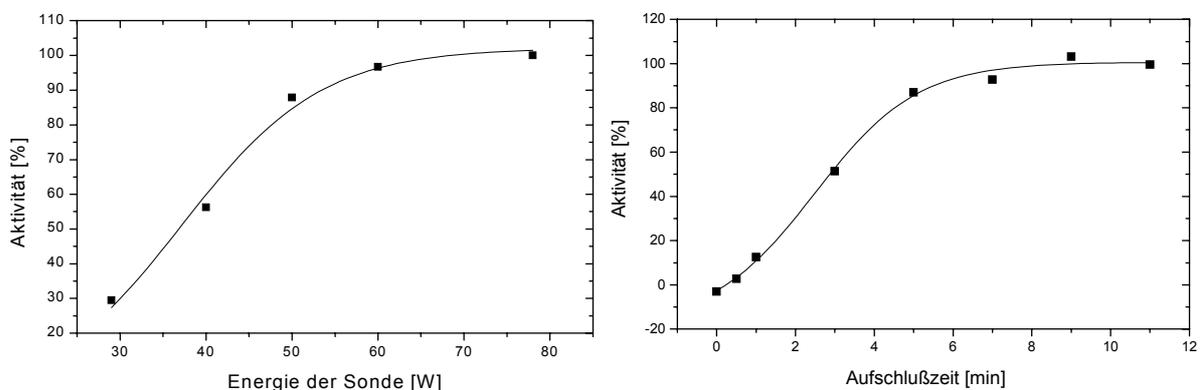


Abbildung 5.1: links: Optimierung der Ultraschallstärke bei einer Aufschlusszeit von 5 min; rechts: Optimierung der Aufschlusszeit bei einer Geräteeinstellung von 60 W

Auch die optimale Aufschlusszeit ist für einen erfolgreichen Zellaufschluss von Bedeutung. Nach einer Optimierung mit einer Geräteeinstellung von 60 W in Abbildung 5.1 (rechts) wurde eine Zeit von $T = 6$ min gewählt.

Wie die Optimierungsversuche zeigen, erfolgt ein optimaler Zellaufschluss bei 60 W und einer Aufschlusszeit von $t = 6$ min. Diese Einstellungen wurden daher für alle nachfolgenden Versuche gewählt.

5.9 Bestimmung der L-Serindehydratase-Aktivität

Die Bestimmung der L-Serindehydratase-Aktivität in Rohextrakten erfolgte nach Tabelle 5.5.

Tabelle 5.5: Bestimmung der L-Serindehydratase-Aktivität in Rohextrakten

Durchführungsschritte	Volumen [μ l]
KPP-Puffer, 100 mM, pH 7,6	300
L-Serin (20 g/l in KPP, 100 mM, pH 7,6)	50
Enzymlösung	50
Inkubation für $t = 30$ min bei $T = 51^\circ\text{C}$	
DNPH (1 g/l in 2 M HCl)	150
Inkubation für $t = 10$ min bei RT	
NaOH (3 M)	550
Inkubation für $t = 10$ min bei RT	
Absorptionsmessung bei $\lambda = 550$ nm	

Zur Bestimmung der Aktivitäten verdünnter Enzymlösungen, die nach der chromatographischen Aufreinigung erhalten wurden, wurde der oben beschriebene Assay variiert. Im Vergleich zur Aktivitätsbestimmung in Rohextrakten wurde ein größeres Volumen der Enzymlösung eingesetzt und die Reaktionszeit zwischen Enzym und Substrat verlängert (Tabelle 5.6). Mit der hier beschriebenen Methode zur Pyruvatanalytik kann jeweils pro Enzymtest ein Messpunkt nach einer definierten Reaktionszeit des Enzyms mit dem Substrat aufgenommen werden. Ein Referenzwert zum Zeitpunkt $t = 0$ min diene dazu, die Konzentration des Pyruvates in der Reaktionsmischung zu ermitteln, das nicht aus der enzymatischen Umsetzung resultiert. Der Anteil des während des Assays gebildeten Pyruvates ergibt sich aus der Differenz des Mess- und Referenzwertes.

Tabelle 5.6: Bestimmung der Aktivität nativer verdünnter L-Serindehydratase

Durchführungsschritte	Volumen [μ l]
KPP-Puffer, 100 mM, pH 7,6	50
L-Serin (20 g/l in KPP, 100 mM, pH 7,6)	50
Enzymlösung	300
Inkubation für $t = 30$ min bei $T = 51^\circ\text{C}$	
DNPH (1 g/l in 2 M HCl)	150
Inkubation für $t = 10$ min bei RT	
NaOH (3 M)	550
Inkubation für $t = 10$ min bei RT	
Absorptionsmessung bei $\lambda = 550$ nm	

5.10 Bestimmung der L-Threonindehydratase-Aktivität

Die Bestimmung der L-Threonindehydratase-Aktivität erfolgte analog zu Anhang 5.9. Als Substrat wurde anstatt des L-Serins L-Threonin eingesetzt.

5.11 Bestimmung der Pyruvatkonzentration

Bei der Umsetzung von Pyruvat mit DNPH bildet sich ein Hydrazon, das im alkalischen pH-Bereich einen roten Farbstoff bildet. Dieser kann photometrisch bei $\lambda = 550$ nm detektiert werden (HÖRNER, 1997). Der Test verläuft nach folgender Vorschrift (Tabelle 5.7):

Tabelle 5.7: Bestimmung der Aktivität nativer verdünnter L-Serindehydratase

Durchführungsschritte	Volumen [μ l]
KPP-Puffer, 100 mM, pH 7,6	350
Probelösung	50
DNPH (1 g/l in 2 M HCl)	150
Inkubation für t = 10 min bei RT	
NaOH (3 M)	550
Inkubation für t = 10 min bei RT	
Absorptionsmessung bei $\lambda = 550$ nm	

Die Pyruvatkonzentration ergibt sich nach einer Kalibration (Abbildung 5.2):

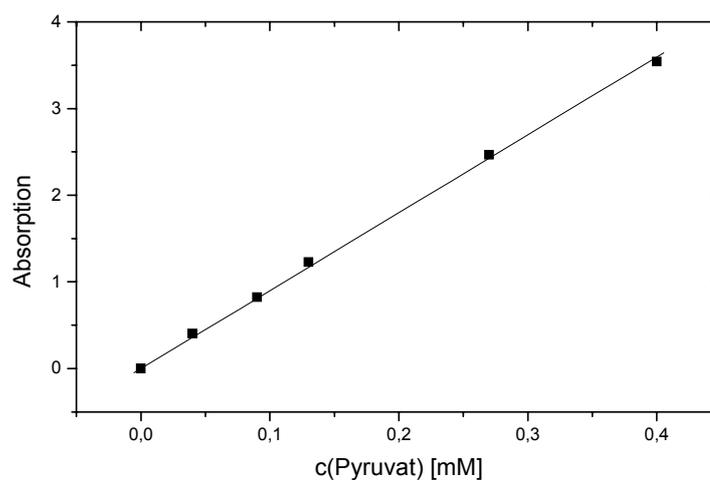


Abbildung 5.2: Kalibrationsgerade zur Bestimmung der Pyruvatkonzentration

Der lineare Bereich der Kalibration verläuft von 0 bis 0,4 mM Pyruvat. Die Pyruvatkonzentration ergibt sich aus der gemessenen Absorption nach folgender Gleichung:

$$c = A / (8,99 \text{ l/mM}) \quad \text{Gleichung 5.3}$$

c: Pyruvatkonzentration [mM]; A: Absorption

Der Extinktionskoeffizient für das Hydrazon berechnet sich nach Gleichung 2.2 zu 8,855 ml/($\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$).

5.12 Bestimmung der Ammoniumkonzentration

Eine einfache Methode, Ammoniumkonzentrationen zu bestimmen, ist ein enzymatischer Nachweis mittels der Glutamatdehydrogenase (EC 1.4.1.2). Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von Ammonium mit 2-Oxoglutarat zu Glutamat, wobei gleichzeitig NADH oxidiert wird (Abbildung 5.3). So ist eine photometrische Detektion bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ möglich.



