

**Ein ungewöhnlicher Stärkeabbauweg im hyperthermophilen
archaeellen Sulfatreduzierer *Archaeoglobus fulgidus* Stamm 7324**

und

**Charakterisierung Stärke-abbauender Enzyme aus geothermalen
Habitaten**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Antje Labes

Kiel 2004

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2000 bis Dezember 2004 am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Labor von Herrn Prof. Dr. P. Schönheit durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. P. Schönheit

Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel, den

Der Dekan

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit war bisher noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens, andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

.....
(Antje Labes)

Ein Teil der während der Doktorarbeit erzielten Ergebnisse ist in den folgenden Artikeln veröffentlicht worden bzw. wird zur Veröffentlichung eingereicht:

Labes A, Schönheit P (2001) Sugar utilization in the hyperthermophilic, sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324: starch degradation to acetate and CO₂ via a modified Embden-Meyerhof pathway and acetyl-CoA synthetase (ADP-forming). Arch.Microbiol. 176:329-338 [published erratum in Arch.Microbiol. 177: 431-432].

Labes A, Schönheit P (2003) ADP-dependent glucokinase from the hyperthermophilic sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324. Arch.Microbiol. 180:69-75

Labes A, Schönheit P. Unusual starch degradation pathway in the hyperthermophilic sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324: Characterization of cyclodextrin glucoamylase, cyclodextrinase, maltodextrin phosphorylase and phosphoglucomutase.

Turnert P, Labes A, Fridjonsson OH, Hreggvidson GO, Schönheit P, Kristjansson JK, Holst O, Nordberg Karlsson E. Two novel cyclodextrin-degrading enzymes isolated from thermophilic bacteria, have similar domain structures but different oligomeric states and activity profiles

Inhalt

1	Zusammenfassung.....	6
2	Summary	10
3	Einleitung.....	12
4	Material und Methoden.....	19
4.1	Wachstum von <i>Archaeoglobus fulgidus</i> Stamm 7324 und Stamm VC16.....	19
4.2	Enzymmessungen in Rohextrakten.....	20
4.3	Proteinbiochemische Methoden.....	23
4.4	Charakterisierung von gereinigten Enzymen.....	33
4.5	Molekularbiologische Methoden.....	41
4.6	Analytische Methoden.....	45
5	Ergebnisse I: Ein ungewöhnlicher Stärkeabbauweg im hyperthermophilen archaeellen Sulfatreduzierer <i>Archaeoglobus fulgidus</i> Stamm 7324.....	47
5.1	Wachstum auf Stärke und Laktat.....	47
5.2	Enzyme des Stärkeabbaus zu Glucose-6-Phosphat	49
5.3	Enzyme des Glucoseabbaus zu Pyruvat.....	49
5.4	Enzyme der Acetatbildung aus Pyruvat.....	51
5.5	Substratspezifische Induktion der Enzyme des Glucoseabbaus zu Acetat	52
5.6	Kohlenmonoxid-Dehydrogenase und F ₄₂₀ -Gehalt	52
5.7	Reinigung und Charakterisierung der Enzyme des Stärkeabbaus zu Glucose-6-Phosphat	53
5.8	Reinigung und Charakterisierung der ADP-GLK, dem ersten Enzym des modifizierten Embden-Meyerhof-Weges	67
6	Ergebnisse II: Charakterisierung Stärke-abbauender Enzyme aus geothermalen Habitaten ..	72
6.1	Enzym mit Pullulanase-Aktivität.....	73
6.2	Enzym mit Neopullulanase-Aktivität	74
6.3	Enzyme mit Cyclodextrinase-Aktivität	76

7	Diskussion I: Ein ungewöhnlicher Stärkeabbauweg im hyperthermophilen archaeellen Sulfatreduzierer <i>Archaeoglobus fulgidus</i> Stamm 7324.....	85
7.1	Wachstum auf Stärke.....	85
7.2	Enzyme des Stärkeabbaus zu Glucose-6-Phosphat	87
7.3	Enzyme eines modifizierten Embden-Meyerhof-Weges und der Acetatbildung	95
7.4	Charakterisierung der ADP-abhängigen Glucokinase.....	97
7.5	Wachstumsversuche und Enzymmessungen zum Zuckerstoffwechsel in <i>A. fulgidus</i> Stamm VC16.....	100
8	Diskussion II: Charakterisierung Stärke-abbauender Enzyme aus geothermalen Habitaten.....	101
8.1	Pullulanase.....	101
8.2	Neopullulanase	102
8.3	Cyclodextrinasen	103
9	Literatur.....	107
10	Abkürzungen.....	116
	Danksagung.....	118
	Lebenslauf.....	119

1 Zusammenfassung

Untersuchungen zum Zuckerstoffwechsel in Archaea haben ergeben, dass Glucose und Hexosepolymere über modifizierte glycolytische Abbauwege, häufig über modifizierte Embden-Meyerhof-Wege, umgesetzt werden. Die Verwendung von Zuckern durch den einzigen archaeellen Sulfatreduzierer, den hyperthermophilen *Archaeoglobus fulgidus*, war noch umstritten.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass *A. fulgidus* Stamm 7324, nicht jedoch der Typstamm VC16, auf Stärke und Sulfat als Kohlenstoff- und Energiequelle wächst. Dabei wird Acetat gebildet. Ein ungewöhnlicher Stärkeabbauweg zu Acetat wurde in *A. fulgidus* Stamm 7324 aufgeklärt. Einige Schlüsselenzyme dieses Weges wurden gereinigt und charakterisiert.

In einem zweiten Teil wurden Stärke-abbauende Enzyme aus geothermalen Habitaten mit dem Ziel untersucht biotechnologisch interessante Eigenschaften zu finden.

1.1 Stärkeabbau in *A. fulgidus* Stamm 7324

A. fulgidus Stamm 7324 wuchs in Gegenwart von Hefeextrakt (0.5 g/l) und Sulfat (30 mM) auf Stärke (1 g/l) als Kohlenstoff- und Energiequelle, wobei Stärke (1 mol Glucose-Äquivalente) während des exponentiellen Wachstums unvollständig mit Sulfat zu 2 mol Acetat, 2 mol CO₂ und 1 mol H₂S oxidiert wurde. Neben Stärke konnten auch Amylose und β -Cyclodextrin als Substrate verwendet werden. Andere Zucker, wie zum Beispiel Glucose, Fructose und Maltose, dienten nicht als Wachstumssubstrat. Hiermit wird erstmalig das Wachstum eines Sulfatreduzierers auf Stärke bzw. einem Polysaccharid beschrieben.

Zellextrakte Stärke-gewachsener Zellen von *A. fulgidus* Stamm 7324 enthielten die Enzyme eines ungewöhnlichen Stärkeabbauweges zu Acetat. Dieser umfasst die Umwandlung von Stärke zu Glucose-6-Phosphat sowie die Umwandlung von Glucose zu Pyruvat über einen modifizierten Embden-Meyerhof-Weg. Aktivitäten der Schlüsselenzyme der Umsetzung von Stärke zu Acetat wurden in Gegenwart von Stärke induziert, was die funktionelle Beteiligung dieser Enzyme beim Stärkeabbau unterstreicht. In *A. fulgidus* Stamm VC16 konnten weder Enzymaktivitäten des Stärkeabbaus noch die entsprechenden homologen Gene nachgewiesen werden.

Stärkeabbau zu Glucose-6-Phosphat. Zellextrakte Stärke-gewachsener Zellen von *A. fulgidus* Stamm 7324 enthielten die Enzyme eines ungewöhnlichen Stärkeabbauweges, wie er bisher nur für *Klebsiella oxytoca* und *Thermococcus* sp. B1001 vorgeschlagen wurde. Dabei wird Stärke durch eine Cyclodextrin-Glucanotransferase in Cyclodextrine umgewandelt. Diese werden nach Transport in die Zelle durch eine Cyclodextrinase linearisiert. Die entstehenden Maltooligosaccharide werden unter Phosphorylierung durch eine Maltodextrin-Phosphorylase gespalten. Das entstandene Produkt Glucose-1-Phosphat wird durch eine Phosphoglucomutase in Glucose-6-Phosphat umgewandelt, ein Zwischenprodukt der Glycolyse. Diese vier Enzyme wurden gereinigt und charakterisiert. Die N-terminale Aminosäuresequenz und die molekularen und katalytischen Eigenschaften der gereinigten Enzyme des Stärkeabbaus zu Glucose-6-

Phosphat ähnelten ihren Homologen aus der Familie der *Thermococcales*. Die Enzyme des klassischen Abbauweges von Stärke, α -Amylase und Pullulanase, konnten nicht nachgewiesen werden.

Glucoseabbau zu Pyruvat über einen modifizierten Embden-Meyerhof-Weg. Zellextrakte Stärke-gewachsener Zellen von *A. fulgidus* Stamm 7324 enthielten alle Enzymaktivitäten eines modifizierten Embden-Meyerhof-Weges, wie er bisher für Vertreter der *Thermococcales* beschrieben wurde: ADP-abhängige Glucokinase, Glucose-6-Phosphat-Isomerase, ADP-abhängige 6-Phosphofruktokinase, Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase, Triosephosphat-Isomerase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin-Oxidoreduktase, 3-Phosphoglycerat-Mutase, Enolase und Pyruvat-Kinase. Das erste Enzym dieses modifizierten Embden-Meyerhof-Weges, die ADP-abhängige Glucokinase wurde gereinigt und charakterisiert. Die Eigenschaften dieses Enzyms ähnelten denen seiner Homologen aus der Familie der *Thermococcales*. Die Bildung von Glucose als Substrat für die Glucokinase lässt sich durch den bisher beschriebenen Stärkeabbauweg nicht erklären.

Pyruvat-Umsetzung zu Acetat. Die weitere Umsetzung des Pyruvats zu Acetat erfolgte über eine Pyruvat: Ferredoxin-Oxidoreduktase sowie über eine für Archaea typische ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase. Die Aktivitäten einer Phosphotransacetylase und einer Acetat-Kinase konnten nicht nachgewiesen werden.

Mit diesem ungewöhnlichen Stärkeabbauweg konnte zum ersten Mal der Abbau eines polymeren Zuckers, d.h. Stärke, durch einen Sulfatreduzierer gezeigt werden. Der Abbauweg ist in Abbildung 1 zusammengefasst.

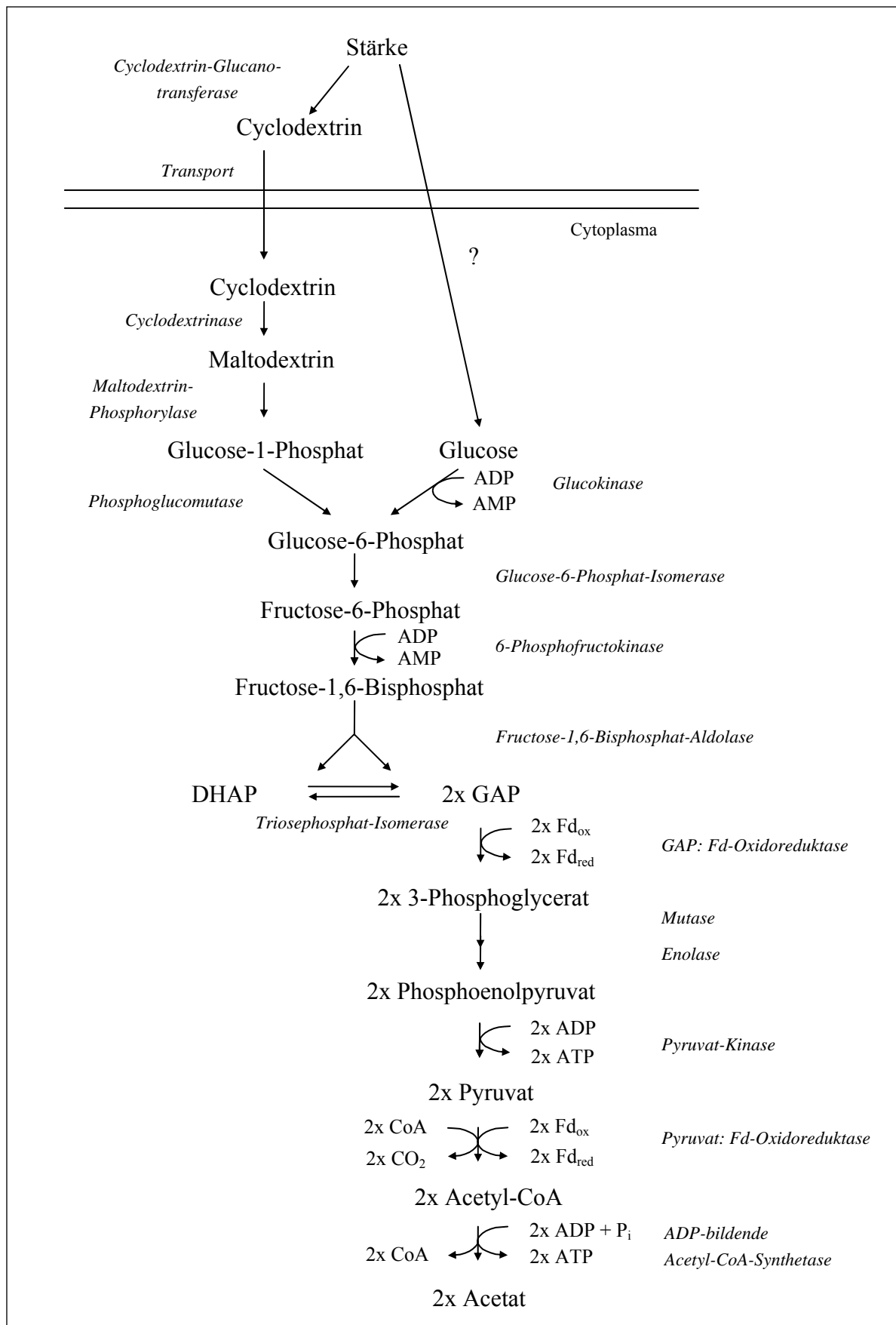


Abbildung 1 Vorgeschlagener Abbauweg von Stärke zu Acetat und CO₂ in *A. fulgidus* Stamm 7324. Das Fragezeichen kennzeichnet die noch nicht aufgeklärte Bildung von Glucose aus Stärke. Abkürzungen: DHAP Dihydroxyacetonphosphat, GAP Glycerinaldehyd-3-Phosphat, Fd Ferredoxin, ox oxidiert, red reduziert.

1.2 Untersuchung von Stärke-abbauenden Enzymen aus geothermalen Habitaten

Weiterhin wurden für diese Dissertation Untersuchungen an Stärke-umsetzenden Enzymen im Rahmen des EU-Projektes „Thermogenes“ durchgeführt. Die Gene dieser Enzyme wurden aus Umwelt-DNA bzw. verschiedenen Organismen geothermalen Habitats in Island isoliert. Ziel war es, Enzyme aus der Glycosylhydrolase-Familie 13 zu charakterisieren, die in Bezug auf Substratspezifität, Kationenabhängigkeit und Stabilität für die biotechnologische Anwendung von Interesse sind. Dabei wurden sieben verschiedene Gene von Stärke-abbauenden Enzymen, die von anderen Arbeitsgruppen isoliert, kloniert und sequenziert worden waren, in *E. coli* überexprimiert. Die erhaltenen Proteine wurden gereinigt und charakterisiert. Es handelte sich dabei um je ein Protein mit Pullulanase- bzw. Neopullulanase-Aktivität sowie fünf verschiedene Proteine, die Cyclodextrinase-Aktivität zeigten. Die untersuchten Proteine zeigten mit ihrer hohen Stabilität bei moderat thermophilen Bedingungen und ihrem breiten Substratspektrum biotechnologisch interessante Eigenschaften. Unterschiede in den Substratspezifitäten konnten auf Unterschiede in der Aminosäuresequenz zurückgeführt werden. So war z.B. das Vorhandensein einer N-terminalen Domäne mit der Cyclodextrinase-Aktivität korreliert.

2 Summary

Comparative analyses of sugar catabolism in archaea revealed that degradation of glucose and hexose polymers proceeds via modified glycolytic pathways, mainly via modified Embden-Meyerhof pathways. The utilization of sugars by *Archaeoglobus fulgidus* species, which represent the first isolated archaeal sulfat reducer, has not unequivocally been demonstrated so far. Thus, in this thesis it was found that *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324, rather than the type strain VC16, was able to grow on starch and sulfate as energy and carbon source. Starch was degraded to acetate via an unusual starch degradation pathway. Some key enzymes were purified and characterized.

Furthermore, starch degrading and modifying enzymes from geothermal habitats were characterized to find properties useful for biotechnological applications.

2.1 Starch degradation in *A. fulgidus* strain 7324

A. fulgidus strain 7324 was found to grow on starch (1 g/l) and sulfate (30 mM) in presence of yeast extract (0.5 g/l) as energy and carbon source. During exponential growth on starch, 1 mol of glucose-equivalent was incompletely oxidized with sulfate to approximately 2 mol acetate, 2 mol CO₂ and 1 mol H₂S. Beside starch, amylose and β-cyclodextrin were used as substrates. Other sugars, e.g. glucose, fructose and maltose were not utilized. This is the first report of growth of a sulfat reducer on starch, i.e. on a polymeric sugar.

Extracts of starch-grown cells of *A. fulgidus* Stamm 7324 contained all activities of an unusual starch degradation pathway to acetate, which includes the conversion of starch to glucose 6-phosphate as well as the conversion of glucose to pyruvate via a modified Embden-Meyerhof pathway. Specific activities of the key enzymes of the starch conversion to acetate were significantly higher in starch-grown cells than in lactate-grown cells, indicating induction of these enzymes during starch catabolism.

In *A. fulgidus* strain VC16 neither enzyme activities of starch degradation nor the corresponding homologous genes were detected.

Starch degradation to glucose 6-phosphate. Extracts of starch-grown *A. fulgidus* strain 7324 contained all enzymes of a starch degradation pathway so far only described for *Klebsiella oxytoca* and *Thermococcus* sp. B1001. In this pathway starch is converted to cyclodextrins by means of a cyclodextrin glucanotransferase. After transport into the cell cyclodextrins are linearised via a cyclodextrinase. By means of a maltodextrin phosphorylase the resulting maltooligodextrins are cleaved by phosphorylation. The resulting glucose 1-phosphat is converted via phosphoglucomutase to glucose 6-phosphat, an intermediate of glycolysis. These four enzymes were purified and characterized. The N-terminal amino acid sequences and the molecular and catalytic properties of the enzymes were very similar to their homologs of the *Thermococcales*. The classical enzymes of starch degradation, α-amylase and pullulanase, could not be detected in *A. fulgidus* strain 7324

Glucose degradation to pyruvate via a modified Embden-Meyerhof pathway. In extracts of starch-grown cells the following enzymes of a modified Embden-Meyerhof pathway were detected: ADP-dependent glucokinase, phosphoglucose isomerase, ADP-dependent 6-phosphofructokinase, fructose-1,6-phosphate aldolase, glyceraldehyde-3-phosphate: ferredoxin oxidoreductase, phosphoglycerate mutase, enolase, and pyruvate kinase. So far, this pathway was only described for *Thermococcales*. The first enzyme of this modified Embden-Meyerhof pathway, ADP-dependent glucokinase, was purified and characterized. The properties of the glucokinase were similar to the glucokinases from *Thermococcales*. So far, formation of glucose as substrate of the ADP-dependent glucokinase can not be explained by the described starch degradation pathway.

Pyruvate conversion to acetate. Pyruvate conversion to acetate involved pyruvate: ferredoxin oxidoreductase and ADP-forming acetyl-CoA synthetase. Activities of phosphotransacetylase and acetate kinase could not be detected.

The findings indicate that the archaeal sulfate reducer *A. fulgidus* strain 7324 converts starch to acetate via an unusual starch degradation pathway, a modified Embden-Meyerhof pathway and acetyl-CoA synthetase (ADP-forming). This is the first report of a starch degradation pathway in a sulfate reducer.

2.2 Characterization of starch degrading enzymes from geothermal habitats

Furthermore, starch degrading and modifying enzymes from geothermal habitats were characterized within the EC project "Thermogenes". The genes of these enzymes were isolated from environmental DNA and organisms, respectively, originating from geothermal habitats in Iceland. The intention of these experiments was the characterization of enzymes from the glycosylhydrolase family 13 in respect to their substrate specificity, cation dependence and stability in order to find properties of biotechnological interest. Starting from seven different isolated, sequenced and cloned. Seven different genes of starch degrading enzymes were expressed in *E. coli*, purified and characterized. One protein showed pullulanase activity and one neopullulanase activity, respectively; five proteins exhibited cyclodextrinase activity. The characterized proteins were highly stable at moderate thermophilic conditions and showed a broad substrate spectrum, useful properties for biotechnological applications. Differences in substrate specificity can be explained by differences in amino acid sequences, e.g. the existence of a N-terminal domain correlated with cyclodextrinase activity.

3 Einleitung

3.1 Zuckerstoffwechsel in Archaea

Sequenzvergleiche von 16S-rRNA und 18S-rRNA aus prokaryotischen und eukaryotischen Organismen führten zu einem phylogenetischen Stammbaum des Lebens (Abbildung 1), nach dem sich die Gesamtheit der Organismen in die drei Domänen Eukarya, Bacteria und Archaea gliedert (Woese 1987; Woese et al. 1990).

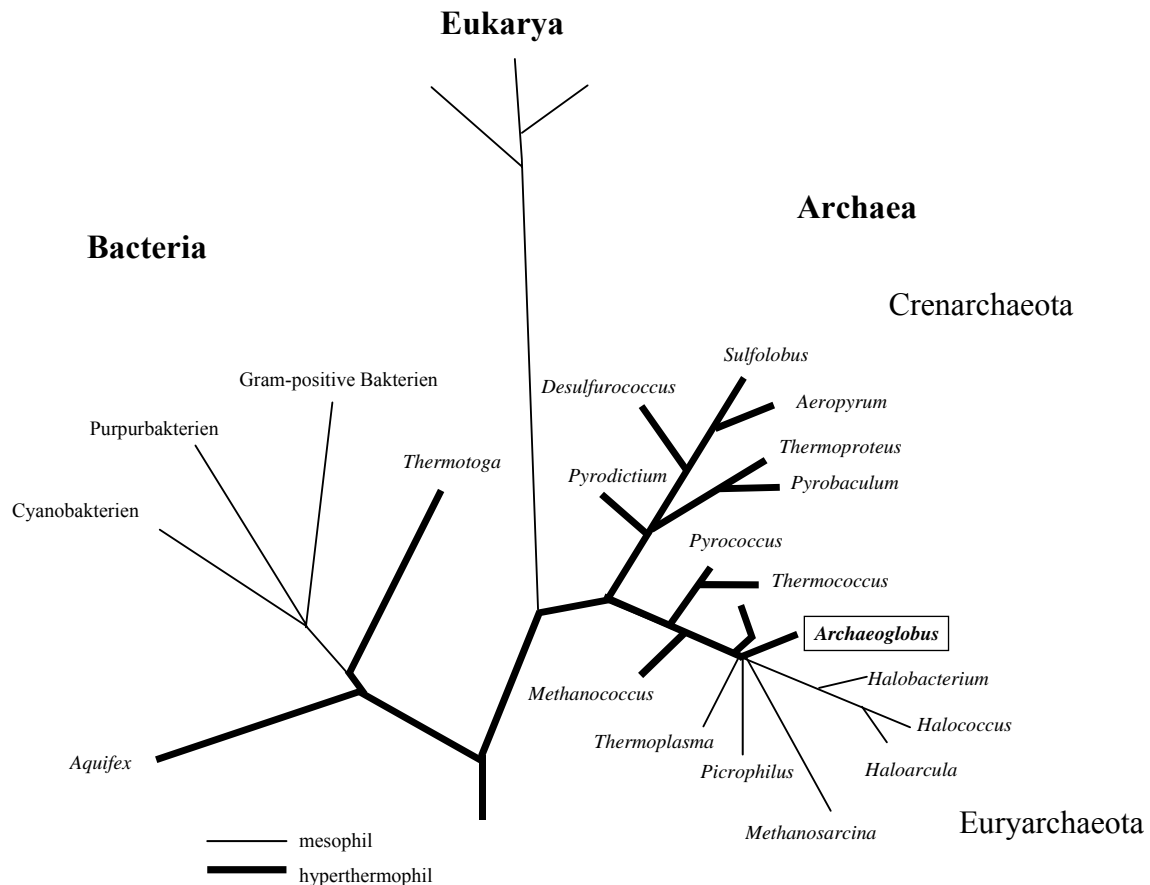


Abbildung 2 Einordnung von hyperthermophilen Mikroorganismen in den phylogenetischen Stammbaum. Verzweigungsgrad und Verzweigungslängen basieren auf rRNA-Sequenzvergleichen (schematisch nach Woese et al. 1990; Stetter 1993, modifiziert). Hyperthermophile Organismen der Domänen Bacteria und Archaea sind durch dicke Linien dargestellt.

Die Archaea unterscheiden sich von den Bacteria und Eukarya neben den 16S-rRNA Sequenzmustern durch zahlreiche molekulare und biochemische Merkmale. Die Art des Zellwandaufbaus und der Cytoplasmamembran ist für die Archaea charakteristisch. Die Zellwand enthält weder Muraminsäure noch D-Aminosäuren und kann Proteine, Pseudomurein, Polysaccharide oder auch Methanochondroitin enthalten (Kandler und König 1998). Die Plasmamembran besteht anstelle von Glycerinestern aus Di- oder Tetraetherlipiden (Langworthy und Pond 1986; De Rosa und Gambacorta 1988). Sie trägt zur Stabilität bei, die für die Besiedlung extremer Standorte nötig ist. Einige Charakteristika der Archaea ähneln

denen der Eukarya, z.B. der Transkriptionsmodus (Thomm 1996), das Vorhandensein von Histonproteinen (Sandman und Reeve 2001) und das Vorkommen von Introns in tRNAs (Kaine et al. 1983).

Viele Archaea besiedeln Biotope mit extrem hohen Temperaturen, extremen pH-Werten oder extrem hohen Salzkonzentrationen. Die Lebensräume der hyperthermophilen Archaea, also der an hohe Temperaturen angepassten Organismen mit einem Wachstumsoptimum über 80°C (Stetter 1999), sind oft in vulkanisch aktiven Zonen zu finden: in marinen Hydrothermalquellen, submarin erhitzten Sedimenten und terrestrischen Solfataren. Aus der Domäne der Bacteria sind nur wenige hyperthermophile Spezies bekannt (Abbildung 2), die den *Aquificales* und *Thermotogales* angehören (Huber und Stetter 1992; Blöchl et al. 1995).

Die Domäne der Archaea wird in Crenarchaeota und Euryarchaeota eingeteilt (Woese et al. 1990). Die Crenarchaeota sind phänotypisch relativ homogen und zum großen Teil hyperthermophil. In diese Gruppe gehören schwefelabhängige Ordnungen wie z.B. die *Sulfolobales* oder die *Desulfurococcales* (Woese 1987). Die Euryarchaeota stellen eine phänotypisch heterogene Gruppe dar. Sie weisen in Bezug auf Lebensraum und Physiologie sehr vielfältige Eigenschaften auf. Neben mesophilen Organismen, wobei die Methanogenen dominieren (Burggraf et al. 1991), sind thermophile Organismen der Ordnungen *Archaeoglobales*, *Thermoplasmatales* und *Thermococcales* und die extrem halophilen Organismen zu finden (Woese und Olsen 1986; Woese 1987; Woese 1987).

Die hyperthermophilen Bacteria und Archaea bilden im phylogenetischen Stammbaum die tiefsten Abzweigungen (Abbildung 2). Sie werden deshalb auch als ursprüngliche Organismen angesehen, womit vermutlich auch ihre Stoffwechselleistungen ursprünglich sind. Es wird angenommen, dass sich das Leben unter thermophilen Bedingungen entwickelt hat und sich in den bis heute noch vorhandenen extremen Biotopen aufgrund relativ konstanter Umweltbedingungen nur sehr langsam weiterentwickelt (Wächtershäuser 1988; Wächtershäuser 1992; Stetter et al. 1990). Damit sind die hyperthermophilen Organismen für die Forschung von großem Interesse. In den vorwiegend anaeroben Biotopen sind vor allem Wasserstoff, Kohlendioxid, Schwefel und Schwefelverbindungen zu finden. Deshalb sind chemolithoautotrophe Stoffwechseltypen weit verbreitet. Zu ihnen gehören die Reduktion von Schwefel zu H₂S (dissimilatorische Schwefelreduktion, z.B. *Pyrodictium*), die Reduktion von CO₂ zu CH₄ (Methanogenese, z.B. *Methanococcus*), die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser mit entweder H₂ (Knallgasreaktion, z.B. *Aquifex*) oder mit schwefelhaltigen Verbindungen als Elektronendonatoren (aerobe Atmung, z.B. *Aquifex*) und die Reduktion von Nitrat zu N₂ (Denitrifikation, *Pyrobaculum*) (Danson 1988; Wächtershäuser 1992; Schönheit und Schäfer 1995; Stetter 1996). Neben chemolithoautotrophen Stoffwechseltypen sind viele Archaea befähigt einen chemoorganoheterotrophen Stoffwechsel durchzuführen.

Zur Reduktion von Sulfat zu H₂S (dissimilatorische Sulfatreduktion) mit organischen oder anorganischen Elektronendonoren ist nur eine einzige archaeelle Gattung befähigt, *Archaeoglobus*. *Archaeoglobus fulgidus* wurde von Stetter aus marinen hydrothermalen Systemen in Vulcano/Italien isoliert (Stetter et al. 1987; Stetter 1988). Der Organismus zeigt

ein Temperaturoptimum von 83°C. *A. fulgidus* gehört phylogenetisch zur Gruppe der Euryarchaeota und ist eng mit den methanogenen Archaea und etwas weiter entfernt mit den *Thermococcales* verwandt (Abbildung 2). Zusätzlich zum Typstamm VC16, dessen Genom vollständig sequenziert vorliegt (Klenk et al. 1997), wurden weitere Stämme aus anderen Habitaten isoliert: Stamm 7324 kommt in Porenwasser an geothermal erhitzten Erdöllagerstätten in der Nordsee vor (Beeder et al. 1994). Stamm Z wurde ebenfalls in Vulcano isoliert (Zellner et al. 1989b). DNA-DNA-Hybridisierungen ergaben hohe Übereinstimmungen zwischen den einzelnen Stämmen.

A. fulgidus ist in der Lage, mit Wasserstoff und CO₂ chemolithoautotroph zu wachsen, wobei Sulfat bzw. Thiosulfat als Elektronenakzeptoren dienen. Bevorzugt ist jedoch chemoorganoheterotrophes Wachstum mit unterschiedlichen organischen Substraten und Sulfat, wie z. B. Komplexbestandteilen oder kurzkettige Säuren, wie Laktat. Der Abbauweg von Laktat ist vollständig aufgeklärt worden (Kunow et al. 1994): Laktat wird über Pyruvat zu Acetyl-CoA abgebaut und dann über einen modifizierten Acetyl-CoA/Kohlenmonoxid-Dehydrogenase-Weg zu CO₂ oxidiert. An der Oxidation von Laktat sind mehrere Enzyme und Coenzyme beteiligt, die ursprünglich als typisch für Methanogene beschrieben wurden, wie zum Beispiel die methanogenen Cofaktoren Methanopterin, Methanofuran und der Faktor F₄₂₀ (Thauer und Kunow 1995; Vorholt et al. 1995). Das Vorhandensein des Faktors F₄₂₀ führt zu einer blau-grünen Fluoreszenz. Die Reduktion des Sulfates verläuft wie die bakterielle Sulfatreduktion über aktiviertes Sulfat mit Hilfe der Enzyme ATP-Sulfurylase, APS-Reduktase und Sulfitreduktase (Dahl et al. 1994). Diese vollständige Oxidation von Laktat zu CO₂ wurde auch für *A. fulgidus* Stamm 7324 beschrieben, wogegen Stamm Z Laktat unvollständig zu Acetat oxidiert (Beeder et al. 1994; Zellner et al. 1989b).

Während die Laktat-Umsetzung bei den einzelnen *A. fulgidus* Stämmen gut untersucht wurde, lagen über den Abbau von Zuckern bzw. Zuckerpolymeren kaum Ergebnisse vor. Zwar wurden bei der Erstbeschreibung von *A. fulgidus* Stamm VC16 Glucose und Stärke als Wachstumssubstrate angegeben (Stetter et al. 1987; Stetter 1988), detaillierte Untersuchungen des Wachstums oder Fermentationsbilanzen liegen jedoch nicht vor. Zudem konnte in späteren Untersuchungen kein Wachstum von *A. fulgidus* Stamm VC16 und Stamm Z mit Zuckern gezeigt werden (Zellner et al. 1989b). Außerdem wurden im Genom von *A. fulgidus* Stamm VC16 keine konservierten Gene identifiziert, die für Schlüsselenzyme der bekannten Glucoseabbauwege Embden-Meyerhof-Weg und Entner-Doudoroff-Weg kodieren (Cordwell 1999). Aufgrund dessen wurde postuliert, dass *A. fulgidus* nicht mit Zuckern als Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen kann (Cordwell 1999; Klenk et al. 1997).

Im Gegensatz zu *A. fulgidus* ist die Verwertung von Zuckern, z.B. Maltose und Stärke, durch andere Archaea gut untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass alle bisher untersuchten zuckerverwertenden Archaea ihre Substrate nicht über die klassischen glycolytischen Abbauwege Embden-Meyerhof-Weg und Entner-Doudoroff-Weg abbauen, sondern Modifikationen dieser Wege zeigen (Schönheit und Schäfer 1995). Die Modifikationen beziehen sich vor allem auf die Schlüsselenzyme der Abbauwege.

So sind für den modifizierten Entner-Doudoroff-Weg der thermoacidophilen Archaea *Sulfolobus*, *Thermoplasma* und *Picrophilus* Enzyme beschrieben, die zu einem nicht-phosphorylierten Abbau von Glucose zu Pyruvat über die Intermediate Gluconat und 2-Keto-3-Desoxygluconat (KDG) führen: Glucose-Dehydrogenase, Gluconat-Dehydratase und KDG-Aldolase. Eine spezifische Kinase phosphoryliert Glycerat zu 2-Phosphoglycerat. Die weitere Umsetzung zu Pyruvat erfolgt über die aus dem klassischen Weg bekannten Enzyme Enolase und Pyruvat-Kinase (De Rosa et al. 1984; Smith et al. 1989; Selig et al. 1997; Budgen und Danson 1986; Reher 2004). Anstelle des 2-Phosphoglycerats kann auch KDG durch eine KDG-Kinase zu 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat phosphoryliert werden, wie für die extrem halophilen Archaea beschrieben. Damit liegt ein partiell-phosphorylierter Entner-Doudoroff-Weg vor (Johnsen et al. 2001).

Im Gegensatz zu den modifizierten Entner-Doudoroff-Wegen der aeroben Archaea ist für viele anaerobe Archaea der Glucoseabbau über modifizierte Embden-Meyerhof-Wege beschrieben (Abbildung 3). Diese Modifikationen beziehen sich auf die Glucokinase (GLK), die 6-Phosphofruktokinase (PFK), die Glucose-6-Phosphat-Isomerase (PGI), die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-oxidierenden Enzyme sowie die Pyruvat-Kinase (PK).

Anstelle der klassischen ATP-abhängigen GLK und PFK der Bacteria und Eukarya verwenden die Euryarchaeota *Thermococcus* und *Pyrococcus* ADP-abhängige Enzyme (Kengen et al. 2001). Für die Crenarchaeota *Aeropyrum pernix* und *Pyrobaculum aerophilum* wurde vorgeschlagen, dass die Umsetzung von Glucose zu Pyruvat mit ATP-abhängigen Kinasen erfolgt, die sich jedoch von den ATP-abhängigen Kinasen aus Bacteria und Eukarya unterscheiden. Diese GLK gehören nicht zur klassischen Glucokinase-Familie, sondern zur ROK-Familie, die Repressorproteine, offene Leserahmen mit unbekannter Funktion und Zuckerkinasen einschließt (Hansen et al. 2002b). Die PFK gehören zur PFK-B Familie, im Gegensatz dazu gehören die ATP-abhängigen PFK aus Bacteria und Eukarya der PFK-A Familie an (Hansen und Schönheit 2001). In *Thermoproteus tenax* ist die PFK Pyrophosphat-abhängig (Siebers et al. 1998).

Auch die PGI der Archaea unterscheiden sich von ihren bakteriellen und eukaryontischen Homologen. So gehören die neuartigen metallabhängigen PGI der *Thermococcales* der Cupinfamilie und nicht der klassischen PGI-Superfamilie an (Verhees et al. 2001; Swan et al. 2003). Die PGI aus *A. pernix* und *P. aerophilum* gehören zu einer bifunktionellen PGI/Phosphomannose-Isomerase (PMI)-Familie. Diese Familie gehört zwar zur PGI-Superfamilie, unterscheidet sich jedoch von den klassischen PGIs aus Bacteria durch eine ungewöhnliche Substratspezifität, in dem sie zusätzlich zur Isomerisierung von Glucose-6-Phosphat auch Mannose-6-Phosphat umsetzt. Diese Familie scheint bei Archaea und hyperthermophilen Bakterien verbreitet zu sein (Hansen et al. 2004).

Die Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) zu 3-Phosphoglycerat ist für viele Archaea eine GAP: Ferredoxin-Oxidoreduktase (GAPOR) beschrieben, die die klassischen Enzyme GAP-Dehydrogenase und Phosphoglycerat-Kinase ersetzt (Schönheit und Schäfer 1995; Selig et al. 1997). Außerdem wurde für *T. tenax* und *A. pernix* beschrieben, dass die

Umsetzung von GAP zu 3-Phosphoglycerat durch eine nicht-phosphorylierende GAP-Dehydrogenase katalysiert wird, wobei NADH entsteht (Brunner und Hensel 2001; Reichstein 2001; Wendorff 2002).

Pyruvat-Kinasen (PK) aus Archaea zeigen im Gegensatz zu ihren bakteriellen Homologen eingeschränkte regulatorische Eigenschaften. Klassische heterotrope allosterische Effektoren von PK aus Bacteria und Eukarya haben keinen Einfluss auf die Aktivität der archaellen PK (Johnsen et al. 2003).

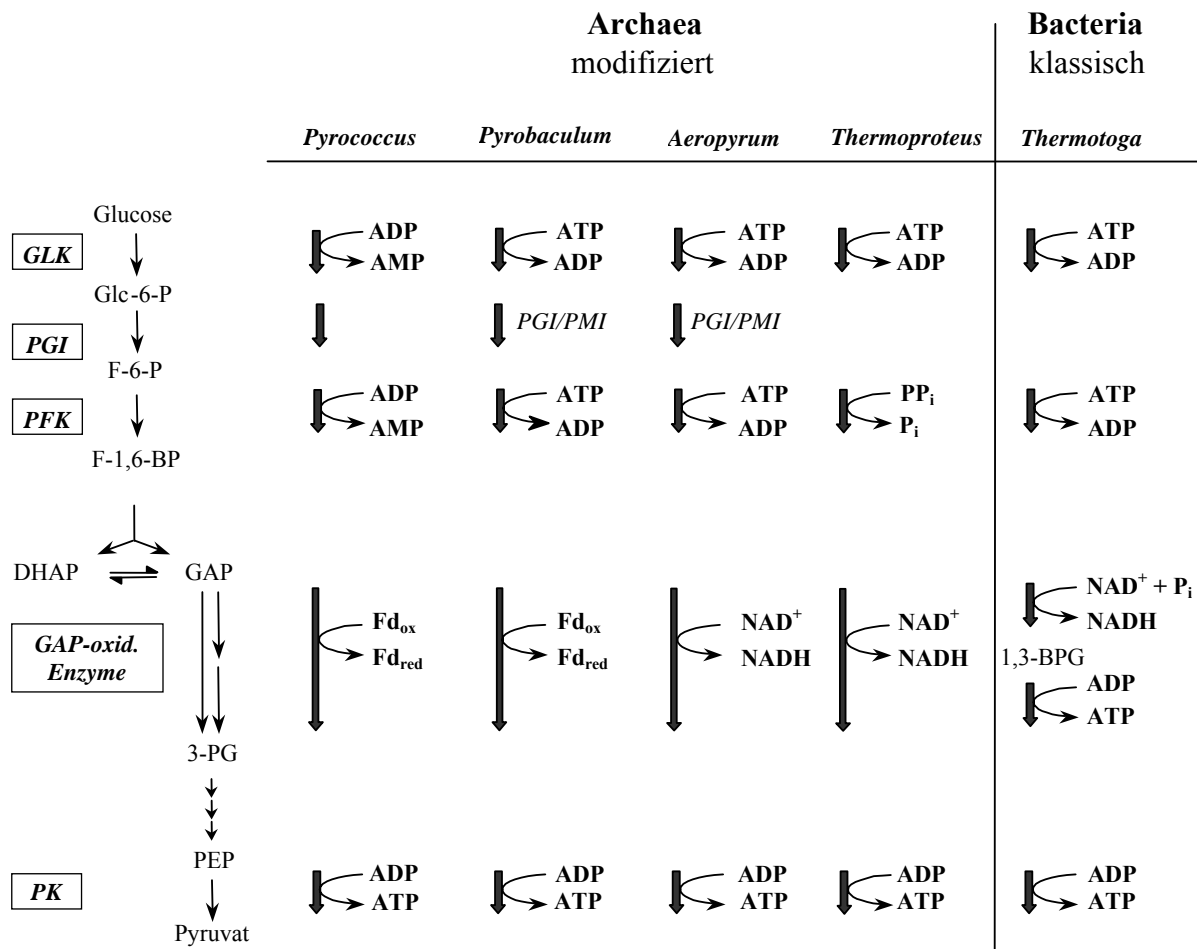


Abbildung 3 Vergleichende Darstellung der Enzyme des Glucoseabbaus der modifizierten Embden-Meyerhof-Wege in verschiedenen hyperthermophilen Archaea und des klassischen Embden-Meyerhof-Weges in dem hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima*. Abkürzungen: Glc-6-P = Glucose-6-Phosphat, F-6-P = Fructose-6-Phosphat, F-1,6-BP = Fructose-1,6-Bisphosphat, DHAP = Dihydroxyacetonphosphat, GAP = Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 3-PG = 3-Phosphoglycerat, 2-PG = 2-Phosphoglycerat, 1,3-BPG = 1,3-Bisphosphoglycerat, PGI = Phosphoglucose-Isomerase, PEP = Phosphoenolpyruvat, GLK = Glucokinase, PFK = 6-Phosphofruktokinase, PK = Pyruvat-Kinase, oxid. = oxidierende, Fd = Ferredoxin, ox = oxidiert, red = reduziert.

Im Gegensatz zu den Archaea wird im hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* Glucose über den klassischen Embden-Meyerhof-Weg abgebaut (Schröder et al. 1994; Selig et al. 1997). Dieser enthält eine klassische ATP-abhängige GLK und eine ATP-abhängige PFK. GAP wird durch die klassischen Enzyme GAP-Dehydrogenase und Phosphoglycerat-Kinase zu 3-Phosphoglycerat umgesetzt. PFK und PK aus *T. maritima* sind klassisch

allosterisch reguliert (Hansen et al. 2002a; Johnsen et al. 2003). Das Vorkommen des klassischen Weges in diesem hyperthermophilen Bakterium spricht dafür, dass die Modifikationen in den Zuckerabbauwegen bei den Archaea nicht auf eine Anpassung an die Hyperthermophilie zurückzuführen sind, sondern wahrscheinlich phylogenetische Gründe haben (Selig et al. 1997).