Abbildung 5.3: enzymatische Ammoniumbestimmung mit Glutamatdehydrogenase

Der Test wurde unter Verwendung der folgenden Lösungen durchgeführt:

Lsg. 1: 9,3 g Triethanolamin + 95 mg ADP + 670 mg 2-Oxoglutarat mit Wasser auf 100 ml auffüllen; pH 8,0

Lsg. 2: 30 mg NADH+H⁺ + 60 mg NaHCO₃ + 10 ml H₂O

Lsg. 3: Glutamatdehydrogenase (2400 U/ml)

Lsg. 1 (100 μl), Lsg. 2 (100 μl) und 100 μl Probe wurden in einer Quarzküvette vorgelegt und nach Temperatúrausgleich die Reaktion durch Zugabe von Lsg. 3 (20 μl) gestartet. Der Verlauf der NADH-Absorption wurde bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ aufgezeichnet und die Ammoniumkonzentration aus der Anfangssteigung nach vorheriger Kalibration (0-19 μM) berechnet. Die Kalibrationsgerade ist in Abbildung 5.4 abgebildet.

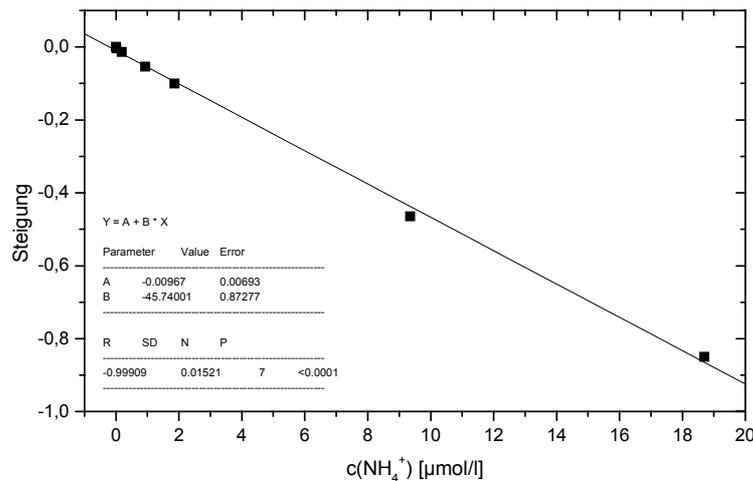


Abbildung 5.4: Kalibrationsgerade für die enzymatische Ammoniumbestimmung

5.13 Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen mittels HPLC

Da Aminosäuren keine Chromophore enthalten, werden sie zur Detektion derivatisiert. Dafür kann Ortho-Phthaldialdehyd eingesetzt werden, das bei RT und pH 9,5 mit einem Thiol und primären Aminen zu einem 2-alkylthio-2-alkylsubstituierten Isoindol reagiert.

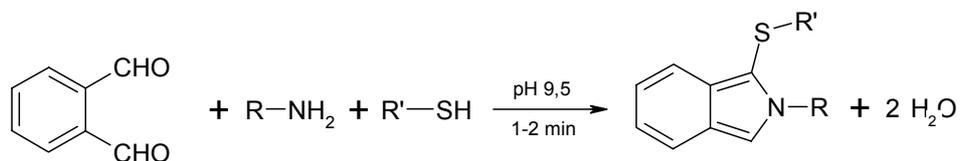


Abbildung 5.5: Derivatisierung primärer Aminosäuren mit OPA in Gegenwart eines Thiols

Die Detektion erfolgt fluoreszenzspektroskopisch bei $\text{Ex} : \text{Em} = 330 \text{ nm} : 460 \text{ nm}$, wobei OPA aufgrund der fehlenden Fluoreszenz zu keinen Störungen führt.

OPA-Reagenz:

- 270 mg OPA in 5 ml Ethanol lösen
- 200 µl Mercaptoethanol mit 0,4 M Boratpuffer, pH 9,5 auf 50 ml auffüllen
- 24 h altern lassen

Säule:

Waters, RP Resolved C18, 5 μm , 150 mm * 4 mm

Laufmittel:

A: 0,05 M Natriumacetat, 0,05 M NaH_2PO_4 , pH 7

B: 54 % MeOH, 46 % Wasser

Laufgradient:

0-50 min: 0-100% B

-55 min: 100% B

-60 min: -0% B

5.14 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte colorimetrisch mit dem BioRad DC-Proteintest, der auf der Methode nach Lowry basiert. 5 μl der zu messenden Probe wurden mit 25 μl Lösung A und 200 μl Lösung B auf einer Mikrotiterplatte gemischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte bei $\lambda = 655 \text{ nm}$, wobei die Absorptionsintensität proportional zur Proteinkonzentration ist. Diese konnte mittels Kalibration mit BSA zwischen $c = 0$ und 2 g/l errechnet werden.

5.15 KOH-Test auf Liposaccharide

Mit einer Impföse wird ein Tropfen 3 %ige KOH-Lösung auf einem Objektträger mit einer Bakterienkolonie verrieben. Bei Gram negativen Bakterien werden dabei Liposaccharide aus der Zellwand gelöst und bilden aufgrund ihrer zähen klebrigen Konsistenz beim Hochziehen der Öse Fäden.

5.16 Charakteristika der BioRad-Econo-Pac Cartridges

Zur Isolierung der L-Serindehydratase wurden Chromatographiesäulen der Firma BioRad verwendet. Sie wurden mit den jeweiligen Säulenmaterialien gepackt geliefert und weisen daher eine hohe Homogenität auf und hohe Auflösung auf (BioRad-Homepage). Für die Isolierung der L-Serindehydratase wurden die CHT II - (Hydroxylapatit) und High Q - (Anionenaustausch) Säulen eingesetzt, deren charakteristische Daten in Tabelle 5.8 aufgelistet sind.

Tabelle 5.8: Charakteristika verwendeter BioRad-Säulen

Säulenart	Hydroxylapatit (CHT II)	Anionenaustausch (High Q)
Funktionelle Gruppe	$[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]_2$	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
Säulenvolumen	5 ml (1,33 * 3,6 cm)	5 ml (1,33 * 3,6 cm)
Bindungskapazität	15 mg BSA; 30 mg Lysozym	170 mg BSA
Partikeldurchmesser	20 μm	50 μm
Porengröße	800 Å	1000 Å
Optimale Flußrate	0,5 ml/min	0,5 - 3 ml/min
Maximaler Druck	3,45 bar (20°C)	3,4 bar (20°C)

5.17 Vivaspin-Konzentratoren

Vivaspin 20 - Konzentratoren (Vivascience, Hannover) (Abbildung 5.6) [Produktbeschreibung Vivaspin] sind zur Aufkonzentrierung von Proteinen entwickelt worden. Sie bestehen aus einem zweiteiligen System, von denen der obere Teil ein Volumen von 20 ml verdünnter Proteinlösung fasst und eine Ultrafiltrationsmembran mit einem cut-off von 30 kDa enthält. Mit Hilfe einer Zentrifuge kann eine Ultrafiltration bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 4000 rpm und $T = 4^\circ\text{C}$ innerhalb von 20 min durchgeführt werden. Auf diese Weise kann ein Aufkonzentrierungsfaktor von ca. 50 erreicht werden. Ein zusätzlicher Effekt dieses Schrittes ist die Abtrennung von Verunreinigungen mit einer Molmasse unterhalb der Ausschlussgröße. Die aufkonzentrierte Proteinlösung verbleibt im oberen Einsatz des Konzentrators zurück, so dass sie entnommen und für weitere Untersuchungen eingesetzt werden kann.

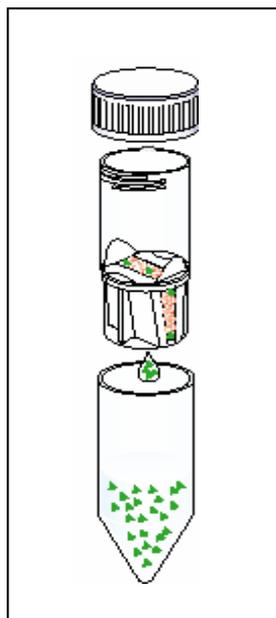


Abbildung 5.6: Schematische Aufbau des Vivaspin 20-Konzentrators [Produktbeschreibung Vivaspin]

5.18 Grundeinstellungen des 2D-Fluoreszenzspektrometers

Exzitations/Emissionsintervall:	10 nm
Exzitations-/Emissionsslit:	10 nm / 20 nm
Scanspeed:	12000 nm / min
PMT-Voltage:	700 V
Response:	automatic
Shutter controll	

5.19 Gelelektrophorese

Für gelelektrophoretische Untersuchungen wurde das PHAST-System (Pharmacia) eingesetzt. Für eine nicht reduzierende Probenvorbereitung und der Verwendung von homogenen SDS Gelen wurden die folgenden Lösungen benötigt [KOSEMUND, 1997]:

1. SDS-Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 8,0 + 2 mM EDTA + 5% SDS + 0,02% Bromphenolblau
2. Waschlösung: 10% EtOH + 5% HAc
3. 0,4% AgNO₃
4. Stop-Lösung: 5-10% Glycerin
5. Fixier-Lösung: 0,3 g NaAc + 4 ml 1,6% Na₂S₂O₃ + 10 ml 5% Glutaraldehyd + 30 ml 95% EtOH, 5% HAc + 56 ml Wasser
6. Entwickler: 150 ml 2,5% Na₂CO₃ + 1 ml 2% Formaldehyd
7. Reduzierlösung: 3,7 g Tris-HCl + 100 ml 1,6% Na₂S₂O₃ mit Eisessig auf pH 5-6 einstellen

Probenvorbereitung

Die zu untersuchenden Proben wurden 1:1 mit SDS-Puffer verdünnt und für 5 min bei 100 °C gekocht. Feststoffe wurden für 3 min bei 10000 rpm abzentrifugiert.

Gelfärbung

Die Färbung der Gele erfolgte mittels Silberfärbung [BLUM *et al.*(1987)]:

Schritt	Lösung	Zeit [min]	Temperatur [T]
1	Waschlösung	2	50
2	Waschlösung	4	50
3	Fixier-Lösung	6	50
4	Waschlösung	3	50
5	Waschlösung	5	50
6	Wasser	2	50
7	Wasser	2	50
8	0,4% AgNO ₃	6,5	40
9	Wasser	0,5	30
10	Wasser	0,5	30
11	Entwickler	0,5	30
12	Entwickler	4	30
13	Reduzierlösung	2	30
14	Stop-Lösung	5	50

5.20 Abkürzungsverzeichnis

-	negativ	d	Zeit in Tagen
λ	Wellenlänge	Da	Dalton
ϵ	Extinktionskoeffizient	DNA	Desoxyribonukleinsäure
(v/v)	Volumenanteil	DNPH	Dinitrophenylhydrazin
+	positiv	DTT	Dithiothreitol
μ_{\max}	maximale Wachstumsrate	E	Aktivierungsenergie
a	Häufigkeitsfaktor	EC	Enzyme Commission
Ala	Alanin	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Arg	Arginin	Em	Emission
Asn	Asparagin	Ex	Exzitation
Asp	Asparaginsäure	Gln	Glutamin
BFM	Biofeuchtmasse	Glx	Glutaminsäure
BPO	Bromoperoxidase	Gly	Glycin
BSA	Bovines Serum Albumin	h	Stunde
BTM	Biotrockenmasse	HEPE	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-
CPO	Chloroperoxidase	S	ethansulfonsäure
Cys	Cystein	His	Histidin

HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie	PLP	Pyridoxalphosphat
Ile	Isoleucin	Pro	Prolin
k	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante	PVC	Polyvinylchlorid
k.A.	keine Angabe	R	allgemeine Gaskonstante
kHz	Kiloherz	REM	Raster-Elektronenmikroskopie
K _M	Michaelis-Konstante	RNA	Ribonukleinsäure
KPP	Kaliumphosphat	rpm	rounds per minute
LDH	Lactatdehydrogenase	RT	Raumtemperatur
Leu	Leucin	SDS	Natriumdodecylsulfat
Lys	Lysin	Ser	Serin
M	M	t	Zeit
MB	Marine Broth	T	Temperatur
Met	Methionin	Thr	Threonin
NAD	Nicotinadenindinucleotid	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminimethan
H	reduziert	Trp	Tryptophan
nkat	Nanokatal	Tyr	Tyrosin
OD	Optische Dichte	u.a.	unter anderem
OPA	o-Phthaldialdehyd	UV	ultraviolett
p	Patrialdruck	V	Reaktionsgeschwindigkeit
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese	Val	Valin
PCR	Polymerase Kettenreaktion	V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
Phe	Phenylalanin	W	Watt
		z.B.	zum Beispiel

5.21 Chemikalienverzeichnis

α-Lactalbumin	Fluka	Bacto Agar	Fluka
5-Br-Tryptopan	Aldrich	Bacto Pepton	Difco
6-Br-Indol	Aldrich	Bromphenolblau	Fluka
7-Br-Indol	Aldrich	BSA	Fluka
AlCl ₃	Riedel de Haen	CASO	Merck
Ammoniumsulfat	Merck	CoCl ₂	Merck

CuCl ₂	Fluka	L-Leucin	Merck
Desmophen 3600	Hoechst	L-Lysin	Sigma
Dextran	Sigma	L-Methionin	Merck
D-Serin	Sigma	L-Phenylalanin	Fluka
D-Threonin	Sigma	L-Prolin	Riedel de Haen
EDTA	Fluka	L-Serin	Sigma
Eisensulfat	Fluka	L-Threonin	Fluka
Ethanolamin	Sigma	L-Tryptophan	Sigma
Eupergit	Röhm	L-Tyrosin	Merck
Gelelektrophorese- standard	Sigma	L-Valin	Sigma
Glucose	Fluka 49159	Malzextrakt	Difco
Glutamatdehydro- genase	Sigma	Marine Broth 2216	Difco
Glutaraldehyd	Sigma	MgSO ₄	Fluka
Glycerin	Fluka	MnCl ₂	Merck
H ₂ O ₂	Fluka	Monochlordimedon	Fluka
HCl (konz.)	Fluka	NaBH ₄	Sigma
Hefeextrakt	Difco	NaBr	Fluka
HEPES	Sigma	NaCl	Merck
K ₂ HPO ₄	Fluka	NADH	Fluka
KH ₂ PO ₄	Riedel de Haen	NADP	ICN Biomedicals
Lactoferrin	Fluka	NaOH	Riedel de Haen
L-Alanin	Riedel de Haen	Natriumacetat	Fluka
L-Arganin	Riedel de Haen	Neocuproin	Sigma
L-Asparagin	Fluka	OPA	Merck
L-Asparaginsäure	Merck	o-Phenantrolin	Fluka
L-Cystein	Sigma	Phenolrot	Fluka
L-Glutamin	Serva	Phenylhydrazin	Fluka
L-Glutaminsäure	Merck	Pyridoxalphosphat	Fluka
L-Glycin	Merck	Pyruvat	Boehringer
L-Histidin	Fluka	Resazurin	Fluka
L-Isoleucin	Riedel de Haen	SDS	Fluka
L-Lactat	Merck	SeaSalts	Sigma
		Tris*HCl	Fluka

Trypton	Difco	Vitamin B ₁₂	Fluka
Tween 80	Sigma	ZnSO ₄	Merck
VA-Epoxy	Riedel de Haen		

5.22 Geräteverzeichnis

2D-Fluoreszenzspektrometer F4500	Hitachi
Abgasanalytik EGAS-1	Braun
Analysenwaage	Sartorius
Autoklav	Integra Biosciences
Brutschrank	Memmert
Brutschrank	Memmert
Brutschrank	Memmert
Durchflusszytometer EPICS XL-MCL	Coulter
Elektronenmikroskop DSM 940	Zeiss
Fermenter Biostat B, Q	Braun
FPLC	BioRad
Kühlzentrifuge Megafuge 1.0 RS	Heraeus
Kühlzentrifuge Sigma 3420	Braun
Lichtmikroskop BH-2	Olympus
Lyophile Genevac SF50	Biometra
Mikrotiterplatten-Lesegerät	BioRad
Phast System	Pharmacia
pH-Meter MP 220	Mettler Toledo
Photometer Uvicon 940	Kontron
Reinbank	Flour Laboratories
Stomacher Lab Blender	Seward Medical
Thermoschüttler	Eppendorf
Thermoschüttler Certomat HK	Braun
Thermostat F3	Haake
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Trockenschrank	Memmert
Ultraschallsonde Labsonic U	Braun
US-Bad Sonorex Super RK 510H	Bandelin