Da aufgrund der vorhandenen Daten die Frage der Zuckerverwertung und der entsprechenden Enzyme bei *A. fulgidus* nicht entschieden werden konnte, wurde in der vorliegenden Arbeit geprüft, ob *A. fulgidus*-Stämme in der Lage sind, mit Zuckern zu wachsen. Es wurde gezeigt, dass *A. fulgidus* Stamm 7324 mit Stärke als Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen kann, wobei Acetat als ein Produkt gebildet wird. Ausgehend von diesem Befund sollten die folgenden Aufgaben bearbeitet werden:

1. Charakterisierung des Wachstums von *A. fulgidus* Stamm 7324 auf Zuckern und Sulfat und Vergleich zum Wachstum auf Laktat und Sulfat.
2. Identifizierung der Enzyme, die an der Umsetzung von Stärke zu Acetat beteiligt sind. Insbesondere sollte geprüft werden, ob *A. fulgidus* Stamm 7324 ebenso wie andere Archaea Enzyme modifizierter Zuckerabbauwege enthält.
3. Reinigung und Charakterisierung ausgewählter Enzyme des Stärkeabbaus.

3.2 Enzyme des Stärkeabbaus aus geothermalen Habitaten

Zusätzlich zu den Untersuchungen zum Abbau von Stärke durch *A. fulgidus* wurden Untersuchungen an thermophilen Stärke-umsetzenden Enzymen aus heißen Quellen in Island im Rahmen des EU-Projektes „Thermogenes“ durchgeführt. Ziel war es neuartige Proteine für die Umsetzung von Stärke zu finden und diese auf mögliche Eignung für biotechnologische Anwendungen zu untersuchen.

Stärke ist nach Cellulose das zweithäufigste Polysaccharid, das von Pflanzen produziert wird. Stärke setzt sich aus Amylose (15%–25%) und Amylopektin (75%–85%) zusammen. Amylose ist ein lineares Molekül, das aus 1,4-verknüpften α -D-Glucopyranose-Resten besteht. Amylopektin ist ein verzweigtes Polymer und enthält zusätzlich zu den α -1,4-Verknüpfungen auch α -1,6-glycosidische Bindungen. Die Hydrolyse von Stärke erfordert die koordinierte Aktivität verschiedener Enzyme, wie zum Beispiel α -Amylasen, Glucoamylasen, Pullulanasen und α -Glucosidasen. Mikroorganismen, die in der Lage sind diese Enzyme zu produzieren, spielen eine große Rolle in der Biodegradation natürlicher Polysaccharide. Der Abbau von Stärke ist bei Bakterien, Pilzen und Hefen weit verbreitet (Antranikian 1990). Es wurden bereits verschiedene thermophile und hyperthermophile Bakterien und Archaea beschrieben, die mit Stärke als Kohlenstoffquelle wachsen und extrem thermostabile Stärke-modifizierende und -abbauende Enzyme produzieren (Leuschner und Antranikian 1995).

Diese Gruppe von Enzymen, die in der Lage sind, die glycosidische Bindung zwischen zwei oder mehr Kohlenhydraten bzw. einem Kohlenhydrat und einem Rest zu hydrolysieren, wird

Glycosylhydrolase genannt. Glycosylhydrolasen wurden aufgrund von Aminosäuresequenz-Ähnlichkeiten in mehr als 45 Familien eingeteilt (Henrissat 1991; Henrissat und Bairoch 1993). Die Glycosylhydrolase-Familie 13 (GH-13-Familie, α -Amylase-Familie) enthält dabei die Mehrheit der bekannten Enzyme des Stärkeabbaus (MacGregor et al. 2001). Dazu gehören zum Beispiel die α -Amylasen, klassische industriell genutzte Enzyme, die zum Abbau von Stärke in zahlreiche Produkte verwendet werden (Guzman-Maldonado und Paredes-Lopez 1995; Van der Maarel et al. 2002). Zur GH-13-Familie gehören aber auch Enzyme mit einem großen Spektrum an Stärke-modifizierenden bzw. -hydrolysierenden Aktivitäten, wie zum Beispiel Pullulanasen, α -1,6-Glucosidasen, verzweigende Enzyme, maltogene α -Amylasen, Neopullulanasen und Cyclodextrinasen (CDase) (Kuriki und Imanaka 1999; MacGregor et al. 2001).

Trotz der Vielfalt der katalysierten Aktivitäten zeigen die Aminosäuresequenzen dieser Enzymfamilie vier hochkonservierte Regionen in der Nähe des aktiven Zentrums (MacGregor et al. 2001). Diese hochkonservierten Regionen wurden durch die Arbeitsgruppe Kristjansson (Prokaria, Reykjavik, Island) verwendet, um Gene Stärke-modifizierender Enzyme aus Umwelt-DNA und aus thermophilen Organismen zu suchen. Diese wurden aus verschiedenen Probenahme-Stellen an heißen Quellen (50-60°C) in Island isoliert. Dazu wurde die „CODEHOP consensus primer strategy“ verwendet (Rose et al. 2003), bei der Primer konstruiert wurden, die am 5'-Ende zu den hochkonservierten Regionen der GH-13-Familie komplementär waren, am 3'-Ende jedoch degenerierte Bereiche enthielten. Dazu wurden zwei der vier konservierten Regionen der GH-13-Familie verwendet. Schrittweise wurden so vollständige Gene erschlossen, die anschließend sequenziert, mit bekannten Sequenzen der GH-13-Familie verglichen (Arbeitsgruppe Kristjansson) und zur Expression in verschiedene Vektoren kloniert wurden (Arbeitsgruppe Holst, Lund, Schweden).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt sieben dieser Genprodukte überexprimiert, gereinigt und charakterisiert um potentiell neuartige und thermostabile GH-13-Proteine zu finden und sie auf ihre mögliche Anwendung in Stärke-modifizierenden Prozessen in der Biotechnologie zu überprüfen. Im Vordergrund standen dabei Enzyme, die sehr effizient Cyclodextrine hydrolysieren, sowie Enzyme, die Pullulan abbauen.

4 Material und Methoden

4.1 Wachstum von *Archaeoglobus fulgidus* Stamm 7324 und Stamm VC16

4.1.1 Züchtung

A. fulgidus Stamm 7324 (DSM 8774) sowie *A. fulgidus* Stamm VC16 (DSM 4304) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen und in einem 100 Liter Biostat-Fermenter (Braun, Melsungen) gezüchtet. Die Wachstumstemperatur betrug 76°C, es wurde mit 60 Upm gerührt und mit 1 bar N₂/CO₂ (80%/20%) begast. Das Medium war modifiziert nach Möller-Zinkhan et al. und enthielt 1 g/l Stärke, 30 mM Sulfat und 0.5 g/l Hefeextrakt als Kohlenstoff- und Energiequelle (Möller-Zinkhan et al. 1989).

Das Basalmedium enthielt pro l: 100 ml Salzlösung und 10 ml Spurenelementlösung (siehe unten), 2 mg (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ x 6 H₂O, 0.5 g Hefeextrakt.

Die Salzlösung enthielt (pro l) 74 g MgSO₄ x 7 H₂O, 3.4 g KCl, 27.5 g MgCl₂ x 6 H₂O, 2.5 g NH₄Cl, 1.4 g CaCl₂ x 2 H₂O, 1.4 g K₂HPO₄, 180 g NaCl, 5 ml Resazurin (0.2% w/v).

Die Spurenelementlösung enthielt (pro l) 1.5 g Titriplex I, 3 g MgSO₄ x 7 H₂O, 0.01 g Na₂WO₄, 0.01 g H₃BO₃, 0.01 g Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0.025 g NiCl₂ x 6 H₂O, 0.3 g Na₂SeO₃ x 5 H₂O, 0.45 g MnSO₄ x 1 H₂O, 1.0 g NaCl, 0.1 g FeSO₄ x 7 H₂O, 0.18 g CoSO₄ x 7 H₂O, 0.1 g CaCl₂ x 2 H₂O, 0.18 g ZnSO₄ x 7 H₂O, 0.01 g CuSO₄ x 5 H₂O, 0.02 g KAl(SO₄)₂ x 12 H₂O. Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit KOH auf pH 6.5 eingestellt.

Der pH-Wert des Mediums wurde mit HCl auf pH 6.8 eingestellt. Nach dem Begasen mit 0.5 bar N₂/CO₂ (80%/20%) und Autoklavieren wurden dem Medium zur Reduktion 0.5 ml 0.5 M Na₂S und 0.5 ml 0.5 M Na₂S₂O₄ pro 50 ml zugegeben. Außerdem wurden 5.5 g/l NaHCO₃ aus einer 100fach Stammlösung zugegeben. Das Medium wurde 2%-ig inokuliert. Die Ernte der Zellen erfolgte in der stationären Wachstumsphase, die Lagerung der Zellpellets bei –70°C.

Des weiteren wurden Wachstumsexperimente in 125 ml Müller-Krempelflaschen mit 50 ml Basalmedium durchgeführt. Verschiedene Zucker (je 10 mM Maltose, Glucose und Fructose oder je 1 g/l Saccharose, Cellobiose, Stärke, Pullulan, Dextrin, β-Cyclodextrin, Amylose und Amylopektin) wurden als Substrate in der Gegenwart von 0.5 g/l Hefeextrakt und Sulfat (30 mM) getestet. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne Zusatz von Zucker. Das Wachstum wurde durch Bestimmung der Zellzahl verfolgt. Für jeden Zucker wurden 6 Passagen mit jeweils 2% Inokulum durchgeführt.

4.1.2 Fermentationsbilanz für das Wachstum von *A. fulgidus* Stamm 7324 auf Stärke

Die Fermentationsbilanz von wachsenden Kulturen von *A. fulgidus* Stamm 7324 wurde in 125-ml Serumflaschen mit 50 ml sulfathaltigem Medium mit entweder Laktat oder Stärke als Substrat bestimmt. Für diese Experimente enthielt das Medium kein NaHCO_3 und die Gasphase bestand aus 100% N_2 (0.5 bar). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und die Konzentration von L-Laktat, Stärke, Acetat und CO_2 bestimmt (4.6). H_2S wurde in separaten Kulturen bestimmt, nachdem das H_2S aus der Gasphase durch Zugabe von NaOH (finaler pH-Wert 11) gefällt wurde (Selig und Schönheit 1994). Die resultierende H_2S -Konzentration im Medium repräsentiert die Gesamtmenge an H_2S , die während des Wachstums gebildet wurde. Die Bestimmung erfolgte colorimetrisch (Cline 1969). Die Fermentationsbilanz wurde korrigiert gegen das Wachstum und die Produktbildung bei Wachstum auf Hefeextrakt (0.5 g/l) in Abwesenheit von Laktat beziehungsweise Stärke.

4.2 Enzymmessungen in Rohextrakten von *A. fulgidus* Stamm 7324 und Stamm VC16

Rohextrakte wurden unter aeroben Bedingungen präpariert. Die Zellen wurden in der späten exponentiellen Phase durch Zentrifugation bei 4°C für 20 min bei $10000 \times g$ geerntet und in 100 mM Tris-HCl pH 8.0 oder 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 resuspendiert und bei -20°C gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels dreimaliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle (American Instrument Company, Silver Spring, Maryland, USA) bei 86 bar. Diese Suspension wurde 15 min bei $10000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Proteingehalt im löslichen Überstand wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt (4.3.1). Das Pellet wurde zur Bestimmung von membranassoziierten Enzymen in 50 mM Natriumacetat pH 5.0 aufgenommen (Brown et al. 1990).

Für den Nachweis der extrazellulären Enzyme α -Amylase, Pullulanase und Cyclodextrin-Glucanotransferase wurde Wachstumsüberstand ankonzentriert. Dazu wurden verschiedene Methoden verwendet: Filtration mit Filtern mit $0.4 \mu\text{m}$ Porenweite, Ultrafiltration mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa (Brown et al. 1990), Zentrifugation in Centricon-Röhrchen mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa (Koch et al. 1990) sowie Vakuumzentrifugation bei 50°C . Zusätzlich wurden Wachstumsüberstand bzw. Pelletfraktion auf eine Stärkesäule aufgetragen (Hanus und Kucera 1974) und gebundene Proteine mit 2 M NaCl eluiert.

Im Folgenden werden die Testsysteme beschrieben, die zur Bestimmung der Enzyme verwendet wurden. Die Enzymtests wurden an einem beheizbaren Ultrospec2000 Photometer (Pharmacia, Freiburg) in Halbmikro-Einwegküvetten ($d = 1 \text{ cm}$) durchgeführt.

Testsysteme, die mit der Reduktion von Benzylviologen gekoppelt waren, wurden unter anaeroben Bedingungen in mit Gummistopfen verschlossenen Glasküvetten mit N_2 (0.2 bar) als Gasphase durchgeführt. Das Benzylviologen wurde durch Zugabe von Natriumdithionit vor dem Start der Reaktion anreduziert.

Die Testlösungen wurden in den Küvetten bei der jeweiligen Temperatur vorinkubiert, die Startbarkeit sowie die Proteinabhängigkeit der Reaktion durch die verschiedenen Substrate

bzw. durch Extrakt wurden überprüft. Es war sichergestellt, dass die verwendeten Hilfsenzyme im Test nicht limitierend waren. Bei diskontinuierlichen Testsystemen wurde in Eppendorfgläsern bei der entsprechenden Temperatur im Thermoblock inkubiert. Nach Inkubation für verschiedene Zeiten wurden die Eppendorfgläser für 10 min auf Eis gestellt. Danach wurde entweder eiskalte Detektionslösung hinzugegeben oder ein Aliquot entnommen und in analytische Tests eingesetzt. Die Proteinabhängigkeit der Reaktion und die Startbarkeit wurden in entsprechenden Kontrollansätzen überprüft.

Enzymtests mit Pyridinnukleotiden wurden bei 365 nm, mit Benzylviologen bei 578 nm durchgeführt. Für die Berechnung der Enzymaktivitäten wurden die folgenden molaren Extinktionskoeffizienten (in $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pro 2 Elektronen) verwendet: $\epsilon_{365}(\text{NAD(P)H})=3.4$, $\epsilon_{578}(\text{BV}_{\text{red}})=17.2$.

Dabei gilt für die Testsysteme: 1 Unit (U) ist definiert als 1 μmol verbrauchtes Substrat oder gebildetes Produkt pro Minute, im Falle von Benzylviologen als 2 μmol Viologen pro Minute. Für Testsysteme, die Umsetzung von Stärke mit Hilfe des Iod-Tests bestimmen, gilt: 1 U ist definiert als 1% Stärkeumsatz pro Minute.

Für die Berechnung von Konzentrationen der verwendeten, aus Glucoseeinheiten bestehenden, Polysaccharide wurde als Molekulargewicht das Molekulargewicht von Glucose abzüglich zweier Moleküle Wasser verwendet oder die Konzentration in g/l angegeben.

α -Amylase-Aktivität und Pullulanase-Aktivität wurden als Freisetzung reduzierender Zucker aus Stärke bzw. Pullulan mit Hilfe des DNS-Assays bestimmt (4.6), wie bei Brown beschrieben (Brown et al. 1990). Der Testansatz enthielt in 200 μl 50 mM Natriumacetat pH 5.0, 5 mM CaCl_2 , 1% Stärke (löslich) bzw. Pullulan und Protein. Als Protein wurde Membranfraktion bzw. mit verschiedenen Methoden ankonzentrierter Wachstumsüberstand (s.o.) verwendet. Nach Inkubation bei 80°C für 5 bis 45 min wurden die Ansätze für 10 min auf Eis inkubiert und dann vollständig in das DNS-Assay eingesetzt. Als Kontrolle dienen Membranfraktionen und Wachstumsüberstände von Stärke-gewachsenen Zellen von *Pyrococcus furiosus* (DSMZ 3638), die in einem 100-l Fermenter gezüchtet worden waren (Fiala und Stetter 1986) und die unter den gleichen Bedingungen wie für *A. fulgidus* Stamm 7324 präpariert wurden.

Cyclodextrin-Glucanotransferase-Aktivität wurde als Abnahme von Stärke mit Hilfe des Iod-Tests bestimmt (4.6). Der 200 μl -Testansatz enthielt 0.5% lösliche Stärke in 50 mM Natriumacetat pH 5.5 mit 1 mM CaCl_2 sowie verschiedene Mengen Pelletfraktion bzw. ankonzentrierter Wachstumsüberstand. Nach Inkubation bei 80°C für 5-60 min wurde jeweils ein 20 μl Aliquot in den Iod-Test gegeben. Die restlichen 180 μl wurden in das DNS-Assay (4.6) eingesetzt, um auszuschließen, dass reduzierende Zucker gebildet wurden.

Cyclodextrinase-Aktivität wurde als Freisetzung reduzierender Zucker aus α -Cyclodextrin mit Hilfe des DNS-Assay bestimmt (4.6). Der bei 80°C für 1-15 min inkubierte Testansatz (200 μl) enthielt 0.5% α -Cyclodextrin in 50 mM Natriumacetat pH 4.5 sowie Zellextrakt (5-150 μg Protein). Der komplette Ansatz wurde in das DNS-Assay eingesetzt.

Maltodextrin-Phosphorylase-Aktivität wurde als phosphatabhängige Umsetzung von Maltoheptaose zu Glucose-1-Phosphat gemessen, in dem dieses weiter zu Glucose-6-Phosphat umgesetzt wurde. Mit Hilfe der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase wurde diese Reaktion mit der Reduktion von NADP^+ gekoppelt. Im diskontinuierlichen Testverfahren enthielt der Inkubationsansatz (250 μl) 50 mM KPP pH 6.8, 2.5 mM MgCl_2 , 1 mM Maltoheptaose und 5-200 μg Extrakt. Nach Inkubation für 5-30 min bei 80°C wurden 750 μl eiskalte Detektionslösung (50 mM KPP pH 6.8, 2.5 mM MgCl_2 , 1 mM NADP^+ , 2 U Phosphoglucomutase und 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) hinzugegeben und bis zum Ablauf der Reaktion bei Raumtemperatur inkubiert.

Phosphoglucomutase-Aktivität wurde als Glucose-1,6-Bisphosphat-abhängige Umwandlung von Glucose-1-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat bestimmt, in dem das Glucose-6-Phosphat mit Hilfe der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase umgesetzt wurde, wobei NADP^+ reduziert wird. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte bei 80°C im diskontinuierlichen Test. Die Inkubationsansätze (250 μl) enthielten 50 mM HEPES pH 8.2 5 mM MgCl_2 , 10 mM Glucose-1-Phosphat, 0.15 mM Glucose-1,6-Bisphosphat und 5-200 μg Extrakt. Nach Inkubation wurden 750 μl eiskalte Detektionslösung hinzugegeben (50 mM Tris-HCl pH 8, 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 1 mM NADP^+) und bis zum vollständigen Ablauf der Reaktion bei Raumtemperatur inkubiert.

Enzyme des Embden-Meyerhof-Weges und der Pyruvat-Umsetzung zu Acetat. Aktivitäten von ADP-abhängiger Glucokinase, ADP-abhängiger 6-Phosphofruktokinase, Pyruvat-Kinase und Glycerinaldehyd-3-Phosphat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (GAPOR), Glucose-6-Phosphat-Isomerase, Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase, Triosephosphat-Isomerase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Phosphoglycerat-Mutase und Enolase, sowie die Enzyme der Pyruvatumsetzung zu Acetat, Pyruvat: Ferredoxin-Oxidoreduktase, Acetyl-CoA-Synthetase (ADP-bildend), Acetat-Kinase und Phosphotransacetylase, wurden bestimmt wie bereits beschrieben (Schäfer und Schönheit 1991; Schäfer und Schönheit 1992; Schäfer und Schönheit 1993; Schröder et al. 1994; Selig et al. 1997).

Weitere Enzyme. Aktivitäten von Malat-Dehydrogenase, ATPase, Kohlenmonoxid-Dehydrogenase, Adenylat-Kinase und NADP : Ferredoxin-Oxidoreduktase wurden bestimmt wie bei Schäfer und Schönheit beschrieben (Schäfer und Schönheit 1991; Schäfer und Schönheit 1992; Schäfer und Schönheit 1993). Die Schlüsselenzyme eines klassischen oder modifizierten Entner-Doudoroff-Weges wurden gemessen wie bei Johnsen beschrieben (Johnsen et al. 2001).

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden mit einer modifizierten Methode nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). Es wurden 100 µl Probe und 900 µl Bradford-Reagenz (35 mg Serva blue G, 25 ml 96% Ethanol und 50 ml ortho-Phosphorsäure auf 500 ml A. bidest.) eingesetzt, gut gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm gemessen. Eine Proportionalität der Messwerte war bis zu einer Proteinmenge von 7 µg im Test gegeben. Die Eichung erfolgte mit einem Standard aus Rinderserum-Albumin Fraktion V (Merck, Darmstadt).

4.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese diente, neben der Reinheitskontrolle während der Proteinreinigung, der Bestimmung der apparenten molekularen Masse der Untereinheiten gereinigter Proteine. Die Elektrophorese erfolgte nach Laemmli in 12%-igen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (7 cm x 8 cm x 0.1 cm) in einer Mini Protean II Elektrophorese Zelle (Biorad, München). Trenn- und Sammelgel hatten folgende Zusammensetzung (Laemmli 1970):

	Trenngel (12%)	Sammelgel (3.75%)
30% Acrylamid 0.8% Bisacrylamid	1 ml	0.25 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	0.625 ml	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	-	0.3 ml
10% SDS	0.025 ml	0.05 ml
A. bidest.	0.818 ml	1.625 ml
10% Ammoniumpersulfat	12.5 µl	12.5 µl
TEMED	1.25 µl	2.5 µl

Die Proben wurden mit 5x Auftragspuffer (63 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% Glycerin, 0.05% Bromphenolblau) versetzt, 10 min bei 95°C inkubiert und in die Geltaschen pipettiert. Der Elektrophoresepuffer bestand aus 25 mM Tris mit 190 mM Glycin und 0.02% SDS (pH-Wert wie eingewogen). Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel erfolgte bei 70 V für 10 min. Die Trennung der Proteine über das Trenngel erfolgte bei 210 V für 60 min. Als Molekulargewichtsmarker dienten Standards von Biorad (München) oder PeqLab (Erlangen).

Färbung mit Coomassie. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine für mindestens 10 min in 25% Isopropanol und 10% Essigsäure im Gel fixiert und anschließend mit 0.03% Coomassie Brilliant Blue R250 in 10% Essigsäure gefärbt. Abschließend erfolgte die Entfernung von nicht-proteingebundenem Farbstoff mit 10% Essigsäure.

Silberfärbung. Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel in Fixierlösung (50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Ethanol in A. bidest) für mindestens eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde das Gel dreimal je eine Minute in 50% (v/v) Ethanol gewaschen und für eine Minute in Dinatriumthiosulfat (63 mg in 200 ml A. bidest) inkubiert. Es folgten dreimaliges Waschen mit A. bidest für je 20 s und 20 min Imprägnation (0.4 g Silbernitrat, 150 µl 37% (v/v) Formaldehyd in 200 ml A. bidest). An zwei erneute Waschschritte mit A. bidest schloss sich die Entwicklung (6 g Na₂CO₃, 1 mg Na₂S₂O₃ und 70 µl Formaldehyd in 100 ml A. bidest) an. Sobald die Proteinbanden die gewünschte Intensität hatten, wurde die Färbereaktion gestoppt, indem EDTA (3.27 g in 200 ml A. bidest) zugegeben wurde.

Zymogramm. Um die Aktivität der CGTase im Gel zu zeigen, wurde ein Zymogramm präpariert (Thiemann et al. 2004). Dazu wurden die Proben mit Auftragspuffer vermengt und ohne vorherige Hitzedenaturierung auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Lauf wurde das Gel für 30 min in 2.5% (w/v) Triton X-100 in Tris-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 8.5 mit 5 mM CaCl₂) inkubiert, gefolgt von einer 45-minütigen Inkubation in 1% Stärke in Tris-Puffer bei Raumtemperatur. CGTase-Aktivität wurde durch Inkubation des Gels für 30 min bei 60°C in Tris-Puffer bestimmt. Die verbliebene Stärke wurde durch Färbung mit Lugolscher Lösung gezeigt. Enzymaktivität zeigte sich durch helle Flecken um die Proteinbanden.

4.3.3 Blotten und N-terminale Aminosäuresequenzierung

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenzen wurden je 15 bis 20 µg Protein durch Blotten auf eine ImmobilonTM Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran (Millipore, Eschborn) übertragen. Die Proben wurden zuvor auf ein 12%-iges SDS-Polyacrylamidgel (4.3.2) aufgetragen. Als Laufpuffer diente 100 mM Tris-HCl pH 8.2 mit 100 mM Tricin und 0.1% SDS. Die Membran wurde vor dem Blotten in Methanol getaucht und die für das Blotten notwendigen Materialien (Membran, Gel, Adapter und Filterpapier) in Transferpuffer (50 mM Natriumborat pH 9.0 mit 20% Methanol und 0.02% SDS) äquilibriert. Es wurde eine Mini Trans-Blot Zelle (Biorad, München), betrieben mit einem PowerPac 1000 (Biorad, München), verwendet. Der Transfer des Proteins aus dem Gel auf die Membran erfolgte über 4 h bei konstant 35 V und 6 W. Anschließend wurde die Membran für 1 bis 2 min in 0.3% Coomassie Brilliant Blue R250 mit 50% Methanol und 10% Essigsäure gefärbt und in 50% Methanol mit 10% Essigsäure entfärbt. Die Sequenzierung erfolgte durch Herrn Dr. R. Schmid (Universität Osnabrück).

4.3.4 Apparentes Molekulargewicht von nativen Proteinen

Die apparenten molekularen Massen der gereinigten Proteine wurden unter nativen Bedingungen säulenchromatographisch mittels Ausschluss-Chromatographie an einer Superdex 200 HiLoad 16/60 (120 ml) (Pharmacia, Freiburg) bestimmt. Bei jedem Säulenlauf mit 0.1 M Tris-HCl pH 7.4 mit 150 mM NaCl und einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min betrug das Probenvolumen 1 ml. Als Molekulargewichtsstandards dienten Dextran Blue

(2000 kDa), β -Amylase (200 kDa), Alkohol Dehydrogenase (150 kDa), Rinderserum-Albumin (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Cytochrom c (12.4 kDa) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) oder der Molekulargewichtsstandard von Biorad (München) bestehend aus: Thyroglobulin (670 kDa), IgG (158 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Myoglobin (17 kDa) und B₁₂ (1.35 kDa).

4.3.5 Ultrafiltration

Ultrafiltrationen wurden mit Hilfe einer 100 ml oder 10 ml Ultrafiltrationszelle (Amicon, Beverly, USA) durchgeführt. Diese Methode diente dem Ankonzentrieren oder dem Umpuffern von Proteinlösungen während der Proteinreinigung. Zur Ultrafiltration konnten Filter (Sartorius, Göttingen) verschiedener Ausschlussgrößen eingesetzt werden. Die gewählte Ausschlussgröße lag jeweils unter der apparenten Größe der Untereinheiten der Proteine.

4.3.6 Reinigung von nativen Proteinen

Der Zellaufschluss erfolgte jeweils in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 mit 30 mM NaCl, 5 mM EDTA und 1 mM DTE unter aeroben Bedingungen mittels dreimaliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle (American Instrument Company, Silver Spring, Maryland, USA) bei 86 bar. Die erhaltenen Suspensionen wurden bei 100000 x g und 4°C für 90 min in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Die säulenchromatographischen Schritte wurden mit einer BioLogic Workstation (Biorad, München) und FPLC-Säulen von Pharmacia (Feiburg) und Biorad (München) durchgeführt. Die Elution der Proteine von den Säulen wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Zur Berechnung der spezifischen Aktivitäten wurde nach Ermittlung der Aktivität in den Fraktionen die Proteinkonzentration nach Bradford (4.3.1) bestimmt.

Im Folgenden werden die einzelnen Reinigungen beschrieben.

Cyclodextrin-Glucanotransferase (CGTase) wurde aus der Membranfraktion von 60 g Stärke-gewachsenen Feuchtzellen präpariert. Die Pellets nach Ultrazentrifugation wurden in 50 mM Natriumacetat pH 5.0 mit 0.1% SDS aufgenommen, bei 4°C für 30 min inkubiert und erneut einer Zentrifugation bei 100000 x g und 4°C für 90 min unterzogen. Der 100000 x g Überstand wurde auf 2 M Ammoniumsulfat in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 mit 1 mM DTE (Puffer A) eingestellt und auf eine 60 ml-Phenyl-Sepharose HiLoad Säule aufgetragen, die in 2 M Ammoniumsulfat in Puffer A äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einem Ammoniumsulfat-Gradienten von 2 bis 0 M in Puffer A eluiert. Die Fraktionen mit höchster CGTase-Aktivität wurden mittels Ultrafiltration (4.3.5, Ausschlussgröße 10 kDa) auf ein Volumen von 1 ml konzentriert. Diese Proteinlösung wurde auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 (120 ml) Gelfiltrations-Säule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 mit 150 mM NaCl und 1 mM DTE äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Fraktionen mit höchster CGTase-Aktivität wurden wiederum auf 2 M Ammoniumsulfat in Puffer A gebracht und auf eine 15 ml-Phenyl-Sepharose HiLoad Säule

aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Hilfe eines Gradienten 2 bis 0 M Ammoniumsulfat über 300 ml. Die Fraktionen mit den höchsten CGTase-Aktivitäten wurden nach Verdünnung mit 50 mM Tris-HCl pH 9.0 mit 1 mM DTE auf eine UNO Q1-Säule aufgetragen. Die Proteine wurden mit einem NaCl-Gradienten von 0-2 M NaCl in 50 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 1 mM DTE eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden auf 2 M Ammoniumsulfat in Puffer A eingestellt und auf eine RESOURCE Phe-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten mit einer Verminderung um je 5% Ammoniumsulfat für jeweils 1 ml auf 0 M Ammoniumsulfat. Die erhaltenen Fraktionen mit CGTase-Aktivität wurden mittels Ultrafiltration (4.3.5, Ausschlussgröße 10 kDa) auf ein Volumen von 0.5 ml konzentriert. Diese Proteinlösung wurde auf eine Bioprep SE 1000/17-Gelfiltrations-Säule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 mit 150 mM NaCl und 1 mM DTE äquilibriert war. Die Elution erfolgte mit einem Fluss von 0.5 ml/min. Die Fraktionen mit CGTase-Aktivität wurden auf 2 M Ammoniumsulfat in 50 mM BisTris pH 7.0 mit 1 mM DTE eingestellt und erneut auf eine RESOURCE Phe-Säule aufgetragen, die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten mit einer Verminderung um je 5% Ammoniumsulfat für jeweils 1 ml auf 0 M Ammoniumsulfat in 50 mM BisTris pH 7.0 mit 1 mM DTE. Fraktionen mit CGTase-Aktivität zeigten im SDS-Gel zwei Proteinbanden in annähernd gleichem Verhältnis. Diese partiell gereinigte CGTase wurde für die Messungen und die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz verwendet.

Cyclodextrinase (CDase) wurde aus 66 g Stärke-gewachsenen Feuchtzellen präpariert. Der 100000 x g Überstand wurde auf eine 430 ml-Q-Sepharose HiLoad Säule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 9.0 mit 1 mM DTE (Puffer B) äquilibriert war, um die CDase-Aktivität von der Phosphoglucomutase-Aktivität zu trennen. Die Proteine wurden mit einem NaCl-Gradienten von 0 bis 2 M in Puffer B eluiert. Die Fraktionen mit höchster CDase-Aktivität wurden in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 (Puffer C) verdünnt und auf eine 100 ml-DEAE-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem NaCl-Gradienten von 0-1 M in Puffer C. Die Fraktionen mit höchster CDase-Aktivität wurden mittels Ultrafiltration (4.3.5, Ausschlussgröße 10 kDa) auf ein Volumen von 1 ml konzentriert. Diese Proteinlösung wurde auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 (120 ml) Gelfiltrations-Säule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 mit 150 mM NaCl äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Fraktionen mit höchster CDase-Aktivität wurden mit 50 mM Natriumacetat pH 5.0 (Puffer D) verdünnt und auf eine UNO S1-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten von 0-1 M in Puffer D. Die Fraktionen mit der höchsten CDase-Aktivität wurden auf pH 8.0 mit Puffer C gebracht und auf eine UNO Q1-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten von 0-1 M in Puffer C. Die erhaltene Fraktion mit höchster CDase-Aktivität wurde auf eine Bioprep SE 1000/17-Gelfiltrations-Säule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 mit 150 mM NaCl äquilibriert war. Die Elution erfolgte mit einem Fluss von 0.5 ml/min. Apparent homogenes Protein mit CDase-Aktivität konnte ohne signifikanten Aktivitätsverlust über mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden.

Maltodextrin-Phosphorylase (Mal-P) wurde aus 40 g Stärke-gewachsenen Feuchtzellen präpariert. Der 100000 x g Überstand wurde auf pH 5.0 gebracht und auf eine 75 ml-SP-Sepharose HiLoad Säule aufgetragen, die in 50 mM Natriumacetat pH 5.0 (Puffer E) äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einem NaCl-Gradienten von 0 bis 2 M in 50 mM Tris-HCl pH 9.0 (Puffer F) eluiert. Die Fraktionen mit höchster Mal-P-Aktivität wurden auf pH 6.8 durch Verdünnung in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (Puffer G) und auf eine in Puffer F äquilibrierte 20 ml-Q-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Hilfe eines NaCl-Gradienten von 0-2 M in Puffer G. Die Fraktionen mit der höchsten Mal-P-Aktivität wurden auf 2 M Ammoniumsulfat in 50 mM Tris-HCl pH 7.0 (Puffer H) eingestellt und auf eine 20 ml-Phenyl-Sepharose HiLoad Säule aufgetragen, die in 2 M Ammoniumsulfat in Puffer H äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einem Ammoniumsulfat-Gradienten von 2 bis 0 M in Puffer H eluiert. Die Fraktionen mit höchster Mal-P-Aktivität wurden erneut auf 2 M Ammoniumsulfat in Puffer H eingestellt und auf eine RESOURCE Eth-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Ammoniumsulfat-Gradienten von 2 bis 0 M in Puffer H. Die erhaltene Fraktion mit höchster Mal-P-Aktivität wurde auf eine Bioprep SE 1000/17-Gelfiltrations-Säule aufgetragen, die in Puffer G mit 200 mM NaCl äquilibriert war. Die Elution erfolgte mit einem Fluss von 0.5 ml/min. Apparent homogenes Protein mit Mal-P-Aktivität konnte ohne signifikanten Aktivitätsverlust über mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden, Lagerung bei -20°C führte zu einem Aktivitätsverlust.

Phosphoglucomutase (PGluM) wurde aus 66 g Stärke-gewachsenen Feuchtzellen präpariert. Der 100000 x g Überstand wurde auf eine 430 ml-Q-Sepharose HiLoad Säule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 9.0 mit 1 mM DTE (Puffer I) äquilibriert war, um die PGluM-Aktivität von der CDase-Aktivität zu trennen. Die Proteine wurden mit einem NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M in Puffer I eluiert. Die Fraktionen mit höchster PGluM-Aktivität wurden auf 2 M Ammoniumsulfat in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 mit 1 mM DTE (Puffer J) eingestellt und auf eine 15 ml-Phenyl-Sepharose HiLoad Säule aufgetragen, die in 2 M Ammoniumsulfat in Puffer J äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einem Ammoniumsulfat-Gradienten von 2 bis 0 M in Puffer J eluiert. Die Fraktionen mit höchster PGluM-Aktivität wurden erneut auf 2 M Ammoniumsulfat in Puffer J eingestellt und auf eine RESOURCE Eth-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Ammoniumsulfatgradienten von 2 bis 0 M in Puffer J. Die erhaltene Fraktion mit höchster PGluM-Aktivität wurde auf eine Bioprep Se 1000/17-Gelfiltrations-Säule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 mit 150 mM NaCl und 1 mM DTE äquilibriert war. Die Elution erfolgte mit einem Fluss von 0.5 ml/min. Die Fraktionen mit höchster PGluM-Aktivität wurden mit Puffer J auf pH 8.0 eingestellt und auf eine UNO Q1-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M in Puffer J. Apparent homogenes Protein mit PGluM-Aktivität eluierte bei 0.1 M NaCl und konnte ohne signifikanten Aktivitätsverlust über mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden.

ADP-Glucokinase (ADP-GLK) wurde aus 30 g Stärke-gewachsenen Feuchtzellen präpariert. Alle Puffer für chromatographische Schritte enthielten 1 mM DTE. Der 100000 x g Überstand

wurde auf eine 430 ml-Q-Sepharose HiLoad Säule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 9.0 mit 1 mM DTE (Puffer K) äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 3 ml/min und einem pH-Gradienten von pH 8.0 (in Puffer K) bis pH 5.5 in 50 mM Piperazin pH 5.5 mit 1 mM DTE (Puffer L), gefolgt von einem Salzgradienten von 0 bis 2 M NaCl in Puffer L eluiert. Die Fraktionen mit höchster ADP-GLK Aktivität wurden auf 2 M Ammoniumsulfat in Puffer K, pH 7.0 eingestellt und auf eine 15 ml-Phenyl-Sepharose-Säule, äquilibriert in Puffer K mit 2 M Ammoniumsulfat, aufgetragen. Protein wurde mit einem fallenden Ammoniumsulfat-Gradienten (300 ml) von 2 nach 0 M eluiert. Die ADP-GLK-Aktivität eluierte zwischen 0.6 und 0.5 M Ammoniumsulfat und wurde mittels Ultrafiltration (Ausschlussgröße 30 kDa) auf ein Volumen von 1 ml konzentriert. Diese Proteinlösung wurde auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrations-Säule aufgetragen, die in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.8 (Puffer M) mit 0.15 mM NaCl und 1 mM DTE äquilibriert war, Elution erfolgte mit einer Flussrate von 1 ml/min. Die Fraktionen mit höchster ADP-GLK-Aktivität wurden mit A. bidest. auf 5 mM Puffer M verdünnt und auf eine 5 ml-Hydroxylapatit-Säule aufgetragen. Protein wurde mit einem steigenden Phosphatgradienten (0-500 mM) eluiert. Die Fraktionen mit ADP-GLK-Aktivität wurden auf 10 mM Puffer M eingestellt und auf eine Uno Q1-Säule aufgetragen. Protein wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 2 M in Puffer M eluiert. Die erhaltene ADP-GLK-Aktivität wurde auf 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt und auf eine RESOURCE Iso-Säule (1 ml), die in 2 M Ammoniumsulfat äquilibriert wurde, aufgetragen. Protein wurde mit einem fallenden, 20 ml Ammoniumsulfat-Gradienten von 2 bis 0 M eluiert. Apparent homogenes Protein mit ADP-GLK-Aktivität konnte ohne signifikanten Aktivitätsverlust über mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden.

4.3.7 Reinigung von rekombinanten Proteinen aus geothermalen Habitaten

Gene von Proteinen der GH-13-Familie wurden mit Hilfe der CODEHOP-Strategie durch die Arbeitsgruppe Kristjansson (Prokaria, Reykjavik, Island) isoliert und von der Arbeitsgruppe Holst (Lund, Schweden) in verschiedene Vektoren kloniert. Die transformierten *E. coli*-Stämme (Amy1, Amy29, Amy92, Amy98 und Amy132) bzw. partiell gereinigtes Protein (Amy89 und Amy90) wurden von diesen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die entsprechenden Proteine. Die allgemeinen Bedingungen für die Reinigung dieser Proteine entsprachen denen der nativ gereinigten Proteine (4.3.6). Die für den Zellaufschluss verwendeten Puffer und Modifikationen in der Vorgehensweise sind angeben.

Tabelle 1 Übersicht über Namen und putative Funktion von rekombinanten Stärke-modifizierenden Enzymen aus geothermalen Habitaten. Die Vorarbeiten wurden durch die Arbeitsgruppen Kristjansson (Prokaria, Reykjavik, Island) und Holst (Lund, Schweden) durchgeführt. Die eigenen Arbeiten sind in der letzten Spalte dargestellt.

Protein	Putative Funktion	Ausgangsmaterial für diese Arbeit	Eigene Arbeiten
Amy1	Cyclodextrinase	<i>E. coli</i> -Pellet nach Expression	Reinigung, Charakterisierung
Amy29	Neopullulanase	<i>E. coli</i> Top10 mit Vector pBTac1	Plasmid-Präparation, Transformation, Expression, Reinigung, Charakterisierung
Amy89	Maltogene Amylase	Partiell gereinigtes Protein	Charakterisierung
Amy90	Pullulanase	Partiell gereinigtes Protein	Charakterisierung
Amy92	Neopullulanase	<i>E. coli</i> -Pellet nach Expression	Reinigung, Charakterisierung
Amy98	Maltogene Amylase	<i>E. coli</i> TOP10 mit Vektor pET22b	Expression, Reinigung, Charakterisierung
Amy132	Neopullulanase	<i>E. coli</i> TOP10 mit Vektor pJOE3057	Plasmid-Präparation, Transformation, Expression, Reinigung, Charakterisierung

Amy1

Bei *Amy1* handelt es sich um eine putative Cyclodextrinase (CDase), deren Gen 77% Ähnlichkeit zum Gen einer CDase aus *Alicyclobacter acidocaldarius* hat. Die Aktivität wurde daher als Linearisierung von α -Cyclodextrin bestimmt, in dem die entstehenden reduzierenden Zucker mit Hilfe des DNS-Assays (4.6) quantifiziert wurden. Der Standard-Testansatz bei 55°C enthielt: 50 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 1 mM DTE und 1 mM CaCl₂, 0.5% α -Cyclodextrin und Protein.

Das Enzym wurde durch die Arbeitsgruppe Holst in pET32a mit einem N-terminalen His-Tag kloniert und in den *E. coli*-Stamm Origami (DE3)pLys transformiert und exprimiert. Diese *E. coli*-Zellen wurden zur Reinigung des überexprimierten Proteins bereitgestellt. Diese wurden in 50 mM Tris-HCl pH 8.2 mit 0.3 M NaCl und 4 mM Imidazol (Puffer A) suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels 5-maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 48000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für 30 min bei 50°C inkubiert und die hitzepräzipitierten Proteine pelletiert (48000 x g, 4°C, 30 min). Der Überstand wurde auf eine 7 ml-Ni-NTA-Säule aufgetragen, die in Puffer A äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einem steigenden Imidazol-Gradienten von 4 bis 500 mM bei einer Flussrate von 1.5 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten CDase-Aktivität wurden mittels Ultrafiltration (4.3.5) auf ein Volumen von 1.5 ml (Ausschlussgröße: 50 kDa) eingengt. Die Proteinlösung wurde auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrations-Säule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 150 mM NaCl und 1 mM DTE äquilibriert war. Protein wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten CDase-Aktivität enthielten apparent

homogenes Protein, das bei -20°C ohne Aktivitätsverlust über Monate gelagert werden konnte. Ein Enterokinase-Verdau wurde durchgeführt (4.3.8).

Amy29

Bei Amy29 handelt es sich um eine putative Neopullulanase (NPase), deren Gen 56% Ähnlichkeit zum Gen einer NPase aus *Synechocystis sp.* hat. Die Aktivität wurde daher als Abbau von Pullulan bestimmt, in dem die entstehenden reduzierenden Zucker mit Hilfe des DNS-Assays (4.6) gemessen wurden. Der Standard-Testansatz bei 55°C enthielt 50 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 1 mM DTE und 10 mM CaCl_2 , 0.5% Pullulan und Protein.

Das Protein wurde durch die Arbeitsgruppe Holst (Lund, Schweden) ohne Reinigungs-Tag in den Vector pBTac1 kloniert und in *E. coli* TOP10 transformiert. Nach Isolierung des Plasmids wurde dieses in *E. coli* BL21(DE3)-RIL codon plus transformiert und das Protein exprimiert. Das Pellet nach Ernte der Zellen wurde in 50 mM Natriumacetat pH 5.8 suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels 5-maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei $48000 \times g$ bei 4°C für 30 min zentrifugiert und der Überstand für 60 min bei 45°C inkubiert. Die hitzepräzipitierten Proteine wurden pelletiert ($48000 \times g$, 4°C , 30 min). Dem folgte ein zweiter Hitzeschritt bei 55°C für 1 h mit anschließender Zentrifugation. Der Überstand wurde mit Tris-HCl pH 9.0 (Puffer B) verdünnt und auf eine 150 ml-DEAE-Säule aufgetragen, die in Puffer B äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einem steigenden NaCl-Gradienten von 0 bis 2 M in 50 mM Natriumacetat pH 5.5 (Puffer C) eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten NPase-Aktivität wurden auf eine 1 ml SP-HiTrap-Säule aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem NaCl-Gradienten von 0 bis 2 M in Puffer B. Die Fraktionen mit höchster NPase-Aktivität wurden mittels Ultrafiltration (4.3.5) auf ein Volumen von 0.5 ml (Ausschlussgröße: 30 kDa) eingengt. Die Proteinlösung wurde auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrations-Säule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 150 mM NaCl und 1 mM DTE sowie 10 mM CaCl_2 äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten NPase-Aktivität enthielten apparent homogenes Protein, das bei -20°C ohne Aktivitätsverlust über Monate gelagert werden konnte.

Amy89 und Amy90

Bei Amy89 handelt es sich um eine putative maltogene Amylase (MA). Bei Amy90 handelt es sich um eine putative Pullulanase. Die Gene beider Proteine wurden aus *Bacillus thermoleovorans* r805 aus der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Kristjansson isoliert. Die Gene wurden in pET32a mit einem N-terminalen Trx-Tag, His-Tag und S-Tag kloniert und in den *E. coli*-Stamm Origami (DE3)pLys transformiert und dort exprimiert. Die Proteine wurden an 1 ml-HisTrap-Säulen gereinigt und wurden durch die Arbeitsgruppe Kristjansson zur detaillierten Untersuchung bereitgestellt. Ein Enterokinase-Verdau wurde durchgeführt, um die N-terminalen Tags zu entfernen (4.3.8).

Amy92

Bei Amy92 handelt es sich um eine putative Neopullulanase (NPase), deren Gen 65% Ähnlichkeit zum Gen einer NPase aus *Thermoactinomyces vulgaris* hat. Die Aktivität wurde daher als Abbau von Pullulan bestimmt, in dem die entstehenden reduzierenden Zucker mit Hilfe des DNS-Assays (4.6) gemessen wurden. Der Standard-Testansatz bei 55°C enthielt 50 mM Natriumacetat pH 5.7 mit 50 mM NaCl, 0.5% Pullulan und Protein.

Das Enzym wurde durch die Arbeitsgruppe Holst (Lund, Schweden) in pET22b mit einem N-terminalen His-Tag kloniert und in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) transformiert und dort exprimiert. Das Pellet nach Ernte der Zellen (20 g) wurde durch die Arbeitsgruppe Holst zur Verfügung gestellt und wurde in 20 mM Tris-HCl pH 7.5 suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels 3-mal 2 min Ultraschall (60% Output, Duty cycle 0.5). Diese Suspension wurde bei 13000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Cu²⁺-NTA-Säule aufgetragen, die mit 20 mM Imidazol in 50 mM Natriumphosphatpuffer mit 0.75 M NaCl (Puffer D) äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einem steigenden Imidazol-Gradienten von 20 bis 500 mM in Puffer D eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten NPase-Aktivität wurden gegen 50 mM Natriumacetat pH 5.7 mit 50 mM NaCl dialysiert. Anschließend wurde eine Hitzefällung bei 50°C für 30 min durchgeführt und die hitzepräzipitierten Proteine durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand wurde auf eine UNO Q1-Säule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 9.0 äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einem NaCl-Gradienten von 0-2 M in 50 mM Piperazin pH 5.5 mit 1 mM CaCl₂ eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten NPase-Aktivität enthielten apparent homogenes Protein, das bei -20°C ohne Aktivitätsverlust über Monate gelagert werden konnte.

Amy98

Bei Amy98 handelt es sich um eine putative maltogene Amylase (MA), deren Gen 74% Ähnlichkeit zum Gen einer MA aus *Bacillus stearothermophilus* hat. Die Aktivität wurde daher als Abbau von Stärke bestimmt, in dem die entstehenden reduzierenden Zucker mit Hilfe des DNS-Assays (4.6) gemessen wurden bzw. in dem die Abnahme der Stärkekonzentration mit Hilfe des Iod-Tests (4.6) bestimmt wurde. Der Standard-Testansatz bei 55°C enthielt 50 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 5 mM CaCl₂, 0.5% Stärke und Protein.

Das Enzym wurde durch die Arbeitsgruppe Holst (Lund, Schweden) in pET22b mit einem N-terminalen His-Tag kloniert und stand zur Expression im *E. coli* Stamm BL21(DE3) und Untersuchung bereit. Das Pellet nach Ernte der Zellen (25 g) wurde durch die Arbeitsgruppe Holst zur Verfügung gestellt und wurde in 50 mM Tris-HCl pH 8.2 mit 0.3 M NaCl und 4 mM Imidazol (Puffer E) suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels 5-maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 48000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für 30 min bei 50°C inkubiert und die hitzepräzipitierten Proteine pelletiert (48000 x g, 4°C, 30 min). Ein zweiter Hitzeschritt für 60 min und anschließende Zentrifugation schlossen sich an. Der Überstand wurde auf eine Ni-NTA Säule (7 ml) aufgetragen, die in Puffer E äquilibriert

war. Die Proteine wurden mit einem steigenden Imidazol-Gradienten von 4 bis 500 mM eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten MA-Aktivität wurden mittels Ultrafiltration (4.3.5) auf ein Volumen von 1.5 ml (Ausschlussgröße: 50 kDa) eingengt. Die Proteinlösung wurde auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrations-Säule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 150 mM NaCl und 1 mM DTE äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten MA-Aktivität wurden mit 50 mM Tris-HCl pH 9.0 auf pH 9.0 eingestellt und auf eine UNO Q1-Säule aufgetragen, die in diesem Puffer äquilibriert wurde. Die Proteine wurden mit einem steigenden NaCl-Gradienten von 0 bis 2 M in 50 mM Natriumacetat pH 5.8 eluiert. Die Fraktionen mit MA-Aktivität enthielten apparent homogenes Protein, das bei -20°C ohne Aktivitätsverlust über Monate gelagert werden konnte.

Amy132

Bei Amy132 handelt es sich um eine putative Neopullulanase (NPase), deren Gen 79% Ähnlichkeit zum Gen einer NPase aus *Bacillus stearothermophilus* hat. Die Aktivität wurde daher als Abbau von Pullulan bestimmt, in dem die entstehenden reduzierenden Zucker mit Hilfe des DNS-Assays (4.6) gemessen wurden. Der Standard-Testansatz bei 55°C enthielt 50 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 1 mM DTE und 1 mM CaCl_2 , 0.5% Pullulan und Protein.

Das Enzym wurde durch die Arbeitsgruppe Kristjansson in pJOE3075 kloniert und stand zur weiteren Bearbeitung bereit. Nach Isolierung des Plasmid wurde dieses in *E. coli* BL21(DE3)-RIL codon plus transformiert und das Protein dort exprimiert. Das Pellet nach Ernte der Zellen wurde in 50 mM Piperazin pH 6 mit 0.3 M NaCl und 1 mM CaCl_2 (Puffer F) suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels 5-maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei $48000 \times g$ und 10°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für 30 min bei 50°C inkubiert und die hitzepräzipitierten Proteine pelletiert ($48000 \times g$, 10°C , 30 min). Der Überstand wurde mit 50 mM Tris-HCl pH 9.0 (Puffer G) auf pH 9.0 gebracht und auf eine 20 ml-Q-Sepharose HiLoad Säule aufgetragen, die in Puffer G äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einem steigenden NaCl-Gradienten von 0 bis 2 M in 50 mM Natriumacetat pH 5.8 eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten NPase-Aktivität wurden mittels Ultrafiltration (4.3.5) auf ein Volumen von 2 ml (Ausschlussgröße: 50 kDa) eingengt. Die Proteinlösung wurde auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrations-Säule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 150 mM NaCl äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten NPase-Aktivität wurden mit Puffer G mit 1 mM DTE auf pH 9.0 eingestellt und auf eine UNO Q1-Säule aufgetragen, die in diesem Puffer äquilibriert wurde. Die Proteine wurden mit einem steigenden NaCl-Gradienten von 0 bis 2 M in 50 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 1 mM DTE eluiert. Die Fraktionen mit NPase-Aktivität enthielten apparent homogenes Protein, das bei -20°C ohne Aktivitätsverlust über Monate gelagert werden konnte.

4.3.8 Enterokinase-Verdau

Zur Entfernung von His-Tags von Proteinen mittels Enterokinase wurde folgender Ansatz verwendet: 2.5 mg Protein, 50 μ l 50 mM CaCl_2 , 172.5 μ l 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2.5 μ l Enterokinase (1 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH 8.0). Es wurde für 24 h bei 37°C inkubiert. Eine Kontrolle ohne Enterokinase diente als Vergleich. Der Erfolg des Verdau wurde mittels SDS-Gelelektrophorese (4.3.2) überprüft.

4.4 Charakterisierung von gereinigten Enzymen

Zur Charakterisierung der Enzyme gehörten die Bestimmung der kinetischen Parameter, des Temperaturoptimums, der Thermostabilität und des pH-Optimums. Außerdem wurde der Einfluss verschiedener Kationen auf die Aktivität und die Substratspezifität bestimmt. Die Bildung von Produkten wurde untersucht. Da die Enzymaktivität aller Enzyme nicht sauerstoffempfindlich war, wurden alle Experimente unter aeroben Bedingungen durchgeführt.

Die kinetischen Parameter wurden jeweils aus der Darstellung der Daten nach Lineweaver-Burk ermittelt. Die Bestimmung der Temperaturstabilität erfolgte durch Inkubation in geschlossenen Gefäßen für 120 min. Nach der Inkubation wurden die Inkubationsgefäße jeweils für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend die Restaktivität unter Standardbedingungen bestimmt.

4.4.1 Enzyme des Stärkeabbaus zu Glucose-6-Phosphat aus *A. fulgidus* Stamm 7324

Cyclodextrin-Glucanotransferase

CGTase-Aktivität (Stärke \rightarrow Cyclodextrine) wurde bei 80°C als Abnahme von Stärke mit Hilfe des Iod-Test bestimmt (4.6). Der 200 μ l-Testansatz enthielt 0.5% lösliche Stärke in 50 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 1 mM CaCl_2 und 1 mM DTE sowie Protein. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen pH 4.0 und pH 8.0 getestet. Die Ansätze enthielten entweder jeweils 100 mM Natriumacetat (pH 4.0 bis pH 6) oder 50 mM Kaliumphosphatpuffer (KPP, pH 6.0 bis pH 8.0) jeweils mit 1 mM DTE und 1 mM CaCl_2 . Die Temperaturabhängigkeit der CGTase wurde zwischen 20°C und 90°C in 50 mM KPP pH 7.0 mit 1 mM DTE und 1 mM CaCl_2 getestet. Der Einfluss von CaCl_2 (1-5 mM) und NaCl (0.2-2 M) auf die Aktivität der CGTase wurde bei 80°C in 50 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 1 mM DTE getestet.

Die Bildung der Produkte α - und β -Cyclodextrin wurde mit Hilfe des Methylrot- bzw. Phenolphthalein-Tests (4.6) bestimmt. Der Standard-Testansatz wurde dazu für 18 h bei 60°C inkubiert. danach wurden Aliquots entnommen und in die Analyse eingesetzt.

Cyclodextrinase

CDase-Aktivität (Cyclodextrin \rightarrow Maltooligodextrin) wurde als Freisetzung reduzierender Zucker aus α -, β - oder γ -Cyclodextrin bei 80°C mit Hilfe des DNS-Assay bestimmt (4.6). Der bei 80°C inkubierte Testansatz (200 μ l) enthielt 0.5% α -Cyclodextrin in 50 mM Natriumacetat pH 4.5 sowie Extrakt. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen pH 4.0 und pH 7.0 in 100 mM Natriumacetat getestet. Die Temperaturabhängigkeit der CDase wurde zwischen 20°C und 90°C in 50 mM Natriumacetat pH 4.5 getestet. Zur Bestimmung der Temperaturstabilität der CDase wurde gereinigtes Protein zwischen 80°C und 90°C inkubiert. Die Testansätze enthielten: 1 μ g Protein in 20 μ l 100 mM Natriumacetat pH 4.5.

Der Einfluss verschiedener zweiwertiger Kationen wurde unter Standardbedingungen getestet, nachdem das Protein in 20 mM EDTA für 30 min vorinkubiert wurde. Die Kationen wurden in Konzentrationen von 0.1-10 mM eingesetzt.

Die Produktbildung aus den verschiedenen Cyclodextrinen wurde mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Der Inkubationsansatz enthielt je 1.25% Cyclodextrin, 50 mM Natriumacetat pH 4.5 sowie Protein. Der Ansatz wurde für verschiedene Zeiten (30 min-18 h) bei 80°C inkubiert. Je Ansatz wurden 5 μ l auf die Dünnschichtplatte aufgetragen (4.6).

Maltodextrin-Phosphorylase

Mal-P-Aktivität ((Glucose)_n + P_i \rightarrow (Glucose)_{n-1} + Glucose-1-Phosphat) wurde bei 80°C als phosphatabhängige Umsetzung von Maltoheptaose zu Glucose-1-Phosphat gemessen, in dem dieses weiter zu Glucose-6-Phosphat umgesetzt wurde. Mit Hilfe der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase wurde diese Reaktion mit der Reduktion von NADP⁺ gekoppelt. Der diskontinuierliche Testansatz enthielt 50 mM KPP pH 6.8, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM Maltoheptaose und Protein, die Detektionslösung 50 mM KPP pH 6.8, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺, 2 U Phosphoglucomutase und 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Nach Inkubation bei 80°C wurden die Proben auf Eis gekühlt, eiskalte Detektionslösung zugegeben und bei Raumtemperatur bis zum Ablauf der Reaktion inkubiert. Zur Bestimmung der Substratspezifität wurde Maltoheptaose durch verschiedene Maltooligo- und Polysaccharide in Konzentrationen von 1-50 mM ersetzt. Zur Untersuchung der Spezifität für den Phosphoryldonor wurde anorganisches Phosphat durch Pyrophosphat, Glucose-6-Phosphat, AMP, ADP, ATP und Pyridoxalphosphat in Konzentrationen von 0.1-10 mM ersetzt. Die Umsetzung von Glucose-1- oder Glucose-6-Phosphat zu Maltooligosacchariden wurde mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie untersucht. Die Reaktionsansätze enthielten 20 mM Glucose-1-Phosphat oder Glucose-6-Phosphat, 50 mM MES pH 5.8, 2.5 mM MgCl₂ sowie Protein.

Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen pH 4.0 und pH 8.0 in jeweils 100 mM Natriumacetat (pH 4.0 bis pH 5.0), Piperazin

(pH 5 bis pH 7.5), Triethanolamin (pH 7.5 bis pH 8.5) oder HEPES (pH 8.5 bis pH 9.0) getestet. Die Temperaturabhängigkeit der Mal-P wurde zwischen 25°C und 90°C in 50 mM KPP pH 5.8 getestet. Zur Bestimmung der Temperaturstabilität der Mal-P wurde gereinigtes Protein bei Temperaturen zwischen 80°C und 95°C für 120 min inkubiert. Die Testansätze enthielten: 1 µg Protein in 20 µl 100 mM KPP pH 5.8.

Die folgenden klassischen Effektoren von α -Glucanphosphorylasen wurden bei 80°C im Konzentrationsbereich zwischen 10 µM und 5 mM getestet: AMP, ADP, ATP, Glucose, α -Cyclodextrin, β -Cyclodextrin, Ammoniumsulfat, Natriumsulfat, Natriumvanadat, Natriummolybdat.

Das Coenzym Pyridoxalphosphat wurde mit Hilfe eines Proteinspektrums in 50 mM KPP pH 5.8 mit 200 mM NaCl nachgewiesen. Die Quantifizierung wurde des Pyridoxalphosphats wurde durch die Umsetzung mit Phenylhydrazinhydrochlorid vorgenommen (Wada und Snell 1961): Dazu wurden 50 µl pyridoxalphosphathaltiger Probe (bis 30 µM Pyridoxalphosphat) mit 950 µl Phenylhydrazinhydrochlorid (2% in 10 N H₂SO₄) versetzt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 410 nm bestimmt. Die Eichung erfolgte mit käuflichem Pyridoxalphosphat.

Phosphoglucomutase

PGluM-Aktivität (Glucose-1-Phosphat \rightleftharpoons Glucose-6-Phosphat) wurde bei 50°C im kontinuierlichen Ansatz als Bildung von Glucose-6-Phosphat in Anwesenheit von Glucose-1,6-Bisphosphat bestimmt. Diese Reaktion wurde mit der Reduktion von NADP⁺ mit Hilfe der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase gekoppelt. Der Testansatz enthielt: 50 mM HEPES pH 8.2, 1 mM DTE, 10 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺, 1 mM Glucose-1-Phosphat, 0.125 mM Glucose-1,6-Bisphosphat, 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Protein. Für höhere Temperaturen wurde ein diskontinuierlicher Test verwendet. Die Inkubationslösung enthielt 50 mM HEPES pH 8.2, 1 mM DTE, 5 mM MgCl₂, 10 mM Glucose-1-Phosphat, 0.125 mM Glucose-1,6-Bisphosphat und Protein. Nach Inkubation wurden die Proben auf Eis gekühlt und eiskalte Detektionslösung hinzugegeben (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 1 mM NADP⁺) und bis zum vollständigen Ablauf der Reaktion inkubiert. Die Reaktion von Glucose-6-Phosphat zu Glucose-1-Phosphat bzw. die Umsetzung von Mannose-6-Phosphat wurde mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie untersucht. Der Testansatz bei 80°C enthielt 50 mM HEPES pH 8.2, 5 mM MgCl₂, 0.125 mM Glucose-1,6-Bisphosphat sowie 5 oder 10 mM Glucose-6-Phosphat bzw. Mannose-6-Phosphat. Nach Inkubation für 15-90 min bei 80°C wurden jeweils Aliquots entnommen und davon 2-5 µl auf Dünnschichtplatten aufgetragen.

Die Aktivierung der PGluM-Aktivität durch Zusatz von 5-20 mM Cystein, Imidazol oder Histidin wurde im Standardansatz bei 50°C untersucht. Dazu wurde das Protein mit der entsprechenden Menge des Zusatzes für 20 min in Anwesenheit von MgCl₂ bei 50°C inkubiert und anschließend die Aktivität bestimmt.

Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde bei 50°C zwischen pH 4.0 und pH 9.0 in jeweils 100 mM Natriumacetat (pH 4.0 bis pH 6.0), Triethanolamin (pH 6.0 bis pH 8.0) und Tris-HCl (pH 8.0 bis pH 9.0) getestet. Die Temperaturabhängigkeit der PGluM wurde zwischen 35°C und 90°C in 100 mM HEPES pH 8.2 im diskontinuierlichen Test getestet. Zur Bestimmung der Temperaturstabilität der PGluM wurde gereinigtes Protein bei 80°C in An- oder Abwesenheit von MgCl₂ inkubiert. Die Testansätze enthielten: 10 µg Protein in 50 µl 100 mM HEPES pH 8.2.

Die Hemmung der Aktivität des gereinigten Enzyms durch Vanadat wurde bei 50°C durch Zugabe von 0-100 µM Natriumvanadat getestet. Durch die Zugabe von 1-50 mM EDTA wurde getestet, ob die Hemmung aufhebbar war.

4.4.2 ADP-abhängige Glucokinase

ADP-GLK-Aktivität (E.C.2.7.1.2) ($\text{Glucose} + \text{ADP} \rightarrow \text{Glucose-6-Phosphat} + \text{AMP}$) wurde bei 50°C durch Kopplung der ADP- und Glucose-abhängigen Bildung von Glucose-6-Phosphat mit der Reduktion von NADP⁺ über die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase bei 365 nm bestimmt. Das optimale ADP/MgCl₂-Verhältnis von 1:2 wurde für alle kinetischen Bestimmungen verwendet. Der Testansatz enthielt 50 mM Triethanolamin pH 7.6, 10 mM Glucose, 2 mM ADP, 4 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺ und 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Für Messungen über 55°C wurde ein diskontinuierlicher Test verwendet. Der Testansatz enthielt 50 mM Triethanolamin pH 7.6 (der pH-Wert wurde jeweils auf die entsprechende Temperatur eingestellt), 4 mM MgCl₂, 2 mM ADP, 10 mM Glucose und Protein. Nach der Inkubation wurden die Inkubationsgefäße auf Eis gekühlt und anschließend die Glucose-6-Phosphat-Menge bei 37°C im kontinuierlichen Testsystem als NADP⁺-Reduktion in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 mit 1 mM NADP⁺ und 0.5 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Dieses Testsystem wurde verwendet, um die Temperaturabhängigkeit der Aktivität und die Spezifität für Nukleotide und Kationen bei 80°C zu bestimmen. Die Kationenspezifität wurde unter Standardbedingungen im diskontinuierlichen Testsystem bei 80°C getestet, indem Mg²⁺ durch jeweils die gleiche Konzentration an Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ oder Ni²⁺ ersetzt wurde. Die Nukleotidspezifität wurde unter Standardbedingungen im diskontinuierlichen Testsystem bei 80°C getestet, indem ADP durch die jeweils gleiche Konzentration an alternativen Phosphoryldonoren (ATP, AMP, UDP, GDP, CDP, Acetylphosphat oder PP_i) ersetzt wurde.

Für die Bestimmung der Zuckerspezifität wurde der Verbrauch von ADP bei 80°C in einem diskontinuierlichen Test bestimmt. Nach der Inkubation in 50 mM Triethanolamin pH 7.6 mit 4 mM MgCl₂, 2 mM ADP und 0.1-100 mM der verschiedenen Zucker wurden die Inkubationsgefäße auf Eis gekühlt und anschließend bei 37°C die NADH-Oxidation in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 mit 5 mM PEP, 0.3 mM NADH, 1.5 U Laktat-Dehydrogenase und 2 U Pyruvat-Kinase beobachtet. Glucose wurde durch folgende Zucker ersetzt: Fructose, Mannose, Galactose, 2-Desoxyglucose, Glucosamin, Ribose und Xylose. Für die Verwendung von Fructose-6-Phosphat als alternatives Substrat (ADP-PFK-Aktivität) wurde die Aktivität

durch Kopplung der Fructose-1,6-Bisphosphat-Bildung mit der NADH-Oxidation bei 55°C in 50 mM Triethanolamin pH 7.6 mit 5 mM Fructose-6-Phosphat, 2 mM ADP, 4 mM MgCl₂, 0.3 mM NADH, 3 U Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase, 4 U Triosephosphat-Isomerase und 1 U Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase bestimmt.

Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der ADP-GLK vom pH-Wert wurde zwischen 3.0 und 10.0 bei 55°C im kontinuierlichen Testsystem mit entweder Zitronensäure (pH 3.0-4.0), Acetat (pH 4.0-5.5), Piperazin (pH 5.5-6.5 und pH 8.5-9.5) oder HEPES (pH 6.5-8.5) (jeweils 100 mM) getestet.

Der Einfluss der Temperatur auf die Enzymaktivität wurde im kontinuierlichen und diskontinuierlichen Testsystem zwischen 25°C und 95°C getestet. Zur Bestimmung der Temperaturstabilität des gereinigten Enzyms wurde jeweils gereinigtes Protein (1.75 µg in 150 µl Triethanolamin pH 7.6) mit oder ohne potentiell stabilisierende Substanzen bei Temperaturen zwischen 80°C und 100°C bis zu 120 min inkubiert.

4.4.3 Stärkeabbauende Enzyme aus heißen isländischen Quellen

Amy1: putative Cyclodextrinase

Cyclodextrinase-Aktivität (Cyclodextrin → Maltooligodextrin) wurde als Freisetzung reduzierender Zucker aus α-, β- oder γ-Cyclodextrin mit Hilfe des DNS-Assay bestimmt (4.6). Der bei 55°C inkubierte Testansatz (200 µl) enthielt 0.5% α-Cyclodextrin in 50 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 1 mM DTE und 1 mM CaCl₂ sowie Protein. Die Hydrolyse-Aktivität von Amy1 wurde mit verschiedenen Maltooligo- und Polysacchariden in Konzentrationen von 0.05-1% getestet. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen pH 4.0 und pH 8.0 in 100 mM Natriumacetat (pH 4.0-pH 6.5) und 100 mM KPP (pH 6.5- pH 8.0) getestet. Die Temperaturabhängigkeit von Amy1 wurde zwischen 20°C und 70°C in 50 mM Natriumacetat pH 6 getestet. Zur Bestimmung der Temperaturstabilität wurde gereinigtes Protein bei Temperaturen zwischen 55°C und 65°C inkubiert. Die Testansätze enthielten: 5 µg Protein in 60 µl 100 mM Natriumacetat pH 6.0 mit 1 mM DTE mit oder ohne 1 mM CaCl₂.

Der Einfluss verschiedener zweiwertiger Kationen wurde unter Standardbedingungen getestet, nachdem das Protein gegen 20 mM EDTA in 50 mM Natriumacetat pH 6 mit 1 mM DTE für 24 h dialysiert worden war, gefolgt von einer Dialyse gegen 50 mM Natriumacetat pH 6 mit 1 mM DTE. Die Kationen wurden in Konzentrationen von 0.1-10 mM eingesetzt.

Die Produktbildung aus den verschiedenen Substraten wurde mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Der Inkubationsansatz enthielt je 0.5% Substrat, 50 mM Natriumacetat pH 6 mit 1 mM DTE und 1 mM CaCl₂ sowie Protein. Der Ansatz wurde für verschiedene Zeiten (bis 60 min) bei 55°C inkubiert. Je Ansatz wurden 2 und 5 µl auf die Dünnschichtplatte aufgetragen (4.6).

Transglycosylierungs-Aktivität wurde mit Kombinationen aus Glucose, Maltose und Maltotriose (je einzeln, in Kombination von je zwei Zuckern oder alle drei Zucker) als Substrat untersucht. Die Testansätze enthielten 50 mM Natriumacetat pH 6 mit 1 mM DTE und 1 mM CaCl₂, je 100 mM Glucose, Maltose und/oder Maltotriose sowie Protein. Die Ansätze wurden für 20 min bei 55°C inkubiert und je 5 µl Aliquots auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen (4.6).

Amy29: putative Neopullulanase

Neopullulanase-Aktivität (Pullulan → Panose) wurde als Freisetzung reduzierender Zucker aus Pullulan bei 65°C mit Hilfe des DNS-Assay bestimmt (4.6). Der Testansatz (200 µl) enthielt 0.5% Pullulan in 50 mM Natriumacetat pH 5 mit 1 mM DTE und 10 mM CaCl₂ sowie Protein. Die Hydrolyse-Aktivität von Amy29 wurde mit verschiedenen Maltooligo- und Polysacchariden in Konzentrationen von 0.05-1% in Gegenwart von 1 mM DTE und 10 mM CaCl₂ getestet. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen pH 4.0 und pH 8.0 in 100 mM Natriumacetat (pH 4.0-pH 5.5), 100 mM Piperazin (pH 5.5- pH 7.5) und 100 mM Triethanolamin (pH 7.5- pH 8.0) mit jeweils 10 mM CaCl₂ getestet. Die Temperaturabhängigkeit von Amy29 wurde zwischen 20°C und 85°C in 50 mM Natriumacetat pH 5 mit 1 mM DTE und 10 mM CaCl₂ getestet. Zur Bestimmung der Temperaturstabilität wurde gereinigtes Protein bei Temperaturen zwischen 65°C und 90°C inkubiert. Die Testansätze enthielten: 5 µg Protein in 60 µl 100 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 1 mM DTE mit oder ohne 1 M NaCl.

Der Einfluss verschiedener zweiwertiger Kationen wurde unter Standardbedingungen getestet, nachdem das Protein gegen 5 mM EDTA in 50 mM Natriumacetat pH 5 für 3 h dialysiert worden war, gefolgt von einer Dialyse gegen 50 mM Natriumacetat pH 5 für 18 h. Die Kationen wurden in Konzentrationen von 0.1-10 mM eingesetzt.

Die Produktbildung aus Pullulan wurde mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Der Inkubationsansatz enthielt je 0.5% Pullulan, 50 mM Natriumacetat pH 5 mit 1 mM DTE und 10 mM CaCl₂ sowie Protein. Der Ansatz wurde für verschiedene Zeiten (bis 15 min) bei 65°C inkubiert. Je Ansatz wurden 2 µl auf die Dünnschichtplatte aufgetragen (4.6).

Amy89: putative maltogene Amylase

Maltogene Amylase-Aktivität (Stärke → Maltose) wurde als Freisetzung reduzierender Zucker (Maltose) aus Stärke bei 60°C mit Hilfe des DNS-Assay bestimmt (4.6). Der Testansatz (200 µl) enthielt 0.25% Stärke in 50 mM Natriumacetat pH 5.5 mit 5 mM CaCl₂ sowie Protein. Die Hydrolyse-Aktivität von Amy89 wurde mit verschiedenen Maltooligo- und Polysacchariden (je 0.25%) in Gegenwart von 5 mM CaCl₂ getestet. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen pH 2.5 und pH 8.0 in 100 mM Citrat (pH 2.0-pH 4.5), Natriumacetat (pH 4.5-pH 5.5), Piperazin (pH 5.5-pH 7.5) und Triethanolamin (pH 7.5-pH 8.0) getestet. Die Temperaturabhängigkeit von Amy89 wurde zwischen 40°C und 90°C in 50 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 5 mM CaCl₂

getestet. Zur Bestimmung der Temperaturstabilität wurde gereinigtes Protein nach Enterokinasebehandlung bei Temperaturen zwischen 65°C und 90°C inkubiert. Die Testansätze enthielten: 5 µg Protein in 60 µl 100 mM Natriumacetat pH 5.8 mit oder ohne 5 mM CaCl₂.

Der Einfluss verschiedener zweiwertiger Kationen wurde unter Standardbedingungen getestet, nachdem das Protein gegen 10 mM EDTA in 50 mM Natriumacetat pH 5.8 für 3 h dialysiert worden war, gefolgt von einer Dialyse gegen 50 mM Natriumacetat pH 5.8 für 18 h. Die Kationen wurden in Konzentrationen von 0.1-10 mM eingesetzt.

Die Produktbildung aus Stärke wurde mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Der Inkubationsansatz enthielt je 0.5% Stärke, 50 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 5 mM CaCl₂ sowie Protein. Der Ansatz wurde für verschiedene Zeiten (bis 15 min) bei 60°C inkubiert. Je Ansatz wurden 2 µl auf die Dünnschichtplatte aufgetragen (4.6).

Amy90: putative Pullulanase

Pullulanase-Aktivität (Pullulan → Maltooligosaccharide) wurde als Freisetzung reduzierender Zucker aus Pullulan bei 60°C mit Hilfe des DNS-Assay bestimmt (4.6). Der Testansatz (200 µl) enthielt 0.25% Pullulan in 50 mM Natriumacetat pH 5.5 mit 5 mM CaCl₂ sowie Protein. Die Hydrolyse-Aktivität von Amy89 wurde mit verschiedenen Maltooligo- und Polysacchariden (je 0.25%) in Gegenwart von 5 mM CaCl₂ getestet. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen pH 2.5 und pH 8.0 in 100 mM Citrat (pH 2.5-pH 4.5), Natriumacetat (pH 4.5-pH 5.5), Piperazin (pH 5.5-pH 7.5) und Triethanolamin (pH 7.5-pH 8.0) getestet. Die Temperaturabhängigkeit von Amy90 wurde zwischen 40°C und 90°C in 50 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 5 mM CaCl₂ getestet. Zur Bestimmung der Temperaturstabilität wurde gereinigtes Protein nach Enterokinasebehandlung bei Temperaturen zwischen 65°C und 90°C inkubiert. Die Testansätze enthielten: 5 µg Protein in 60 µl 100 mM Natriumacetat pH 5.8 mit oder ohne 5 mM CaCl₂.

Der Einfluss verschiedener zweiwertiger Kationen wurde unter Standardbedingungen getestet, nachdem das Protein gegen 10 mM EDTA in 50 mM Natriumacetat pH 5.8 für 3 h dialysiert worden war, gefolgt von einer Dialyse gegen 50 mM Natriumacetat pH 5.8 für 18 h. Die Kationen wurden in Konzentrationen von 0.1-10 mM eingesetzt.

Die Produktbildung aus Pullulan wurde mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Der Inkubationsansatz enthielt je 0.5% Pullulan, 50 mM Natriumacetat pH 5 mit 1 mM DTE und 10 mM CaCl₂ sowie Protein. Der Ansatz wurde für verschieden Zeiten (bis 15 min) bei 65°C inkubiert. Je Ansatz wurden 2 µl auf die Dünnschichtplatte aufgetragen (4.6).

Amy92: putative Neopullulanase

Neopullulanase-Aktivität (Pullulan → Panose) wurde als Freisetzung reduzierender Zucker aus Pullulan bei 55°C mit Hilfe des DNS-Assay bestimmt (4.6). Der Testansatz (200 µl)

enthielt 0.5% Pullulan in 50 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 10 mM CaCl₂ sowie Protein. Die Hydrolyse-Aktivität von Amy92 wurde mit verschiedenen Maltooligo- und Polysacchariden in Konzentrationen von 0.05-1% in Gegenwart von 5 mM CaCl₂ getestet. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen pH 2.5 und pH 8.0 in 100 mM Citrat (pH 2.5-pH 4.5), Natriumacetat (pH 4.5-pH 5.5), Piperazin (pH 5.5-pH 7.5) und Triethanolamin (pH 7.5-pH 8.0) getestet. Die Temperaturabhängigkeit von Amy92 wurde zwischen 20°C und 70°C in 50 mM Piperazin pH 6 mit 1 mM CaCl₂ getestet. Zur Bestimmung der Temperaturstabilität wurde gereinigtes Protein bei Temperaturen zwischen 55°C und 67°C inkubiert. Die Testansätze enthielten: 5 µg Protein in 20 µl 100 mM Piperazin pH 6 mit oder ohne 5 mM CaCl₂.

Der Einfluss verschiedener zweiwertiger Kationen wurde unter Standardbedingungen getestet, nachdem das Protein gegen 1 mM EDTA in 50 mM Piperazin pH 6.0 dialysiert worden war, gefolgt von einer Dialyse gegen 50 mM Piperazin pH 6.0. Die Kationen wurden in Konzentrationen von 0.1-10 mM eingesetzt.

Die Produktbildung aus verschiedenen Substraten wurde mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Der Inkubationsansatz enthielt je 0.5% Substrat, 50 mM Piperazin pH 6.0 mit 5 mM CaCl₂ sowie Protein. Der Ansatz wurde für verschiedene Zeiten (bis 30 min) bei 55°C inkubiert. Je Ansatz wurden 2-5 µl auf die Dünnschichtplatte aufgetragen (4.6).

Amy98: putative maltogene Amylase

Maltogene Amylase-Aktivität (Stärke → Maltose) wurde als Freisetzung reduzierender Zucker (Maltose) aus Stärke bei 57.5°C mit Hilfe des DNS-Assay oder als Stärkeabnahme mit Hilfe des Iod-Tests bestimmt (4.6). Der Testansatz (200 µl) enthielt 0.5% Stärke in 50 mM KPP pH 6.5 mit 5 mM DTE sowie Protein. Die Hydrolyse-Aktivität von Amy98 wurde mit verschiedenen Maltooligo- und Polysacchariden (je 0.05-1%) getestet. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen pH 4.0 und pH 10.0 in 100 mM Natriumacetat (pH 4.0-5.5), Piperazin (pH 5.5-7.5, sowie pH 8.5-10) und HEPES (pH 7.5-8.5) getestet. Die Temperaturabhängigkeit von Amy98 wurde zwischen 35°C und 75°C in 50 mM KPP pH 6.5 mit 5 mM DTE getestet. Zur Bestimmung der Temperaturstabilität wurde gereinigtes Protein nach Enterokinasebehandlung bei Temperaturen zwischen 55°C und 68°C inkubiert. Die Testansätze enthielten: 2.5 µg Protein in 40 µl 100 mM KPP pH 6.5 mit oder ohne 5 mM CaCl₂ bzw. 1 M NaCl.

Der Einfluss verschiedener zweiwertiger Kationen wurde unter Standardbedingungen getestet, nachdem das Protein gegen 50 mM EDTA in 50 mM KPP pH 6.5 für 24 h dialysiert worden war, gefolgt von einer Dialyse gegen 50 mM KPP pH 6.5 für 18 h. Die Kationen wurden in Konzentrationen von 0.1-10 mM eingesetzt.

Die Produktbildung aus verschiedenen Substraten wurde mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Der Inkubationsansatz enthielt je 0.5% Substrat, 50 mM Natriumacetat pH 5.8 mit

5 mM CaCl₂ sowie Protein. Der Ansatz wurde für verschiedene Zeiten (bis 15 min) bei 57.5°C inkubiert. Je Ansatz wurden 2-5 µl auf die Dünnschichtplatte aufgetragen (4.6).

Amy132: putative Neopullulanase

Neopullulanase-Aktivität (Pullulan → Panose) wurde als Freisetzung reduzierender Zucker aus Pullulan bei 55°C mit Hilfe des DNS-Assay bestimmt (4.6). Der Testansatz (200 µl) enthielt 0.5% Pullulan in 50 mM Natriumacetat pH 5.8 sowie Protein. Die Hydrolyse-Aktivität von Amy132 wurde mit verschiedenen Maltooligo- und Polysacchariden in Konzentrationen von 0.05-1% in Gegenwart von 1 mM DTE und 1 mM CaCl₂ getestet. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen pH 4.0 und pH 8.0 in 100 mM Natriumacetat (pH 4.0-pH 6.5) und 100 mM KPP (pH 6.5-pH 8.0) getestet. Die Temperaturabhängigkeit von Amy132 wurde zwischen 20°C und 70°C in 50 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 1 mM DTE und 1 mM CaCl₂ getestet. Zur Bestimmung der Temperaturstabilität wurde gereinigtes Protein bei Temperaturen zwischen 55°C und 65°C inkubiert. Die Testansätze enthielten: 5 µg Protein in 60 µl 100 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 1 mM DTE mit oder ohne 1 mM CaCl₂.

Der Einfluss verschiedener zweiwertiger Kationen wurde unter Standardbedingungen getestet, nachdem das Protein gegen 20 mM EDTA in 50 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 1 mM DTE für 24 h dialysiert worden war, gefolgt von einer Dialyse gegen 50 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 1 mM DTE. Die Kationen wurden in Konzentrationen von 0.1-10 mM eingesetzt.

Die Produktbildung aus verschiedenen Substraten wurde mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Der Inkubationsansatz enthielt je 0.5% Substrat, 50 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 1 mM DTE und 1 mM CaCl₂ sowie Protein. Der Ansatz wurde für verschiedene Zeiten (bis 15 min) bei 55°C inkubiert. Je Ansatz wurden 2 und 5 µl auf die Dünnschichtplatte aufgetragen (4.6).

Transglycosylierungs-Aktivität wurde mit Kombinationen aus Glucose, Maltose und Maltotriose (je einzeln, in Kombination von je zwei Zuckern oder alle drei Zucker) als Substrat untersucht. Die Testansätze enthielten 50 mM Natriumacetat pH 5.8 mit 1 mM DTE und 1 mM CaCl₂, je 100 mM Glucose, Maltose und/oder Maltotriose sowie Protein. Die Ansätze wurden für 30 min bei 55°C inkubiert und je 5 µl Aliquots auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen (4.6).

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 Isolierung von genomischer DNA

Zur Extraktion genomischer DNA (Sambrook et al. 1989) aus *Archaeoglobus fulgidus* Stamm 7324 wurden jeweils 1.73 g Feuchtzellen in 5 ml TES-Puffer (10 ml TE-Puffer mit 0.86 g Saccharose; TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8.0 mit 0.1 mM EDTA) vorsichtig suspendiert. Nach Zugabe von 550 µl 10% SDS und 15 µl Proteinase K (20 mg/ml) wurde die Suspension

für 30 min bei 60°C und anschließend nach Zugabe von 600 µl 5 M NaCl für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 30 min bei 4°C zentrifugiert (48000 x g) und die DNA aus dem Überstand mit einem Volumen eiskaltem Isopropanol gefällt. Diese wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C (24000 x g) pelletiert und der Überstand dekantiert. Das Präzipitat wurde in 500 µl TE-Puffer über Nacht bei 4°C resuspendiert, die Suspension abschließend mit 5 µl RNase (100 mg/ml) für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert.

Konzentration und Reinheit der erhaltenen genomischen DNA wurden jeweils sowohl photometrisch als auch über ein 0.8%-iges Agarosegel bestimmt (4.5.3).

4.5.2 Polymerase Kettenreaktion

Mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR, (Mullis et al. 1986)) können DNA-Fragmente spezifisch amplifiziert werden. Sie diente in dieser Arbeit der Amplifikation des CGTase-Genes aus genomischer DNA und der Überprüfung auf ein vorhandenes Insert von Transformanten. Die PCRs wurden in 50 µl Reaktionsansätzen in einem Thermocycler (T-3 oder T-personal, Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Der Reaktionsansatz enthielt 190 ng genomische DNA (nach Reinigung mit dem DNeasy Tissue kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers), je 1 µM forward und reverse Primer, 5 µl ProofStart PCR Puffer (Qiagen), 0.5 mM MgSO₄, 300 µM dNTP-Mix und 2.5 U ProofStart-DNA-Polymerase (Qiagen). Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 5 min bei 95°C, 5 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 50°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 120 s, 30 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 55°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 120 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisation bei 72°C für 7 min.

Die verwendeten Primer (Tabelle 2) waren homolog zur aus der N-terminalen Aminosäuresequenz abgeleiteten Nukleotidsequenz der CGTase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 (GTf) und zur C-terminalen Sequenz der α-Glucanotransferase (GTr) aus *Thermococcus litoralis*.

Tabelle 2 Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung von DNA, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Der Vorwärtsprimer ist mit f und der Rückwärtsprimer mit r bezeichnet. Klammern geben gewobbelte Positionen an.

Name	Basensequenz (5' → 3')
GTf	ATG GAA AA(AG) ATA AAC TTC ATA TTT GGC ATC
GTr	TCA AAG CTC CCT GAA CCT TAC CGT G

4.5.3 Konzentrationsbestimmung und Reinheitsanalyse von DNA

Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm. Die Konzentration von DNA wurde durch Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt. Es gilt: Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht bei einer Küvettschichtdicke von 1 cm einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml Doppelstrang-DNA bzw. 37 µg/ml Einzelstrang-DNA. Darüber hinaus ist der Absorptionskoeffizient 260/280 ein Maß für die Reinheit von Nukleinsäuren. Reine DNA-Lösungen haben einen Quotienten von 1.8 bis 2 (Sambrook et al. 1989).

Agarosegelelektrophorese. Zur Konzentrationsbestimmung von DNA wurden DNA-Standards bekannter Konzentrationen neben einer Probe mit unbekannter DNA-Konzentration aufgetragen. Durch visuellen Vergleich von Banden gleicher Laufstrecke konnte die DNA-Konzentration der Probe unter der Annahme, dass die Intensität proportional zur Masse ist, abgeschätzt werden.

Daneben wurden Agarosegele dazu genutzt, DNA-Fragmente, Plasmide und genomische DNA der Größe nach analytisch oder präparativ zu trennen. Die Trennung erfolgte für hochmolekulare DNA in 1%-igen und für niedermolekulare DNA in 2%-igen Agarosegelen.