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Struktur des Bryostatin 1	1
Abbildung 1.2: links oben: <i>Flustra foliacea</i> auf Stein; rechts oben: <i>Membranipora membranacea</i> auf <i>Laminaria</i> sp. (Braunalge); unten: <i>Bugula plumosa</i> [PICTON & COSTELLO, 2001]	3
Abbildung 1.3: Organisationsschema eines Bryozoen-Einzeltiers [WESTHEIDE, 1996]	3
Abbildung 1.4: Mikrobieller Bewuchs auf Flustrakolonien (Aufnahmen: Dr. Manfred Rohde, GBF, Braunschweig) [ULBER, 2002]	4
Abbildung 1.5: Unbesiedelte äußere Wachstumszonen bei <i>Flustra foliacea</i> (Aufnahmen: Dr. Manfred Rohde, GBF, Braunschweig) [ULBER, 2002]	5
Abbildung 2.1: Biosynthetische Herstellung von Tryptophan aus Serin und Indol [HANKE, 1999]	8
Abbildung 2.2: Übersicht über die Arbeitsvorgänge zur Etablierung einer L-Serin-Analytik ..	9
Abbildung 2.3: Strukturformeln von L-Serin (links) und D-Serin (rechts)	9
Abbildung 2.4: Reproduzierbarkeit von Kultivierungen des Teststammes F15 auf Mikrotiterplatten (T = 37 °C, 900 rpm)	11
Abbildung 2.5: Fe-S-Cluster in L-Serindehydratasen (rot: Eisen, grün: Schwefel, gelb: Cystein des Proteinrestes, schwarz: Proteinrest) [STRYER, 1999]	12
Abbildung 2.6: Erster Schritt der Dehydratisierung von L-Serin mittels L-Serindehydratase [FLINT & ALLEN, 1996]	13
Abbildung 2.7: Folgeschritte der Dehydratisierung von L-Serin mittels L-Serindehydratase.	14
Abbildung 2.8: Dendrogramm der 16S-rDNA-Verwandschaft von MBT-A4. Die 10%-Skala stellt den Austausch von 10 Nukleotiden auf 100 Sequenzpositionen dar.	15
Abbildung 2.9: lichtmikroskopische Aufnahme von <i>Paracoccus seriniphilus</i> -Kolonien auf Marine Broth 2216	17
Abbildung 2.10: REM-Aufnahmen von <i>Paracoccus seriniphilus</i> kultiviert im Marine Broth (links), <i>Paracoccus marcusii</i> (mitte) [HARKER et al., 1998], <i>Paracoccus carotinifaciens</i> (rechts) [TSUBOKURA et al., 1999]	18
Abbildung 2.11: Agglomeratbildung von <i>Paracoccus seriniphilus</i> im L-Serin-Minimal-Medium	19
Abbildung 2.12: Biofilmbildung von <i>Paracoccus seriniphilus</i> im L-Serin-Minimalmedium.	20
Abbildung 2.13: Verlauf der scheinbaren optischen Dichte während der Kultivierung im L-Serin Minimalmedium	20
Abbildung 2.14: Optimierung der Wachstumstemperatur von <i>Paracoccus seriniphilus</i>	22

Abbildung 2.15: Optimierung des pH-Wertes im Wachstumsmedium von <i>Paracoccus seriniphilus</i>	23
Abbildung 2.16: Vergleich von Kultivierungen mit Sea Salts- und NaCl-Zusatz	24
Abbildung 2.17: Optimierung der NaCl-Konzentration im Wachstumsmedium von <i>Paracoccus seriniphilus</i>	24
Abbildung 2.18: Umsetzung von Pyruvat zu L-Lactat mittels L-Lactatdehydrogenase [VARSANYI, 2002]	29
Abbildung 2.19: Bildung des Hydrazons [(2,4-Dinitrophenyl)-hydrazono]-propionsäure aus Pyruvat und DNPH	30
Abbildung 2.20: Strukturformel von Tween 80 [BLACK, 1998]	32
Abbildung 2.21: Einfluss der Inkubationszeit der vorkultivierten Zellen im L-Serin-Minimalmedium zur Induktion der L-Serindehydratase	33
Abbildung 2.22: links: durchflusszytometrische Referenzmessungen in der stationären Wachstumsphase zur Differenzierung lebender (linker Peak) und toter (rechter Peak) Zellen; rechts: Vitalitätsuntersuchungen von in MB 100-Medium angezogener <i>Paracoccus seriniphilus</i> -Zellen in exponentieller Phase im MB-Medium (rot), nach Umsetzen in L-Serin-Minimalmedium (grün), nach 1 h im L-Serin-Minimalmedium (blau)	35
Abbildung 2.23: Ermittlung des Erntezeitpunktes von <i>Paracoccus seriniphilus</i> zur Optimierung der L-Serindehydratase-Aktivität	36
Abbildung 2.24: Kultivierung von <i>Paracoccus seriniphilus</i> im L-Serin-Minimalmedium ohne Tween 80-Zusatz	39
Abbildung 2.25: Kultivierung von <i>Paracoccus seriniphilus</i> im L-Serin-Minimalmedium ohne Tween 80-Zusatz mit Inokulum von $OD_{590\text{ nm}} = 0,2$	41
Abbildung 2.26: Kultivierung von <i>Paracoccus seriniphilus</i> im L-Serin-Minimalmedium mit Tween 80-Zusatz	42
Abbildung 2.27: Vergleich der Optischen Dichten von Kultivierungen im L-Serin-Minimalmedium mit und ohne Zusatz von Tween 80	43
Abbildung 2.28: Kultivierung von <i>Paracoccus seriniphilus</i> im komplexen Medium	44
Abbildung 2.29: Redoxsystem DTT	45
Abbildung 2.30: Optimierung der $FeSO_4$ und DTT-Konzentrationen zur Aktivierung der L-Serindehydratase; Optimierung der $FeSO_4$ -Konzentration bei $c(DTT) = 18\text{ mM}$; Optimierung der DTT-Konzentration bei $c(FeSO_4) = 1,8\text{ mM}$	46
Abbildung 2.31: Redoxsystem Cystein – Cystin	47

Abbildung 2.32: Oktaedrischer Eisen-Cystein-Komplex [MOST, 1999]	47
Abbildung 2.33: Struktur von HEPES (links: unprotonierte, rechts: protonierte Form).....	49
Abbildung 2.34: Langzeitstabilität der stabilisierten und nicht stabilisierten L-Serindehydratase.....	49
Abbildung 2.35: Übersicht über die Isolierung der L-Serindehydratase.....	50
Abbildung 2.36: Anteil der L-Serindehydratase-Aktivität der Fraktionen der Ammoniumsulfatfällung als Anteil der Gesamtaktivität.....	52
Abbildung 2.37: Optimierung der Konzentration des Äquilibrierungspuffers der Hydroxylapatit-Chromatographie.....	54
Abbildung 2.38: Elutionsprofil der L-Serindehydratase nach Anionenaustausch auf High Q-Säule	56
Abbildung 2.39: Elutionsprofil der L-Serindehydratase ohne Aktivierung mit L-Cystein; A-D: Aktivitätspeaks; C: Aktivitätspeak der reinen nativen L-Serindehydratase (Kapitel 2.8.3)	58
Abbildung 2.40: SDS-PAGE-Analyse des Isolates von Peak B	59
Abbildung 2.41: L-Serin- (Peak A) und L-Threonindehydratase-Aktivität (Peak B) nach Anionenaustausch-Chromatographie und Aktivierung der Fraktionen mit FeSO ₄ /L-Cystein und PLP	60
Abbildung 2.42: SDS-PAGE-Analyse (20% Polyacrylamid) der Aufreinigungsschritte der L-Serindehydratase (1: Größenstandard; 2: Rohextrakt (1:20), 3: Ammoniumsulfatfällung, 4: Hydroxylapatit-Chromatographie, 5: Anionenaustausch-Chromatographie (nach 50facher Aufkonzentrierung); Silberfärbung [LAROCHE <i>et al.</i> , 2002].....	62
Abbildung 2.43: Kalibrationskurve des Größenstandards der Gelelektrophorese in Abbildung 2.42	62
Abbildung 2.44: Hypothetische Teilstruktur von Sephacryl HR [AMERSHAM, 1998].....	63
Abbildung 2.45: Kalibrationskurve UV-aktiver Substanzen zur Molmassenbestimmung der nativen L-Serindehydratase mittels Sephacryl S-100 Gelelektrophorese	64
Abbildung 2.46: Elutionsprofil der L-Serindehydratase bei Sephacryl S-100 Gelfiltration. Darstellung der L-Serindehydratase- und L-Threonindehydratase-Aktivität.....	65
Abbildung 2.47: Optimierung des pH-Wert (links) und Temperatur (rechts) der L-Serindehydratase.....	67
Abbildung 2.48: Enzymkinetik, direkte Auftragung V gegen [S].....	68
Abbildung 2.49: Enzymkinetik, Auftragung nach Lineweaver-Burk [WIEMANN, 2000].....	69
Abbildung 2.50: Enzymkinetik, Auftragung nach Hanes [WIEMANN, 2000]	69

Abbildung 2.51: Enzymkinetik, Auftragung nach Eadie-Hofstee [WIEMANN, 2000]	70
Abbildung 2.52: Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen L-Serinumsetzung gegen [S]	71
Abbildung 2.53: Chelatisierung von Fe ²⁺ mit o-Phenantrolin	72
Abbildung 2.54: Inhibitionseigenschaften verschiedener chemischer Verbindungen (1 mM) auf die L-Serindehydratase-Aktivität	73
Abbildung 2.55: Inhibitionseigenschaften von Metallsalzen auf die L-Serindehydratase-Aktivität	74
Abbildung 2.56: Inhibitionseigenschaften von L-Aminosäuren (c = 10 mM) auf die L-Serindehydratase-Aktivität	74
Abbildung 2.57: Inhibierender Einfluss von D-Serin auf die L-Serindehydratase-Aktivität ...	75
Abbildung 2.58: Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen Substratkonzentration für mit D-Serin inhibierte und nicht inhibierte L-Serindehydratase (links) und entsprechende Lineweaver-Burk-Darstellung (rechts)	76
Abbildung 2.59: Kalibrationskurve zur L-Serin-Bestimmung	77
Abbildung 2.60: Vergleich der L-Serin-Bestimmung mittels L-Serindehydratase und HPLC bei <i>Paracoccus seriniphilus</i> -Kultivierung (links), Vergleich der L-Serin-Bestimmung mittels HPLC und L-Serindehydratase zur Kontrolle der enzymatischen Tryptophansynthese (rechts)	78
Abbildung 2.61: Mechanismus der Enzyymbindung an VA-Epoxy [SOSNITZA, 1999]	80
Abbildung 2.62: Vergleich zwischen Durchflussverfahren und Stop-flow zur enzymatischen L-Serin-Bestimmung, c (L-Serin) = 2,5 g/l, \dot{v} = 2,4 ml/min	81
Abbildung 2.63: Elutionspeaks zur Ermittlung von L-Serinkonzentrationen mittels immobilisierter L-Serindehydratase	81
Abbildung 2.64: Kalibrationskurven zur L-Serin-Bestimmung mittels nativer und immobilisierter L-Serindehydratase	82
Abbildung 2.65: Stabilität des Enzymimmobilisates ohne (links) und mit (rechts) enzymstabilisierenden Bedingungen	83
Abbildung 2.66: Langzeitstabilität des Immobilisates	83
Abbildung 2.67: Schematischer Aufbau zur online-Bestimmung von L-Serinkonzentrationen [LAROCHE <i>et al.</i> , 2002]	86
Abbildung 3.1: Strukturformel von 3-Diiodtyrosin	87
Abbildung 3.2: Strukturen einiger Halometabolite und ihre Produzenten	88
Abbildung 3.3: Katalytisches Zentrum Vanadium-haltiger Haloperoxidasen	90

Abbildung 3.4: Reaktionsmechanismus der enzymatischen Halogenierung mittels FeHeme-Haloperoxidase (MCD: Monochlordimedon)	90
Abbildung 3.5: Biosynthese von Pyrrolnitrin über die Produktion von 7-Cl-Tryptophan [HÖLZER, 2000].....	91
Abbildung 3.6: Durch Tryptophan-7-Halogenase katalysierte regioselektive Chlorierung von Tryptophan zu 7-Cl-Tryptophan [HÖLZER, 2000]	92
Abbildung 3.7: Haloperoxidasenachweis mittels Halogenierung von Monochlordimedon.....	94
Abbildung 3.8: Haloperoxidasenachweis mittels Bromierung von Phenolrot zu Bromphenolblau	94
Abbildung 3.9: oben links: Wellenlängenscanverlauf während der Phenolrot-Bromierung (Reaktionszeit 6,5 min); oben rechts: Verschiebung des Absorptionsmaximums des Produktes der Halogenierung; unten: Verläufe der Absorptionsintensitäten der Edukte und Produkte der Phenolrot-Bromierung.	96
Abbildung 3.10: 2D-Fluoreszenzspektrum von Phenolrot (links) und Bromphenolblau (rechts)	97
Abbildung 3.11: Vergleich der CPO-Aktivitätsbestimmung mittels Monochlordimedon- (schwarz) und Phenolrot-Bromierung (blau).....	97
Abbildung 3.12: Vergleich der Aktivitätsbestimmung der Haloperoxidase aus <i>Caldariomyces fumago</i> in der Küvette und in Mikrotiterplatte.....	98
Abbildung 3.13: OD-Verlauf der <i>Anabaena</i> -Kultivierung in BG-11-Medium.....	99
Abbildung 3.14: REM-Aufnahmen vom Stamm MBT-12 in der exponentiellen Wachstumsphase im CASO-Medium (links); lichtmikroskopische Aufnahme von MBT-12-Kolonien auf CASO-Medium (rechts)	101
Abbildung 3.15: Wachstum von MBT-12 auf MB100, MB50, MB20	102
Abbildung 3.16: Optimaler pH-Wert und NaCl-Konzentration im Wachstumsmedium von MBT-12	103
Abbildung 3.17: links: Optimierung der Wachstumstemperatur von MBT-12 in CASO-Medium; rechts: entsprechende maximalen Optischen Dichten	103
Abbildung 3.18: links: fakultativ anaerobes Wachstum von MBT-12 im Hochschichtröhrchen; rechts: unbeimpftes Vergleichsröhrchen mit rotfarbigem aeroben Bereich.....	104
Abbildung 3.19: Strukturformeln von 5-Bromtryptophan, 6-Bromtryptophan und 7-Bromtryptophan.....	108

Abbildung 3.20: Enzymatische Umsetzung von L-Serin mit Indol (X=Br, Y,Z=H: 5-Br-Indol; Y=Br, X,Z=H: 6-Br-Indol; Z=Br, X,Y=H: 7-Br-Indol) zu L-Tryptophan (X=Br, Y,Z=H: 5-Br-Trp; Y=Br, X,Z=H: 6-Br-Trp; Z=Br, X,Y=H: 7-Br-Trp).....	109
Abbildung 3.21: UV-Spektrum von Tryptophan und 5-Br-Tryptophan in Konzentrationen von jeweils 6,25 mg/l.....	110
Abbildung 3.22: HPLC-Spektren bromierter Tryptophanderivate.....	111
Abbildung 3.23: Verläufe der mittels HPLC gemessenen L-Serin- und 6-Br-Tryptophan-Konzentrationen bei der enzymatischen 6-Br-Tryptophan-Synthese.....	111
Abbildung 3.24: 2D-Fluoreszenzspektren von 5-Bromtryptophan, 167 mg/l (oben links); 7-Bromtryptophan, 16,5 mg/l (oben rechts); Tryptophan, 5,7 µg/l (unten links); 6-Bromtryptophan, 16,5 mg/l (unten rechts)	112
Abbildung 3.25: Kalibrationskurven zur Detektion von Tryptophan (links) und 5-Br-Tryptophan (rechts) mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie.....	113
Abbildung 3.26: 2D-Fluoreszenzspektrum eines Gemisches aus von Tryptophan, 5-Br-Tryptophan, 7-Br-Tryptophan (links); Differenz des Spektrums links und dem von reinem Tryptophan (rechts)	114
Abbildung 5.1: links: Optimierung der Ultraschallstärke bei einer Aufschlusszeit von 5 min; rechts: Optimierung der Aufschlusszeit bei einer Geräteeinstellung von 60 W.....	128
Abbildung 5.2: Kalibrationsgerade zur Bestimmung der Pyruvatkonzentration	130
Abbildung 5.3: enzymatische Ammoniumbestimmung mit Glutamatdehydrogenase	131
Abbildung 5.4: Kalibrationsgerade für die enzymatische Ammoniumbestimmung	132
Abbildung 5.5: Derivatisierung primärer Aminosäuren mit OPA in Gegenwart eines Thiols	132
Abbildung 5.6: Schematische Aufbau des Vivaspin 20-Konzentrators [Produktbeschreibung Vivaspin]	134

7 Literaturverzeichnis

AMERSHAM (1998). Gel filtration – Principles and Methods, Pharmacia

ARNDT, M. (2002). Sulfitoxidase aus dem marinen Bakterium *Sulfitobacter pontiacus*, Dissertation, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover

ATLAS, R. M. (1995). Handbook of Media for Environmental Microbiology, CRC-Press,

BAKER, S. C., FERGUSON, J., LUDWIG, B., PAGE, M. D., RICHTER, O. M. H., van SPANNING, R. J. M. (1998). Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1046-78.