Dazu wurde Agarose in 30 ml TBE-Puffer (89 mM Tris-HCl pH 8.0 mit 89 mM Borat und 2.5 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst, nach Abkühlung auf etwa 60°C 30 µg Ethidiumbromid zugegeben und in eine Gießvorrichtung (7x10 cm) gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6x Auftragspuffer (Fermentas, Vilnius, Litauen) versetzt und neben einen Standard (*Hind*III verdaute λ-DNA oder Gene Ruler 100 bp Ladder plus, Fermentas, Vilnius, Litauen) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 100 V in TBE-Puffer. Anschließend wurden die Gele auf einem UV-Schirm (366 nm) analysiert.

4.5.4 Sequenzierung

Das Produkt der PCR zur Amplifikation des CGTase-Gens wurde sequenziert. Die Sequenzierung des gereinigten PCR-Produkts erfolgte nach Sanger, wobei durch Einbau von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden Kettenabbrüche erzeugt wurden (Sanger et al. 1977). Die fluoreszenzmarkierten Produkte wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt, mit einem Laser angeregt und die emittierte Fluoreszenz detektiert (ABI PRISM 310, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA).

Die Sequenzansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 10 bis 40 ng PCR-Produkt (gereinigt mit dem Gel Extraction Kit von peqlab nach Angaben des Herstellers), 3.2 pmol Primer (GTF bzw. GTr), 2 µl Big Dye Terminator Cycle Sequencing Premix (ABI PRISM, Applied Biosystems, Warrington, England), 2 µl Big Dye Terminator Cycle Sequencing Puffer auf 10 µl A. bidest. Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 1 min bei 96°C und 25 Zyklen aus Denaturierung bei 96°C für 10 s, Annealing bei 55°C für 5 s und Polymerisation bei 60°C für 4 min. Anschließend wurden die Sequenz-Ansätze für die nachfolgende Sequenzierung gefällt. Dazu wurde zu den Ansätzen 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3 M Natriumacetat pH 5.2 und 25 µl 100% Ethanol gegeben und für 15 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Durch 30-minütige Zentrifugation wurde die DNA pelletiert, dann das Pellet einmal mit 35 µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend für 5 min in einer Vakuumentrifuge getrocknet. Das getrocknete Pellet konnte nach Lösen in 12 µl A. bidest. zur Sequenzierung eingesetzt werden. Die Fällung der DNA war nicht so stringent, dass bereits die erste Base nach dem Primer gelesen werden konnte. Erst Fragmente mit mehr als 30 Nukleotiden ergaben signifikante Signale.

4.5.5 Isolierung von Plasmiden und Reinigung von DNA

Isolierung von Plasmid-DNA. Die Vektoren pBTac1 und pJOE3075 mit den Genen für die Proteine Amy29 bzw. Amy132 wurde mit dem Plasmid Miniprep Kit (PeqLab, Erlangen) aus *E. coli* TOP10 isoliert, um die Plasmide anschließend in einen anderen *E. coli*-Stamm zu transformieren.

Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen und Agarosegelen. PCR-Ansätze wurden von Restriktionsenzymen, Salzen und Puffer gereinigt, indem sie über präparative Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die DNA-Banden auf einem UV-Schirm mittels Skalpell ausgeschnitten wurden. Die DNA wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aus dem Gel extrahiert.

4.5.6 Transformation

Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen. Die Herstellung kompetenter Zellen des *E. coli*-Stammes BL21(DE3)-CodonPlus-RIL erfolgte in Anlehnung an das Protokoll im T-Cloning Kit Manual der Firma Fermentas (Vilnius, Litauen). 400 ml antibiotikahaltiges LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7.5, Antibiotika siehe unten) wurden 10%-ig mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter aeroben Bedingungen bis zu einer OD bei 578 nm von 0.6 inkubiert. Dann wurden die Kulturen 20 min auf Eis inkubiert und 15 min zentrifugiert (8000 x g, 4°C). Nach Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 200 ml eiskaltem TBS-Puffer (5 mM Tris-HCl pH 7.0 mit 100 mM NaCl und 5 mM MgCl₂) suspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min wurde das Pellet in 200 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (5 mM Tris-HCl pH 7.0 mit 100 mM CaCl₂ und 5 mM MgCl₂) suspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 10 min zentrifugiert, in 20 ml eiskalter CaCl₂-Lösung suspendiert und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde bis zu einer Endkonzentration von 20% mit Glycerin versetzt und in 200 µl Aliquots mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -70°C.

Transformation von einem Vektor in *E. coli*. Es wurde gereinigte Plasmid-DNA (pBTac1 bzw. pJOE3075 mit den Genen von Amy29 bzw. Amy132) in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert. Je Transformationsansatz wurden 80 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2 µg Plasmid-DNA vorsichtig gemischt und für 60 min auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden dann für 40 s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl SOC-Medium (0.5% Hefeextrakt, 2% Trypton, 10

mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ und 20 mM Glucose, auf 37°C vorgewärmt) wurden die Zellen für 30 min bei 37°C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Aliquots dieser Ansätze wurden zur Selektion auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten (LB-Medium (4.5.6) mit 18 g/l Agar) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.5.7 Expression

Die Expressionen wurden in LB-Medium (4.5.6) mit den entsprechenden Antibiotika bei 37°C unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Nach Expression wurden die Zellen bei 4°C für 20 min mit 8000 x g pelletiert. Im Folgenden werden die Bedingungen der Expressionen für die exprimierten Proteine dargestellt:

Amy29 wurde in 3200 ml LB-Medium (4.5.6) mit 100 µg/ml Carbenicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol exprimiert. Die Induktion mit 0.5 mM IPTG erfolgte bei einer OD₅₇₈ von 0.8. Nach 18 h Expression wurden die Zellen bei einer OD₅₇₈ von 3.5 pelletiert.

Amy132 wurde in 400 ml LB-Medium (4.5.6) mit 100 µg/ml Carbenicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol exprimiert. Die Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte bei einer OD₅₇₈ von 0.7. Nach 3 h Expression wurden die Zellen bei einer OD₅₇₈ von 2.5 pelletiert.

4.6 Analytische Methoden

Gaschromatographische Bestimmung von CO₂. Die Bestimmung erfolgte mit einem HP 5890 II Gaschromatographen von Hewlett Packard (Hamburg) mit einer Porapak Q 80/100 (180 cm x 0.3 cm) Säule und N₂ als Trägergas. Die Detektion erfolgte mit einem Flammenionisationsdetektor. Die Eichung mit CO₂ erfolgte mit Gasgemischen in einem Konzentrationsbereich bis 5% CO₂ in N₂. In diesem Bereich war das Integral der Peakflächen proportional zur Konzentration. Den Versuchsansätzen wurden Gasproben (30 µl) mit gasdichten Spritzen entnommen. Mit Hilfe der Retentionszeit wurde CO₂ identifiziert. Über das Integral der Peaks konnte die Konzentration an CO₂ in den Proben bestimmt werden. Der Gaschromatograph hatte folgende Einstellungen: N₂-Flussrate: 29 ml/min, Brenngasfluss H₂: 32 ml/min, Brenngasfluss Luft: 420 ml/min, Injektor: 100°C, Säulenofen: 100°C, Detektor: 400°C und Methanizer: 375°C.

Substratbestimmung von Stärke und Laktat. Stärke wurde nach Hydrolyse mit Amyloglycosidase als Glucoseäquivalente mit Hilfe der Enzyme Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase bestimmt (Beutler 1988). L-Laktat wurde durch Kopplung mit der Bildung von NADH durch die Laktat-Dehydrogenase bestimmt (Noll, 1988).

3,5-Dinitrosalicylsäure (DNS)-Assay zur Bestimmung von reduzierenden Zuckern. Zu 200 µl Probe mit bis zu 2% Substrat wurden 200 µl DNS-Reagenz (2 N NaOH, 30 g Natrium-Kalium-Tartrat, 1 g 3,5-Dinitrosalicylsäure ad 100 ml A. bidest, filtriert) gegeben und für 5 min gekocht. Nach Zugabe von 600 µl Wasser wurde die Extinktion bei 546 nm bestimmt (Miller 1959). Als Standard wurden 7 mM Glucose verwendet. Der Extinktionskoeffizient betrug 0.165 mM⁻¹cm⁻¹.

Bestimmung von Stärke im Iod-Test. Stärke wurde als Stärke-Iod-Komplex-Bildung bestimmt. Dazu wurde 1 ml Iod-Lösung (0.01% Iod, 0.1% Kaliumiodid in 3.8 mM HCl) zu 20 μ l Probe mit bis zu 0.5% Stärke gegeben. Die Bestimmung der Extinktion erfolgte bei 660 nm. 0.5% Stärke ergaben eine Extinktionsänderung von 0.5.

Bestimmung von α -Cyclodextrin. α -Cyclodextrin wurde durch die Bestimmung der Extinktionsabnahme bei 505 nm nach Bildung von Methylorange- α -Cyclodextrin-Einschlusskomplexen quantifiziert. Der Testansatz enthielt: α -Cyclodextrin-haltige Probe (bis 5 mM), 10 μ l 0.6 N HCl, 15 μ l 1 mM Methylorange in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.0 und A. bidest ad 1000 μ l. Der Extinktionskoeffizient betrug $0.86 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Bestimmung von β -Cyclodextrin. β -Cyclodextrin wurde durch die Bestimmung der Extinktionsabnahme bei 550 nm durch Bildung von Phenolphthalein- β -Cyclodextrin-Einschlusskomplexen quantifiziert. Der Testansatz enthielt 50 μ l β -Cyclodextrin-haltige Probe, 0.5 ml Phenolphthaleinlösung (1.5 Teile 3.8 mM Phenolphthalein in 98% Ethanol, 50 Teile Carbonatpuffer pH 10.5) und 0.7 ml A. bidest. Der Extinktionskoeffizient betrug $10 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Bestimmung von F₄₂₀. Coenzym Faktor F₄₂₀ wurde aus 0.5 g Feuchtzellen, die entweder auf Stärke/Sulfat oder Laktat/Sulfat gewachsen waren, isoliert and spektrometrisch quantifiziert (Schönheit et al. 1981).

Dünnschichtchromatographische Bestimmung von Zuckern. Mono- und Oligosaccharide wurden auf Kieselgel 60-Platten (Merck) mit Butanol-Ethanol-Wasser (5:3:2) als Laufmittel getrennt. Anschließend wurden die Platten in 5% H₂SO₄ getaucht und für 15 min bei 120°C entwickelt. Zucker erscheinen als dunkle Flecken auf hellem Untergrund. Zusätzlich wurden Färbungen durch Tauchen in Mandelins-Reagenz (0.6 g Ammoniummetavanadat in 22.5 ml A. bidest, 2.5 ml konzentrierter Schwefelsäure und 25 ml Aceton (reinst)) und anschließendem Entwickeln für 5 min bei 120°C vorgenommen. Zucker erscheinen als helle Flecken auf gelbem Untergrund. Als Standard wurde ein 0.1% Mix aus Sacchariden von 1-13 Glucoseeinheiten verwendet.

Zur Unterscheidung von Panose und Isopanose wurde eine Hydrolyse mit Glucoamylase vorgenommen (Imanaka und Kuriki 1989) und anschließend auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Handelt es sich um Panose, ist nur Glucose als Reaktionsprodukt nachzuweisen, Isopanose wird zu Glucose und Maltose abgebaut.

Dünnschichtchromatographische Bestimmung von Zuckerphosphaten. Zuckerphosphate wurden auf Cellulose-Platten (Merck) mit Isobuttersäure-Ammoniak-Wasser (66:1:33) als Laufmittel getrennt. Anschließend wurden die Platten in Ammoniumthiocyanat (1% in Aceton) getaucht, 5 min im Warmluftstrom getrocknet und in Eisen-III-Chlorid-Lösung (50 mg in 100 ml Aceton) getaucht und erneut getrocknet. Zuckerphosphate erscheinen als helle Flecken auf rostrotem Untergrund.

Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass *A. fulgidus* Stamm 7324, jedoch nicht *A. fulgidus* Stamm VC16 auf Stärke und Sulfat als Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen kann. Die Enzyme des Stärkeabbaus zu Acetat wurden identifiziert. Alle Enzyme des Stärkeabbaus zu Glucose-6-Phosphat wurden gereinigt und charakterisiert, ebenso eine ADP-abhängige Glucokinase als erster Schritt eines modifizierten Embden-Meyerhof-Weges. Vergleichend wurden bei beiden Stämmen Wachstumsuntersuchungen mit Laktat und Sulfat durchgeführt.

Zusätzlich wurden Untersuchungen an thermophilen Stärke-umsetzenden Enzymen im Rahmen des EU-Projektes „Thermogenes“ durchgeführt. Aus Umwelt-DNA und Organismen geothermaler Habitats sollten Gene von neuartigen Proteinen für die Umsetzung von Stärke gefunden werden. Diese Proteine sollten auf mögliche biotechnologisch nutzbare Eignung untersucht werden.

5 Ergebnisse I: Ein ungewöhnlicher Stärkeabbauweg im hyperthermophilen archaeellen Sulfatreduzierer *Archaeoglobus fulgidus* Stamm 7324

5.1 Wachstum von *A. fulgidus* auf Stärke und Laktat

Über das Wachstum von *A. fulgidus* Stämmen mit Zuckern liegen bisher keine detaillierten Untersuchungen oder Fermentationsbilanzen vor. Daher wurde das Wachstum von *A. fulgidus* Stamm 7324 und Stamm VC16 auf verschiedenen Zuckern (Glucose, Fructose, Maltose und Saccharose, je 10 mM sowie Cellobiose, Stärke, Amylose, Amylopektin, Dextrin, β -Cyclodextrin und Glycogen, je 1 g/l) und 30 mM Sulfat als Kohlenstoff- und Energiequelle untersucht. Die Medien enthielten 0.5 g Hefeextrakt pro Liter. Nach 4 Passagen mit je 2% Inokulum konnte ein signifikantes Wachstum von *A. fulgidus* Stamm 7324 auf Stärke und Sulfat beobachtet werden. Die maximal erreichte Zelldichte betrug $1-2 \times 10^8$ Zellen/ml. Neben Stärke werden als weitere Kohlenstoffquellen die Stärkebestandteile Amylose und Amylopektin sowie die Zucker Glycogen und β -Cyclodextrin verwertet. Mit Amylose und β -Cyclodextrin werden dreimal so hohe Zellzahlen (bis zu 3.5×10^8 Zellen/ml) erreicht wie beim Wachstum auf Stärke. Für alle anderen Zucker konnte kein signifikantes Wachstum beobachtet werden ($2-3 \times 10^7$ Zellen/ml, entsprechend dem Wachstum auf 0.5 g/l Hefeextrakt). Das Wachstum auf Stärke wurde charakterisiert.

Das Wachstum von *A. fulgidus* Stamm 7324 auf Stärke hing von der Anwesenheit von 30 mM Sulfat und geringen Mengen Hefeextrakt (0.5 g/l) ab. Ohne Sulfat bzw. Hefe konnte kein Wachstum beobachtet werden. Eine typische Wachstumskurve für das Wachstum auf Stärke und Sulfat zeigt Abbildung 4A. Der Organismus wuchs mit einer Verdopplungsrate von ca. 4-5 Stunden. Während der exponentiellen Wachstumsphase wurde ungefähr 1 mM

Glucoseäquivalent umgesetzt. Pro mol Glucoseäquivalent, das mit Sulfat oxidiert wurde, wurden 2 mol Acetat, 2 mol CO₂ und 1 mol H₂S gebildet.

Zum Vergleich wurde das Wachstum von *A. fulgidus* Stamm 7324 auf Laktat (10 mM) und Sulfat (30 mM) analysiert. Der Organismus wuchs auf diesen Substraten mit einer Verdopplungszeit von 4–5 Stunden auf eine Zelldichte von 3×10^8 Zellen/ml. Pro mol Laktat wurden mit Sulfat 3 mol CO₂ und 1.5 mol H₂S gebildet. Dies weist darauf hin, dass Laktat, im Gegensatz zu Stärke, vollständig zu CO₂ oxidiert wird (Abbildung 4B).

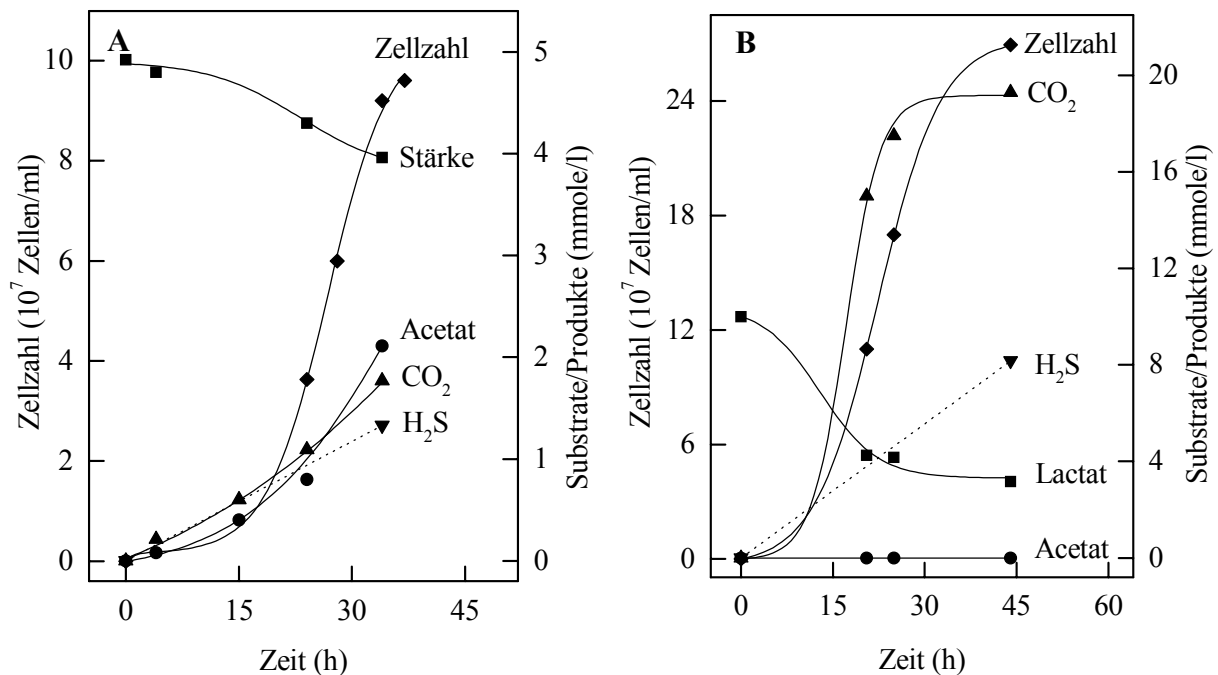


Abbildung 4 A Stärkeabbau in Anwesenheit von Sulfat zu CO₂, Acetat und H₂S und B Laktatabbau zu CO₂ und H₂S in wachsenden Kulturen von *A. fulgidus* Stamm 7324. Der Organismus wurde bei 76°C in 125-ml Müller-Krempel-Flaschen mit 50 ml Medium mit 0.5 g/l Hefeextrakt und 1 g Stärke/l bzw. 10 mM Laktat, gezüchtet. Wachstum (Zellzahl, ◆), Laktat- oder Stärkeverbrauch [als Glucose-Äquivalente angegeben] (■) und die Bildung von CO₂ (▲), H₂S (▼) und Acetat (●) wurden zu den angegebenen Zeiten bestimmt.

Für *A. fulgidus* Stamm VC16 konnte weder auf Stärke noch auf den anderen getesteten Zuckern signifikantes Wachstum nachgewiesen werden, nach drei bis vier Passagen mit je 2% Inokulum wurden nur noch Zelldichten erreicht ($2-5 \times 10^7$ Zellen/ml), wie sie beim Wachstum auf 0.5 g/l Hefeextrakt beobachtet werden konnten. Im Gegensatz dazu wuchs *A. fulgidus* Stamm VC16 mit Laktat und Sulfat auf eine Zelldichte von $3-5 \times 10^8$ Zellen/ml.

Diese Untersuchungen zeigen, dass *A. fulgidus* Stamm 7324 im Gegensatz zu Stamm VC16 in der Lage ist Stärke und Sulfat als Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwenden.

5.2 Enzyme des Stärkeabbaus zu Glucose-6-Phosphat in *A. fulgidus* Stamm 7324

In Stärke-gewachsenen Zellen von *A. fulgidus* Stamm 7324 wurden die folgenden Enzymaktivitäten gemessen, die an einem ungewöhnlichen Stärkeabbauweg beteiligt sind, wie er in ähnlicher Form für *Thermococcus* sp. und *Klebsiella oxytoca* beschrieben wurde (Hashimoto et al. 2001; Fiedler et al. 1996): Membran-Fractionen enthielten die Aktivität einer Cyclodextrin-Glucanotransferase (0.09 Umg^{-1} bei 80°C , CGTase). Zellextrakte enthielten Aktivitäten der folgenden Enzyme bei 80°C : Cyclodextrinase (0.02 Umg^{-1} , CDase), Maltodextrin-Phosphorylase (0.015 Umg^{-1} , Mal-P) und Phosphoglucomutase (0.04 Umg^{-1} , PGluM). Aktivitäten einer α -Amylase oder einer Pullulanase als Enzyme des klassischen Stärkeabbaus konnten nicht gemessen werden. Als Referenzorganismus diente *Pyrococcus furiosus*, bei dem unter selben Präparations- und Testbedingungen wie für *A. fulgidus* Stamm 7324 sowohl eine α -Amylase (0.8 Umg^{-1}), als auch eine Pullulanase (0.15 Umg^{-1}) gemessen werden konnten. Diese Enzymaktivitäten entsprechen denen, die für *P. furiosus* beschrieben wurden (Rüdiger et al. 1995).

Die spezifischen Aktivitäten von CDase, Mal-P und PGluM waren in Stärke-gewachsenen Zellen 2.5-4.5-fach höher als in Laktat-gewachsenen Zellen (Tabelle 3). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass diese Enzyme während des Wachstums auf Stärke induziert werden.

Tabelle 3 Vergleich der spezifischen Aktivitäten von Enzyme des Stärkeabbaus zu Glucose-6-Phosphat in Laktat- und Stärke-gewachsenen Zellen von *A. fulgidus* Stamm 7324 bei 80°C .

	Laktat-gewachsen (Umg^{-1})	Stärke-gewachsen (Umg^{-1})	Induktion (-fach)
Cyclodextrinase	0.005	0.02	4
Maltodextrin-Phosphorylase	0.0035	0.015	4.5
Phosphoglucomutase	0.016	0.040	2.5

5.3 Enzyme des Glucoseabbaus zu Pyruvat in *A. fulgidus* Stamm 7324

Nach der Identifizierung der Enzyme des Stärkeabbaus bis zur Stufe des Glucose-6-Phosphats stand dessen weiterer intrazellulärer Abbau im Mittelpunkt der Untersuchungen. Stärke-gewachsene Zellen von *A. fulgidus* Stamm 7324 enthielten alle Enzyme eines modifizierten Embden-Meyerhof-Weges (Tabelle 4). Die Aktivitäten der Schlüsselenzyme eines klassischen oder modifizierten Entner-Doudoroff-Weges, wie zum Beispiel Glucose-Dehydrogenase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Gluconat-Dehydratase, 6-Gluconat-Dehydratase und KD(P)G-Aldolase, konnten nicht bestimmt werden. Im Folgenden werden die Enzyme des modifizierten Embden-Meyerhof-Weges beschrieben.

5.3.1 ADP-abhängige Kinasen

Zellextrakte von *A. fulgidus* Stamm 7324 katalysierten die ADP-abhängige Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat mit einer spezifischen Aktivität von 0.1 Umg^{-1} (50°C). PP_i und ATP dienen nicht als Phosphoryldonoren. Die ADP-abhängige Glucokinase (ADP-GLK) wurde gereinigt und charakterisiert (5.7). Fructose-6-Phosphat wurde ADP-abhängig zu Fructose-1,6-Bisphosphat umgesetzt. Die spezifische Aktivität betrug 0.11 Umg^{-1} (50°C). PP_i und ATP dienen nicht als Phosphoryldonoren. Die ADP-abhängige Phosphofruktokinase (ADP-PFK) wurde bereits gereinigt und charakterisiert (Hansen und Schönheit 2003).

5.3.2 Enzyme der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Oxidation

Zellextrakte Stärke-gewachsener Zellen von *A. fulgidus* Stamm 7324 enthielten Aktivitäten einer Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin-Oxidoreduktase (GAPOR), die als GAP-abhängige Reduktion von Benzylviologen mit einer Rate von 0.1 Umg^{-1} (50°C) bestimmt wurde. Die Rate der Benzylviologen-Reduktion konnte nicht durch die Zugabe von 10 mM Phosphat zu Phosphat-freien Extrakten ($<10 \text{ }\mu\text{M}$ Phosphat) stimuliert werden. Eine Zugabe von Arsenat (10 mM, Kalium-Salz) erhöhte die Aktivität der GAPOR nicht. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die GAP-Oxidation nicht über 1,3-Bisphosphoglycerat verläuft. Die Aktivität der GAP-Dehydrogenase betrug in Stärke-gewachsenen Zellen 0.005 Umg^{-1} bei 50°C . Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität konnte nicht bestimmt werden. Die GAPOR wurde bereits gereinigt und charakterisiert (Gebhard 2002).

5.3.3 Weitere Enzyme des Embden-Meyerhof-Weges

Extrakte Stärke-gewachsener Zellen zeigten die Aktivitäten folgender Enzyme des Embden-Meyerhof-Weges: Glucose-6-Phosphat-Isomerase, Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase, Triosephosphat-Isomerase, Phosphoglycerat-Mutase, Enolase und Pyruvat-Kinase. Die spezifischen Aktivitäten und kinetischen Konstanten dieser Enzyme sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die Pyruvat-Kinase wurde bereits charakterisiert (Johnsen et al. 2003). Außerdem wurde sowohl in Laktat- als auch in Stärke-gewachsenen Zellen Adenylat-Kinase-Aktivität von 2.6 Umg^{-1} gemessen, die die Regeneration des aus ADP gebildeten AMP katalysiert.

Tabelle 4 Spezifische Aktivitäten und apparente K_m -Werte der Enzyme des Glucose-Abbaus zu Pyruvat in Stärke-gewachsenen Zellen von *Archaeoglobus fulgidus* Stamm 7324. Abkürzungen: *ADP-GLK* ADP-abhängige Glucokinase, *ADP-PFK* ADP-abhängige 6-Phosphofruktokinase, *BV* Benzylviologen, *CoA* Coenzym A, *Fd* Ferredoxin, *F-1,6-BP* Fructose-1,6-Bisphosphat, *F-6-P* Fructose-6-Phosphat, *GAP* Glycerinaldehyd-3-Phosphat, *Glc* Glucose, *G-6-P* Glucose-6-Phosphat, *GAPOR* Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Fd-Oxidoreduktase, *PEP* Phosphoenolpyruvat, *2-PG* 2-Phosphoglycerat, *3-PG* 3-Phosphoglycerat, *P_i* anorganisches Phosphat, *n.b.* nicht bestimmt.

Enzymaktivität	Temperatur (°C)	Spezifische Aktivität (Umg ⁻¹)	Apparenter K_m (mM)
ADP-GLK	50	0.1	0.26 (Glc) 0.2 (ADP)
Glucose-6-Phosphat-Isomerase	80	0.06	4 (F-6-P)
ADP-PFK	50	0.11	3.3 (F-6-P) 1 (ADP)
Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase	50	0.01	4.2 (F-1,6-BP)
Triosephosphat-Isomerase	50	0.38	0.16 (GAP)
GAPOR	50	0.07	0.28 (GAP)
Phosphoglycerat-Mutase	50	0.02	n.b.
Enolase	50	0.79	2 (2-PG)
Pyruvat-Kinase	50	0.13	3.3 (PEP) 0.6 (ADP)

Die Ergebnisse der Enzymmessungen lassen darauf schließen, dass die Umsetzung von Glucose zu Pyruvat während des Wachstums von *A. fulgidus* Stamm 7324 auf Stärke über einen modifizierten Embden-Meyerhof-Weg verläuft.

5.4 Enzyme der Acetatbildung aus Pyruvat in *A. fulgidus* Stamm 7324

Zellextrakte Stärke-gewachsener Zellen von *A. fulgidus* Stamm 7324 enthielten eine Pyruvat: Ferredoxin-Oxidoreduktase, die die CoA-abhängige Oxidation von Pyruvat zu Acetyl-CoA unter Reduktion von Benzylviologen mit einer Rate von 0.13 Umg⁻¹ (50°C) katalysierte. Aktivitäten einer Acetat-Kinase oder einer Phosphotransacetylase konnten nicht gemessen werden. Anstelle dessen katalysierten die Extrakte die ADP- und P_i-abhängige Umwandlung von Acetyl-CoA zu Acetat, ATP und CoA mit einer spezifischen Aktivität von 0.3 Umg⁻¹ (50°). Dies spricht für die Anwesenheit einer ADP-bildenden Acetyl-CoA-Synthetase (ACD). Die apparenten K_m Werte für ADP (15 µM), P_i (300 µM) und Acetyl-CoA (23 µM) wurden bestimmt. Die ACD aus *A. fulgidus* Stamm 7324 wurde bereits charakterisiert (Knierim 2004).

5.5 Substratspezifische Induktion der Enzyme des Glucoseabbaus zu Acetat

Zum Vergleich wurden die Aktivitäten der Schlüsselenzyme des modifizierten Embden-Meyerhof-Weges in Laktat-gewachsenen Zellen von *A. fulgidus* Stamm 7324 gemessen. Die spezifischen Aktivitäten der ADP-abhängigen Glucokinase, der ADP-abhängigen 6-Phosphofruktokinase und der Pyruvat-Kinase waren in Stärke-gewachsenen Zellen signifikant höher als in Laktat-gewachsenen Zellen. Die Aktivität einer GAPOR konnte in Laktat-gewachsenen Zellen nicht gezeigt werden. Die Aktivität der ACD war in Stärke-gewachsenen Zellen zehnfach höher als in Laktat-gewachsenen Zellen, die kein Acetat während des Wachstums bilden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese katabolen Enzyme während des Wachstums auf Stärke induziert werden (Tabelle 5). Zum Vergleich wurden die auch anabol verwendeten Enzyme Triosephosphat-Isomerase und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase in Laktat- und Stärke-gewachsenen Zellen gemessen. Ihre Aktivität war nicht substratspezifisch verändert.

Tabelle 5 Vergleich der spezifischen Aktivitäten (Umg^{-1}) ausgewählter Enzyme des Glucoseabbaus zu Acetat in Laktat- und Stärke-gewachsenen Zellen von *A. fulgidus* Stamm 7324. Alle Aktivitäten wurden bei 50°C bestimmt. n.b. nicht bestimmbar.

Enzym	Laktat-gewachsene Zellen (Umg^{-1})	Stärke-gewachsene Zellen (Umg^{-1})	Induktion (-fach)
Glucokinase	0.007	0.1	14
Phosphofruktokinase	0.01	0.11	11
Pyruvat-Kinase	0.028	0.13	5
GAP: Fd-Oxidoreduktase	n.b.	0.07	-
Acetyl-CoA-Synthetase (ADP-bildend)	0.03	0.3	10

Die Ergebnisse der Enzymuntersuchungen in Rohextrakten von *A. fulgidus* Stamm 7324 deuten darauf hin, dass Stärke über einen ungewöhnlichen Stärkeabbau zu Glucose-6-Phosphat (und Glucose) abgebaut wird. Die weitere Umsetzung zu Pyruvat erfolgt über einen modifizierten Embden-Meyerhof-Weg. Aus Pyruvat wird Acetat gebildet, wobei eine ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase beteiligt ist.

5.6 Kohlenmonoxid-Dehydrogenase und F_{420} -Gehalt in *A. fulgidus* Stamm 7324

A. fulgidus Stamm 7324 enthielt eine aktive Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (CO-DH), die an der Oxidation von Laktat zu CO_2 beteiligt ist. Die Rate der CO-DH und der Faktor F_{420} -Gehalt wurden vergleichend in Laktat- und Stärke-gewachsenen Zellen untersucht. Die Aktivität der CO-DH in Stärke-gewachsenen Zellen entsprach mit einer Rate von $0.1\text{--}0.2 \text{ Umg}^{-1}$ (50°C) der Aktivität in Laktat-gewachsenen Zellen. Dagegen ist der Faktor F_{420} -Gehalt in Stärke- und Laktat-gewachsenen Zellen verschieden, er war in Stärke-gewachsenen Zellen von *A. fulgidus* Stamm 7324 ($<0.03 \text{ nmol/mg Protein}$) signifikant niedriger, als in Laktat-gewachsenen Zellen ($0.6 \text{ nmol/mg Protein}$). Aufgrund des geringen F_{420} -Gehaltes zeigten

Stärke-gewachsene Zellen, im Gegensatz zu Laktat-gewachsenen Zellen, nicht die typische blau-grüne Fluoreszenz, die bei allen *Archaeoglobus fulgidus*-Stämmen beobachtet werden kann. Nach Transfer von *A. fulgidus* Stamm 7324 aus Laktat/Sulfat-Medium in Stärke/Sulfat-Medium verminderte sich die F_{420} -spezifische Fluoreszenz während des Wachstums. Diese Fluoreszenz konnte nach einem Transfer zurück in Laktat/Sulfat-Medium komplett wieder hergestellt werden, was dafür spricht, dass der F_{420} -Gehalt substratspezifisch reguliert wird.

5.7 Reinigung und Charakterisierung der Enzyme des Stärkeabbaus zu Glucose-6-Phosphat in *A. fulgidus* Stamm 7324

Im Folgenden werden die Reinigung und Charakterisierung der Enzyme des Stärkeabbaus zu Glucose-6-Phosphat beschrieben. Die Enzyme wurden in Bezug auf die molekularen und katalytischen Eigenschaften, Temperaturoptima, Thermostabilität und auf den Einfluss von Kationen charakterisiert.

5.7.1 Cyclodextrin-Glucanotransferase (CGTase)

Die CGTase katalysiert die folgende Reaktion:



Die Enzymaktivität wurde durch Bestimmung der Stärkeabnahme oder als Bildung von α - bzw. β -Cyclodextrin bestimmt.

Partielle Reinigung. Die CGTase wurde aus Stärke-gewachsenen Zellen von *A. fulgidus* Stamm 7324 partiell angereichert. Die Reinigung erfolgte nach Lösen des Enzyms aus der Zellmembran mit Hilfe von 0.1% SDS über sechs säulenchromatographische Schritte. Dabei wurde die CGTase mit einer Gesamtausbeute von 1.4% und einer spezifischen Aktivität von 30 U mg^{-1} (80°C) 333-fach angereichert (Tabelle 6).

Tabelle 6 Reinigung der CGTase aus *A. fulgidus* Stamm 7324. Die Enzymaktivität wurde bei 80°C im diskontinuierlichen Testsystem in 50 mM Natriumacetat pH 4.5 mit 5 mM CaCl₂ und 0.5% Stärke als Abnahme von Stärke bestimmt.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (Umg ⁻¹)	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Pelletfraktion nach SDS-Elution	1990	195	0.09	100	1
Phenyl-Sepharose	700	70	0.1	36	1.1
Superdex 200	150	23.7	0.15	12	1.6
Phenyl-Sepharose	75	13	0.17	6.6	1.88
UNO Q1	37.6	10	0.266	5.1	2.95
RESOURCE Phe	7.5	6.39	0.85	3.2	9.4
Bioprep SE 1000/17	0.5	3	6	1.5	66.6
RESOURCE Phe	0.09	2.75	30	1.4	333

Nach dem letzten Reinigungsschritt zeigten sich auf dem SDS-Gel noch 2 Banden. Mit Hilfe eines Zymogramms (4.3.2) wurde die Bande, die die CGTase-Aktivität enthielt, identifiziert. Es handelt sich um die 80 kDa-Bande (Abbildung 5).

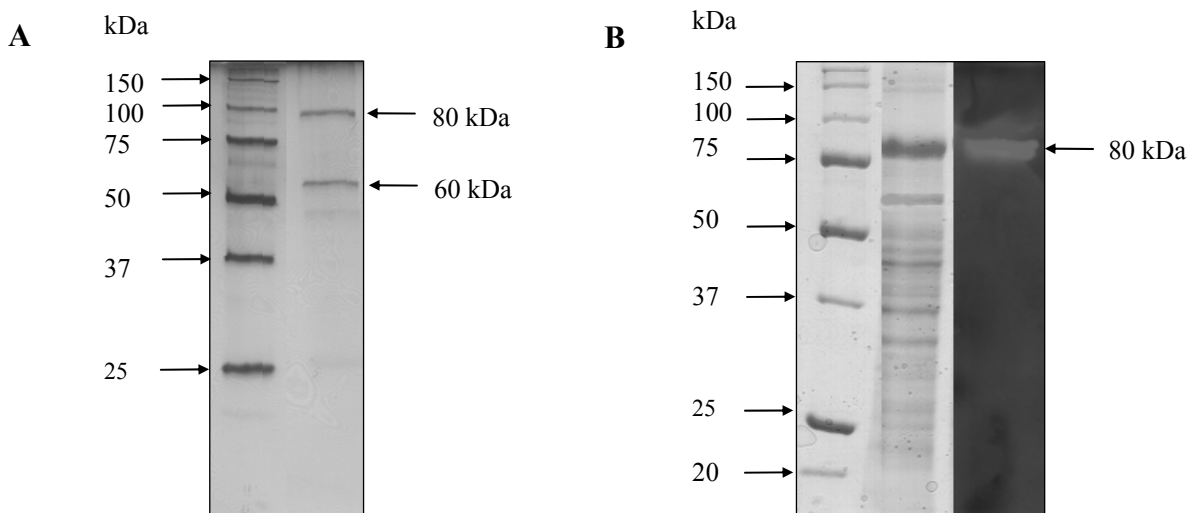


Abbildung 5 Reinigung der CGTase aus *A. fulgidus* Stamm 7324. **A** SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung von partiell gereinigter CGTase. *Spur 1*: Molekulargewichtsstandard; *Spur 2*: 1 µg Protein nach RESOURCE Phe. **B** Zymogramm der CGTase aus *A. fulgidus* Stamm 7324. *Spur 1*: Molekulargewichtsstandard; *Spur 2*: 10 µg Protein nach Superdex 200 gefärbt mit Coomassie Brilliantblau; *Spur 3*: 10 µg Protein nach Superdex mit anschließender Aktivitätsfärbung.

Biochemische Charakterisierung. Das pH-Optimum des Proteins lag bei pH 7. Die spezifische Aktivität mit 0.5% Stärke als Substrat betrug 30 Umg⁻¹. Dabei wurden sowohl die Abnahme von Stärke, als auch die Bildung von α - und β -Cyclodextrin bestimmt. Die Aktivität des Proteins war durch Zugabe von 1 mM DTE, jedoch nicht durch Zugabe von NaCl (0.1-1 M) stabilisierbar. 1 mM Calciumchlorid erhöhte die Aktivität des Enzyms fünffach. Die CGTase aus *A. fulgidus* zeigte ein Temperaturoptimum bei 83°C.

Das apparente native Molekulargewicht der CGTase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 wurde mit 260 kDa, das der Untereinheit mit 80 kDa bestimmt. Die N-terminale Aminosäuresequenz (19 Aminosäuren) der Untereinheit der CGTase wurde bestimmt mit: (M)EKINFIFGIHNNHQPLGNF. Ein Alignment der N-terminalen Aminosäuresequenz der CGTase von *A. fulgidus* Stamm 7324 mit verschiedenen charakterisierten archaeellen (Cyclodextrin-)Glucanotransferasen zeigte den höchsten Grad an Übereinstimmung mit der α -Glucanotransferase aus *Thermococcus litoralis* (18 Aminosäuren identisch, Abbildung 6). Mit der N-terminalen Aminosäuresequenz der CGTase von *A. fulgidus* Stamm 7324 konnte kein homologer ORF im Genom des nahe verwandten Typstamms *A. fulgidus* Stamm VC16 identifiziert werden.

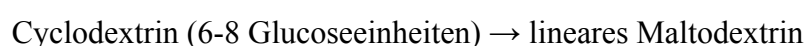
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> Stamm 7324	MEKINFI FGIHNNHQPLGNF
<i>Thermococcus litoralis</i> GTase	MEKINFI FGIHNNHQPLGNF
<i>Thermococcus</i> sp. B1001 CGTase	MRSRKIYMLVLLLLFLG-F
<i>Thermococcus kodakaraensis</i> CGTase	MG--RLVSVVLLIVLLLTPI

Abbildung 6 Alignment der N-terminalen Aminosäuresequenzen der CGTase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 und archaeellen Glucanotransferasen aus Archaea. Das Alignment wurde mit Hilfe von ClustalX (Thompson et al. 1997) mit Standardeinstellungen erstellt. Dunkle Hinterlegungen zeigen identische Reste, helle Hinterlegungen konservierte Substitutionen an. NCBI Accession-Nummern: *T. litoralis* D88253, *Thermococcus* sp. B1001 BAB18101, *Thermococcus kodakaraensis* BAB78538.

Sequenzierung. Aufgrund der geringen Ausbeute bei der nativen Reinigung der CGTase wurden nur wenige biochemische Parameter bestimmt, insbesondere die N-terminale Aminosäuresequenz. Aufgrund der hohen Identität der N-terminalen Aminosäuresequenz zur GTase aus *Thermococcus litoralis* wurden mit der Sequenz dieser GTase und der N-terminalen Aminosäuresequenz aus *A. fulgidus* Stamm 7324 Primer konstruiert, um das entsprechende Gen aus *A. fulgidus* Stamm 7324 zu amplifizieren. Das erhaltene PCR-Produkt hatte eine Größe von ca. 2000 Basenpaaren. Das Gen wurde direkt sequenziert, bisher liegen 45% der Gensequenz vor. Die Gensequenz zeigte ebenso wie die N-terminale Aminosäuresequenz die höchste Ähnlichkeit mit der Sequenz der GTase aus *T. litoralis* (61 von 898 Nukleotiden abweichend, entsprechend 7%, nicht dargestellt). Ein Vergleich auf Ebene der entsprechenden abgeleiteten Aminosäuren zeigte, dass nur ca. 1% der Aminosäuren verschieden war und es sich hierbei um ausschließlich konservierte Austausche handelte (Abbildung 31, siehe Diskussion).

5.7.2 Cyclodextrinase (CDase)

Die CDase katalysiert die folgende Reaktion:



Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe des DNS-Assays (4.6) als Zunahme freiwerdender reduzierender Zucker bestimmt.

Reinigung. Die CDase wurde aus Stärke-gewachsenen Zellen von *A. fulgidus* Stamm 7324 bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die Reinigung erfolgte über sechs

säulenchromatographische Schritte. Dabei wurde die CDase mit einer Gesamtausbeute von 0.9% und einer spezifischen Aktivität von 36 U mg^{-1} (80°C) 545-fach angereichert (Tabelle 7). Nach dem letzten Schritt zeigte sich auf dem SDS-Gel nur eine Bande (Abbildung 7).

Tabelle 7 Reinigung der CDase aus *A. fulgidus* Stamm 7324. Die Enzymaktivität wurde bei 80°C im diskontinuierlichen Testsystem als Bildung von reduzierenden Zuckern aus 0.5 % α -Cyclodextrin in 50 mM Natriumacetat pH 4.5 gemessen.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (U mg^{-1})	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Zellfreier Extrakt	1820	121	0.066	100	1
Q-Sepharose	684	118	0.17	97.5	2.6
DEAE-Sepharose	199	116	0.58	95.9	8.8
Superdex 200 16/60	3.7	9	2.4	7.4	36.4
Uno S1	1	8.3	8.3	6.8	125
Uno Q1	0.12	1.21	10	1	151
Bioprep SE 1000/17	0.03	1.08	36	0.9	545

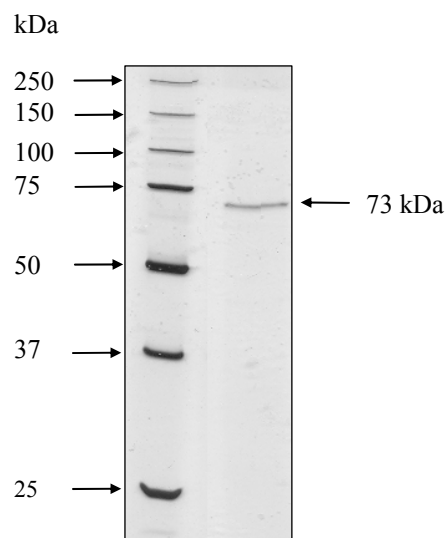


Abbildung 7 Reinigung der CDase aus *A. fulgidus* Stamm 7324. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Silbernitrat von gereinigter CDase. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande der CDase. *Spur 1*: Molekulargewichtsstandard; *Spur 2*: $0.3 \mu\text{g}$ Protein nach Bioprep SE 1000/17.