BAST, B. (1999). Mikrobiologische Methoden. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

BEIJERINCK, M. W., MINKMAN, D. C. J. (1910). Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien. *Zentbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt II* 25, 30-63.

BEYNON, R., J., EASTERBY, J., S. (1996). Buffer Solutions. Irl Press at Oxford University Press.

BLACK, S. (1998), Properties of detergents, University of Texas, online in Internet, URL: (<http://psyche.uthct.edu/shaun/SBlack/detergnt.html>), [6.8.2002]

BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99

BRENDA-Datenbank, The Comprehensive Enzyme Information System, online in Internet, URL: www.brenda.uni-koeln.de , [17.5.2002]

BUTLER, A. (1999). Mechanistic considerations of the vanadium haloperoxidases. *Coordination Chemistry Reviews* 187, 17-35

- BUTLER, A., WALKER, J. V. (1993). Marine Haloperoxidasen. *Chem. Rev.* 93, 1937-1944
- CARDON, B. P., BARKER, H. A. (1947). Amino acid fermentations by *Clostridium propionicum* and *Diplococcus glyciniphilus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 12, 165-171
- CARTER, J. E., SAGER, R. (1972). Ferrous ion-dependent L-serine dehydratase from *Clostridium acidurici*. *J. Bacteriol.* 109, 757-763
- CASHION P., HOLDER-FRANKLIN M. A., MCCULLY J., & FRANKLIN M. (1977). A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal. Biochem* 81, 461-466.
- COLLINS, M. D. (1985). Isoprenoid quinone analyses in bacterial classification and Identification. In: *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, pp. 267-287. Edited by M. Goodfellow & D. E. Minnikin, London: Academic Press.
- COLLINS, M. D. (1994). Isoprenoid quinones. In: *Chemical methods in prokaryotic Systematics*, pp.265-305. Edited by M. Goodfellow & A. G. O'Donnell, Chichester: John Wiley & Sons.
- CYPIONKA, H., (2000), Grundlagen der Physiologie der Organismen, ICBM, Oldenburg, online in Internet, URL: <http://www.icbm.de/pmbio/phykurs.htm>, [6.8.2002]
- DAGOSTINO, L., GOODMAN, A. E. & MARCHALL, K. C. (1991). Physiological responses induced in bacteria adhering to surfaces. *Biofouling* 4,113-119.
- DAVIS, H. D., DOUDOROFF, M. & STANIER, R. Y. (1969). Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: taxonomic implications. *Int J Syst Bacteriol* 19, 375-390.
- DESOETE, G. (1983). A least squares algorithm for setting additive trees to proximity data. *Psychometrika* 48, 621-626.
- DOBSON, S. J. & FRANZMANN, P. D. (1996). Unification of the genera *Deleya* (Baumann *et al.* 1983), *Halomonas* (Vreeland *et al.* 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson & Gibbons 1952) into a single genus, *Halomonas*,

and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*. *Int J Syst Bacteriol* 46, 550-558.

DORONINA, N. V., TROTENKO, Y. A., KRAUSOVA, V. I. & SUZINA, N. E. (1998). *Paracoccus methylutens* sp. nov. - a new aerobic facultatively methylotrophic bacterium utilizing dichloromethane. *Syst Appl Microbiol* 21, 230-236.

DORONINA, N. V. & TROTENKO, Y. A. (2000). A novel plant-associated thermotolerant alkaliphilic methylotroph of the genus *Paracoccus*. *Microbiologiya* 69, 706-711 (in Russian). English translation: *Microbiology* 69, 593-598.

DOWHAN, W., JRn. & SNELL, E. E. (1970). D-serine dehydratase from *Escherichia coli*. 2. Analytical studies and subunit structure. *J. Biol. Chem.* 245 (18), 4618-4628

DSMZ, Catalogue of Strains, Seventh Edition, 2001

DUETZ, W. A., RÜEDI, L., HERMANN, R., O'CONNOR, K., BÜCHS, J., WITHOLT, B. (2000). Methods for Intense Aeration, Growth, Storage, and Replication of Bacterial Strains in Microtiter Plates. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (6), 2641-2646

EL-AWAMRY, Z. A., RAGAB, A. M., GHONAMY, E. A., AHMED, S. A. (1990). L-Serine Dehydratase in Some Filamentous Fungi. *Egypt. J. Microbiol.* 25 (1), 31-49

ESCARA, J. F. & HUTTON, J. R. (1980). Thermal stability and renaturation of DNA in dimethylsulphoxide solutions: acceleration of renaturation rate. *Biopolymers* 19, 1315-1327.

FARIAS, M. E., DE SAAD, A. M. S., DE RUIZ HOLGADO, A. A. P, OLIVER, G. (1991). Purification and Properties of L-Serine Dehydratase from *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931. *Cur. Microbiol.* 22, 205-211

FAURIE, R., (2000), Intelligente Sensorik zur Verbesserung des Produktionsintegrierten Umweltschutzes, Amino GmbH, online in Internet, URL: <http://www.amino.de/german/..%5Cimages/handblatt.pdf> [6.8.2002]

FELSENSTEIN, J. (1993). phylip (phylogenetic inference package) version 3.5.1. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA, USA.

FLEMMING, H.-C., & WINGENDER J., (2001). Biofilme – Die bevorzugte Lebensform der Bakterien. *Biologie in unserer Zeit* 3, 2001, 169-180

FLINT, D. H., ALLEN, R. M. (1996). Iron-Sulfur Proteins With Nonredox Functions. *Chem. Rev.* 96, 2315-2334

GABLER, M. (1999). D-Aminosäureoxidase (EC 1.4.3.3) aus dem Pilz *Fusarium oxysporum* – Kultivierung, Induktion, Isolierung und Charakterisierung, Dissertation, Universität Braunschweig

GANNON, F., BRIDGELAND, E. S., JONES, K. M. (1976). L-Serine Dehydratase from *Arthrobacter globiformis*. *Biochem. J.* 161, 345-355

Genialab, Produktinformation, online in Internet, URL: <http://www.genialab.de/3.htm>, [12.3.2002]

GRABOWSKI, R., BUCKEL, W. (1991). Purification and properties of an iron-sulfur-containing and pyridoxal-phosphate-independent L-serine dehydratases from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*. *FEBS* 199, 89-94

GRABOWSKI, R., HOFMEISTER, E. M., BUCKEL, W. (1993). Bacterial L-serine dehydratases: a new family of enzymes containing iron-sulfur clusters. *TIBS* 18, 297-300

GRÖGER, H., CAPAN, E., BARTHUBER, A., VORLOP, K.-D. (2001). Asymmetric Synthesis of an (R)-Cyanohydrin Using Enzymes Entrapped in Lens-Shaped Gels. *Organic Letters* 3 (13), 1969-1972

GROTH, I., SCHUMANN, P., WEISS, N., MARTIN, K. & RAINEY, F. A. (1996). *Agrococcus jenensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of actinomycetes with diaminobutyric acid in the cell wall, *Int J Syst Bacteriol* 46, 234-239.

GRÜNDIG, B., JAHNZ, U., VORLOP, K.-D. (1999). Robuste Immobilisierung von Enzymen für Biosensoren mit PCS, Biotechnica 1999, online in Internet, URL: <http://www.fal.de/messe/biotechnica99/thema/produkte05.htm>, [23.6.2002]

HANKE, T., (1999). Diplomarbeit, Universität Hannover

HARKER, M., HIRSCHBERG, J. & OREN, A. (1998). *Paracoccus marcusii* sp. nov., an orange Gram-negative coccus. *Int J Syst Bacteriol* 48, 543-548.