Biochemische Charakterisierung. Das apparente native Molekulargewicht der CDase von *A. fulgidus* Stamm 7324 wurde mit 69 kDa, das der Untereinheit mit 73 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine monomere Struktur des Proteins. Die N-terminale Aminosäuresequenz der Untereinheit der CDase konnte nicht bestimmt werden, da der N-Terminus geblockt vorlag.

Die CDase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 verwendete ausschließlich Cyclodextrine als Substrate. Es konnte keine Aktivität mit Stärke, Pullulan, Amylose, Amylopektin oder mit Oligosacchariden gezeigt werden. Die Abhängigkeit der Raten von der Substratkonzentration zeigte für alle Cyclodextrine eine Michaelis-Menten-Kinetik. Tabelle 8 zeigt die kinetischen Konstanten für die Cyclodextrine. Es wird deutlich, dass γ -Cyclodextrin bevorzugt verwendet wurde.

Tabelle 8 Kinetische Konstanten der CDase aus *A. fulgidus* Stamm 7324. Die Bestimmung erfolgte bei 80°C und pH 4.5 im diskontinuierlichen Testsystem.

	α -Cyclodextrin	β -Cyclodextrin	γ -Cyclodextrin
V_{\max} (Umg ⁻¹)	22	42	21
K_m (mM)	0.26	0.63	0.02
V_{\max}/K_m	84.6	66.6	1050

Mittels Dünnschichtchromatographie konnte nachgewiesen werden, dass das Enzym; im Gegensatz zu allen bekannten Cyclodextrinasen, die zyklischen Dextrine ausschließlich zu den entsprechenden Oligosacchariden linearisierte und keine weitere Hydrolysisierung des Oligosaccharids katalysierte (Abbildung 8). Auch eine Inkubation bis zu 24 Stunden zeigte keine weiteren Reaktionsprodukte (Daten nicht gezeigt).

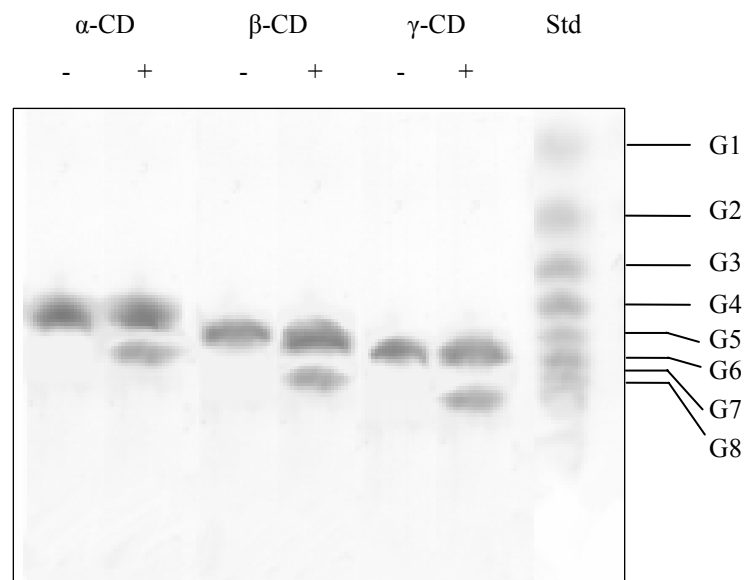


Abbildung 8 Bestimmung der Reaktionsprodukte der CDase aus α -, β - und γ -Cyclodextrin. Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel 60 von Reaktionsansätzen mit 0.5% Cyclodextrin und 2 μ g Protein in 50 mM Natriumacetat pH 4.5 nach Inkubation bei 80°C für 1.5 Stunden (+). Als Kontrolle wurden Ansätze ohne Protein inkubiert (-). Färbung mit 5% H₂SO₄ und 15-minütiger Inkubation bei 120°C. *Spuren 1* und *2* α -Cyclodextrin; *Spuren 3* und *4* β -Cyclodextrin; *Spuren 5* und *6* γ -Cyclodextrin; *Spur 7* Glucose-Einheiten-Standard. Die Cyclodextrine zeichnen sich durch unregelmäßige Laufstrecken aus und erscheinen somit kleiner, als der Standard mit dem entsprechenden linearisierten Maltooligosaccharid. Die durch die CDase linearisierten Oligosaccharide zeigen ein dem Standard entsprechendes Laufverhalten.

Das pH-Optimum der CDase lag pH 4.5. Eine Behandlung mit 20 mM EDTA führte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust des Enzyms. Das ist ein Hinweis darauf, dass die Aktivität der CDase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 abhängig von divalenten Kationen war. Der Zusatz von Ca^{2+} , Co^{2+} oder Mg^{2+} (je 10 mM) führte zu einer Wiederherstellung der Aktivität. Ni^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} in Konzentrationen von 1 mM übten eine hemmende Wirkung auf die CDase aus.

Das Temperaturoptimum der CDase lag bei 80°C. Die Darstellung der Daten nach Arrhenius ergab einen linearen Bereich zwischen 30°C und 80°C, daraus wurde eine Aktivierungsenergie von 150 kJmol^{-1} ermittelt (Abbildung 9).

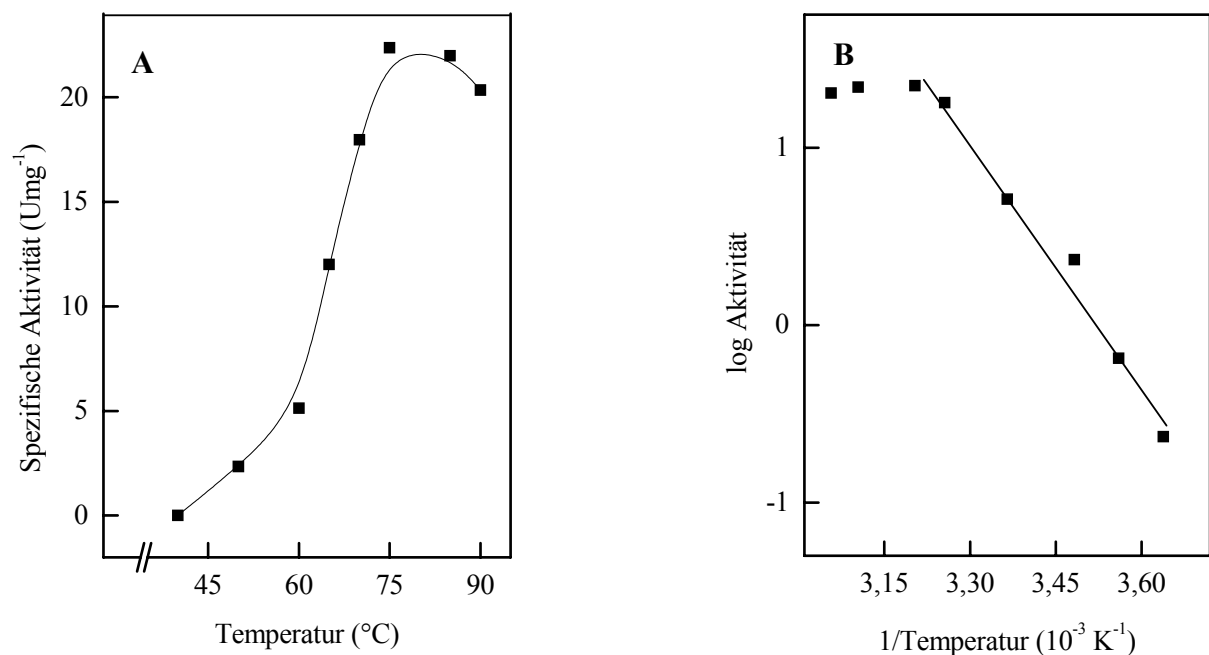
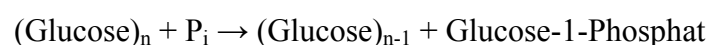


Abbildung 9 Temperaturabhängigkeit der CDase-Aktivität aus *A. fulgidus* Stamm 7324. **A** Spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur. **B** Darstellung derselben Daten nach Arrhenius.

Die Thermostabilität der CDase wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten getestet. Bis 80°C wurde kein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet. Bei 90°C betrug die Halbwertszeit des Enzyms noch 50 Minuten. Die Thermostabilität konnte nicht durch den Zusatz von NaCl , CaCl_2 oder MgCl_2 erhöht werden.

5.7.3 Maltodextrin-Phosphorylase (Mal-P)

Die Mal-P katalysiert die folgende Reaktion:



Die Enzymaktivität wurde als Bildung von Glucose-1-Phosphat bestimmt.

Reinigung. Die Mal-P wurde aus Stärke-gewachsenen Zellen von *A. fulgidus* Stamm 7324 bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die Reinigung erfolgte über fünf

säulenchromatographische Schritte. Dabei wurde die Mal-P mit einer Gesamtausbeute von 1.6% und einer spezifischen Aktivität von 8.3 Umg^{-1} (60°C) 573-fach angereichert (Tabelle 9). Nach dem letzten Reinigungsschritt zeigte sich auf dem SDS-Gel nur eine Bande (Abbildung 10).

Tabelle 9 Reinigung der Mal-P aus *A. fulgidus* Stamm 7324. Die Enzymaktivität wurde bei 60°C im diskontinuierlichen Testsystem als Bildung von Glucose-1-Phosphat aus 0.75 mM Maltoheptaose in 50 mM KPP pH 6.8 mit 2.5 mM MgCl_2 gemessen.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (Umg^{-1})	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Zellfreier Extrakt	2002	30	0.015	100	1
SP-Sepharose	40.8	1.8	0.045	6.1	3
Q-Sepharose	11.4	2.3	0.2	7.6	13
Phenyl-Sepharose	2.3	1.1	0.49	3.7	33
RESOURCE Eth	0.5	1	2	3.3	133
Bioprep SE 1000/17	0.03	0.25	8.3	1.6	573

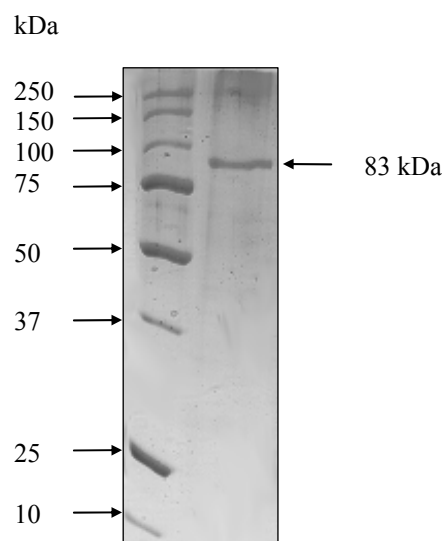


Abbildung 10 Reinigung der Mal-P aus *A. fulgidus* Stamm 7324. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau von gereinigter Mal-P. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande der Mal-P. *Spur 1*: Molekulargewichtsstandard; *Spur 2*: 2 μg Protein nach Bioprep SE 1000/17.

Biochemische Charakterisierung. Das apparente native Molekulargewicht der Mal-P von *A. fulgidus* Stamm 7324 wurde mit 350 kDa, das der Untereinheit mit 83 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine homotetramere Struktur des Proteins. Die N-terminale Aminosäuresequenz (24 Aminosäuren) der Untereinheit der Mal-P wurde bestimmt mit: METVVNXIKSKLPENLEGLLDLAY. Ein Alignment der N-terminalen Aminosäuresequenz der Mal-P von *A. fulgidus* Stamm 7324 mit allen bekannten archaellen Mal-P bzw. eng verwandten Glycogen-Phosphorylasen (Abbildung 11) zeigte den höchsten Grad an

Übereinstimmung mit der Mal-P aus *Thermococcus litoralis* (23 Aminosäuren identisch, Xavier et al. 1999). Mit der N-terminalen Aminosäuresequenz der Mal-P von *A. fulgidus* Stamm 7324 konnte kein homologer ORF im Genom des nahe verwandten Typstamms *A. fulgidus* Stamm VC16 identifiziert werden.

```

Archaeoglobus fulgidus Stamm 7324  M----ETVVNXIKSKLPENLEGLLDLAY
Thermococcus litoralis             M----ETVVNQIKSKLPENLEGLLDLAY
Thermococcus zilligii              MADVSHTVENLIRAKLYPLENLAE---
Sulfolobus solfataricus            M---IVSVTAEIGLDIGQNFACGLGILE
Methanocaldococcus jannaschii     M---KPTAYFCMEFATHQPIKTYAGGL-

```

Abbildung 11 Alignment der N-terminalen Aminosäuresequenzen der MalP aus *A. fulgidus* Stamm 7324 mit Mal-P sowie mit Glycogen-Phosphorylasen aus Archaea. Das Alignment wurde mit Hilfe von ClustalX (Thompson et al. 1997) mit Standardeinstellungen erstellt. Dunkle Hinterlegungen zeigen identische Reste, helle Hinterlegungen konservierte Substitutionen an. NCBI Accession-Nummern: *T. litoralis* AAD28735, *T. zilligii* CAC44972, *S. solfataricus* NP_343877, *M. jannaschii* NP_248641.

Das für den Mechanismus der meisten beschriebenen Phosphorylasen notwendige Pyridoxalphosphat konnte auch bei der Mal-P von *A. fulgidus* Stamm 7324 nachgewiesen werden. Das Enzym enthielt 0.8 mol Pyridoxalphosphat pro mol nativem Protein.

Die Abhängigkeit der Raten der Mal-P von Maltooligodextrinen und Phosphat zeigte eine Michaelis-Menten-Kinetik. Die Mal-P akzeptierte Maltooligodextrine von 3-17 Glucoseeinheiten (Abbildung 12). Stärke und Glycogen wurden ebenfalls umgesetzt.

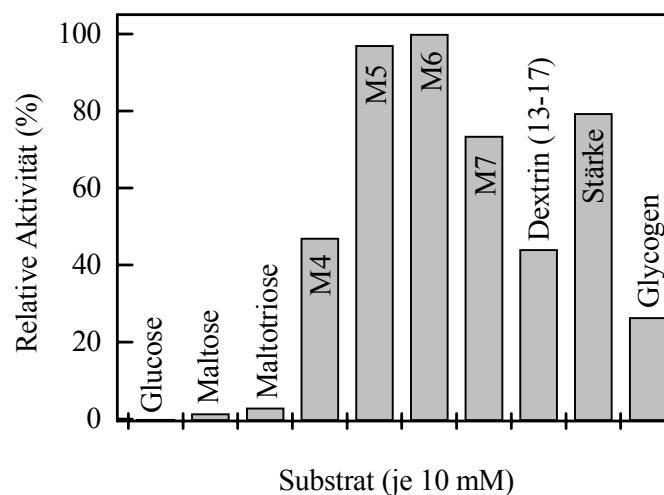


Abbildung 12 Substratspektrum der Mal-P aus *A. fulgidus* Stamm 7324. Die relative Aktivität von 100% entspricht 34 U mg^{-1} .

Die höchste Aktivität zeigte das Enzym mit Maltohexaose, das gereinigte Enzym hatte eine spezifische Aktivität von 34 U mg^{-1} und einen K_m -Wert von 1 mM für Maltohexaose (50°C). Die höchste katalytische Effizienz hatte das Enzym dagegen mit Maltoheptaose, hier betrug die spezifische Aktivität 25 U mg^{-1} und der apparente K_m -Wert 0.47 mM (Abbildung 13). Stärke wurde mit relativ hoher Rate, aber höherem K_m -Wert umgesetzt, gleiches galt für Glycogen (Tabelle 10).

Tabelle 10 Kinetische Konstanten der Mal-P aus *A. fulgidus* bestimmt bei 80°C und pH 5.8 im diskontinuierlichen Testsystem.

	Maltohexaose	Maltoheptaose	Glycogen	Stärke
V_{\max} (Umg ⁻¹)	34	25	14	30
K_m (mM)	1	0.47	42.9	4.9
V_{\max}/K_m	34	53.2	0.33	6.12

Der K_m -Wert für Phosphat bei der Maltoheptaose-abhängigen Reaktion betrug 7.2 mM mit einem V_{\max} -Wert von 25 Umg⁻¹ (Abbildung 13). Das Enzym akzeptiert neben Phosphat keine anderen Phosphoryldonoren, getestet wurden AMP, ADP, ATP, Pyrophosphat und Pyridoxalphosphat.

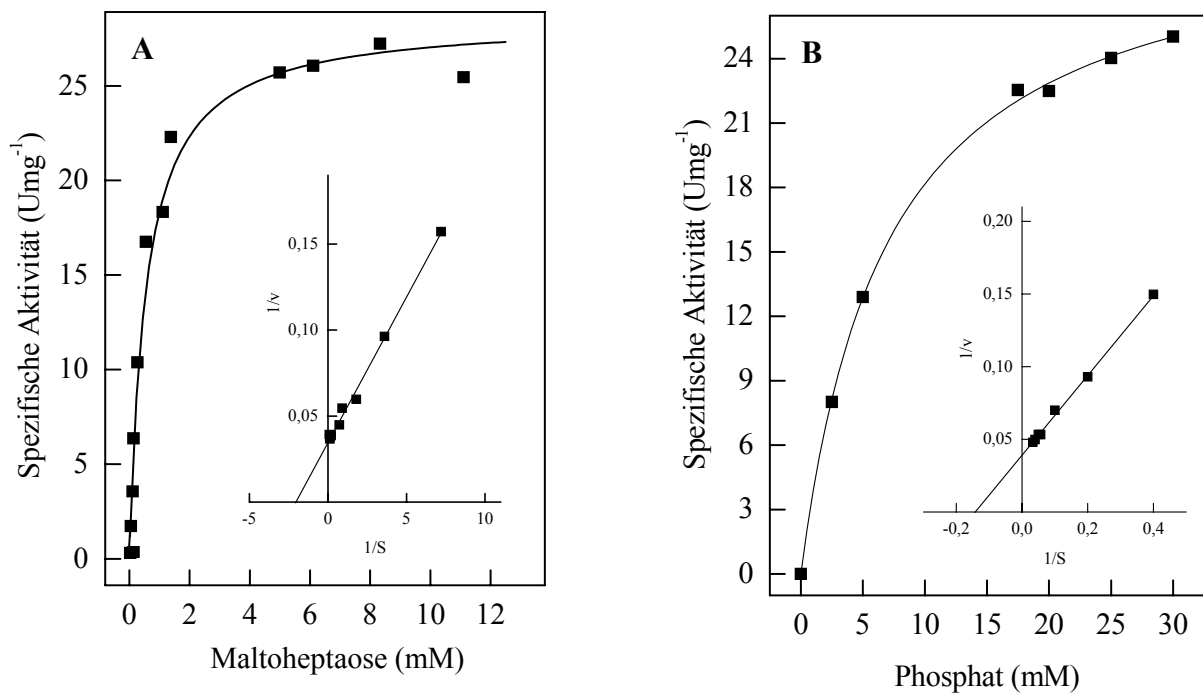


Abbildung 13 Abhängigkeit der Aktivität der Mal-P aus *A. fulgidus* Stamm 7324 von der Konzentration an Maltoheptaose (A) und Phosphat (B). Die Inserts zeigen die Darstellung der Daten nach Lineweaver-Burk.

Dünnschichtchromatographische Experimente zeigten, dass das Enzym auch die Bildung von Maltooligosacchariden aus Glucose-1-Phosphat katalysierte (Abbildung 14).

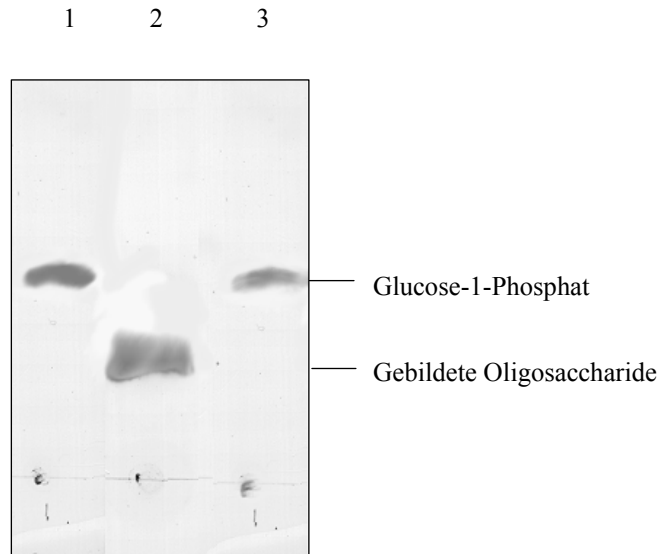


Abbildung 14 Reaktion der Mal-P aus *A. fulgidus* Stamm 7324 mit Glucose-1-Phosphat. Dünnschichtchromatographie auf NanoSilgur mit Butanol/Ethanol/Wasser als Laufmittel, entwickelt mit 5% H_2SO_4 und 15-minütiger Erhitzung auf $120^\circ C$. *Spur 1* Ansatz zum Zeitpunkt t_0 ; *Spur 2*: Ansatz nach Inkubation bei $80^\circ C$ für 45 Minuten; *Spur 3*: Kontrollansatz mit Glucose-1-Phosphat ohne Protein nach Inkubation bei $80^\circ C$.

Der Effekt von typischen Inhibitoren (AMP, Glucose, Ammoniumsulfat, Natriumsulfat, Cyclodextrine, Vanadat und Molybdat) und Aktivatoren (ADP, ATP) eukaryontischer Phosphorylasen in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Aktivität der Mal-P wurde an der Umsetzung von Maltohexaose und Phosphat getestet. Keine der getesteten Substanzen hatte einen signifikanten Einfluss auf die Rate der Mal-P.

Das pH-Optimum des Enzyms lag bei pH 5.8. Das Temperaturoptimum der Mal-P lag bei $80^\circ C$ (Abbildung 15). Aus der Darstellung der Daten nach Arrhenius wurde eine Aktivierungsenergie von 53.6 kJmol^{-1} ermittelt. Die Thermostabilität der Mal-P wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten getestet. Bis $80^\circ C$ wurde kein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet. Bei $95^\circ C$ betrug die Halbwertszeit des Enzyms noch 350 Minuten.

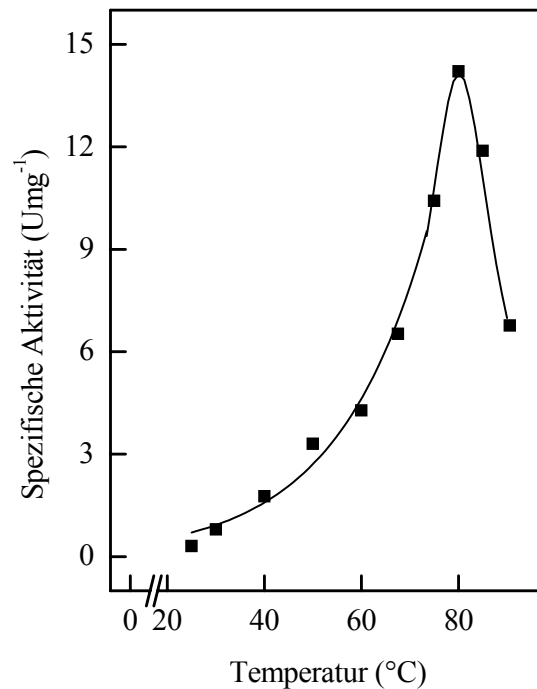


Abbildung 15 Abhängigkeit der Aktivität der Mal-P aus *A. fulgidus* Stamm 7324 von der Temperatur.

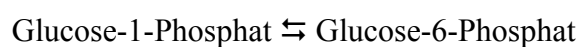
Die molekularen, katalytischen und thermophilen Eigenschaften der Mal-P aus *A. fulgidus* Stamm 7324 sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11 Molekulare und katalytische Eigenschaften der Mal-P aus *A. fulgidus* Stamm 7324.

Parameter	Mal-P
Apparente molekulare Masse (kDa)	
Nativ	350
Untereinheit	83
Oligomere Struktur	α_4
pH-Optimum	5.8
Temperaturoptimum (°C)	80
Arrhenius-Aktivierungsenergie (kJmol ⁻¹ , 30-80°C)	53.6
Apparenter K_m (mM) für P _i bei 50°C mit Maltoheptaose	7.2

5.7.4 Phosphoglucomutase (PGluM)

Die PGluM katalysiert folgende Reaktion:



Diese Reaktion ist von der Anwesenheit des Kofaktors Glucose-1,6-Bisphosphat abhängig.

Reinigung. Die PGluM wurde aus Stärke-gewachsenen Zellen von *A. fulgidus* Stamm 7324 bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die Reinigung erfolgte über fünf

säulenchromatographische Schritte. Dabei wurde die PGluM mit einer Gesamtausbeute von 0.1% und einer spezifischen Aktivität von 4.4 U mg^{-1} (50°C) 122-fach angereichert (Tabelle 12). Nach dem letzten Reinigungsschritt zeigte sich auf dem SDS-Gel nur eine Bande (Abbildung 16).

Tabelle 12 Reinigung der PGluM aus *A. fulgidus* Stamm 7324. Die Enzymaktivität wurde bei 50°C im kontinuierlichen Testsystem als Bildung von Glucose-6-Phosphat in 50 mM HEPES pH 8.2 mit 5mM MgCl_2 , 1 mM Glucose-1-Phosphat, 0.125 mM Glucose-1,6-Bisphosphat, 1 mM NADP^+ und 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase gemessen.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (U mg^{-1})	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Zellfreier Extrakt	1820	65.9	0.036	100	1
Q-Sepharose	240	16.8	0.07	25.5	1.9
Phenyl-Sepharose	6.9	0.81	0.117	1.2	3.25
RESOURCE Eth	0.95	0.69	0.866	1	24
Bioprep SE 1000/17	0.15	0.52	3.4	0.79	94.4
Uno Q1	0.015	0.066	4.4	0.1	122

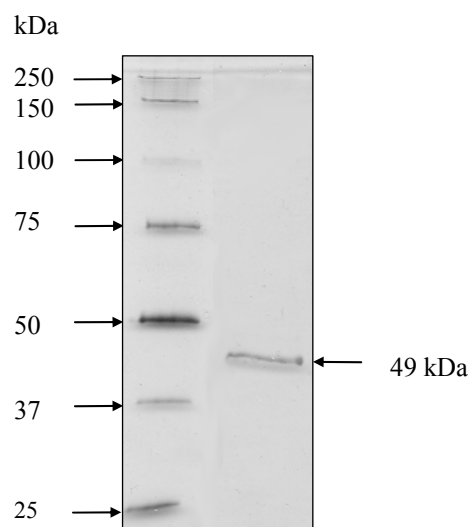


Abbildung 16 Reinigung der PGluM aus *A. fulgidus* Stamm 7324. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Silbernitrat von gereinigter Phosphoglucomutase. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande der Phosphoglucomutase. *Spur 1*: Molekulargewichtsstandard; *Spur 2*: 0.3 μg Protein nach UNO Q1.

Biochemische Charakterisierung. Das apparente native Molekulargewicht der PGluM von *A. fulgidus* Stamm 7324 wurde mit 200 kDa, das der Untereinheit mit 49 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine homotetramere Struktur des Proteins. Die N-terminale Aminosäuresequenz (15 Aminosäuren) der Untereinheit der PGluM wurde bestimmt mit: M(X)KIFGTFGVRGIANE. Abbildung 17 zeigt ein Alignment der N-terminalen Aminosäuresequenz mit den bekannten bereits gereinigten sowie putativen archaeellen

PGLuM. Die N-terminalen Aminosäuresequenz ist denen der Homologen aus der Familie der *Thermococcales* sehr ähnlich. Mit der N-terminalen Aminosäuresequenz konnte kein homologer ORF in *A. fulgidus* Stamm VC16 identifiziert werden.

<i>Archaeoglobus fulgidus</i> Stamm 7324	M--XKIFGTFG-VRGIANE
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	M--GKLFGTFG-VRGIANE
<i>Pyrococcus abyssi</i>	M--GKLFGTFG-VRGIANE
<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	M--GKLFGTFG-VRGIANE
<i>Methanococcus mazei</i>	M---ELFGTNG-VRGIANE
<i>Picrophilus torridus</i>	M---KYFGTNG-IRGIPNE
<i>Thermoplasma volcanium</i>	MAVERLFGTNG-IRGIP--
<i>Methanococcus maripaludis</i>	M---KLFGTSG-IRMKNLD
<i>Aeropyrum pernix</i>	M---S--GLAGNVRLFGTA
<i>Haloarcula marismortui</i>	M---DFRGGPT-QRAVMTQ

Abbildung 17 Alignment der N-terminalen Aminosäuresequenzen der PGLuM aus *A. fulgidus* Stamm 7324 und archaeellen Phosphoglucomutasen aus Archaea. Das Alignment wurde mit Hilfe von ClustalX (Thompson et al. 1997) mit Standardeinstellungen erstellt. Dunkle Hinterlegungen zeigen identische Reste, helle Hinterlegungen konservierte Substitutionen an. NCBI Accession-Nummern: *Aeropyrum pernix* BAA81448, *Haloarcula marismortui* YP_137073, *Methanococcus maripaludis* CAF30633, *Methanosarcina mazei* Göl NP_633545, *Picrophilus torridus* AAT43751, *Pyrococcus abyssi* CAB50141, *Pyrococcus horikoshii* BAA30310, *Thermococcus kodakaraensis* AB126241.1, *Thermoplasma volcanium* NP_111139.

Das pH-Optimum des Enzyms lag bei pH 8.2. Eine Vorinkubation mit Cystein, Histidin oder Imidazol (je 5, 10 oder 20 mM) führte, wie für PGLuM aus Bacteria und Eukarya beschrieben, zu einer Aktivierung. Den stärksten Effekt hatte die Zugabe von 20 mM Histidin. Daher wurden alle Proben des gereinigten Enzyms mit 20 mM Histidin versetzt.

Die kinetischen Eigenschaften der PGLuM wurden bei 80°C analysiert. Der apparente K_m - und V_{max} -Wert wurde in Richtung der Glucose-6-Phosphat-Bildung bestimmt, die Reaktion folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik. Der K_m -Wert für Glucose-1-Phosphat wurde mit 0.49 mM und der V_{max} -Wert mit 32 Umg^{-1} bestimmt (Abbildung 18).

Die spezifische Aktivität der PGLuM aus *A. fulgidus* Stamm 7324 war abhängig vom Kofaktor Glucose-1,6-Bisphosphat. Die Abhängigkeit der Rate von der Kofaktor-Konzentration folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik mit einem K_m -Wert von 34 μM . Die PGLuM benötigt für ihre Aktivität divalente Kationen. Für Mg^{2+} wurde eine Michaelis-Menten-Kinetik gezeigt. Der apparente K_m -Wert betrug 0.052 mM.

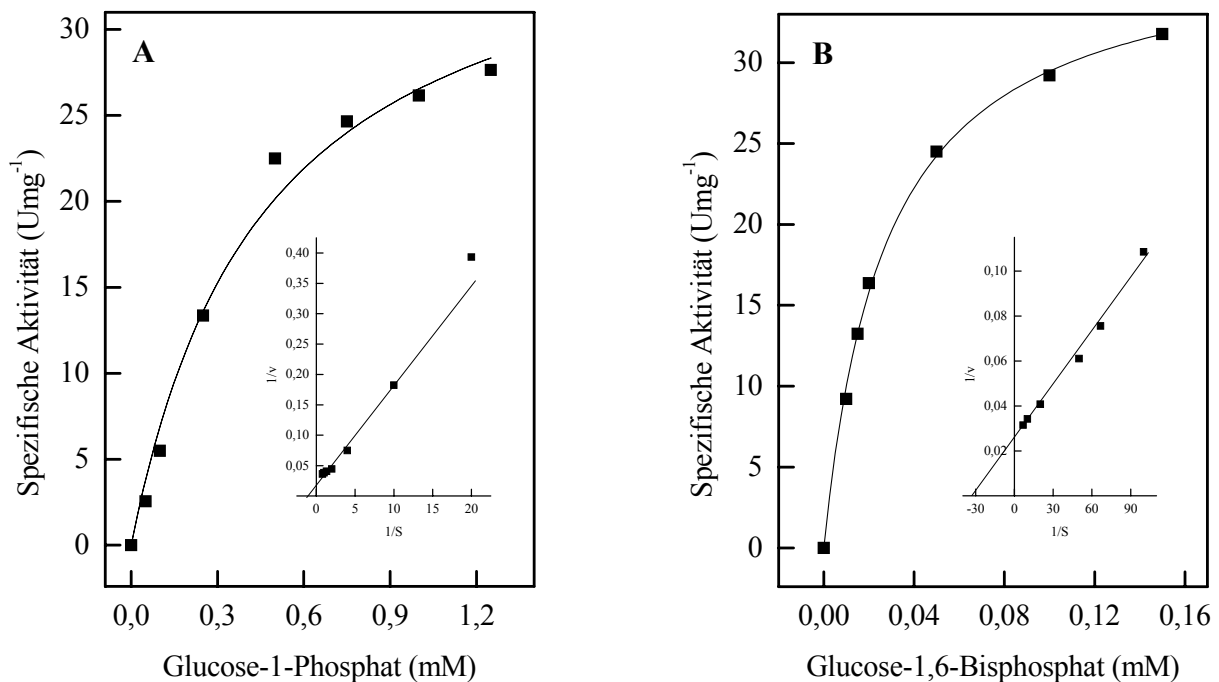


Abbildung 18 Abhängigkeit der Aktivität der PGluM aus *A. fulgidus* Stamm 7324 von der Konzentration an Glucose-1-Phosphat (A) und des Kofaktors Glucose-1,6-Bisphosphat (B) bei 50°C. Die Inserts zeigen die Darstellung der Daten nach Lineweaver-Burk.

Mit Hilfe von dünn-schichtchromatographischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Enzym auch die Umwandlung von Glucose-6-Phosphat in Glucose-1-Phosphat katalysiert. Das Enzym zeigte zusätzlich zur Phosphoglucomutase-Aktivität keine Aktivität mit Mannose-6-Phosphat.

Von PGluM aus Bacteria und Eukarya ist bekannt, dass Vanadat als Phosphatanalogon die Enzymaktivität hemmt. Auch die Aktivität der PGluM aus *A. fulgidus* Stamm 7324 ließ sich mit Vanadat hemmen. Die Zugabe von 80 μM Vanadat führte zu einer vollständigen Hemmung des Enzyms, 30 μM Vanadat führten zu einer Hemmung von 50%.

Das Temperaturoptimum der PGluM lag bei 81°C. Die Darstellung der Daten nach Arrhenius ergab eine Aktivierungsenergie von 78,9 kJmol⁻¹. Die Thermostabilität der PGluM wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten getestet. Bei Inkubation bei 80°C ohne MgCl₂ wurde ein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet, die Halbwertszeit betrug 30 Minuten. Durch Zugabe von 5 mM MgCl₂ konnte eine Stabilisierung des Enzyms herbeigeführt werden, so dass bei einer Inkubation über 120 Minuten kein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet wurde.

Die molekularen, katalytischen und thermophilen Eigenschaften der PGluM aus *A. fulgidus* Stamm 7324 sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13 Molekulare und katalytische Eigenschaften der PGLuM aus *A. fulgidus* Stamm 7324.

Parameter	PgluM
Apparente molekulare Masse (kDa)	
Nativ	200
Untereinheit	49
Oligomere Struktur	α_4
pH-Optimum	8.2
Temperaturoptimum (°C)	81
Arrhenius-Aktivierungsenergie (kJmol ⁻¹ , 30-80°C)	78.9
Apparenter V_{\max} (Umg ⁻¹) bei 80°C	
Glucose-1-Phosphat	32
Apparenter K_m (mM) bei 80°C	
Glucose-1-Phosphat	0.49
MgCl ₂	0.052
Apparenter K_m (mM) des Kofaktors bei 80°C	
Glucose-1,6-Bisphosphat	0.034
50%-Hemmung durch Vanadat (mM)	0.03

5.8 Reinigung und Charakterisierung der ADP-abhängigen Glucokinase, dem ersten Enzym des modifizierten Embden-Meyerhof-Weges aus *A. fulgidus* Stamm 7324

Im Folgenden wird die Reinigung und Charakterisierung des ersten Enzyms des modifizierten Embden-Meyerhof-Weges, einer ADP-abhängige Glucokinase (ADP-GLK), beschrieben. Das gereinigte Enzym wurde in Bezug auf die katalytischen Eigenschaften, Temperaturoptima, Thermostabilität und auf den Einfluss von Kationen biochemisch charakterisiert.

Reinigung. Die ADP-GLK wurde aus Stärke-gewachsenen Zellen von *A. fulgidus* Stamm 7324 bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die Reinigung erfolgte in sechs säulenchromatographischen Schritten. Dabei wurde die ADP-GLK mit einer Gesamtausbeute von 3.6% und einer spezifischen Aktivität von 59 Umg⁻¹ (55°C) ca. 600-fach angereichert (Tabelle 14). Nach dem letzten Reinigungsschritt zeigte sich auf dem SDS-Gel nur eine Bande (Abbildung 19).

Tabelle 14 Reinigung der ADP-GLK aus *A. fulgidus* Stamm 7324. Die Enzymaktivität wurde bei 55°C im kontinuierlichen Testsystem gemessen.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spezifische Aktivität (Umg ⁻¹)	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Zellfreier Extrakt	1673	164	0.098	100	1
Q-Sepharose	66.2	126	1.9	76.8	19.4
Phenyl-Sepharose	11.4	51.3	4.5	31.3	45.8
Superdex 200	2.9	25.2	8.5	15.4	86.8
Hydroxylapatit CHT-I	0.2	7.1	30.4	4.3	310
Uno Q1	0.2	6.7	35.2	4.0	359
RESOURCE Iso	0.12	5.9	58.9	3.6	600

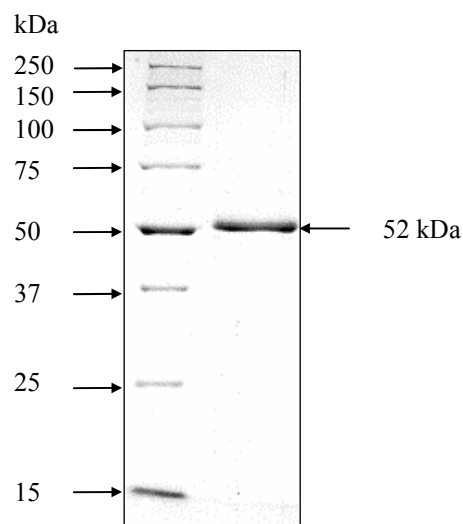


Abbildung 19 Reinigung der ADP-GLK aus *A. fulgidus* Stamm 7324. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau von gereinigter ADP-GLK. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande der ADP-GLK. *Spur 1*: Molekulargewichtsstandard; *Spur 2*: 2 µg ADP-GLK.

Biochemische Charakterisierung. Das apparente native Molekulargewicht der ADP-GLK von *A. fulgidus* Stamm 7324 wurde mit 50 kDa bestimmt, das der Untereinheit mit 52 kDa. Die Ergebnisse sprechen für eine monomere Struktur des Proteins. Die N-terminale Aminosäuresequenz (42 Aminosäuren) der Untereinheit der ADP-GLK wurde bestimmt mit: MKEFLKDRIRLWKSLYVNALENALNAVPNVKGVLLAYNTNID. Ein Alignment der N-terminalen Aminosäuresequenz der ADP-GLK von *A. fulgidus* Stamm 7324 (Abbildung 20) zeigte den höchsten Grad an Übereinstimmung mit der ADP-GLK aus *Thermococcus litoralis* (40 Aminosäuren identisch). Eine wesentlich geringe Übereinstimmung wurde mit der Glucokinase aus *Pyrococcus furiosus* und der bifunktionellen ADP-GLK/ADP-PFK aus *Methanococcus jannaschii* festgestellt. Mit der N-terminalen Aminosäuresequenz der ADP-

GLK von *A. fulgidus* Stamm 7324 konnte kein ORF im Genom des nahe verwandten Typstamms VC16 identifiziert werden.

<i>Archaeoglobus fulgidus</i> Stamm 7324	MKEFLKDRIRLWKRLYVNAFENALNAVNVKGVLLAYNTNID
<i>Thermococcus litoralis</i>	MKESLKDRIRLWKRLYVNAFENALNAVNVKGVLLAYNTNID
<i>Pyrococcus furiosus</i>	MPT-----WEELYKNAIEKAIKSVKVKGVLLGYNTNID
<i>Methanococcus jannaschii</i> (PFK/GLK)	M-----CDIME--IKKFIETIKGTK-LFTAAYNTNVD

Abbildung 20 Alignment der N-terminalen Aminosäuresequenzen der ADP-GLK aus *A. fulgidus* Stamm 7324 mit ADP-GLK aus anderen hyperthermophilen Archaea. Das Alignment wurde mit Hilfe von ClustalX (Thompson et al. 1997) mit Standardeinstellungen erstellt. Dunkle Hinterlegungen zeigen identische Reste, helle Hinterlegungen konservierte Substitutionen an. NCBI Accession-Nummern der verwendeten Proteine: *Thermococcus litoralis* JC7551, *Pyrococcus furiosus* NP_578041, *Methanococcus jannaschii* Q58999.

Die Abhängigkeit des Enzyms von ADP und Glucose folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die apparenten K_m -Werte für ADP und Glucose wurden mit 0.07 und 0.78 mM bestimmt (Abbildung 21). Der apparente V_{max} -Wert betrug 59 Umg^{-1} (50°C). Das pH-Optimum wurde mit pH 7.6 bestimmt, bei pH 5.5 und 9.5 waren noch 50% der Aktivität vorhanden.

Es wurden verschiedene Phosphoryldonoren und Zucker als Substrate für die ADP-GLK getestet. ADP konnte nicht durch ATP, AMP, PP_i , Acetylphosphat oder CDP, UDP und GDP ersetzt werden. Das Enzym war hoch spezifisch für Glucose; nur Glucosamin (50% der Aktivität) und 2-Desoxyglucose (2% der Aktivität) wurden akzeptiert. Fructose, Fructose-6-Phosphat, Mannose, Galactose und Xylose wurden nicht phosphoryliert. Diese Ergebnisse definieren das Enzym als ADP-GLK und schließen eine bifunktionelle Aktivität als Glucokinase mit ADP-abhängiger 6-Phosphofructokinase-Aktivität aus.

Die ADP-GLK benötigte divalente Kationen, die höchste Aktivität wurde mit Mn^{2+} (100%) beobachtet, welches durch Mg^{2+} (60%) und Ca^{2+} (55%) ersetzt werden konnte. Weniger effektiv waren Ni^{2+} (30%), Co^{2+} (25%), Cu^{2+} und Zn^{2+} (beide 15%).

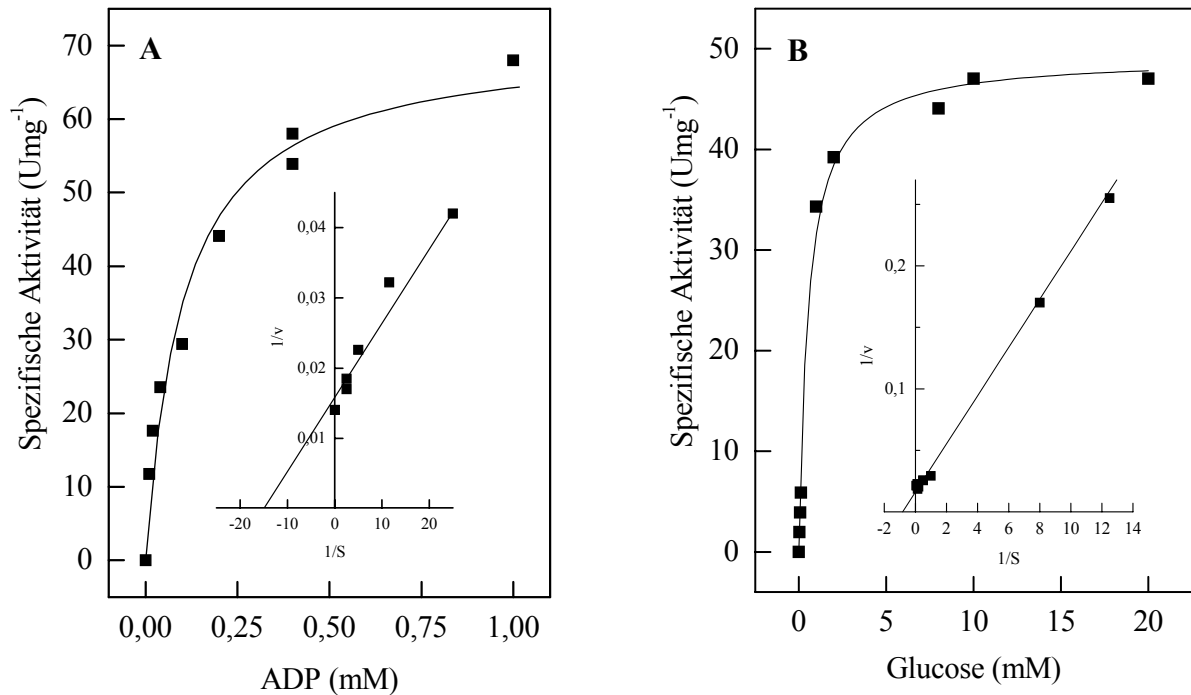


Abbildung 21 Aktivität der ADP-abhängigen Glucokinase bei 50°C. Abhängigkeit der Rate von **A** der ADP-Konzentration und **B** der Glucose-Konzentration. Die Inserts zeigen die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk.

Das Temperaturoptimum der ADP-GLK lag bei 83°C (Abbildung 22). Die Darstellung der Daten nach Arrhenius ergab einen linearen Bereich zwischen 30°C und 83°C, daraus wurde eine Aktivierungsenergie von 39 kJmol⁻¹ ermittelt. Die Thermostabilität der ADP-GLK wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten getestet. Bei 80°C wurde kein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet. Bei 90°C betrug die Halbwertszeit des Enzyms 80 Minuten. Bei 100°C wurde ein vollständiger Verlust der Aktivität nach 30 Minuten Inkubation beobachtet. Die Zugabe von 1 M (NH₄)₂SO₄ oder 1 M NaCl stabilisierte die ADP-GLK signifikant gegen Hitzeinaktivierung (Abbildung 22). In Gegenwart von Ammoniumsulfat, welches am effektivsten stabilisierte, konnten nach 120 Minuten Inkubation bei 100°C noch 70% der Aktivität gemessen werden.

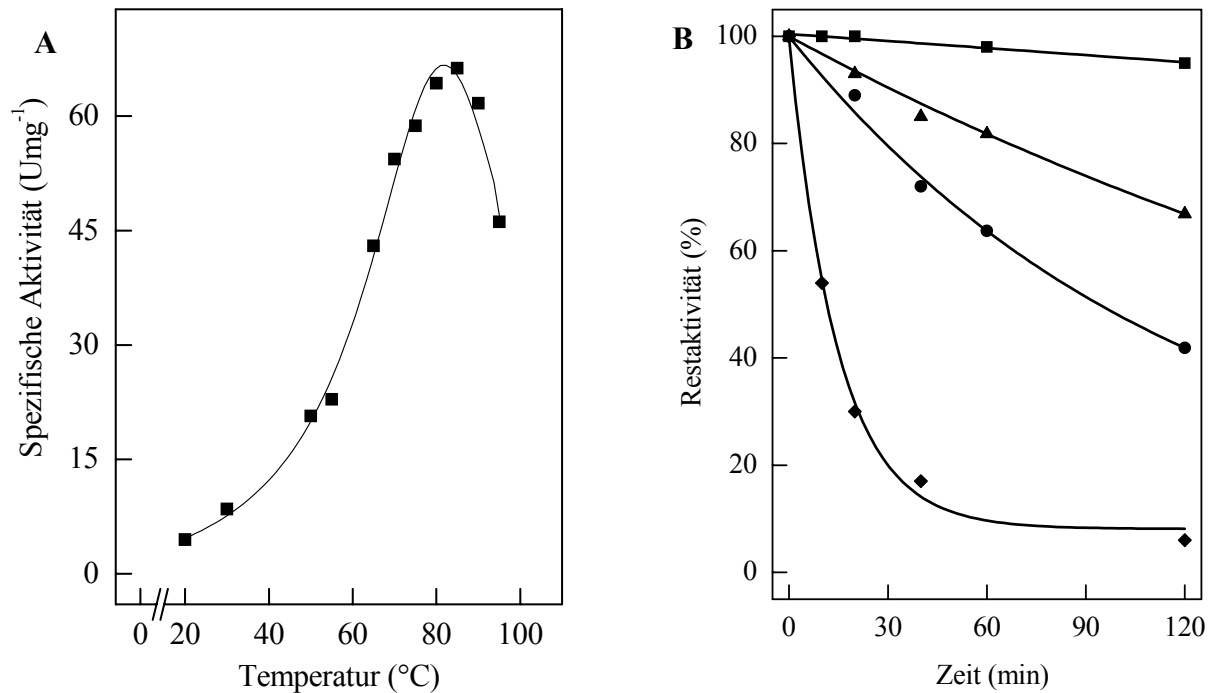


Abbildung 22 Temperaturoptimum (A) und Thermostabilität (B) der ADP-GLK aus *A. fulgidus* Stamm 7324. Für die Bestimmung der Thermostabilität wurde das Enzym in der Gegenwart oder Abwesenheit von Salzen (1 M) bei verschiedenen Temperaturen inkubiert: (■) 80°C, (♦) 100°C, (▲) 100°C mit 1 M (NH₄)₂SO₄, (●) 100°C mit 1 M NaCl. 100% Aktivität entsprechen 59 Umg⁻¹ bei 50°C.

Die molekularen, katalytischen und thermophilen Eigenschaften der ADP-GLK aus *A. fulgidus* Stamm 7324 sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15 Molekulare und katalytische Eigenschaften der ADP-GLK aus *A. fulgidus* Stamm 7324.

Parameter	ADP-GLK
Apparente molekulare Masse (kDa)	
Nativ	50
Untereinheit	52
Oligomere Struktur	α
pH-Optimum	7.6
Temperaturoptimum (°C)	83
Apparenter V_{\max} (Glucose, ADP) (Umg ⁻¹), 50°C	59
Apparenter K_m für ADP (mM)	0.07
Apparenter K_m für Glucose (mM)	0.78

6 Ergebnisse II: Charakterisierung Stärke-abbauender Enzyme aus geothermalen Habitaten

Weiterhin wurden für diese Dissertation Untersuchungen an thermophilen Stärke-umsetzenden Enzymen durchgeführt. Diese Enzyme gehören zur Glycosylhydrolase-Familie 13 (GH-13). Zu dieser Familie gehört die Mehrheit der Stärke-modifizierenden Enzyme, wie die klassischen α -Amylasen, aber auch Pullulanasen, α -1,6-Glucosidasen, verzweigende Enzyme, maltogene α -Amylasen, Neopullulanasen und Cyclodextrinasen (MacGregor et al. 2001). Trotz der Vielfalt der katalysierten Aktivitäten zeigen die Aminosäuresequenzen dieser Enzymfamilie vier hochkonservierte Regionen. Diese hochkonservierten Regionen wurden durch die Arbeitsgruppe Kristjansson (Prokaria, Reykjavik, Island) verwendet, um Gene Stärke-modifizierender Enzyme aus Umwelt-DNA und aus thermophilen Organismen geothermalen Habitats zu suchen. Ziel war es neue Enzyme der GH-13-Familie zu finden und sie auf biotechnologisch interessante Eigenschaften hin zu untersuchen. Insgesamt wurden sieben Gene in *E. coli* überexprimiert. Drei dieser Gene wurden dabei aus Umwelt-DNA isoliert, vier stammten aus verschiedenen Organismen. Die Benennung der isolierten Gene und damit der Proteine erfolgte mit der Abkürzung Amy („amylytisch“) und einer laufenden Nummer (Tabelle 16). Es handelte sich dabei um je ein Protein mit Pullulanase- bzw. Neopullulanase-Aktivität sowie um fünf verschiedene Proteine, die Cyclodextrinase-Aktivität zeigten. Die erhaltenen Proteine wurden gereinigt und in Bezug auf Substratspektren, Abhängigkeit der Aktivitäten von Kationen und thermophile Eigenschaften charakterisiert. Die Substratspektren wurden jeweils mit 0.5% (Amy92, Amy132) bzw. 1% (Amy1, Amy29, Amy89, Amy90, Amy98) verschiedener Poly- und Oligosaccharide untersucht. Von Substraten, mit denen mehr als 10% der maximalen Rate erreicht wurde, wurde die Abhängigkeit der Raten von der Substratkonzentration untersucht. Dabei zeigten alle Proteine eine Michaelis-Menten-Kinetik.

Tabelle 16 Übersicht über die untersuchten Proteine aus geothermalen Habitaten.

	Herkunft	Identität (%)	Putative Funktion	Hauptaktivität (diese Arbeit)
Amy1	Umwelt-DNA	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> (77%)	Cyclodextrinase	Cyclodextrinase
Amy29	Umwelt-DNA	<i>Synechocystis</i> sp.(56%)	Neopullulanase	Neopullulanase
Amy89	<i>Bacillus thermoleovorans</i> r805	<i>Thermus</i> sp. (95%)	Maltogene Amylase	Cyclodextrinase
Amy90	<i>Bacillus thermoleovorans</i> r805	<i>Thermus</i> sp. (95%)	Pullulanase	Pullulanase
Amy92	<i>Thermoactinomyces sacchari</i>	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> (65%)	Neopullulanase	Cyclodextrinase
Amy98	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i> (74%)	Maltogene Amylase	Cyclodextrinase
Amy132	Umwelt-DNA	<i>Bacillus stearothermophilus</i> (79%)	Neopullulanase	Cyclodextrinase

6.1 Amy90: Enzym mit Pullulanase-Aktivität aus *Bacillus thermoleovorans* r805

Expression und Reinigung. Ausgangspunkt der Untersuchungen war gereinigtes rekombinantes Protein, dessen His-Tag durch Enterokinasebehandlung entfernt wurde. Das Protein war bei +4°C und -20°C für mehrere Monate stabil.

Biochemische Charakterisierung. Das Enzym katalysierte die Umsetzung von Pullulan und Stärke. Verschiedene Poly- und Oligosaccharide (Amylose, Amylopektin, β -Cyclodextrin, Dextrin, Maltotriose, Xylan, Trehalose und Glycogen) wurden ebenfalls als Substrate getestet, nur mit Amylose und Trehalose konnte eine geringe Aktivität festgestellt werden (Abbildung 23). Der apparente K_m -Wert für Pullulan wurde mit 4.9 g/l bestimmt (Abbildung 23). Der apparente V_{max} -Wert betrug 25.5 Umg^{-1} (55°C).

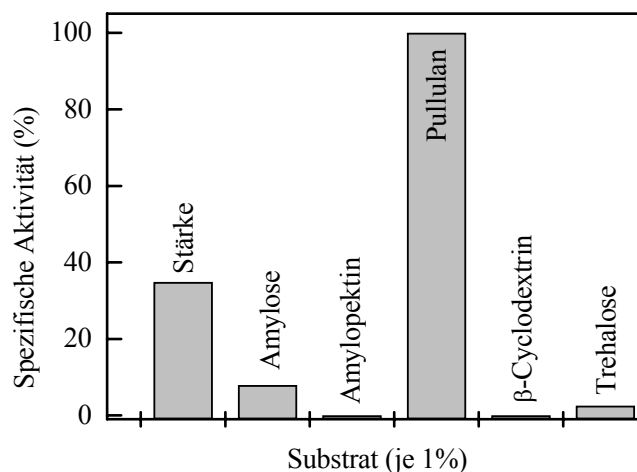


Abbildung 23 Substratspektrum von Amy90 bei 55°C. Es wurde je 1 % Substrat eingesetzt, 100% Aktivität entsprechen 21 Umg^{-1} .

Die Aktivität von Amy90 konnte durch die Zugabe von Calcium um 30% gesteigert werden. Im Gegensatz zu allen bekannten Pullulanasen, die durch Zugabe von EDTA vollständig gehemmt werden, führte eine Behandlung von Amy90 mit EDTA nur zu einer Verminderung der Aktivität um 40%. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das Enzym Calcium sehr fest gebunden hat. Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} und Mn^{2+} hemmten das Enzym bereits in geringen Konzentrationen (unter 0.1 mM).

Das Temperaturoptimum von Amy90 lag bei 55°C. Die Thermostabilität von Amy90 wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten getestet. Bei Inkubation bei 55°C und 65°C wurde kein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet. Die Inkubation bei 70°C führte zu einem starken Aktivitätsverlust, die Halbwertszeit betrug dann nur noch 10 Minuten. Die Zugabe von 5 mM CaCl_2 erhöhte die Halbwertszeit auf 20 Minuten. Wurde der N-terminale Tag nicht durch Enterokinase entfernt, war die Thermostabilität bereits bei 55°C deutlich reduziert.

Die molekularen, katalytischen und thermophilen Eigenschaften von Amy90 sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Die Daten sprechen dafür, dass es sich bei Amy90 um eine Pullulanase Typ II handelt.

Tabelle 17 Molekulare und katalytische Eigenschaften von Amy90.

Parameter	Amy90
Apparente molekulare Masse (kDa)	
Untereinheit	80
Kalkuliert	80.2
pH-Optimum	6.3
Temperaturoptimum (°C)	65
Arrhenius-Aktivierungsenergie (kJmol ⁻¹)	41.8
Apparenter V_{\max} (Pullulan) (Umg ⁻¹)	25.5
Apparenter K_m für Pullulan (g/l)	4.9

6.2 Amy29: Enzym mit Neopullulanase-Aktivität

Expression und Reinigung. Amy29 wurde ohne Reinigungs-Tag in den Vector pBTac1 kloniert. Nach Transformation des Plasmids in *E. coli* BL21(DE3)-RIL codon plus wurde das Gen exprimiert. Aufgrund der geringen Expressionsrate war eine Reinigung über zwei Hitzeschritte bei 45°C und 55°C, eine Q-Sepharose-Säule, eine SP-Sepharose-Säule, eine Superdex 200-Gelfiltrations-Säule, einer Hydroxylapatit-Säule und einer Bioprep SE 1000/17-Gelfiltrations-Säule bis zur apparenten Homogenität notwendig. Das Enzym konnte bei +4°C ohne Aktivitätsverlust für mehrere Wochen gelagert werden, Lagerung bei -20°C führte zu einem Aktivitätsverlust. Das Enzym konnte effektiv durch Zugabe von 5 mM DTE stabilisiert werden.

Biochemische Charakterisierung. Das Enzym katalysierte die Umsetzung verschiedener Polysaccharide in Maltooligosaccharide (Abbildung 24). Pullulan wurde dabei deutlich bevorzugt, kurzkettige Zucker mit weniger als sechs Glucoseeinheiten oder zyklische Zucker wurden nicht verwertet. Das Enzym spaltete nur α -1,4-glycosidische Bindungen. Der apparente K_m -Wert für Pullulan wurde mit 4.5 g/l bestimmt (Abbildung 24). Der apparente V_{\max} -Wert betrug 25 Umg⁻¹ (65°C).

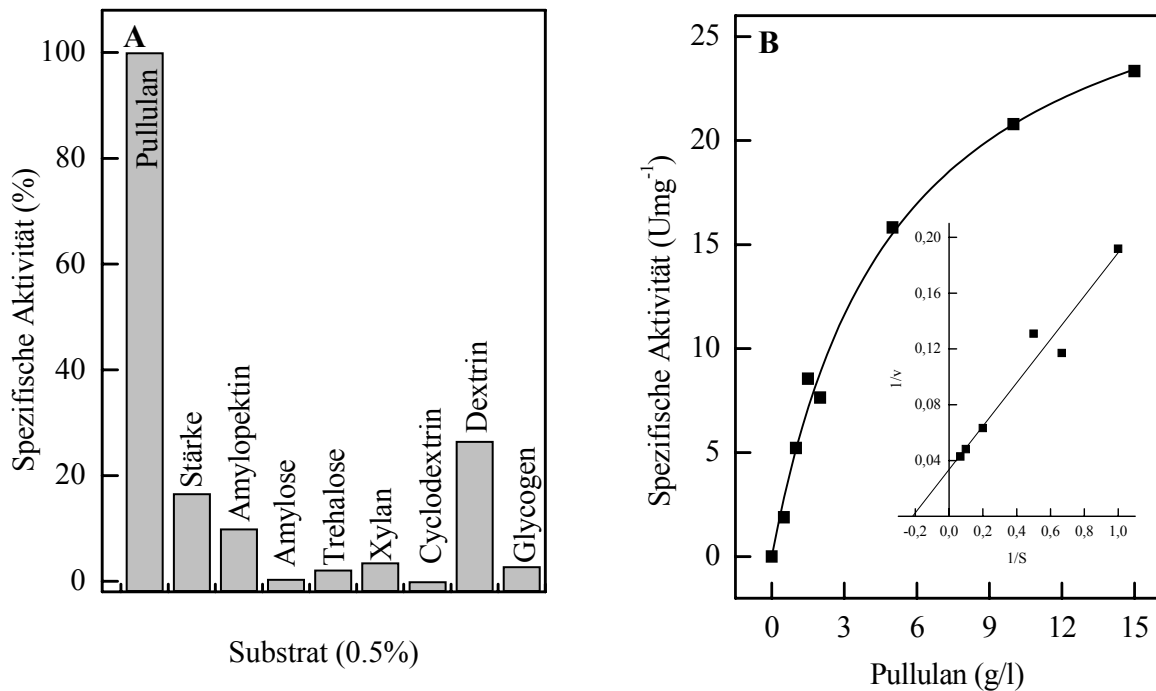


Abbildung 24 Aktivität von Amy29 bei 65°C in Abhängigkeit vom Substrat. **A** Substratspektrum mit je 5 g/l Substrat, 100% Aktivität entsprechen 15 Umg⁻¹ **B** Abhängigkeit der Rate von der Pullulan-Konzentration. Das Insert zeigt die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk.

Dünnschichtchromatographische Experimente zeigten, dass Pullulan ausschließlich zu Panose (6- α -Glycosylmaltose) abgebaut wird, was das Enzym als eine Neopullulanase definiert. Es konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Produkt um Isopanose oder Maltotriose handelt. Die Zugabe von Mn²⁺ führte zu einer Verdreifachung der Aktivität von Amy29. Ca²⁺ hatte keinen besonderen Effekt auf das Enzym. Eine Behandlung mit EDTA führte nicht zu einer Verminderung der Aktivität. Cu²⁺ in geringen Konzentrationen (unter 0.1 mM) führte zu einer vollständigen Hemmung von Amy29.

Das pH-Optimum wurde mit pH 5.3 bestimmt. Das Temperaturoptimum von Amy29 lag bei 65°C. Die Thermostabilität von Amy29 wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten getestet. Bei 65°C wurde kein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet. Bei 80°C betrug die Halbwertszeit des Enzyms 480 Minuten, bei 90°C nur noch 10 Minuten. Die Zugabe von 1 M (NH₄)₂SO₄, 1 M NaCl oder 5 mM CaCl₂ konnte das Enzym nicht stabilisieren.

Die molekularen, katalytischen und thermophilen Eigenschaften von Amy29 sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Die Daten sprechen dafür, dass es sich bei Amy29 um eine Neopullulanase handelt.

Tabelle 18 Molekulare und katalytische Eigenschaften von Amy29.

Parameter	Amy29
Apparente molekulare Masse (kDa)	
Nativ	90
Untereinheit	56
Kalkuliert	57.8
Oligomere Struktur	α_2
pH-Optimum	5.3
Temperaturoptimum (°C)	65
Arrhenius-Aktivierungsenergie (kJmol ⁻¹)	144
Apparenter V_{\max} (Pullulan) (65°C, Umg ⁻¹)	25
Apparenter K_m für Pullulan (g/l)	4.5

6.3 Enzyme mit Cyclodextrinase-Aktivität

Die Eigenschaften der Proteine mit Cyclodextrinase-Aktivität sind in Tabelle 22 zusammengefasst. Im Folgenden werden die Ergebnisse für die einzelnen Proteine beschrieben.

6.3.1 Amy1: Cyclodextrinase

Expression und Reinigung. Das Protein wurde über einen Hitzeschritt bei 50°C, an einer Nickel-NTA-Säule und einer Superdex 200-Gelfiltrationssäule bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Eine Behandlung mit Enterokinase war nicht nötig, da sich nach Inkubation des gereinigten Proteins bei 30°C der N-terminale His-Tag vom Protein löste. Das Protein war bei +4°C und -20°C für mehrere Monate stabil.

Biochemische Charakterisierung. Das Enzym katalysierte die Umsetzung von Stärke sowie von α - und β -Cyclodextrin. Andere Zucker wurden nicht umgesetzt. Der Vergleich von V_{\max}/K_m der Substrate als Maß für die katalytische Effizienz zeigte, dass α -Cyclodextrin das bevorzugte Substrat war (Tabelle 19).

Tabelle 19 Kinetische Konstanten von Amy1. Die Bestimmung erfolgte bei 55°C und pH 6 im diskontinuierlichen Test.

	Stärke	α -Cyclodextrin	β -Cyclodextrin
V_{\max} (Umg ⁻¹)	47.5	43	34
K_m (g/l)	6	4	8
V_{\max}/K_m	7.9	10.8	4.3

Dünnschichtchromatographische Experimente zeigten, dass bei der Umsetzung von Stärke Glucose und Maltose als Produkte gebildet werden. Mit Cyclodextrinen als Substrat wurden

die korrespondierenden Maltooligosaccharide sowie deren Abbauprodukte Glucose, Maltose und Maltotriose gebildet. Für Amy1 konnte eine Transglycosylierungsaktivität gezeigt werden: Aus Glucose und Maltotriose bildete das Enzym Maltose.

Zugabe von 1 mM Ca^{2+} erhöhte die Aktivität des Enzyms um 30%. Eine Behandlung mit 50 mM EDTA führte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust. Die Aktivität des Enzyms konnte durch die Zugabe von divalenten Kationen wieder hergestellt werden, wobei Ca^{2+} effektiv durch Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} und Mn^{2+} ersetzt werden konnte. Cu^{2+} hemmte Amy1 bereits in geringen Konzentrationen (0.1 mM) vollständig.

Das Enzym wurde durch den Zusatz von 1 mM DTE stabilisiert. Das pH-Optimum wurde mit pH 6 bestimmt. Das Temperaturoptimum von Amy1 lag bei 55°C. Die Thermostabilität von Amy1 wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten getestet. Bereits bei 55°C wurde ein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet, die Halbwertszeit betrug 30 Minuten. Die Inkubation bei 65°C führte zu einer fast vollständigen Hitzeinaktivierung des Enzyms nach 20 Minuten. Zugabe von 1 M NaCl konnte das Enzym stabilisieren, die Halbwertszeit bei 55°C verlängerte sich auf 120 Minuten.

Die Daten lassen darauf schließen, dass es sich bei Amy1 um eine Cyclodextrinase handelt.

6.3.2 Amy89: maltogene Amylase aus *Bacillus thermoleovorans* r805

Expression und Reinigung. Ausgangspunkt der Untersuchungen war gereinigtes rekombinantes Protein, dessen His-Tag durch Enterokinasebehandlung entfernt wurde. Das Protein war bei +4°C und -20°C für mehrere Monate stabil.

Biochemische Charakterisierung. Das Enzym katalysierte die Umsetzung verschiedener Polysaccharide zu Maltose (Abbildung 25). Neben den α -1,4-glycosidisch verknüpften Poly- und Oligosacchariden wurde β -Cyclodextrin mit hoher Rate umgesetzt. Das Enzym spaltete nur α -1,4-glycosidische Bindungen; Amylose, Amylopektin, Glycogen und Pullulan wurden nicht umgesetzt. Der apparente K_m -Wert für Stärke wurde mit 4.8 g/l bestimmt. Der apparente V_{\max} -Wert betrug 25.5 Umg^{-1} (55°C). Der V_{\max} -Wert für β -Cyclodextrin betrug dagegen 66.5 Umg^{-1} .

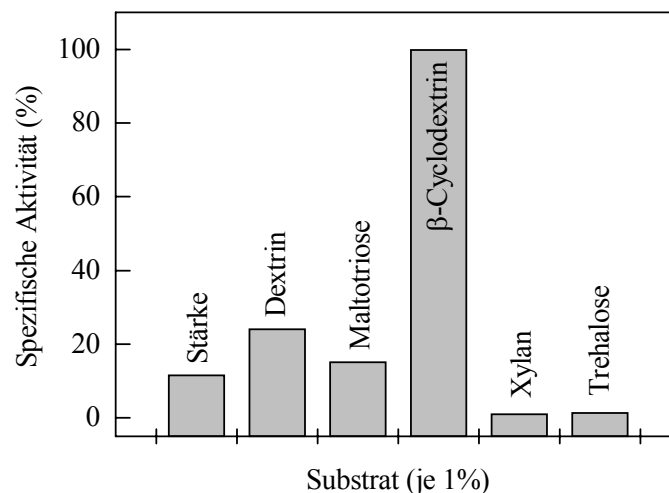


Abbildung 25 Substratspektrum von Amy89 bei 55°C. Es wurde je 1% Substrat eingesetzt, 100% Aktivität entsprechen 66.5 Umg⁻¹.

Dünnschichtchromatographische Experimente zeigten, dass als einziges Produkt aus allen Substraten Maltose gebildet wurde. Diese Eigenschaft definiert Amy89 als Cyclodextrinase mit maltogener Amylase-Aktivität. Zugabe von Calcium erhöhte die spezifische Aktivität von Amy89 um 40%. Eine Behandlung mit EDTA führte nur zu einer Verminderung der Aktivität um 10%. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Ca²⁺ sehr fest im Enzym gebunden ist. Fe²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ und Mn²⁺ hemmten das Enzym bereits in geringen Konzentrationen (unter 0.1 mM).

Das Temperaturoptimum von Amy89 lag bei 55°C. Die Thermostabilität von Amy89 wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten getestet. Bei Inkubation bei 55°C ohne Ca²⁺ wurde ein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet. Die Zugabe von 5 mM CaCl₂ erhöhte jedoch die Halbwertszeit von 15 auf 70 Minuten. Wurde der N-terminale Tag nicht entfernt, war die Thermostabilität des Enzyms deutlich reduziert.

6.3.3 Amy92: Neopullulanase aus *Thermoactinomyces sacchari*

Expression und Reinigung. Das Protein wurde an einer Kupfer-NTA-Säule und einer UNO Q1-Säule bis zur apparenten Homogenität gereinigt und war bei +4°C und -20°C für mehrere Monate stabil.

Biochemische Charakterisierung. Die Aktivität von Amy92 mit verschiedenen Poly- und Oligosacchariden wurde untersucht (Abbildung 26). Die höchste spezifische Aktivität wurde für β-Cyclodextrin (48 Umg⁻¹, 100%) gemessen, gefolgt von α-Cyclodextrin (57%) und Pullulan (38%). Die Aktivität mit Stärke (29%) entsprach ungefähr der Aktivität mit Amylose (28%). Das Enzym spaltete nur α-1,4-glycosidische Bindungen. Kurze Saccharidketten mit weniger als 7 Glucoseeinheiten wurden nicht umgesetzt.

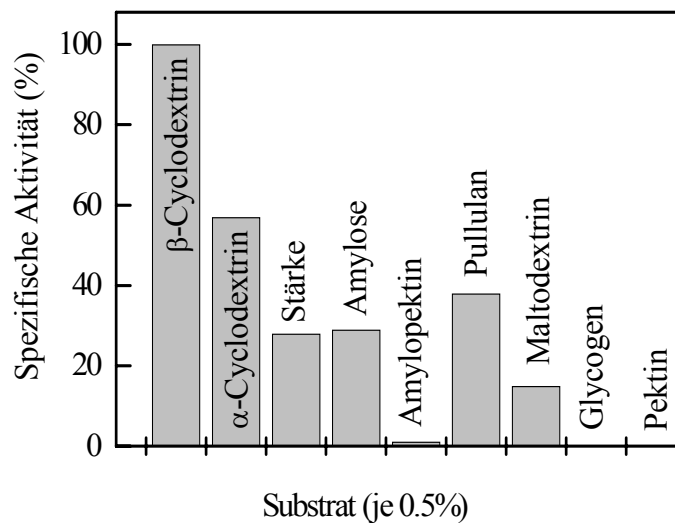


Abbildung 26 Substratspektrum von Amy92 bei 55°C. Es wurden je 0.5% Substrat eingesetzt. 100% entsprechen 47.4 U mg^{-1} .

Der apparente K_m -Wert für β -Cyclodextrin wurde mit 2.4 mM bestimmt. Der apparente V_{\max} -Wert betrug 62 U mg^{-1} (57°C). Der apparente K_m -Wert für Pullulan wurde mit 13.8 g/l bestimmt (entspricht 85 mM in Glucoseeinheiten), der apparente V_{\max} -Wert betrug 64 U mg^{-1} (57°C). Die Ergebnisse zeigten also eine deutliche Bevorzugung des Cyclodextrins.

Dünnschichtchromatographische Experimente zeigten, dass Stärke sowie α - und β -Cyclodextrin in Glucose und Maltose gespalten werden. Pullulan wurde ausschließlich zu Panose (6- α -Glycosylmaltose) abgebaut. Es konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Produkt um Isopanose oder Maltotriose handelt. Diese Ergebnisse definieren das Enzym als eine Cyclodextrinase mit Neopullulanase-Aktivität.

Die Aktivität von Amy92 war abhängig von divalenten Kationen. Ca^{2+} konnte dabei effektiv durch Co^{2+} ersetzt werden. Die optimale Ca^{2+} -Konzentration betrug 1 mM, die optimale Co^{2+} -Konzentration betrug 0.25 mM. Zn^{2+} und Cu^{2+} in Konzentration unter 0.1 mM führten zu einer vollständigen Inhibition.

Das pH-Optimum von Amy92 wurde mit pH 6 bestimmt, bei pH 5 und 7 betrug die Aktivität des Enzyms noch 50%. Das Temperaturoptimum von Amy92 lag bei 57°C . Die Thermostabilität von Amy92 wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten getestet. Die Inkubation bei 57°C in Abwesenheit von Calciumionen führte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust innerhalb von 10 Minuten. Die Zugabe von 1 mM CaCl_2 stabilisierte das Enzym effektiv, so dass bei einer Inkubation über 120 Minuten kein signifikanter Aktivitätsverlust auftrat. Eine Inkubation bei 60°C in Anwesenheit von Calciumionen ergab eine Halbwertszeit von 120 Minuten.

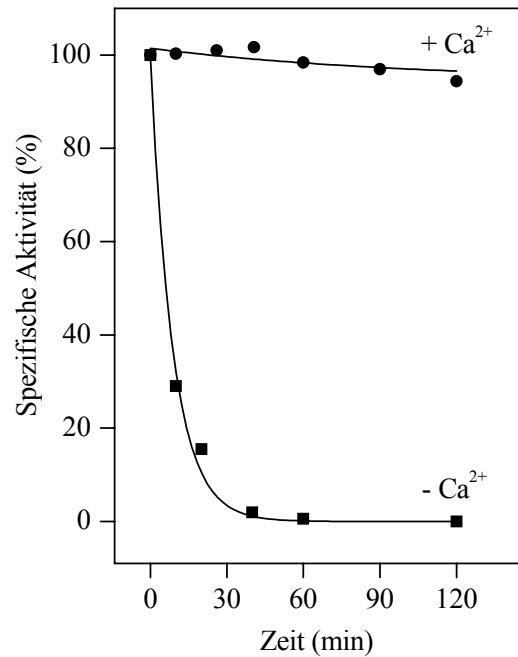


Abbildung 27 Thermostabilität von Amy92 in Abwesenheit und Anwesenheit von CaCl₂. 2 µg Enzym wurden in 20 µl 50 mM Piperazin pH 6 bei 57°C in Gegenwart oder Abwesenheit von CaCl₂ (1 mM) inkubiert. (■) ohne Zusatz von Kationen, (●) Zusatz von 1 mM CaCl₂. 100% Aktivität entsprechen 16 Umg⁻¹ bei 57°C.

6.3.4 Amy98: Maltogene Amylase aus *Anoxybacillus flavithermus*

Expression und Reinigung. Nach Überexpression wurde das 71 kDa-Protein an einer Nickel-NTA-Säule, einer Superdex 200-Gelfiltrations-Säule und einer UNO Q1-Säule gereinigt. Das Protein war bei +4°C und -20°C für mehrere Monate stabil.

Biochemische Charakterisierung. Die Aktivität von Amy98 mit verschiedenen Poly- und Oligosacchariden wurde untersucht (Abbildung 28). Die höchste spezifische Aktivität wurde für Cyclodextrine gemessen. Das Enzym spaltete nur α-1,4-glycosidische Bindungen. Kurze Saccharidketten mit weniger als 4 Glucoseeinheiten wurden nicht umgesetzt.

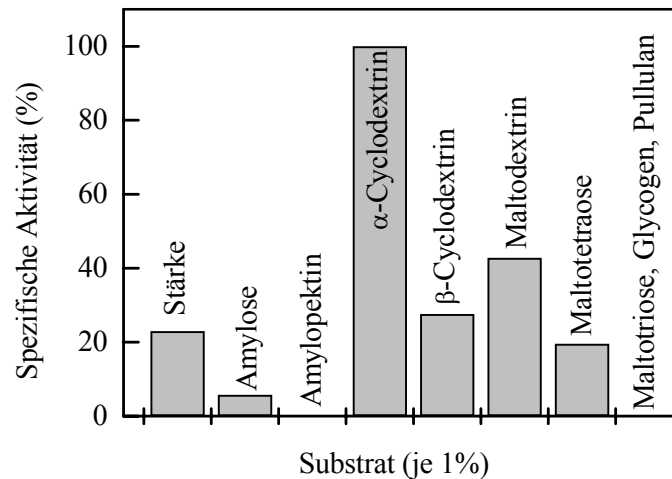


Abbildung 28 Substratspektrum von Amy98 bei 57°C. Es wurde je 1% Substrat eingesetzt. 100% entsprechen einer Aktivität von 658 Umg^{-1} .

Die kinetischen Konstanten für die Substrate α -, β -Cyclodextrin und Stärke sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Bevorzugung der Cyclodextrine, insbesondere von α -Cyclodextrin.

Tabelle 20 Kinetische Konstanten von Amy98. Die Bestimmung erfolgte bei 57°C und pH 6.5 im diskontinuierlichen Testsystem.

	Stärke	α -Cyclodextrin	β -Cyclodextrin
V_{\max} (Umg^{-1})	251	658	75
K_m (g/l)	10.8	0.27	0.36
V_{\max}/K_m	23.2	2437	208

Dünnschichtchromatographische Experimente zeigten, dass alle Substrate in Maltose gespalten werden, bei Substraten mit ungerader Zahl von Glucoseeinheiten entstand zusätzlich Glucose. Diese Ergebnisse definieren das Enzym als eine Cyclodextrinase mit maltogener Amylase-Aktivität.

Die Aktivität von Amy98 konnte nicht durch Zugabe von divalenten Kationen stimuliert werden. Eine intensive Behandlung mit EDTA führte nicht zu einem Aktivitätsverlust.

Das pH-Optimum von Amy98 wurde mit pH 6.5 bestimmt. Das Temperaturoptimum von Amy98 lag bei 57.5°C. Die Thermostabilität von Amy98 wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten getestet. Die Inkubation bei 57.5°C ergab eine Halbwertszeit von 150 Minuten, die Inkubation bei 67.5°C führte zu einer Verkürzung der Halbwertszeit auf 20 Minuten. Die Zugabe von 1 M NaCl stabilisierte das Enzym und erhöhte die Halbwertszeit bei 67.5°C auf 50 Minuten.

6.3.5 Amy132: Neopullulanase

Expression und Reinigung. Das Plasmid pJOE3075 mit dem Gen von Amy132 wurde in den *E. coli* Stamm BL21(DE3)-RIL codon plus transformiert und das Gen exprimiert. Nach Überexpression wurde das 68 kDa-Protein nach einem Hitzeschritt bei 50°C an einer Q-Sepharose-Säule, einer Superdex 200-Gelfiltrations-Säule und einer UNO Q1-Säule gereinigt. Das Protein war bei +4°C und -20°C für mehrere Monate stabil.

Biochemische Charakterisierung. Die Aktivität von Amy132 mit verschiedenen Poly- und Oligosacchariden wurde untersucht (Abbildung 29). Die höchste spezifische Aktivität wurde für Cyclodextrine gemessen. Das Enzym zeigte keine Aktivität mit verzweigten Polysacchariden. Kurze Saccharidketten mit weniger als 4 Glucoseeinheiten wurden nicht umgesetzt.

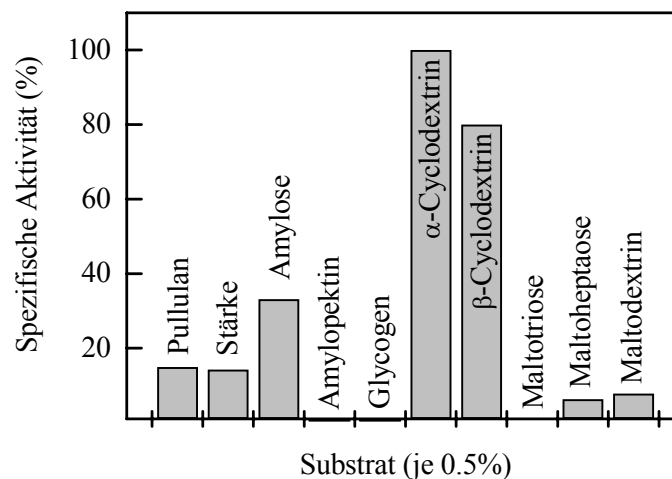


Abbildung 29 Substratspektrum von Amy132 bei 55°C. Es wurden je 0.5% Substrat eingesetzt. 100% entsprechen einer Aktivität von 54 Umg⁻¹.

Die kinetischen Konstanten für die Substrate α -, β -Cyclodextrin und Stärke sind in Tabelle 21 zusammengefasst. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Bevorzugung der Cyclodextrine.

Tabelle 21 Kinetische Konstanten von Amy132. Die Bestimmung erfolgte bei 55°C und pH 6 im diskontinuierlichen Test.

	Stärke	α -Cyclodextrin	β -Cyclodextrin
V_{\max} (Umg ⁻¹)	150	332	200
K_m (g/l)	63	3.3	2.4
V_{\max}/K_m	2.3	100	83.3

Dünnschichtchromatographische Experimente zeigten, dass Stärke sowie α - und β -Cyclodextrin in Maltose gespalten wurden. Bei Substraten mit ungerader

Glucoseeinheitenzahl entstanden zusätzlich Glucose und Maltotriose. Pullulan wurde ausschließlich zu Panose (6- α -Glycosylmaltose) abgebaut. Es konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Produkt um Isopanose oder Maltotriose handelt. Die Ergebnisse definieren das Enzym als eine Cyclodextrinase mit Neopullulanase-Aktivität. Amy132 zeigt Transglycosylierungs-Aktivität: Aus Glucose und Maltotriose wurde Maltose sowie aus Maltose und Maltotriose Maltotetraose gebildet.

Eine Dialyse gegen 20 mM EDTA führte zu einem Aktivitätsverlust von Amy132, dieser konnte nach Dialyse gegen Puffer ohne EDTA jedoch nicht durch die Zugabe von divalenten Kationen (Ca^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , je 0.1-10 mM) ausgeglichen werden. Cu^{2+} , Zn^{2+} und Fe^{2+} inhibierten das Enzym in Konzentrationen unter 0.1 mM.

Das pH-Optimum von Amy132 lag zwischen pH 5.5 und 6. Das Temperaturoptimum von Amy132 lag bei 55°C. Die Thermostabilität von Amy132 wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten getestet. Bei Inkubation bei 55°C wurde kein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet, die Inkubation bei 65°C führte zu einem Aktivitätsverlust, die Halbwertszeit betrug dann 120 Minuten. Bei einer Inkubation bei 70°C betrug die Halbwertszeit nur noch 10 Minuten. Die Zugabe von 5 mM CaCl_2 oder 1 M NaCl konnte das Enzym nicht gegen thermale Inhibition stabilisieren.

6.3.6 Zusammenfassung der Eigenschaften der Cyclodextrin-abbauenden Enzyme

Tabelle 22 Molekulare, katalytische und thermophile Eigenschaften der Proteine mit Cyclodextrinase-Aktivität. Substrate, mit denen die Proteine die höchste Aktivität erreichten (100%), wurden grau hinterlegt. n.b. nicht bestimmt.

Parameter	Amy1	Amy89	Amy92	Amy98	Amy132
Apparente molekulare Masse (kDa)					
Nativ	195 ¹	n.b.	76	148	147
Untereinheit	85 ¹	68	66	71	68
Kalkuliert	65.8	68.4	66.2	69	66
Oligomere Struktur	α_2	n.b.	α	α_2	α_2
pH-Optimum	6	6	6	6.5	5.5-6
Temperaturoptimum (°C)	55	55	57	57.5	55
Arrhenius-Aktivierungsenergie (kJmol ⁻¹)	45	37.5	114	38.4	51
Substratspezifität (%) ²					
Stärke	69	12.5	29	22	14
Amylose	8	4.8	28	6	33
Amylopektin	82	0	0	0	0
α -Cyclodextrin	100	n.b.	57	100	100
β -Cyclodextrin	69	100	100	28	80
Pullulan	0	0	38	0	15
Glycogen	1	0	0	0	0
Maltotetraose	3	15	10	20	1
Maltoheptaose	10	n.b.	27	n.b.	6
Maltodextrin	15	25	17	43	8
Trehalose	0	1	0	0	0
Xylan	0	1	1	0	0

¹ mit N-terminalem Tag, ² bestimmt mit 0.5% (Amy 92, Amy132) bzw. 1% Substrat (Amy1, Amy89, Amy98) bei jeweils optimalem pH-Wert und optimaler Temperatur.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der hyperthermophile Sulfatreduzierer *Archaeoglobus fulgidus* Stamm 7324 auf Stärke und Sulfat als Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen kann. Die Fermentationsbilanz und Enzymmessungen zeigten, dass Stärke unvollständig zu CO₂ und Acetat oxidiert wird. Der Abbau erfolgt über einen ungewöhnlichen Stärkeabbauweg zu Glucose-6-Phosphat, einen modifizierten Embden-Meyerhof-Weg zu Pyruvat und eine ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase zu Acetat und CO₂. Damit konnte zum ersten Mal die Umsetzung eines polymeren Zuckers, d.h. Stärke, in einem sulfatreduzierenden Prokaryonten gezeigt werden.

In *A. fulgidus* Stamm 7324 wurden vier Enzyme des Abbaus der Stärke zu Glucose-6-Phosphat gezeigt, die einen ungewöhnlichen Stoffwechselweg nahe legen, wie er in ähnlicher Form für *Thermococcus* sp. B1001 und *Klebsiella oxytoca* beschrieben wurde. Diese Enzyme wurden gereinigt und charakterisiert. Die Umsetzung von Glucose zu Pyruvat erfolgte über einen modifizierten Embden-Meyerhof-Weg, wie er bisher für Vertreter der *Thermococcales* beschrieben wurde. Der erste Schritt des Embden-Meyerhof-Weges wird von einer ADP-abhängigen Glucokinase katalysiert. Dieses Enzym wurde gereinigt und charakterisiert.