HERMANN, R., WALTHER, N., AKGÜN, A., BÜCHS, J. (2000). Untersuchung der maximalen Sauerstofftransferkapazität des miniaturisierten Screeningsystems Mikrotiterplatte. GVC-Fachschusssitzung „Bioverfahrenstechnik“, Bamberg, 8.-10.5.2002, online in Internet, URL: www.biovt.rwth-aachen.de/pages/res/pub/hermann00.pdf, [28. 5.2001]

HOFMEISTER, A. E. M., ALBRACHT, S. P. J., BUCKEL, W. (1994). Iron-sulfur cluster-containing L-serine dehydratase from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*: correlation of the cluster type with enzymatic activity. *FEBS Letters* 351, 416-418

HOFMEISTER, A. E. M., GRABOWSKI, R., LINDER, D., BUCKEL, W. (1993). L-Serine and L-threonine dehydratase from *Clostridium propionicum*. Two enzymes with different prosthetic groups. *FEBS* 215, 341-349

HOLT, J., G., KRIEG, N., R., SNEATH, P., H., A., STALEY, J., T., WILLIAMS, S., T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data

HÖLZER, M. (2000). Untersuchungen zur Substratspezifität und Regioselektivität der Tryptophan-7-Halogenase und deren Zusammenhang mit der Pyrrolnitrin-Biosynthese, Dissertation, Universität Dresden

HÖNIG, H. (2001). Natürliche Halogenverbindungen, Technische Universität Graz, online in Internet, URL: http://www.cis.tugraz.at/orgc/hoegroup/naturst/skript/natuerliche_halogenverbindungen_low.html, [9.8.2002]

HÖRNER, R. (1997). Untersuchungen zum biotechnologischen Einsatz der D-Aminosäureoxidase aus *Trigonopsis variabilis* für die Herstellung enantiomerenreiner L-Aminosäuren, Dissertation, Clausthal-Zellerfeld

HÜNERS, M. (1999). Naturstoffscreening und Bioprozeßoptimierung der Wirkstoffproduktion eines marinen schwammassoziierten Bakteriums, Dissertation, Braunschweig

HUB, V. A. R., FESTL, H. & SCHLEIFER, K.-H. (1983). Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst Appl Microbiol* 4, 184±192.

JAHNKE, K.-D. (1992). basic computer program for evaluation of spectroscopic DNA renaturation data from GILFORD SYSTEM 2600 spectrophotometer on a PC/XT/AT type personal computer. *J Microbiol Methods* 15, 61-73.

JUKES, T. H. & CANTOR, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132. Edited by N. Munro. New York: Academic Press.

KASPER, C. (2001). Praktikum der Biotechnologie, Universität Hannover

KATAYAMA, Y., HIRAIISHI, A. & KURAIISHI, H. (1995). *Paracoccus thiocyanatus* sp. nov., a new species of thiocyanate-utilizing facultative chemolithotroph, and transfer of *Thiobacillus versutus* to the genus *Paracoccus* as *Paracoccus versutus* comb. nov. with emendation of the genus. *Microbiology* 141, 1469-1477

KAZMAIER, U. (2001). Universität Heidelberg, online in Internet, URL: <http://www.uni-heidelberg.de/institute/fak12/OC/kazmai/Litpdf/Schwefelverbindungen.pdf>, [7.6.2002]

KELLY, D. P., RAINEY, F. A. & WOOD, A. P. (2000). The Genus *Paracoccus*. In: *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd edition. Edited by M. Dworkin, N. Falkow, H. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt. Online at: <http://link.springer.de>.

KIRSCHNING, A., (2001). Institut für Organische Chemie, Universität Hannover, online in Internet, URL: <http://www.unics.uni-hannover.de/nhcdkale/pkc.pdf>, [6.8.2002]

KOSEMUND, D. (1997). Protokoll zum Schwerpunktpraktikum, Universität Hannover

KUYKENDALL, L. D., ROY, M. A., O'NEILL, J. J. & DEVINE, T. E. (1988). Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *Int J Syst Bacteriol* 38, 358-361.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 227, 680-685

LANE, D. J. (1991). 16S-23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 125-175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley.

LAROCHE, M., ULBER, R., PUKALL, R. (2002); Gewinnung und Charakterisierung einer L-Serin Dehydratase aus dem marinen Bakterium *Paracoccus seriniphilus*. *CIT*, eingereicht

LIPSKI, A., REICHERT, K., REUTER, B., SPRÖER, C. & ALTENDORF, K. (1998). Identification of bacterial isolates from biofilters as *Paracoccus alkenifer* sp. nov. and *Paracoccus solventivorans* with emended description of *Paracoccus solventivorans*. *Int J of Syst Bacteriol* 48, 529-536

LOTTSPEICH, R., ZORBAS, H. (1998). Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275

MADAN, V. K., NATH, M. (1983). Threonine dehydratase EC-4.2.1.16 and serine dehydratase from *Cuscuta-campestris*. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 178 (1), 43-51

MAIDAK, B. L., COLE, J. R., LILBURN, T. G., PARKER, C. T. Jr, SAXMAN, P. R., FARRIS, R. J., GARRITY, G. M., OLSEN, G. J., SCHMIDT, T. M. & TIEDJE, J. M. (2001). The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* 29, 173-4

MASEFIELD, G. (2001). Serotonin and the Link between Carbohydrate Intake and Depression, online in Internet, URL: <http://academic.uofs.edu/student/MASEFIELDDG2/helpdesk.htm>, [15.6.2002]

MESHBAH, M., PREMACHANDRAN, U. & WHITMAN, W. B. (1989). Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* 39, 159-167.

MILLER, L. T. (1982). A single derivatization method for bacterial fatty acid methyl esters including hydroxy acids. *J Clin Microbiol* 16, 584-586.

MOST, O. (1999). Protokoll zum Experimentalvortrag "Ganz schön Haarig", online in Internet, URL: <http://www.chemie.uni-marburg.de/~butenuth/644/Haardateien/Dauerwelle1.htm>, [3.7.2002]

NEIDLEMANN, S., L., GEIGERT, J. (1986). Biohalogenation, principles, basic roles and applications, Ellis Horwood Limited, Chichester

NEWMAN, E. B., DUMONT, D., WALKER, C. (1985) In Vitro and In Vivo Activation of L-Serine Deaminase in *Escherichia coli* K-12. *J of Bacteriology* 162 (3), 1270-1275

NEWMAN, E. B., WALKER, C., ZIEGLER-SKYLAKAKIS (1989). A possible mechanism for the *in vitro* activation of L-serine dehydratases activity in *Escherichia coli* K 12. *Biochem. Cell Biol.* 1989, 723-728

OHARA, M., KATAYAMA, Y., TSUZAKI, M., NAKAMOTO, S. & KURAISHI, H. (1990). *Paracoccus kocurii* sp. nov., a tetramethylammonium-assimilating bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 40, 292-296.

PALINSKA, K. (2000), Universität Oldenburg, persönliche Mitteilung

PARDEE, A. B., PRESTIDGE, L. S. (1955). Induced formation of serine and threonine deaminases by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 70, 667-674

- VAN PEE, K.-H. (1996). Biosynthesis of Halogenated Metabolites by Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 375-99
- PICKARD, M., A. (1981). A defined growth medium for the production of chloroperoxidase by *Caldariomyces fumago*. *Can. J. Microbiol.* 27, 1298-1305
- PICTON, B., E. & COSTELLO, M., J. (2001). A guide to marine habitats, fauna and flora in Britain and Ireland, online in Internet, URL: <http://www.itsligo.ie/biomar/about/about.HTM>, [23.5. 2002]
- PROTSCH, C. (2002). Institut für Technische Chemie, laufende Dissertation, Universität Hannover, persönliche Mitteilung
- PUKALL, R., BRAMBILLA, E. & STACKEBRANDT, E. (1998). Automated fragment length analysis of fluorescently-labeled 16S rDNA after digestion with 4-base cutting restriction enzymes. *J Microbiol Methods* 32, 55-64.
- PUKALL, R., KRAMER, I., Taxonomic diversity of cultivable bacteria associated with the bryozoan *Flustra foliacea*; Marine Biology, in Vorbereitung
- PUKALL, R., LAROCHE, M., SCHUMANN, P., KROPPESTEDT, R. M., ULBER, R. (2002). *Paracoccus seriniphilus* sp. nov., a marine L-serine-dehydratase producing coccus isolated from the bryozoan *Bugula plumosa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, im Druck, veröffentlicht online 23 August 2002. DOI 10.1099/ijls.0.02352-0
- PUKALL, R., PÄUKER, O., BUNTEFUß, D., ULRICH, G., LEBARON, P., BERNARD, L., GUINDULAIN, T., VIVES-REGO, J. & STACKEBRANDT, E. (1999). High sequence diversity of *Alteromonas macleodii*-related cloned and cellular 16S rDNAs from a Mediterranean Seawater mesocosm experiment. *FEMS Microbiol Ecol* 28, 335-344.
- RAINEY, F. A., KELLY, D. P., STACKEBRANDT, E., BURGHARDT, J., HIRAISHI, A., KATAYAMA, Y. & WOOD, A.P. (1999). A re-evaluation of the taxonomy of *Paracoccus denitrificans* and a proposal for the combination *Paracoccus pantotrophus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49, 645-51.