Weiterhin wurden Enzyme des Stärkeabbaus charakterisiert, die der Glycosylhydrolase-Familie 13 angehören und deren Gene aus Umwelt-DNA oder Organismen heißer Quellen auf Island isoliert wurden. Von besonderem Interesse waren dabei Cyclodextrin-abbauende Enzyme, die eine neue Subfamilie in der GH-13-Familie bilden.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Untersuchung des Stärkeabbaus in *A. fulgidus* diskutiert. Im zweiten Teil werden die Enzyme des Stärkeabbaus aus geothermalen Habitaten vorgestellt und diskutiert.

7 Diskussion I: Ein ungewöhnlicher Stärkeabbauweg im hyperthermophilen archaeellen Sulfatreduzierer *Archaeoglobus fulgidus* Stamm 7324

7.1 Wachstum von *A. fulgidus* Stamm 7324 auf Stärke

Die Fähigkeit Zucker als Elektronendonoren für die Sulfatreduktion zu verwenden ist eine seltene Eigenschaft innerhalb der Sulfatreduzierer, da diese in der Regel auf Fermentationsprodukten anderer Organismen wachsen. Sulfatreduzierer stehen am Ende der anaeroben Nahrungskette (Widdel und Hansen 1992). Bis jetzt wurde nur für einige bakterielle Sulfatreduzierer ein Wachstum auf Zuckern beschrieben. So wächst *Desulfovibrio fructosovorans* auf Fructose und Sulfat (Cord-Ruwisch et al. 1986). Wachstum auf Fructose ist ebenso für *Desulfotomaculum nigrificans* und *Desulfotomaculum geothermicum*

beschrieben worden (Klemps et al. 1985). Für *Desulfovibrio simplex* konnte Wachstum auf Glucose in Gegenwart von Pepton und Hefeextrakt gezeigt werden (Zellner et al. 1989a). Die Verwendung verschiedener Zucker, inklusive Fructose und Glucose, wurde für *Desulfovibrio termitidis* beschrieben, der aus dem Verdauungstrakt der Termiten isoliert wurde (Trinkerl et al. 1990). Bis heute konnte keine Verwendung von polymeren Zuckern, wie zum Beispiel Stärke, bei Sulfatreduzierern gezeigt werden.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, wächst *A. fulgidus* Stamm 7324 auf Stärke und Sulfat. Die Fermentationsbilanz zeigte, dass die Stärke mit Sulfat unvollständig oxidiert wird. Pro Glucoseäquivalent wurden 2 mol Acetat, 2 mol CO₂ und 1 mol H₂S gebildet. Eine unvollständige Oxidation von Fructose mit einer entsprechenden Stöchiometrie wurde für *Desulfovibrio fructosovorans* gezeigt, der 1 mol Fructose mit Sulfat zu 2 mol Acetat, 2 mol CO₂ und 1 mol H₂S umsetzt (Ollivier et al. 1988). Auch für *D. simplex* wurde Acetatbildung beim Wachstum auf Glucose gezeigt (Zellner et al. 1989a). Acetat wird auch beim Abbau von intrazellulärer Polyglucose in *Desulfovibrio baculatus* (Stams et al. 1983) und *Desulfovibrio gigas* (Fareleira et al. 1997) gebildet. Die unvollständige Oxidation der Stärke in *A. fulgidus* Stamm 7324 ist bemerkenswert, da Laktat von diesem Stamm - im Gegensatz zu Stärke - vollständig zu 3 CO₂ oxidiert wird. Einige *Archaeoglobus*-Arten bilden dagegen auch aus Laktat Acetat. Die Acetatbildung aus Zuckern wurde bisher nicht beobachtet (Zellner et al. 1989b).

Die Bildung von Acetat aus Stärke durch *A. fulgidus* Stamm 7324 legt nahe, dass in Stärkeabbauenden Zellen der modifizierte Acetyl-CoA/Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (CO-DH)-Weg, der an der Oxidation der organischen Substrate zu CO₂ beteiligt ist, nicht oder nur mit niedriger Aktivität arbeitet. Die apparente Abwesenheit des Deazaflavins F₄₂₀ in Stärkegewachsenen Zellen von *A. fulgidus* Stamm 7324 könnte mit dieser Stoffwechselsituation zusammenhängen, da zwei F₄₂₀-abhängige Dehydrogenasen, die Methylentetrahydro-methanopterin-Dehydrogenase und die Methylentetrahydro-methanopterin-Reduktase, an der Acetyl-CoA-Oxidation zu 2 CO₂ über den modifizierten Acetyl-CoA/CO-DH-Weg beteiligt sind (Thauer und Kunow 1995). Diese zwei F₄₂₀-abhängigen Enzyme könnten die Rate der Acetyl-CoA-Oxidation limitieren. Das erste Enzym dieses Weges, die CO-DH, zeigte in Laktat- und Stärkegewachsenen Zellen ähnliche Aktivitäten und ist damit wahrscheinlich nicht der limitierende Schritt in der Acetyl-CoA-Oxidation während des Wachstums von *A. fulgidus* Stamm 7324 auf Stärke (Thauer und Kunow 1995).

Der Grund für den Wechsel von vollständiger Oxidation des Laktats zu unvollständiger Oxidation der Stärke sowie die Regulation des F₄₂₀-Gehaltes in *A. fulgidus* Stamm 7324 ist bisher nicht aufgeklärt. Für andere *Archaeoglobus*-Arten konnte eine solche Regulation bereits gezeigt werden. So hat die CO-DH als Schlüsselenzym des Acetyl-CoA/CO-DH-Weges in *A. lithotrophicus* eine anabole und in *A. fulgidus* Stamm VC16 eine katabole Funktion. Der Faktor F₄₂₀-Gehalt dieser Organismen ist mit diesen verschiedenen Stoffwechselsituationen korreliert (Vorholt et al. 1995).

7.2 Enzyme des Stärkeabbaus zu Glucose-6-Phosphat in *A. fulgidus* Stamm 7324

Die Enzyme des klassischen Stärkeabbaus, α -Amylase und Pullulanase, konnten in *A. fulgidus* Stamm 7324 nicht nachgewiesen werden. Dagegen konnten alle Enzyme eines ungewöhnlichen Stärkeabbauweges zu Glucose-6-Phosphat gezeigt werden, wie er in ähnlicher Form für *Klebsiella oxytoca* (Fiedler et al. 1996) und *Thermococcus* sp. B1001 (Hashimoto et al. 2001) beschrieben wurde (Abbildung 30).

In *A. fulgidus* Stamm 7324 wird Stärke dabei mit Hilfe einer Cyclodextrin-Glucanotransferase (CGTase) unter Zyklisierung zu Cyclodextrinen abgebaut. Die gebildeten Cyclodextrine werden vermutlich über einen Bindeprotein-abhängigen ABC-Transporter in Analogie zu *Klebsiella* und *Thermococcus* in die Zelle transportiert. Der Nachweis eines solchen Transportsystems steht in *A. fulgidus* Stamm 7324 noch aus. In der Zelle werden die Cyclodextrine mit Hilfe einer Cyclodextrinase (CDase) linearisiert und dann abgebaut. Diese Reaktion wird Phosphat-abhängig von einer Maltodextrin-Phosphorylase (Mal-P) katalysiert, wobei Glucose-1-Phosphat gebildet wird. Dieses wird durch die Phosphoglucomutase (PGluM) in Glucose-6-Phosphat umgewandelt. Die Aktivitäten von CDase, Mal-P und PGluM waren in Stärke-gewachsenen Zellen im Vergleich zu Laktat-gewachsenen Zellen bis zu 4.5-fach erhöht. Dieser Befund und das Fehlen der klassischen Enzyme des Stärkeabbaus sprechen dafür, dass der Abbau von Stärke *in vivo* über den beschriebenen Weg verläuft.

Dieser vorgeschlagene Weg unterscheidet sich von dem in *Thermococcus* sp. B1001 beschriebenen Weg. In diesem Organismus verläuft er nur bis zur Cyclodextrinase, die in der Lage ist die Cyclodextrine zu Maltose und Glucose abzubauen (Hashimoto et al. 2001).

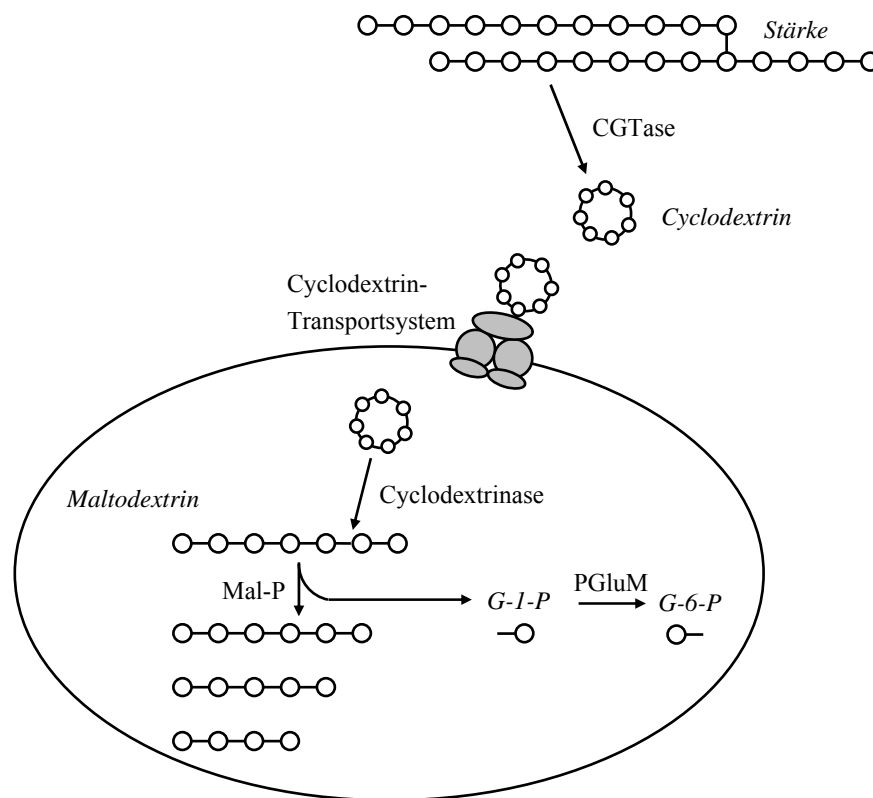


Abbildung 30 Vorgeschlagener Abbaupfad für Stärke zu Glucose-6-Phosphat im hyperthermophilen sulfatreduzierenden Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* Stamm 7324. Grau dargestellt ist das postulierte Bindeprotein-abhängige Cyclodextrin-Transportsystem in Analogie zu *Klebsiella oxytoca* und *Thermococcus* sp. B1001. Abkürzungen: *CGTase* Cyclodextrin-Glucanotransferase, *G-1-P* Glucose-1-Phosphat, *G-6-P* Glucose-6-Phosphat, *Mal-P* Maltodextrin-Phosphorylase, *PGluM* Phosphoglucomutase.

Die Enzyme des Stärkeabbaus zu Glucose-6-Phosphat wurden aus *A. fulgidus* Stamm 7324 gereinigt und charakterisiert. Im Folgenden werden diese Enzyme in Bezug auf ihre katalytischen, molekularen und thermophilen Eigenschaften hin untersucht und mit denen der entsprechenden Homologen aus Bacteria und Archaea verglichen.

7.2.1 Cyclodextrin-Glucanotransferase (CGTase)

CGTasen repräsentieren eine große Gruppe der mikrobiellen Stärke-abbauenden Enzyme, die die Bildung von zyklischen, nicht-reduzierenden Maltooligosacchariden (Cyclodextrine) aus Stärke katalysieren. CGTasen sind von zahlreichen bakteriellen Spezies bekannt, vor allem von *Bacillus*-Spezies, aber auch von anderen Cyclodextrin-bildenden Arten, wie zum Beispiel von dem Enterobakterium *Klebsiella*. In der Regel handelt es sich um induzierbare extrazelluläre Enzyme, die zur Glycosylhydrolase-Familie 13 gehören. Im Allgemeinen ist wenig bekannt über die physiologische Rolle dieser Enzyme, da die meisten Mikroorganismen Cyclodextrine nicht als Wachstumssubstrat verwenden können (Biwer et al. 2002; Tonkova 1998). Dagegen ist die physiologische Funktion der CGTase als erstes Enzym einen ungewöhnlichen Stärkeabbauwegs während des Wachstums von *A. fulgidus* Stamm 7324 wahrscheinlich.

Aus der Domäne der Archaea sind CGTasen nur aus *Thermococcales* bekannt, es handelt sich bei der CGTase aus *Thermococcus* sp. B1001 ebenso wie bei *A. fulgidus* Stamm 7324 um das erste Enzym eines ungewöhnlichen Stärkeabbauwegs (Hashimoto et al. 2001). Die CGTase aus *T. kodakaraensis* wurde rekombinant hergestellt, ihre physiologische Funktion konnte bisher nicht gezeigt werden (Rashid et al. 2002).

Die CGTase wurde aus der Pelletfraktion von *A. fulgidus* Stamm 7324 angereichert. Die N-terminale Aminosäuresequenz der CGTase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 zeigte die höchste Ähnlichkeit zu einer α -Glucanotransferase (GTase) aus *Thermococcus litoralis* (Jeon et al. 1997; Xavier et al. 1999). Mit Hilfe der N-terminalen Aminosäuresequenz und der Sequenz der GTase aus *T. litoralis* wurde das entsprechende CGTase-Gen aus *A. fulgidus* Stamm 7324 amplifiziert. Die Größe des PCR-Produktes entsprach mit ca. 2000 Basenpaaren dem Gen der GTase aus *T. litoralis* (1980 bp). Es konnten bereits 45% des Gens sequenziert werden. Die Gensequenz zeigte, wie die N-terminale Aminosäuresequenz, die höchste Ähnlichkeit zu der Sequenz der GTase aus *T. litoralis* (7% Abweichung). Abbildung 31 zeigt ein partielles Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenz der CGTase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 mit den entsprechenden Sequenzbereichen der CGTasen aus *Thermococcus* sp. B1001 und *Thermococcus kodakaraensis* sowie mit der GTase aus *Thermococcus litoralis*. Es wird deutlich, dass die Sequenzen der Enzyme aus *A. fulgidus* Stamm 7324 und *T. litoralis* fast identisch sind. Bei den Unterschieden handelt es sich ausschließlich um konservierte Austausche.

Die höchste Sequenz-Ähnlichkeit zu einer GTase aus *T. litoralis* ist überraschend, da die Hauptaktivität der GTase die Bildung linearer Saccharide ist (Xavier et al. 1999), es sich bei der Aktivität des Proteins aus *A. fulgidus* Stamm 7324 jedoch um eine Zyklisierungsaktivität handelt: Es konnte gezeigt werden, dass die CGTase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 die Bildung von α - und β -Cyclodextrinen aus Stärke katalysiert. Es gibt keine Hinweise darauf, dass dieses Enzym die Bildung linearer α -1,4-Glucane katalysiert. Jeon et al. beschreiben allerdings für die GTase aus *T. litoralis* neben der Bildung linearer Saccharide auch die Bildung von Cyclodextrinen (Jeon et al. 1997).

N-terminaler Bereich

```

Af -----
Tl 1 -----MERINFI FG-- IHNHQLG----- 17
Tsp 1 --MRSRKIYMLVLLLLFLGFSEQISTVAAGVSPSPAGDPQTWVIYQIVIDRFYDNGTNSNNDPLKSPGLY 68
Tk 1 --MGR LVS VLV LLL LTP-----IASAWEV--PERGIYQVMVDRFYDNGTNSNNEPF-----Y 49

Af -----VFEEAYNRSYRPFMEILEEFPEMKVNVHFSGLPLEWIEENKPDYLDLLKSLIKRGQLEIVVAGFY
Tl 18 -NFGWVFEEAYNRSYRPFMEILEEFPEMKVNVHFSGLPLEWIEENKPDYLDLLKSLIKRGQLEIVVAGFY 86
Tsp 69 DPNKENWKLYWGGDLEGLIAKLPYLYELGVSAIWISPVFDNIDVPINGSNGLEAGYHGYWPKDFKVIIEEH 138
Tk 50 DPTHSNYRLYWGGDLEGLIEKLDYIKSLGVSMIWVSPINDNINSLAYGS----APYHGYWTRDYKRIEEH 115

Af -----EPVLA AIPKEDRLVQIEMLKDYARKLGYDAKGVWLTERVWQPELVKSLREAGIEYVVVDDYHFMSA
Tl 87 EPVLA AIPKEDRLVQIEMLKDYARKLGYDAKGVWLTERVWQPELVKSLREAGIEYVVVDDYHFMSA 152
Tsp 139 FGTWEIFRRLSQEAAKYNTITIIDFVFNHNSPNNDAGEY GALYDNGTFVIDYPTDANYATVHPITKS 204
Tk 116 FGGWEDFRRLVKEAKKRGICIIDVYVFNHNSPNVNYGEY GALYDNGTFITDYFKD TKNAEVNPI TGI 181

```

C-terminaler Bereich

```

Af -----KQIPEEIKRELAYDWQLRAILQDHFIKPEETLDNYRLVKYHELGD FVNQPYEYKMIENGVK-----LW
Tl 468 KQIPEEIRRELAYDWQLRAILQDHFIKPEETLDNYRLVKYHELGD FVNQPYEYEMIENGVK-----LW 549
Tsp 510 GTFSEVLPAGSVSVWQYKATPTDPWVGAI DPMGRAGNIVTVSCEGFGDVPGRVLIITNGQDYWTAEVTYW 580
Tk 483 GKASVYLP RDSVYVFHIEGEQK KPLTGSITPYAARPGQ EIVIGCAGFGKG-GKVIITGGRE----AKVLSW 548

Af -----REGGVYAEKIP-----ARVEKKIELTEDG--FIAKYRVLLEKPYKALFGVE----INLAVHSVMEKP
Tl 550 REGGVYAEKIP-----ARVEKKIELTEDG--FIAKYRVLLEKPYKALFGVE----INLAVHSVMEKP 607
Tsp 581 SDKSVF E FIVPSGITTQLNENHVEVRIERADGATSN GIAFEYLTNKQIPALFEVRNTQGTNLETQVGEFLW 650
Tk 549 EDGKIVV E VPR---LETSAAWVNVTVV-SDGGRSPPRPLRYYS GNDVPALIALN----ASLVGEVSGTLW 611

Af -----EF EFAKEFEVNDPYGIGKVR-----I ELDREAKIWKFP IKTLSQSEAGWDFIQQGV
Tl 608 EF EFAKEFEVNDPYGIGKVR-----I ELDKAAK VVKFP IKTLSQSEAGWDFIQQGV 663
Tsp 651 LTGSVPELSYWSPEETIKAVGPM LCPG-WPD--W FVVASVPADTYIEFKFLKAPLGGTGIWEVGSNH 717
Tk 612 LSGDLPELGEPR ELLKSSM GYYFTVAPLPEGVF SVRLYEGKAWGALRPLNLTLYGVGNRTVTLTE 682

```

Abbildung 31 Partielles Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der CGTase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 (Af) und archaeellen (Cyclodextrin-)Glucanotransferasen aus Archaea. Das Alignment wurde mit Hilfe von ClustalX (Thompson et al. 1997) mit Standardeinstellungen erstellt. Die Sequenz aus *A. fulgidus* Stamm 7324 konnte nicht direkt nach dem Primer gelesen werden, daher beginnt der Vergleich erst bei der abgeleiteten Aminosäure des ersten lesbaren Basentriplets. Dunkle Hinterlegungen zeigen identische Reste, helle Hinterlegungen konservierte Substitutionen an. NCBI Accession-Nummern: *T. litoralis* (Tl) D88253, *Thermococcus sp.* B1001 (Tsp) BAB18101, *Thermococcus kodakaraensis* (Tk) BAB78538.

Das Molekulargewicht der Untereinheit der CGTase wurde mit 80 kDa bestimmt und mit Hilfe eines Zymogramms verifiziert. Dieses Molekulargewicht ähnelte dem der GTase aus *T. litoralis* (78 kDa) ebenso wie dem der CGTase aus *Thermococcus sp.* B1001 (83 kDa).

In Übereinstimmung mit der Wachstumstemperatur von 76°C von *A. fulgidus* Stamm 7324 zeigte die CGTase ein Temperaturoptimum von 83°C. Der Zusatz von 1 mM CaCl₂ erhöht die spezifische Aktivität der CGTase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 um das Fünffache. Dieses trifft auch für die Aktivität der bakteriellen CGTasen zu, die abhängig von Calciumionen sind (Tonkova 1998).

Die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung geben keine eindeutige Antwort auf die Frage, ob die CGTase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 der Familie der CGTasen oder eher der Familie der GTasen zugeordnet werden kann; eine detailliertere Charakterisierung mit rekombinantem Protein steht noch aus.

7.2.2 Cyclodextrinase (CDase, EC 3.2.1.54)

Cyclodextrinasen sind Enzyme die in der Lage sind zyklische Oligosaccharide zu hydrolysieren. CDasen sind von verschiedenen Mikroorganismen bekannt, insbesondere von

Bacillaceae und von *Enterobacteriaceae* (Park et al. 2000). Sie gehören zur Glycosylhydrolase-Familie 13 (MacGregor et al. 2001). Die einzige bekannte archaeelle Cyclodextrinase, ein Enzym aus *Thermococcus* sp. B1001, wurde als rekombinantes Protein in *E. coli* hergestellt (Hashimoto et al. 2001).

Die CDase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 katalysierte ausschließlich die Ringöffnung der Cyclodextrine zu den entsprechenden Maltooligosacchariden. Diese Aktivität unterscheidet das Enzym von allen bisher bekannten CDasen, die auch die weitere Hydrolyse des Oligosaccharids katalysieren, in der Regel zu Maltose und Glucose als Endprodukte (Hashimoto et al. 2001; Feederle et al. 1996; Park et al. 2000). Die höchste spezifische Aktivität zeigte die CDase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 mit β -Cyclodextrin. Das gilt auch für die CDase aus *Thermococcus* sp. B1001 (Hashimoto et al. 2001). Die katalytische Effizienz der *A. fulgidus* Stamm 7324 CDase war jedoch für γ -Cyclodextrin deutlich höher, ein Ergebnis das mit der CDase aus *Klebsiella oxytoca* vergleichbar ist. Dieses Enzym zeigte die höchste Rate mit α -Cyclodextrin, die höchste katalytische Effizienz jedoch mit γ -Cyclodextrin (Feederle et al. 1996).

Auch die CDase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 zeigte in Übereinstimmung mit der Wachstumstemperatur dieses Organismus ein hohes Temperaturoptimum und eine hohe Thermostabilität. Für die Aktivität von CDasen sind Calciumionen nötig (MacGregor et al. 2001). Eine Behandlung der CDase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 mit EDTA führte zu einem Aktivitätsverlust, der durch Zusatz von Ca^{2+} , Co^{2+} oder Mg^{2+} wieder aufgehoben werden konnte. Damit ist auch die CDase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 abhängig vom Zusatz von divalenten Kationen, die wahrscheinlich fest im Proteinmolekül fixiert sind. Dies ist auch für die mit CDasen eng verwandte maltogene Amylase von *Thermoactinomyces vulgaris* (TVaII) beschrieben. Nur eine intensive Behandlung des Enzyms mit dem Chelatbildner EDTA konnte das Calcium aus dem Enzym lösen, womit ein Aktivitätsverlust herbeigeführt wurde (Kamitori et al. 1999). Kupfer- und Zinkionen, die als typische Inhibitoren von Enzymen der GH-13-Familie bekannt sind (Leveque et al. 2000), hatten bereits in geringen Konzentrationen eine hemmende Wirkung auf die CDase von *A. fulgidus* Stamm 7324. 0.1 mM dieser Ionen führten zu einer vollständigen Hemmung. Ein solcher Effekt ist auch für die Amylasen aus den Archaea *Pyrococcus furiosus* (Laderman et al. 1993; Koch et al. 1990) und *P. woesei* beschrieben (Koch et al. 1991).

Das Molekulargewicht der Untereinheit der CDase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 von 73 kDa entspricht dem Molekulargewicht der CDase aus *Thermococcus* sp. B1001 von 79 kDa und dem Molekulargewicht der bakteriellen CDasen (62-90 kDa). Bakterielle CDasen sind fast ausschließlich als homodimere Proteine beschrieben (Park et al. 2000). Im Gegensatz dazu wurde für das Enzym aus *A. fulgidus* Stamm 7324 eine monomere Struktur ermittelt.

Obwohl die Cyclodextrinase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 ein für Cyclodextrinasen der GH-13-Familie ungewöhnliches Produktspektrum zeigte, weisen das ermittelte Molekulargewicht, die Abhängigkeit von Calciumionen und die Hemmbarkeit durch Kupfer- und Zinkionen darauf hin, dass es sich auch bei diesem Protein um ein Mitglied der GH-13-Familie handelt.

7.2.3 Maltodextrin-Phosphorylase (Mal-P, α -Glucan-Phosphorylase)

α -Glucan-Phosphorylasen katalysieren den schrittweisen Abbau von Poly- und Oligosacchariden zu Glucose-1-Phosphat und spielen vor allem eine zentrale Rolle bei der Mobilisation von Speicherpolysacchariden. Phosphorylasen sind aus allen Domänen des Lebens in vielen Organismen bekannt (Schinzel und Nidetzky 1999), bisher wurde jedoch nur eine archaeele α -Glucan-Phosphorylase beschrieben, die Maltodextrin-Phosphorylase aus *Thermococcus litoralis* (Xavier et al. 1999). Obwohl der Mechanismus aller bekannten α -Glucan-Phosphorylasen gleich ist, unterscheiden sich die Enzyme aus den unterschiedlichen Organismen stark in ihrer Spezifität für Polysaccharide und in ihrer Regulation (Schinzel und Nidetzky 1999).

Das aus *A. fulgidus* Stamm 7324 gereinigte Enzym zeigte eine Präferenz für Maltodextrine mit mehr als vier Glucoseeinheiten. Die Raten mit Stärke und Glycogen erreichten fast 50% der Rate mit Maltoheptaose, die katalytischen Effizienzen waren jedoch verglichen mit den Maltodextrinen um den Faktor 10 (Stärke) bzw. 180 (Glycogen) niedriger. Daher handelt es sich bei dem Enzym nicht um eine Glycogen- oder Stärke-Phosphorylase, sondern um eine Maltodextrin-Phosphorylase, deren physiologische Rolle der Abbau von Maltodextrinen im Cytosol liegt. Dies ist auch für die Mal-P von *E. coli* und *T. litoralis* beschrieben (Schwartz 1987; Xavier et al. 1999). Die spezifische Aktivität und der apparente K_m -Wert der Mal-P für Maltoheptaose waren in *A. fulgidus* Stamm 7324 und *T. litoralis* vergleichbar. Der Reaktionsmechanismus aller bekannten α -Glucan-Phosphorylasen benötigt Pyridoxalphosphat für die Aktivität, wobei die Phosphatgruppe des Pyridoxalphosphats zusammen mit anorganischem Phosphat als Säure-Base-Katalysator dient (Palm et al. 1985). Wie erwartet, enthielt auch die Mal-P aus *A. fulgidus* Stamm 7324 Pyridoxalphosphat, es wurden 0.8 mol Pyridoxalphosphat pro mol nativem Protein nachgewiesen. Mit diesen katalytischen Eigenschaften gleichen sich die beiden archaeeellen Mal-P aus *A. fulgidus* und *T. litoralis* und gehören, wie ihre bakteriellen Homologe, in die Familie der α -Glucan-Phosphorylasen und nicht in die Familie der Disaccharid-Phosphorylasen. Diese verwenden einen anderen, Pyridoxalphosphat-unabhängigen, Mechanismus (Schinzel und Nidetzky 1999).

Für eukaryontische α -Glucan-Phosphorylasen wurde eine allosterische Regulierung oder eine Regulierung durch Phosphorylierung des Proteins beschrieben. Demgegenüber zeigen bakterielle α -Glucan-Phosphorylasen und auch die Mal-P aus *T. litoralis* und die hier untersuchte Mal-P aus *A. fulgidus* Stamm 7324 keine allosterische Aktivierung oder Inhibition (Schinzel und Nidetzky 1999). Dies unterstreicht die Hypothese, dass die Regulation der prokaryontischen α -Glucan-Phosphorylasen auf Transkriptionsebene und nicht auf Proteinebene stattfindet (Schinzel et al. 1992). So wurde die Aktivität der Mal-P aus *A. fulgidus* Stamm 7324 durch das Wachstumssubstrat beeinflusst: Stärke-gewachsene Zellen zeigten im Vergleich zu Laktat-gewachsenen Zellen eine 4.5-fach höhere spezifische Aktivität. Eine solche zuckerspezifische Induktion wurde auch für die Mal-P aus *T. litoralis* beim Wachstum auf Maltose im Vergleich zum Wachstum auf Komplexbestandteilen gezeigt (Xavier et al. 1999).

Das Molekulargewicht der Untereinheit der Mal-P aus *A. fulgidus* Stamm 7324 entsprach mit 83 kDa ungefähr dem der Mal-P aus *T. litoralis* (90 kDa). Ein Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenz mit bekannten archaeellen α -Glucan-Phosphorylasen zeigte die höchste Übereinstimmung mit der Mal-P aus *T. litoralis* (Xavier et al. 1999). Das native Molekulargewicht spricht für eine homotetramere Struktur des Enzyms in *A. fulgidus* Stamm 7324. Die meisten bekannten Phosphorylasen wurden als homodimere oder homotetramere Proteine beschrieben (Palm et al. 1985).

In Übereinstimmung mit der Wachstumstemperatur von *A. fulgidus* Stamm 7324 zeigte die Mal-P ein hohes Temperaturoptimum, das deutlich höher als die Temperaturoptima der mesophilen bakteriellen Mal-P liegt. Das Temperaturoptimum der Mal-P von *T. litoralis* lag bei 98°C.

7.2.4 Phosphoglucomutase (PGluM)

PGluM katalysieren die Umwandlung von Glucose-1-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat, wobei das Gleichgewicht auf Seiten des Glucose-6-Phosphats liegt. Sie spielen eine zentrale Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel von vielen Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren (Hammond und Balinsky 1978; Lytovchenko et al. 2002; Naught und Tipton 2001; Ray, Jr. und Peck, Jr. 1972). Dabei liefern sie die Intermediate des Glycogen- und Trehalosestoffwechsels, mit Glucose-1-Phosphat aber auch den Vorläufer von Zuckernukleotiden, die für die Synthese von verschiedenen Polysacchariden und Glycoproteinen nötig sind. Innerhalb der Archaea wurde PGluM-Aktivität in Rohextrakten von *Thermococcus litoralis* (Xavier et al. 1999), *T. kodakaraensis* (Rashid et al. 2004) und *Methanococcus maripaludis* (Yu et al. 1994) gefunden. Im Genom des Archaeons *Thermococcus kodakaraensis* konnte einem ORF eine PGluM/Phosphomannosemutase-Aktivität zugeordnet werden. Das Genprodukt wurde nach Überexpression in *E. coli* charakterisiert (Rashid et al. 2004).

Ein Vergleich der katalytischen Effizienzen der PGluM aus *A. fulgidus* Stamm 7324 mit der PGluM aus *T. kodakaraensis* für das Substrat Glucose-1-Phosphat zeigte etwa ein Drittel niedrigere Effizienz des Enzyms aus *A. fulgidus* Stamm 7324. PGluM zeigen häufig Aktivitäten mit anderen Hexosephosphaten, ausgehend von der Primärstruktur fasst man daher Phosphoglucomutasen und Phosphomannomutasen (PMM) zu einer Familie zusammen (Shackelford et al. 2004). Die PGluM aus *A. fulgidus* Stamm 7324 zeigte jedoch keine Aktivität mit Mannose-6-Phosphat.

Alle bisher beschriebenen PGluM sind abhängig von Glucose-1,6-Bisphosphat als Kosubstrat, welches unter Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Proteins während der Reaktion neu synthetisiert wird (Ray, Jr. und Roscelli 1964; Najjar 1955). Auch die Aktivität der PGluM aus *A. fulgidus* Stamm 7324 war abhängig von Glucose-1,6-Bisphosphat. Der K_m -Wert lag mit 34 μ M relativ hoch, bakterielle und eukaryontische PGluM haben K_m -Werte für Glucose-1,6-Bisphosphat im Bereich von 0.5-2.2 μ M (Fazi et al. 1990). Die Aktivität aller

bekanntes PGLuM ist abhängig von divalenten Kationen, so auch die Aktivität der PGLuM aus *A. fulgidus* Stamm 7324. Für Mg^{2+} konnte ein K_m -Wert von 0.052 mM ermittelt werden, dieser ist vergleichbar mit K_m -Werten für Mg^{2+} von eukaryontischen PGLuM (Fazi et al. 1990).

Eine Behandlung der PGLuM aus *A. fulgidus* Stamm 7324 mit Histidin, Imidazol und Cystein übte eine aktivierende Wirkung aus. Ray et al. diskutieren, dass die Zugabe dieser Substanzen zur Bindung von Schwermetallen führte, die eine stark inhibierende Wirkung auf PGLuM haben (Ray, Jr. und Roscelli 1966; Milstein 1961a). Den stärksten positiven Effekt auf die Aktivität hatte dabei Histidin, dies ist in Übereinstimmung mit den Beobachtungen an tierischen PGLuM (Milstein 1961b). PGLuM aus pflanzlichen Zellen können besser durch Cystein stabilisiert und aktiviert werden (Galloway und Dugger 1994).

Für PGLuM ist eine reversible Hemmung der Aktivität durch Vanadat beschrieben, dabei wirkt Vanadat als Struktur analogon zu Phosphat, die Hemmung ist vermutlich kompetitiv (Ray, Jr. und Puvathingal 1990; Ray, Jr. et al. 1990; Ray, Jr. und Post 1990). Dieser Effekt von Vanadat wurde auch für die PGLuM aus *A. fulgidus* Stamm 7324 gezeigt. Die Zugabe von 80 μ M Vanadat hatte eine fast vollständige Hemmung der Aktivität zur Folge.

Die PGLuM aus *A. fulgidus* Stamm 7324 zeigte in Stärke-gewachsenen Zellen um den Faktor 2.5 erhöhte Aktivität im Vergleich zu Laktat-gewachsenen Zellen. Eine solche Regulation wurde auch für die PGLuM aus *T. kodakaraensis* beschrieben. Die Aktivität dieser PGLuM war etwa 2.7-fach nach Wachstum auf Stärke im Vergleich zu Wachstum auf Pyruvat gesteigert (Rashid et al. 2004).

Die PGLuM aus *A. fulgidus* Stamm 7324 hatte eine Untereinheit von 49 kDa, das entspricht der Größe der Untereinheit des Enzyms aus *T. kodakaraensis*. Ebenso wie das Enzym aus *T. kodakaraensis* lag die PGLuM aus *A. fulgidus* Stamm 7324 in homotetramerer Struktur vor (Rashid et al. 2004). Dies ist ein Unterschied zu den bakteriellen und eukaryontischen PGLuM, die als Monomere oder Dimere aus Untereinheiten zwischen 47 und 69 kDa vorliegen (Galloway und Dugger 1994; Ray, Jr. und Roscelli 1966; Maino und Young 1974).

Die archaeellen PGLuM zeigten in Übereinstimmung mit den Wachstumstemperaturen von *A. fulgidus* Stamm 7324 und *T. kodakaraensis* hohe Temperaturoptima und hohe Thermostabilitäten (Rashid et al. 2004). Diese Stabilität war in *A. fulgidus* Stamm 7324 von der Anwesenheit von Mg^{2+} abhängig.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle Enzyme des ungewöhnlichen Stärkeabbauweges zu Glucose-6-Phosphat eine hohe Ähnlichkeit zu den homologen Proteinen aus *Thermococcus*-Arten aufwiesen. Die hier beschriebenen Enzyme CDase und PGLuM sind die ersten nativ gereinigten und funktionell charakterisierten Vertreter aus der Domäne der Archaea.

7.3 Enzyme eines modifizierten Embden-Meyerhof-Weges und der Acetatbildung in *A. fulgidus* Stamm 7324

A. fulgidus Stamm 7324 setzte Stärke zu Acetat und CO₂ um. Alle Enzyme der Glucose-Umwandlung zu Acetat konnten nachgewiesen werden. Glucose wird dabei über einen modifizierten Embden-Meyerhof-Weg zu Pyruvat umgesetzt. An der weiteren Umsetzung des Pyruvats zu Acetat sind eine Pyruvat: Ferredoxin-Oxidoreduktase und eine ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase beteiligt, wobei ein mol ATP pro mol Acetat über den Mechanismus der Substratstufen-Phosphorylierung gebildet wird. Dieser Abbauweg ist in Abbildung 32 gezeigt. Er umfasst ungewöhnliche Enzyme, so die ADP-abhängige Glucokinase und die ADP-abhängige 6-Phosphofruktokinase sowie eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin-Oxidoreduktase (GAPOR) als GAP-oxidierendes Enzym. Diese Enzyme ersetzen die klassischen ATP-abhängigen Kinasen und die GAP-Dehydrogenase sowie Phosphoglycerat-Kinase. Die Schlüsselenzyme des modifizierten Embden-Meyerhof-Weges (Glucokinase, 6-Phosphofruktokinase und Pyruvat-Kinase) sowie die ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase wurden durch das Wachstumssubstrat Stärke bis zu 14-fach induziert. Die Aktivitäten der Schlüsselenzyme eines klassischen oder modifizierten Entner-Doudoroff-Weges konnten nicht gezeigt werden. Diese Befunde unterstreichen die physiologische Bedeutung dieser Enzyme bei der Stärke-Umsetzung zu Acetat.

Dieser modifizierte Embden-Meyerhof-Weg wurde bereits für *Pyrococcus*- und *Thermococcus*-Spezies beschrieben (Kengen et al. 1994; Selig et al. 1997). Die Schlüsselenzyme dieses Weges wurden aus diesen Organismen bereits gereinigt und charakterisiert (Kengen et al. 1995; Tuininga et al. 1999; Mukund und Adams 1995; Selig et al. 1997; Van der Oost et al. 1998; De Vos et al. 1998).

Neben der Modifikation der Enzyme bezieht sich die Modifikation des Embden-Meyerhof-Weges auch auf die Netto-ATP-Ausbeute. Dieser ist im Gegensatz zum klassischen Embden-Meyerhof-Weg (2 ATP) gleich Null, da für die Regeneration der 2 mol AMP aus den Reaktionen der ADP-abhängigen Kinasen 2 mol ATP in der Adenylatkinase-Reaktion verbraucht werden. Diese 2 mol ATP stammen aus der Pyruvat-Kinase-Reaktion. Die GAP-Oxidation erfolgt über die GAPOR ohne ATP-Bildung.

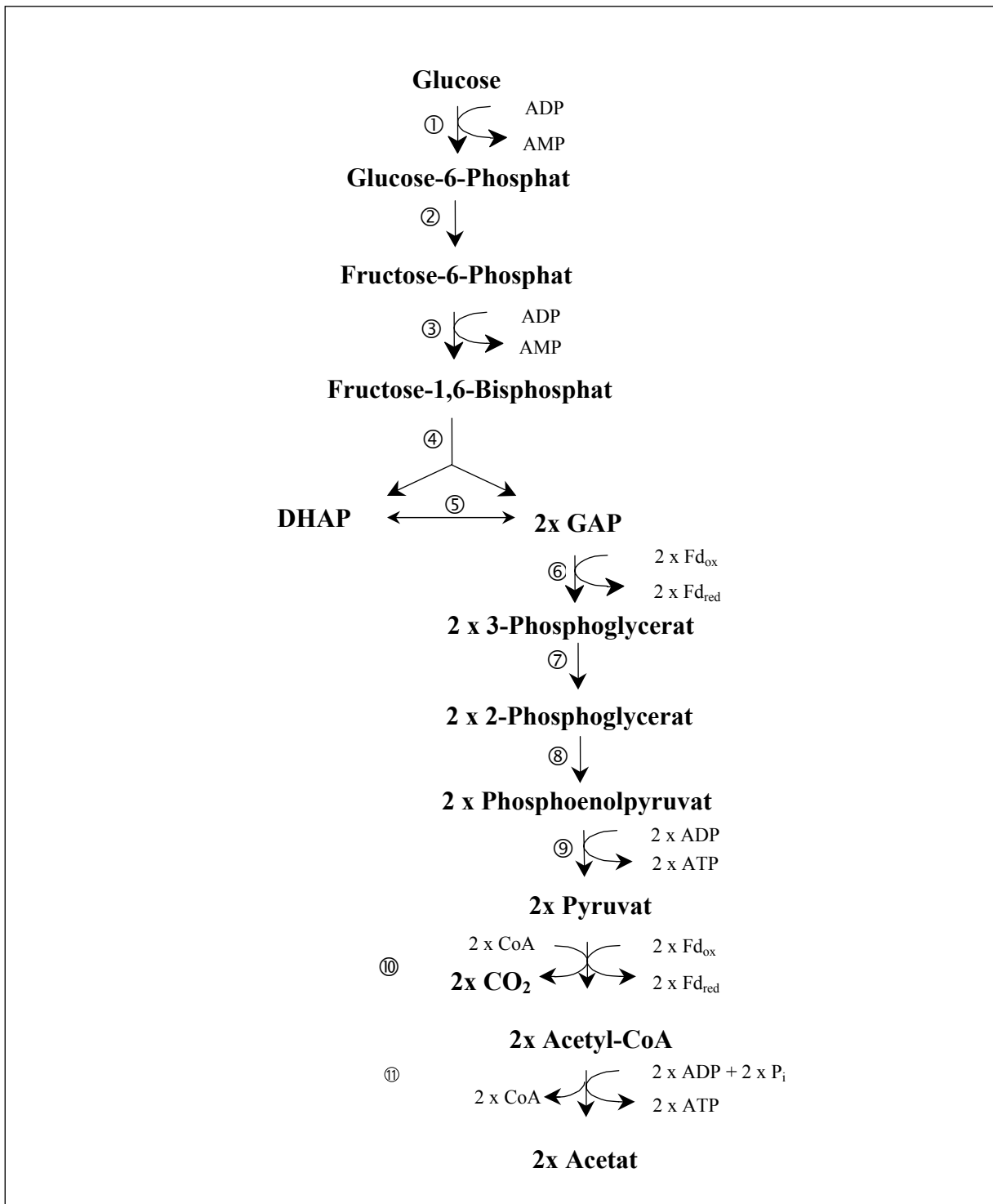


Abbildung 32 Vorgeschlagerter Abbauweg von Glucose zu Acetat und CO_2 in *A. fulgidus* Stamm 7324. Die Enzyme des modifizierten Embden-Meyerhof-Weges und der Pyruvat-Umwandlung zu Acetat und CO_2 sind gezeigt. 1 ADP-abhängige Glucokinase, 2 Glucose-6-Phosphat-Isomerase, 3 ADP-abhängige 6-Phosphofruktokinase, 4 Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase, 5 Triosephosphat-Isomerase, 6 Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin-Oxidoreduktase, 7 3-Phosphoglycerat-Mutase, 8 Enolase, 9 Pyruvat-Kinase, 10 Pyruvat: Ferredoxin-Oxidoreduktase, 11 ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase. *DHAP* Dihydroxyacetonphosphat, Fd_{ox} oxidiertes Ferredoxin, Fd_{red} reduziertes Ferredoxin, *GAP* Glycerinaldehyd-3-Phosphat.