-
- RAINEY, F. A., WARD-RAINEY, N., KROPENSTADT, R. M. & STACKEBRANDT, E. (1996). The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsiaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol* 46, 1088-1092.
- RAMM, W. (2001). Bildung und Charakterisierung biologisch und physiko-chemisch aktiver Metabolite aus den marinen schwamm-assoziierten Bakterien *Psychroflexus* spec. nov. und *Bacillus subtilis*. Dissertation, Universität Braunschweig
- RAMOS, F., WIAME, J.-M. (1982). Occurrence of a Catabolic L-Serine (L-Threonine) Deaminase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 123, 571-576
- RATTEL, B., MANSURI, M., ROZENCWEIG, M. (2001), GPC-Biotec, online in Internet, URL: http://www.gpc-biotec.de/investoren/images/pdf_gb2001/GPC01_Produkt_d.pdf, [6.8.2002]
- RIESEBERG, M. (2000). Durchflußzytometrische Analytik: Ein Weg zur Optimierung biotechnologischer Prozesse. Dissertation, Universität Hannover
- ROBERTSON, L. A. & KUENEN, J. G. (1983). *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulphur bacterium. *J Gen Microbiol* 129, 2847-2855.
- ROBINSON, R. W., AKIN, D. E., NORDSTEDT, R. A., THOMAS, M. V. & ALDRICH, H. C. (1984). Light and Electron Microscopic Examination of Methane-Producing Biofilms from Anaerobic Fixed-Bed Reactors. *Appl Environ Microbiol* 48, 127-136.
- ROSENBERG, I., M. (1996). Protein Analysis and Purification – Benchtop Techniques. Birkhäuser Verlag, Boston, Basel, Berlin
- Röhm, Immobilization of Enzymes on EUPERGIT C and EUPERGIT C 250 L, Produktinformation
- SCHEPER, T., ULBER, R., FAURIE, R. (1999). Use of bioanalytical systems for the improvement of industrial tryptophan production, Verbund Sensorik in der Biotechnologie, online in Internet, URL: http://www.verbund-sensorik.de/projekte/projekt13028_01_deu.pdf, [3.5.2002]

SCHLEGEL, H. G. (1992). Allgemeine Mikrobiologie. Thieme Verlag Stuttgart, 7. Auflage

SCHÖLER, H., F., NIEDAN V., W. (2000). Natürliche Organohalogenverbindungen in der Umwelt. *ATV-DVWK-Schriftenreihe* 18, 10-29

SCHOLZ, J. (1997). Moostierchen (Bryozoa). Die große Organisation in Richtung des kleinsten Raumes, Städte unter Wasser, *Kleine Senckenberg-Reihe*, 24, 85-92

SCHOMBURG, D., Brenda, online in internet: http://www.brenda.uni-koeln.de/php/result_flat.php3?ecno=4.2.1.13, [07.02.02]

SETO, T., IMANARI, M. (1999). Effect of a successive feed of melt indole on the production of L-tryptophan by tryptophan synthase, *Nippon Kagaku Kaishi*, **9**, 609-614

SHAH, G., C. (2000). Blood Stains and pH Indicators, GSP Chemical Industries, online in internet, URL: <http://www.gspchem.com/prod.htm>, [13.5.2000]

SILLER, H., RAINEY, F. A., STACKEBRANDT, E. & WINTER, J. (1996). Isolation and characterization of a new gram-negative, acetone- degrading, nitrate-reducing bacterium from soil, *Paracoccus solventivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 46, 1125-1130.

SIMON, D., HOSHINO, J., KRÖGER, H. (1973). L-Serine dehydratase from rat liver. Purification and some properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 321, 361-368

SOSNITZA, P., (1999). Biosensoren für die Aufarbeitung in der Biotechnologie, Dissertation, Universität Hannover

STERNBERG, C., CHRISTENSEN, B. B., JOHANSEN, T., NIELSEN, A. T., ANDERSEN, J. B., GIVSKOV, M. & MOLIN, S. (1999). Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. *Appl Environ Microbiol* 65, 4108-4117.

STRYER, L. (1999). Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, 4. Auflage

SU, H., MONIAKIS, J., NEWMAN, E. B. (1993). Use of gene fusions of the structural gene *sdaA* to purify L-serine deaminase 1 from *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.* 211, 521-527

TSUBOKURA, A., YONEDA, H. & MIZUTA, H. (1999). *Paracoccus carotinifaciens* sp. nov., a new aerobic Gram-negative astaxanthin-producing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 49, 277-282.

ULBER, R. (2002). Biotechnologische Methoden zur effizienten Rohstoffnutzung, Habilitationsschrift, Universität Hannover

ULBER, R., PROTSCH, C., SOLLE, D., HITZMANN, B., WILLKE, B., FAURIE, R., SCHEPER, T. (2001). Use of bioanalytical systems for the improvement of industrial tryptophan production. *Chemical Engineering & Technology* 24 (7), 15-17.

URAKAMI, T., ARAKI H., OYANAGI, H., SUZUKI, K.-I. & KOMAGATA, K. (1990). *Paracoccus aminophilus* sp. nov. and *Paracoccus aminovorans* sp. nov., which utilize N,N-dimethylformamide. *Int J Syst Bacteriol* 40, 287-291.

URAKAMI, T., TAMAOKA, J., SUZUKI, K.-I. & KOMAGATA, K. (1989). *Paracoccus alcaliphilus* sp. nov., an alkaliphilic and facultatively methylotrophic bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 39, 116-121.

VARSAANYI, M. (2002). Biochemisch-Molekularbiologisches Praktikum für Mediziner, Universität Bochum, online in Internet, URL: http://www.physiolchem.ruhr-unibochum.de/01_enzyme.pdf, [13.7.2002]

Vivaspin Produktbeschreibung, online in Internet, URL: http://www.vivascience.com/en/downloads/pdf/vivaspin_6_20.pdf, [27.6.2002]

VO-DINH, T., CULLURN, B. (2000) Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366, 540-551

WEBER K., OSBORN, M. (1969). The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412

WESTHEIDE, W., RIEGER, R. (1996). Spezielle Zoologie, Erster Teil: Einzeller und Wirbellose Tiere, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York

WIEMANN, A. C. (2000). Synthese und Eigenschaften neuer peptidischer Phosphatase-Inhibitoren auf Phosphonat-Basis. Dissertation, Technische Universität Braunschweig.

WIESNER, W. (1987). Molekulare und katalytische Eigenschaften einer Chlorperoxidase und einer Bromperoxidase aus *Pseudomonas pyrrocinia*. Dissertation Universität Hohenheim

WONG, H. C., LESSIE, T. G. (1979). Hydroxy Amino Acid Metabolism in *Pseudomonas cepacia*: Role of L-Serine Deaminase in Dissimilation of Serine, Glycine, and Threonine. *J. Bacteriol.* 140 (1), 240-245

WURTZEL, E. T., VALDEZ, G., MATTHEWS, P. D. (1997). Variation in Expression of Carotenoid Genes in Transformed *E. coli* Strains. *Bioresearch Journal* 1, 1-11

ZEECK, A. (2001). GWDG, online in Internet, URL: <http://www.gwdg.de/~ucoc/zeeck/hom3.html>, [6.8.2002]

ZINECKER, H., ANDREESEN, J. R., PICH, A. (1998). Partial purification of an iron-dependant L-serine dehydratase from *Clostridium sticklandii*. *J. Basic Microbiol.* 38 (2), 147-155

Lebenslauf

Name	Marc Laroche
Adresse	Dorotheenstr. 5a / Zi. 326 30419 Hannover
geboren	10.10.1973 in Bad Oeynhausen
Vater	Helmut Laroche, Personalreferent
Mutter	Karola Laroche, Hausfrau
1980 – 1984	Grundschule
1984 – 1993	Besuch des Besselgymnasiums in Minden
6/1993	Abitur
7/1993 – 9/1994	Zivildienst
9/1994 – 6/1999	Chemiestudium an der Universität Hannover
12/1998 – 6/1999	Diplomarbeit: <i>“Vergleichende Untersuchungen zum enzymatischen Abbau von Caseinschichten auf Oberflächen“</i>
6/1999-7/1999	wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover
seit 8/1999	Dissertation am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover: <i>„Enzymscreening an marinen Mikroorganismen“</i>