Die Verwendung eines modifizierten Embden-Meyerhof-Weges bei der Umsetzung von Glucose zu Pyruvat und einer ADP-bildenden Acetyl-CoA-Synthetase zur Acetat-Synthese in *A. fulgidus* Stamm 7324 sind typische archaeele Merkmale (Selig et al. 1997). Im Gegensatz dazu wird in der Domäne der Bacteria Glucose über die klassischen Embden-Meyerhof- bzw. Entner-Doudoroff-Wege sowie das Enzympaar Phosphotransacetylase und Acetat-Kinase zu Acetat abgebaut. Dies gilt auch für die bekannten bakteriellen Sulfatreduzierer. So wurden alle Enzyme des klassischen Embden-Meyerhof-Weges sowie eine Acetat-Kinase in dem bakteriellen Sulfatreduzierer *Desulfovibrio gigas* gemessen, der den internen Speicherstoff Polyglucose zu Acetat umwandelt (Fareleira et al. 1997). Aktivitäten einer Acetat-Kinase und einer Phosphotransacetylase wurden ebenfalls in anderen Sulfatreduzierern gemessen, die Acetat aus Acetyl-CoA als Teil der unvollständigen Oxidation organischer Substanzen bilden (Widdel und Hansen 1992). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die domänenspezifische Verwendung von unterschiedlichen Embden-Meyerhof-Wegen und unterschiedlichen Enzymen für die Acetatbildung auch für sulfatreduzierende Prokaryonten zutrifft.

Das erste Enzym des modifizierten Embden-Meyerhof-Weges in *A. fulgidus* Stamm 7324, die ADP-abhängige Glucokinase, wurde gereinigt und charakterisiert.

7.4 Charakterisierung der ADP-abhängigen Glucokinase aus *A. fulgidus* Stamm 7324

In Tabelle 23 sind die molekularen und katalytischen Eigenschaften der ADP-GLK aus *A. fulgidus* Stamm 7324 im Vergleich zu den Eigenschaften mit der ADP-GLK aus *P. furiosus* (Kengen et al. 1995) und aus *T. litoralis* (Koga et al. 2000) sowie der der ADP-GLK-Aktivität der bifunktionellen ADP-GLK/ADP-PFK aus *M. jannaschii* (Sakuraba et al. 2002) dargestellt.

Tabelle 23 Molekulare und kinetische Eigenschaften der ADP-GLK aus *A. fulgidus* Stamm 7324 im Vergleich zu den ADP-GLK aus *P. furiosus* (Kengen et al. 1995) und *T. litoralis* (Koga et al. 2000) und zur bifunktionellen ADP-GLK/ADP-PFK aus *M. jannaschii* (Sakuraba et al. 2002).

	<i>A. fulgidus</i>	<i>T. litoralis</i>	<i>P. furiosus</i>	<i>M. jannaschii</i>
Apparente molekulare Masse				
Nativ (kDa)	50	54	93	55
Untereinheit (kDa)	50	54	43	53
Oligomere Struktur	α	α	α_2	α
pH-Optimum	7.6	7.5	7.5	n.b.
Temperaturoptimum (°C)	83	>100	105	n.b.
Apparenter V_{\max} (Glucose, ADP) (Umg^{-1})	350 ³	160 ²	~1000 ⁴	21.5 ¹
Apparenter K_m für ADP (mM)	0.07 ¹	1.9 ²	0.033 ¹	0.032 ¹
Apparenter K_m für Glucose (mM)	0.78 ¹	0.4 ²	0.7 ¹	1.6 ¹
Apparenter V_{\max} (Fructose-6-P, ADP) (Umg^{-1})	0 ³	n.b.	n.b.	7.7 ¹
Apparenter K_m für Fructose 6-P (mM)	n.b.	n.b.	n.b.	0.01 ¹

¹ gemessen bei 50°C, ² gemessen bei 37°C, ³ gemessen bei 80°C, ⁴ gemessen bei 105°C, n.b. nicht bestimmt.

Die molekularen Eigenschaften der ADP-GLK aus *A. fulgidus* Stamm 7324 zeigten die höchsten Übereinstimmungen mit dem Enzym aus *T. litoralis*. Beide Enzyme sind Monomere von ca. 50 kDa mit einer fast identischen N-terminalen Aminosäuresequenz (40 von 42 Aminosäuren identisch). Eine monomere Struktur wurde ebenfalls für die ADP-GLK/ADP-PFK aus *M. jannaschii* beschrieben. Im Gegensatz dazu ist das Enzym aus *Pyrococcus* ein Homodimer mit 53 kDa Untereinheiten.

Das Temperaturoptimum der ADP-GLK aus *A. fulgidus* Stamm 7324 lag bei 83°C, das ist ca. 20°C niedriger als die Optima der Enzyme aus *P. furiosus* (105°C) und *T. litoralis* (>100°C), aber in Übereinstimmung mit dem niedrigeren Temperaturoptimum für das Wachstum von *A. fulgidus* Stamm 7324, das bei 76°C lag. Die Wachstumsoptima der *Thermococcales* liegen dagegen bei Temperaturen nahe 100°C. Die ADP-GLK aus *A. fulgidus* Stamm 7324 zeigte eine hohe Thermostabilität: Das Enzym ist bei 80°C stabil und verliert in Anwesenheit von 1 M Ammoniumsulfat nur 30% seiner Aktivität bei einer Inkubation bei 100°C für zwei Stunden. Eine hohe Thermostabilität ist auch von der ADP-GLK von *P. furiosus* bekannt (Kengen et al. 1995).

Die ADP-GLK aus *A. fulgidus* Stamm 7324 war hoch spezifisch für ADP und Glucose. Die apparenten K_m -Werte für beide Substrate lagen jeweils in derselben Größenordnung wie die K_m -Werte der Enzyme aus *P. furiosus*, *T. litoralis* (außer dem 50-fach höheren K_m -Wert für ADP) und *M. jannaschii*. Neben Glucose akzeptierte die ADP-GLK von *A. fulgidus* Stamm 7324 nur Glucosamin und mit sehr geringer Rate 2-Deoxyglucose, dies gilt auch für die Enzyme aus *T. litoralis* und *P. furiosus*. Andere Hexosen, wie zum Beispiel Fructose, Mannose und Galactose wurden nicht phosphoryliert, so wie es auch für die ADP-GLK aus *P. furiosus* beschrieben wurde (Kengen et al. 1995). Insbesondere wurde kein Fructose-6-

Phosphat durch die ADP-GLK von *A. fulgidus* Stamm 7324 phosphoryliert, was eine Bifunktionalität als ADP-GLK/ADP-PFK für dieses Enzym, wie sie für das Enzym aus *M. jannaschii* beschrieben wurde, ausschließt und das Enzym als echte Glucokinase definiert. Für die ADP-GLK aus *T. litoralis* wurden Aktivitäten mit Fructose, Mannose und Galactose gemessen, das Enzym aus *M. jannaschii* zeigte Aktivität mit Fructose. ADP als Phosphoryldonor konnte nicht durch ATP, PP_i, CDP, GDP oder Acetylphosphat ersetzt werden. Für die ADP-GLK aus *T. litoralis* wurde eine Abhängigkeit der Rate von CDP und GDP bei 37°C beschrieben (Koga et al. 2000; Sakuraba et al. 2002). Die Rate der ADP-GLK aus *A. fulgidus* Stamm 7324 war abhängig von den divalenten Kationen Mn²⁺, Mg²⁺ und Ca²⁺, dies ist auch für die ADP-GLK aus *P. furiosus* und *M. jannaschii* beschrieben. Im Gegensatz dazu zeigte das Enzym aus *T. litoralis* keine signifikante Aktivität mit Mn²⁺ und Ca²⁺.

Diese unterschiedlichen Spezifitäten könnten dadurch erklärt werden, dass die Abhängigkeit der Raten von Zuckern, Phosphoryldonoren und divalenten Kationen der Enzyme aus *P. furiosus* (50°C), *T. litoralis* und *M. jannaschii* (beide 37°C) bei Temperaturen bestimmt wurden, die um 50-60°C unter den entsprechenden Temperaturoptima liegen, die Untersuchungen für *A. fulgidus* Stamm 7324 jedoch bei 80°C durchgeführt wurden. Diese Temperatur liegt nahe dem Temperaturoptimum (83°C) des Enzyms.

Mit der N-terminalen Aminosäuresequenz der ADP-GLK aus *A. fulgidus* Stamm 7324 und den vollständigen Primärsequenzen der ADP-GLK von *P. furiosus*, *T. litoralis* und der ADP-GLK/ADP-PFK aus *M. jannaschii* konnte im Genom des nahe verwandten *A. fulgidus* Stammes VC16 kein ORF identifiziert werden, der für ein homologes Gen codiert (Klenk et al. 1997; Stetter 1988).

In dem beschriebenen Stärkeabbauweg in *A. fulgidus* Stamm 7324 (7.2) konnten bisher keine Enzyme nachgewiesen werden, die zur Bildung von Glucose führen. Das Vorkommen einer für Glucose hochspezifischen Glucokinase, die bei Wachstum auf Stärke induziert wird, setzt jedoch Glucose als Substrat voraus. Glucose könnte das Produkt mehrerer Enzyme sein, wie sie bereits für *Klebsiella* und *Thermococcus* beschrieben wurden. In diesen Organismen wurden Enzyme beschrieben, die die Stärkeabbauwege ergänzen. So wird die Aktivität der Mal-P bei *Klebsiella oxytoca* und *E. coli* durch eine Amylomaltase unterstützt. Diese setzt die entstehenden Maltooligosaccharide mit weniger als vier Glucoseeinheiten, die die Mal-P nicht weiter spalten kann, weiter zu Glucose um (Schwartz 1987). Für *T. litoralis* ist das Zusammenwirken der Mal-P und einer α -Glucanotransferase beschrieben. Hierbei wird Maltose durch Transglycosylierung durch die α -Glucanotransferase zu Glucose und Maltooligosacchariden umgesetzt. Letztere werden schrittweise durch die Mal-P abgebaut (Xavier et al. 1999). Im Rohextrakt von *A. fulgidus* Stamm 7324 konnten entsprechende Aktivitäten nicht nachgewiesen werden. Eine weitere Möglichkeit der Glucosebildung ist die Aktivität der CGTase. Die CGTase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 hatte eine hohe Ähnlichkeit zu einer α -Glucanotransferase aus *T. litoralis*. Dieses Enzym ist in der Lage durch Transglycosylierungs-Aktivitäten sowohl zyklische als auch lineare Oligosaccharide sowie

Glucose zu produzieren. Ob die CGTase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 ebenfalls diese Aktivitäten aufweist, bleibt noch zu klären.

7.5 Wachstumsversuche und Enzymmessungen zum Zuckerstoffwechsel in *A. fulgidus* Stamm VC16

In der vorliegenden Arbeit wurde kein Wachstum des *A. fulgidus* Typstamms VC16 mit Stärke oder anderen Zuckern gezeigt. Weiterhin konnten in Extrakten von Laktatgewachsenen Zellen von *A. fulgidus* Stamm VC16, im Gegensatz zu Laktatgewachsenen Zellen von *A. fulgidus* Stamm 7324, keine Aktivitäten einer Glucokinase, einer 6-Phosphofruktokinase und einer Pyruvat-Kinase gemessen werden. Mit Hilfe der N-terminalen Aminosäure-Sequenzen dieser aus *A. fulgidus* Stamm 7324 gereinigten Enzyme wurden keine homologen Gene im Genom von *A. fulgidus* Stamm VC16 identifiziert (Hansen und Schönheit 2003; Johnsen et al. 2003). Die Befunde sprechen dafür, dass der *A. fulgidus* Stamm VC16 nicht über die Gene, die für die katabolen Enzyme des Embden-Meyerhof-Weges codieren, verfügt. Das erklärt die Unfähigkeit des Stammes Zucker als Substrate zu verwenden.

Die Eigenschaften der gereinigten Enzyme des Stärkeabbaus zu Glucose-6-Phosphat und der ADP-abhängige Glucokinase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 ähnelten denen ihrer Homologen aus der Familie der *Thermococcales*. In Übereinstimmung dazu sind die N-terminalen Aminosäuresequenzen der Enzyme bzw. das Gen der CGTase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 den entsprechenden Homologen aus *Thermococcus*-Spezies sehr ähnlich. Diese Befunde könnten durch lateralen Gentransfer von einem Organismus aus der Ordnung der *Thermococcales* in *A. fulgidus* Stamm 7324 erklärt werden. Ähnliche Ergebnisse sind auch für die Glutamat-Dehydrogenase aus *A. fulgidus* Stamm 7324 beschrieben. Diese konnte in *A. fulgidus* Stamm VC16 nicht gemessen werden (Aalen 1997). Die Eigenschaften dieses Enzyms sind sehr ähnlich zu denen seines Homologen aus *Thermococcus litoralis*. Das entsprechende Gen wurde aus *A. fulgidus* Stamm 7324 isoliert, es zeigte 98% Ähnlichkeit zum Gen aus *T. litoralis*. Auch hier wird lateraler Gentransfer von *Thermococcus*-Spezies zu *A. fulgidus* Stamm 7324 diskutiert (Lillestol et al. 2000).

Diskussion II: Charakterisierung Stärke-abbauender Enzyme aus geothermalen Habitaten

Zusätzlich zu den Untersuchungen zum Stärkestoffwechsel von *A. fulgidus* Stamm 7324 wurden in dieser Arbeit Untersuchungen an thermophilen Stärke-umsetzenden Enzymen aus heißen Quellen in Island im Rahmen des EU-Projektes „Thermogenes“ durchgeführt. Dabei stand die Suche nach ungewöhnlichen Substratspektren, die Untersuchung der Abhängigkeit der Aktivitäten von Kationen und die Bestimmung der thermophilen Eigenschaften im Mittelpunkt der Untersuchungen, da diese Eigenschaften von besonderem biotechnologischen Interesse sind. Sieben Gene von Stärke-abbauenden Enzymen der Glycosylhydrolase-Familie 13, die mit Hilfe der „CODEHOP consensus primer strategy“ durch die Arbeitsgruppe Kristjansson (Prokaria, Reykjavik, Island) aus Umwelt-DNA und Organismen geothermaler Habitate isoliert worden waren, wurden in *E. coli* überexprimiert. Die erhaltenen Proteine wurden gereinigt und charakterisiert. Es handelte sich dabei um je ein Protein mit Pullulanase- bzw. Neopullulanase-Aktivität sowie fünf verschiedene Proteine, die Cyclodextrinase-Aktivität zeigten.

7.6 Pullulanase

Das moderat thermophile Protein Amy90, dessen Gen aus *Bacillus thermoleovorans* r105 stammte, wurde rekombinant in *E. coli* hergestellt. Die Reinigung konnte über Affinitätschromatographie mittels eines Tags erfolgen, der jedoch entfernt werden musste, um die Thermostabilität vollständig herzustellen. Das Protein zeigte eine Pullulanase-Aktivität. Abbildung 33 gibt einen Überblick über die verschiedenen Pullulanase-Typen.

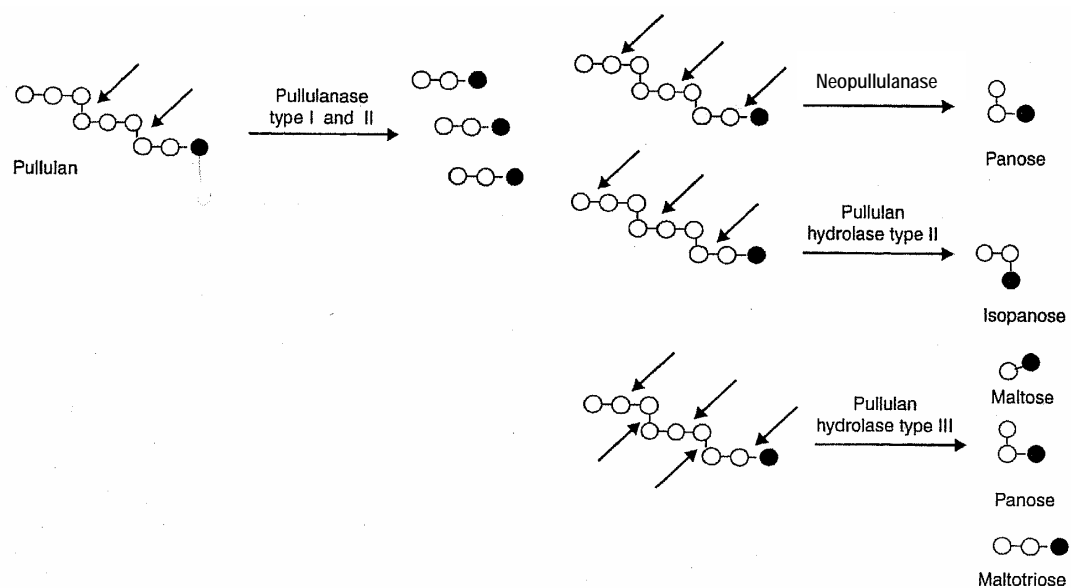


Abbildung 33 Die Aktivität der verschiedenen Pullulan-modifizierenden Enzyme (aus: Bertoldo und Antranikian 2002). Gefüllte Kreise bezeichnen das reduzierende Ende des Zuckers.

Thermostabile und thermoaktive Pullulanasen wurden bereits aus einigen Bacteria und Archaea beschrieben (Niehaus et al. 1999; Brown und Kelly 1993), die meisten von ihnen gehören in die Pullulanase Typ-II-Gruppe (Amylopullulanase), die sowohl α -1,4- als auch α -1,6-glycosidische Bindungen in Polysacchariden spalten und deren Hauptprodukte bei der Hydrolyse von Pullulan Glucose, Maltose und Maltotriose sind. Thermophile Pullulanasen vom Typ I (ausschließlich Aktivität mit α -1,6-glycosidischen Bindungen) sind nur für wenige Organismen beschrieben (Bertoldo und Antranikian 2002).

Die Aminosäuresequenz der Pullulanase aus *B. thermoleovorans* r105 hat die größte Ähnlichkeit zu Pullulanasen vom Typ II, sie ist zu 95% der Aminosäuresequenz der Pullulanase aus *Thermus sp.* identisch. Die konservierten Regionen der α -Amylase-Familie können auch in dieser Sequenz nachgewiesen werden (MacGregor et al. 2001). Die Consensus-Sequenz der Pullulanasen Typ I, YNWGYDP, konnte nicht nachgewiesen werden (Bertoldo und Antranikian 2002; Doman-Pytka und Bardowski 2004). Die für alle Pullulanasen kennzeichnenden Aminosäuren Aspartat und Glutamat im katalytischen Zentrum sind jedoch vorhanden (Kuriki und Imanaka 1999).

Das Substratspektrum der Pullulanase aus *Bacillus thermoleovorans* r105 war relativ eingeschränkt, neben Pullulan wurden nur Stärke, Amylose und Trehalose mit signifikanten Raten umgesetzt. Dies ist eine typische Eigenschaft von Pullulanasen Typ II, nur die Pullulanase Typ II von *Desulfurococcus mucosus* zeigt ein deutlich erweitertes Substratspektrum, das sogar Cyclodextrine einschließt, die sonst als Inhibitoren von Pullulanase Typ II gelten (Duffner et al. 2000). Die Pullulanase aus *Bacillus thermoleovorans* r105 zeigte moderat thermophile Eigenschaften, wobei Ca^{2+} -Ionen für die Stabilisierung gegen thermale Inaktivierung wichtig sind. Dieses Phänomen ist auch für die Pullulanasen vom Typ II aus *Thermococcales* beschrieben (Brown und Kelly 1993; Gantelet et al. 1998).

7.7 Neopullulanase

Das Protein Amy29 wurde kloniert und in *E. coli* überexprimiert, die Expressionsrate war gering. Die Reinigung wurde mit Hilfe von fünf säulenchromatographischen Schritten vorgenommen. Das moderat thermophile Protein, dessen Sequenz die höchste Ähnlichkeit zu einer Neopullulanase aus *Synechocystis sp.* aufweist, zeigte hohe Aktivität mit Pullulan und Stärke, aber auch mit Amylopektin sowie mit kurzkettigen Oligosacchariden. Als Produkt aus Pullulan entsteht Panose. Diese Eigenschaft definiert das Enzym als eine Neopullulanase (Abbildung 33). Neopullulanasen sind auch unter der Bezeichnung Pullulan-Hydrolase Typ I bekannt (Bertoldo 2002). Die Aminosäuresequenz von Amy29 zeigt die typischen Motive von Pullulan-hydrolysierenden Enzymen (Bertoldo und Antranikian 2002; Doman-Pytka und Bardowski 2004). Viele Neopullulanasen zeigen zusätzlich zu der Pullulan-Hydrolyse auch Aktivität mit Cyclodextrinen (siehe auch 7.8, (Park et al. 2000)). Amy29 zeigte diese Aktivität jedoch nicht.

Die Aktivität der Neopullulanase war abhängig von der Zugabe von Mn^{2+} , Calciumionen als typische aktivierende Kationen der GH-13-Familie führten nicht zu einer Aktivierung von

Amy29. Obwohl Amy29 ein moderates Temperaturoptimum hatte, zeichnete sich das Enzym durch eine hohe Thermostabilität aus. Noch 20°C über dem Optimum wurde eine Halbwertszeit von 480 Minuten bestimmt. Die meisten bekannten thermostabilen Neopullulanasen haben eine deutlich geringere Stabilität gegenüber thermaler Inaktivierung. Die Neopullulanase aus *Desulfurococcus mucosus* zeigt zum Beispiel ein Optimum von 85°C, allerdings verbunden mit einer Halbwertszeit von 50 Minuten bei dieser Temperatur (Duffner et al. 2000).

Neopullulanasen sind von industrieller Bedeutung, da ihr Hauptabbauprodukt aus Pullulan, die Panose, als zahnfreundliches Süßungsmittel eingesetzt werden kann. Mit den thermophilen Eigenschaften und dem breiten Substratspektrum könnte Amy29 von weiterem biotechnologischem Interesse sein.

7.8 Cyclodextrinasen

Zu den Cyclodextrin-hydrolysierenden Enzymen gehören drei Subfamilien der GH-13-Familie, die neben der Cyclodextrin-Hydrolyse jeweils unterschiedliche Substrat- und Produktspektren zeigen: Cyclodextrinasen (CDase), maltogene Amylasen und Neopullulanasen (Park et al. 2000). Bisher sind nur wenige dieser Enzyme aus Bacteria und Archaea charakterisiert worden (Lee et al. 2002). Die Zuordnung zu diesen Subfamilien lässt sich auf der Ebene der Aminosäuresequenz vornehmen.

Ausgehend von der Aminosäuresequenz lassen sich daher die fünf untersuchten Proteine Amy1, Amy89, Amy92, Amy98 und Amy132 in die drei verschiedenen Subfamilien der GH-13-Familie einordnen: Amy1 zeigte Ähnlichkeit zu einer Cyclodextrinase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Die Sequenzen der Proteine Amy89 und Amy98 zeigten hohe Ähnlichkeiten zu maltogenen Amylasen aus *Thermus* sp. bzw. *Bacillus stearothermophilus*. Die Sequenzen von Amy92 und Amy132 zeigten hohe Ähnlichkeiten zu Neopullulanasen aus *Thermoactinomyces vulgaris* bzw. *Bacillus stearothermophilus*.

Untersuchungen haben gezeigt, dass die Cyclodextrin-Hydrolyse bei Enzymen der GH-13-Familie mit dem Vorkommen einer zusätzlichen N-terminalen Domäne korreliert ist, der N-Domäne (Van der Maarel et al. 2002). α -Amylasen ohne CDase-Aktivität fehlt diese Domäne. Diese Domäne soll für die Dimerisierung durch Kontakt der aktiven Zentren der Proteine verantwortlich sein, die in der Bildung einer schmalen Spalte resultiert. Diese Spalte hat die Größe von Cyclodextrin-Molekülen und schließt größere Moleküle aus (Park et al. 2000). Die hier untersuchten Proteine Amy1, Amy89, Amy92, Amy98 und Amy132 enthielten diese N-terminale Domäne in ihrer Sequenz und zeigten α_2 -Oligomerisierung. Eine Ausnahme bildet Amy92, für das eine monomere Struktur ermittelt wurde. Alle untersuchten Proteine zeigten konservierte Aminosäuren, die als Cyclodextrin-Bindetasche vorgeschlagen wurden (Kamitori et al. 1999). Ebenfalls teilen die Enzyme die konservierten Regionen, die allen bisher untersuchten Cyclodextrin-abbauenden Enzymen der GH-13-Familie gemein sind (Park et al. 2000). Entsprechend der Vorhersagen aus der Sequenzähnlichkeit konnte für jedes dieser moderat thermophilen Enzyme die Aktivität nachgewiesen werden, die der Zuordnung

zu den einzelnen Subfamilien entspricht. Außerdem katalysierten alle Proteine, wie durch die Anwesenheit der N-Domäne und der Cyclodextrin-Bindestelle vorhergesagt, die Hydrolyse von Cyclodextrinen.

Das Vorhandensein der N-Domäne und die Dimerisierung scheinen also wichtige Faktoren für die spezifische Aktivität mit Cyclodextrinen zu sein, die Ergebnisse zeigen aber, dass auch monomere Enzyme in der Lage sind, Cyclodextrin zu hydrolysieren. Bisher wurden nur wenige monomere Enzyme beschrieben, die in der Lage sind, Cyclodextrine abzubauen, so zum Beispiel eine zellgebundene CDase aus *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Podkovyrov et al. 1993). Die Raten der monomeren Enzyme in Abhängigkeit von der Cyclodextrinkonzentration sind relativ zu den Raten der dimeren Enzyme geringer, dies trifft auch für Amy92 zu.

Bis auf Amy92 zeigten alle untersuchten Enzyme eine von Calciumionen beeinflusste Aktivität und Thermostabilität. In Übereinstimmung mit diesem Befund konnten in allen Sequenzen, auch in der Sequenz von Amy92, Calciumbindestellen identifiziert werden (Kamitori et al., 2002). Die apparente Calciumunabhängigkeit von Amy92 lässt sich durch fest gebundene Calciumionen erklären. Ähnliche Beobachtungen konnten auch für die maltogene Amylase aus *Thermoactinomyces vulgaris* (TVAII, Kamitori et al. 1999) und die α -Amylase aus *Pyrococcus woesei* (Bertoldo und Antranikan 2002) gemacht werden, an deren Kristallstruktur die Calciumbindestellen demonstriert wurden.

Das Sequenzalignment der fünf untersuchten Enzyme mit CDase-Aktivität zeigt Abbildung 34. Als Referenz für das Alignment wurde die maltogene Amylase aus *Thermoactinomyces vulgaris* (TVAII) verwendet, deren Kristallstruktur bereits aufgeklärt wurde und die eine hohe Aktivität mit Cyclodextrinen zeigt (Kamitori et al. 1999). Das Alignment zeigt neben den konservierten Regionen der GH-13-Familie die N-Domäne und die konservierten Regionen, die für Cyclodextrinasen kennzeichnend sind. Die Aminosäuren, die an der Bildung einer Cyclodextrin-Bindetasche beteiligt sind sowie die Aminosäuren, die für die Calciumbindung verantwortlich sind, wurden markiert.

Die Charakterisierung und die Analyse der Aminosäuresequenz der hier untersuchten Proteine, die den drei Subfamilien der GH-13-Familie (Cyclodextrinasen, maltogene Amylasen und Neopullulasen) zugeordnet wurden, zeigten eine sehr hohe Ähnlichkeit der Enzyme zueinander. Diese Ergebnisse unterstützen den Vorschlag, alle Enzyme dieser Subfamilien aufgrund der hohen Ähnlichkeiten zueinander in eine neue gemeinsame Subfamilie der Cyclodextrinasen einzuordnen, wenn sie die N-Domäne besitzen und Cyclodextrinase-Aktivität aufweisen (Lee et al. 2002). Nur maltogene Amylasen und Neopullulasen mit davon verschiedener Struktur und ohne Cyclodextrinase-Aktivität verbleiben in den bisherigen Subfamilien. Dies gilt zum Beispiel für die in dieser Arbeit untersuchte Neopullulanase Amy29, der die N-Domäne fehlt und die daher auch keine CDase-Aktivität aufweist (7.7).

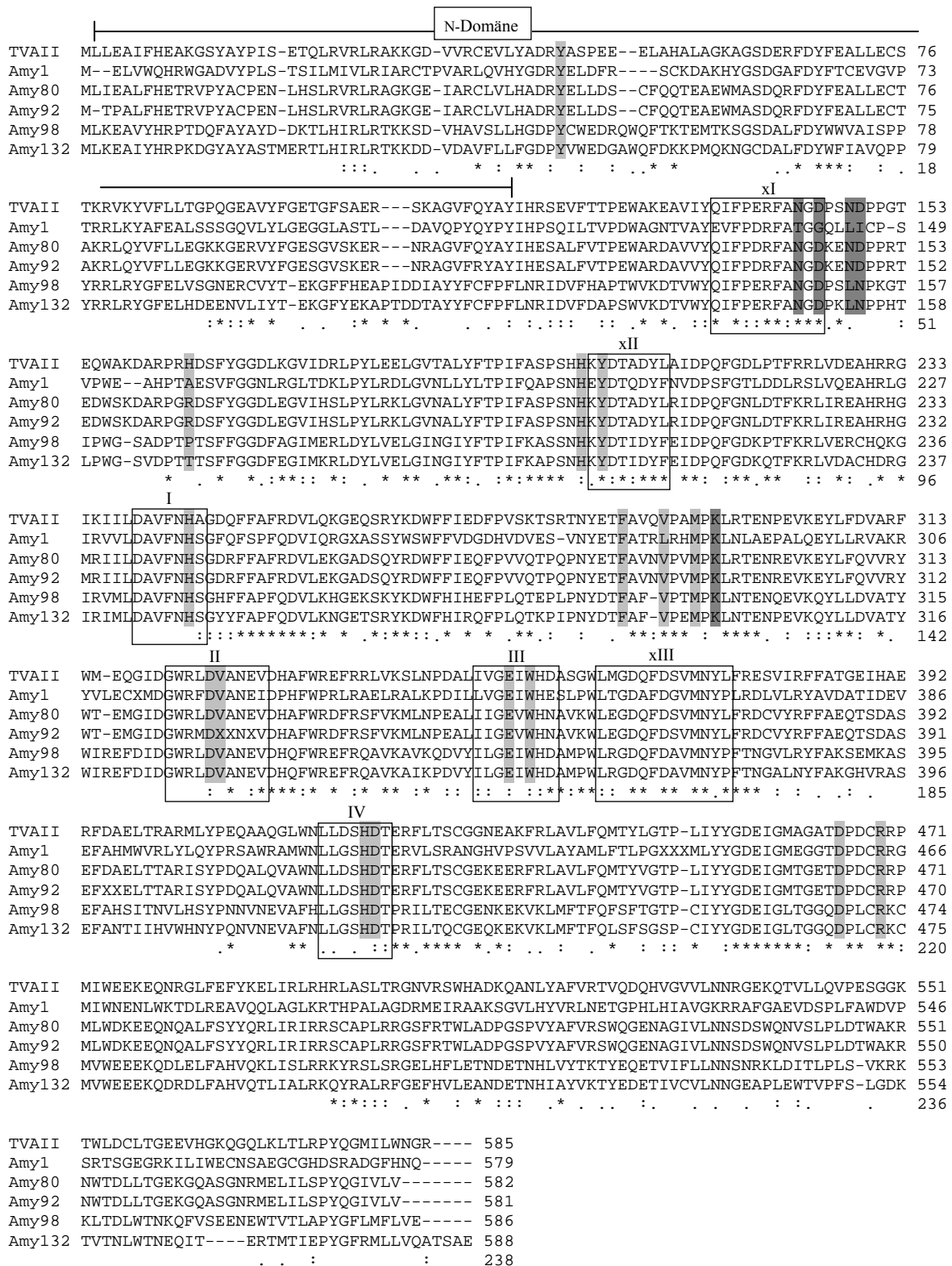


Abbildung 34 Sequenzalignment der fünf untersuchten Cyclodextrin-abbauenden Enzyme und der maltogenen Amylase aus *Thermoactinomyces vulgaris* (TVAI). Das Alignment wurde mit Hilfe von ClustalX (Thompson et al. 1997) mit Standardeinstellungen erstellt. Die vier konservierten Regionen der GH-13-Familie (I-IV, MacGregor et al. 2001) und die konservierten Regionen von Cyclodextrin-abbauenden Enzymen (XI-XIII) sind mit Kästen markiert. Die N-Domäne ist mit einem waagerechten Strich gekennzeichnet. Die Aminosäuren, die eine Cyclodextrin-Bindetasche bilden, sind hellgrau hinterlegt (Kamitori et al. 1999). Aminosäuren, die wichtig für die Ca²⁺-Bindung sind, sind dunkelgrau hinterlegt (Park et al. 2000). Ein Stern markiert identische Aminosäuren, ein Doppelpunkt zeigt konservierte Austausche an, ein Punkt eng verwandte Aminosäuren.

Alle untersuchten Proteine zeigten interessante Eigenschaften für biotechnologische Prozesse in Bezug auf die Substrat- und Produktspektren, die thermophilen Eigenschaften sowie die Abhängigkeit von divalenten Kationen. Die Produktspektren der Neopullulanase, Pullulanase und maltogene Amylase sind von besonderem Interesse. So wird zum Beispiel Panose, das Produkt der Neopullulanase, als Zuckeraustauschstoff verwendet (Kuriki et al. 1992). Pullulanasen werden benötigt, um die α -1,6-glycosidischen Bindungen im Stärkemolekül abzubauen und so die Stärke zum Beispiel im Prozess der Stärkeverzuckerung einem vollständigen Abbau zuzuführen (Van der Maarel et al. 2002). Alle hier untersuchten Proteine waren moderat thermophil und zeichneten sich durch eine gute Thermostabilität bei Temperaturen von 50°-80°C aus. Alle Proteine waren ohne den Zusatz von Kationen aktiv, eine Zugabe erhöhte jedoch die Rate. Diese Eigenschaft könnte von Nutzen sein, da bei der Umsetzung von Stärke auf den Zusatz von Kationen verzichtet werden könnte. Für die Verwendung in der Biotechnologie ist die Herstellung großer Enzymmengen nötig. Hierzu müssen Expression und Reinigungsstrategien der hier beschriebenen Proteine noch optimiert werden.

8 Literatur

- Antranikian G (1990) Physiology and enzymology of thermophilic anaerobic bacteria degrading starch. *FEMS Microbiol.Rev.* 75:201-218
- Beeder J, Nilsen RK, Rosnes JT, Torsvik T, Lien T (1994) *Archaeoglobus fulgidus* isolated from hot North Sea oil field waters. *Appl.Environ.Microbiol.* 60:1227-1231
- Bertoldo C, Antranikian G (2002) Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Curr.Opin.Biotechnol.* 6:151-160
- Beutler HO (1988) Starch. In: Bergmeyer H-U (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn. Verlag Chemie Weinheim, pp 2-10
- Biwer A, Antranikian G, Heinzle E (2002) Enzymatic production of cyclodextrins. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 59:609-617
- Blöchl E, Burggraf S, Fiala G, Lauerer G, Huber G, Huber R, Rachel R, Segerer A, Stetter KO, Völkl P (1995) Isolation, taxonomy and phylogeny of hyperthermophilic microorganisms. *World J.Microbiol.Biotechnol.* 11:9-16
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72:248-254
- Brown SH, Costantino HR, Kelly RM (1990) Characterization of amyolytic enzyme activities associated with the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *Appl.Environ.Microbiol.* 56:1985-1991
- Brown SH, Kelly RM (1993) Characterization of amyolytic enzymes, having both α -1,4 and α -1,6 hydrolytic activity, from the thermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *Appl.Environ.Microbiol.* 59:2614-2621
- Brunner NA, Hensel R (2001) Nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermoproteus tenax*. *Methods Enzymol.* 331:117-131
- Budgen N, Danson MJ (1986) Metabolism of glucose via a modified Entner-Doudoroff pathway in the thermoacidophilic archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett.* 196:207-210
- Cline JD (1969) Spectrometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol.Oceanogr.* 14:454-458
- Cord-Ruwisch R, Ollivier B, Garcia J (1986) Fructose degradation by *Desulfovibrio sp.* in pure culture and in coculture with *Methanospirillum hungatei*. *Curr.Microbiol.* 13:285-289
- Cordwell SJ (1999) Microbial genomes and "missing" enzymes: redefining biochemical pathways. *Arch.Microbiol.* 172:269-279
- Dahl C, Speich N, Trüper HG (1994) Enzymology and molecular biology of sulfate reduction in extremely thermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Methods Enzymol.* 243:331-349
- Danson MJ (1988) Archaeobacteria: the comparative enzymology of their central metabolic pathways. *Adv.Microb.Physiol.* 29:165-231
- De Rosa M, Gambacorta A (1988) The lipids of archaeobacteria. *Prog.Lipid Res.* 27:153-175

- De Rosa M, Gambacorta A, Nicolaus B, Giardina P, Poerio E, Buonocore V (1984) Glucose metabolism in the extreme thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem.J.* 224:407-414
- De Vos WM, Kengen SW, Voorhorst WG, Van der Oost J (1998) Sugar utilization and its control in hyperthermophiles. *Extremophiles* 2:201-205
- Doman-Pytka M, Bardowski J (2004) Pullulan degrading enzymes of bacterial origin. *Crit.Rev.Microbiol.* 30:107-121
- Duffner F, Bertoldo C, Andersen JT, Wagner K, Antranikian G (2000) A new thermoactive pullulanase from *Desulfurococcus mucosus*: cloning, sequencing, purification, and characterization of the recombinant enzyme after expression in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* 182:6331-6338
- Fareleira P, Legall J, Xavier AV, Santos H (1997) Pathways for utilization of carbon reserves in *Desulfovibrio gigas* under fermentative and respiratory conditions. *J.Bacteriol.* 179:3972-3980
- Fazi A, Piacentini MP, Piatti E, Accorsi A (1990) Purification and partial characterization of the phosphoglucomutase isozymes from human placenta. *Prep.Biochem.* 20:219-240
- Feederle R, Pajatsch M, Kremmer E, Bock A (1996) Metabolism of cyclodextrins by *Klebsiella oxytoca* m5a1: purification and characterisation of a cytoplasmically located cyclodextrinase. *Arch.Microbiol.* 165:206-212
- Fiala G, Stetter KO (1986) *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Arch.Microbiol.* 145:56-61
- Fiedler G, Pajatsch M, Bock A (1996) Genetics of a novel starch utilisation pathway present in *Klebsiella oxytoca*. *J.Mol.Biol.* 256:279-291
- Galloway CM, Dugger WM (1994) Purification and characterization of phosphoglucomutase from peas. *Physiologia Plantarum* 92:479-486
- Gantelet H, Ladrat C, Godfroy A, Barbier G, Duchiron F (1998) Characteristics of pullulanases from extremely thermophilic archaea isolated from deep-sea hydrothermal vents. *Biotechnol.Lett.* 20:819-823
- Gebhard S (2002) Zuckerstoffwechsel von hyperthermophilen Archaea: Charakterisierung der Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin Oxidoreduktase aus *Archaeoglobus fulgidus* und Enzyme des Glucoseabbaus in *Pyrobaculum aerophilum*.
- Guzman-Maldonado H, Paredes-Lopez O (1995) Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. *Crit.Rev.Food Sci.Nutr.* 35:373-403
- Hammond KD, Balinsky D (1978) Isozyme studies of several enzymes of carbohydrate metabolism in human adult and fetal tissues, tumor tissues, and cell cultures. *Cancer Res.* 38:1323-1328
- Hansen T, Musfeldt M, Schönheit P (2002a) ATP-dependent 6-phosphofructokinase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: characterization of an extremely thermophilic, allosterically regulated enzyme. *Arch.Microbiol.* 177:401-409

- Hansen T, Reichstein B, Schmid R, Schönheit P (2002b) The first archaeal ATP-dependent glucokinase, from the hyperthermophilic crenarchaeon *Aeropyrum pernix*, represents a monomeric, extremely thermophilic ROK glucokinase with broad hexose specificity. *J.Bacteriol.* 184:5955-5965
- Hansen T, Schönheit P (2001) Sequence, expression, and characterization of the first archaeal ATP-dependent 6-phosphofructokinase, a non-allosteric enzyme related to the phosphofructokinase-B sugar kinase family, from the hyperthermophilic crenarchaeote *Aeropyrum pernix*. *Arch.Microbiol.* 177:62-69
- Hansen T, Schönheit P (2003) ADP-dependent 6-phosphofructokinase, an extremely thermophilic, non-allosteric enzyme from the hyperthermophilic, sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324. *Extremophiles* 8:29-35
- Hansen T, Wendorff D, Schönheit P (2004) Bifunctional phosphoglucose/phosphomannose isomerases from the Archaea *Aeropyrum pernix* and *Thermoplasma acidophilum* constitute a novel enzyme family within the phosphoglucose isomerase superfamily. *J.Biol.Chem.* 279:2262-2272
- Hanus J, Kucera J (1974) Starch gel for gel filtration. *J.Chromatogr.* 97:270-272
- Hashimoto Y, Yamamoto T, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T (2001) Extracellular synthesis, specific recognition, and intracellular degradation of cyclomaltodextrins by the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. strain B1001. *J.Bacteriol.* 183:5050-5057
- Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem.J.* 280 (Pt 2):309-316
- Henrissat B, Bairoch A (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem.J.* 293 (Pt 3):781-788
- Huber R, Stetter KO (1992) The Order Thermotogales. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W und Schleifer KH (eds) *The Prokaryotes. A Handbook of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, 2nd edn. Springer-Verlag, New York, pp 3810-3815
- Imanaka T, Kuriki T (1989) Pattern of action of *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase on pullulan. *J.Bacteriol.* 171:369-374
- Jeon BS, Taguchi H, Sakai H, Ohshima T, Wakagi T, Matsuzawa H (1997) 4- α -glucanotransferase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* - enzyme purification and characterization, and gene cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli*. *Eur.J.Biochem.* 248:171-178
- Johnsen U, Hansen T, Schönheit P (2003) Comparative analysis of pyruvate kinases from the hyperthermophilic archaea *Archaeoglobus fulgidus*, *Aeropyrum pernix*, and *Pyrobaculum aerophilum* and the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: unusual regulatory properties in hyperthermophilic archaea. *J.Biol.Chem.* 278:25417-25427
- Johnsen U, Selig M, Xavier KB, Santos H, Schönheit P (2001) Different glycolytic pathways for glucose and fructose in the halophilic archaeon *Halococcus saccharolyticus* [published erratum appears in *Arch.Microbiol.* 2003 180: 503]. *Arch.Microbiol.* 175:52-61

- Kaine BP, Gupta R, Woese CR (1983) Putative introns in tRNA genes of prokaryotes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 80:3309-3312
- Kamitori S, Abe A, Ohtaki A, Kaji A, Tonozuka T, Sakano Y (1999) Crystal structures and structural comparison of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 alpha-amylase 1 (TVAI) at 1.6 Å resolution and alpha-amylase 2 (TVAII) at 2.3 Å resolution. *J.Mol.Biol.* 318:443-453
- Kandler O, König H (1998) Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cell Mol.Life Sci.* 54:305-308
- Kengen SW, de Bok FA, van Loo ND, Dijkema C, Stams AJ, De Vos WM (1994) Evidence for the operation of a novel Embden-Meyerhof pathway that involves ADP-dependent kinases during sugar fermentation by *Pyrococcus furiosus*. *J.Biol.Chem.* 269:17537-17541
- Kengen SW, Tuininga JE, de Bok FA, Stams AJ, De Vos WM (1995) Purification and characterization of a novel ADP-dependent glucokinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J.Biol.Chem.* 270:30453-30457
- Kengen SW, Tuininga JE, Verhees CH, Van der Oost J, Stams AJ, De Vos WM (2001) ADP-dependent glucokinase and phosphofructokinase from *Pyrococcus furiosus*. *Methods Enzymol.* 331:41-53
- Klemp R, Cypionka H, Widdel F, Pfennig N (1985) Growth with hydrogen, and further physiological characteristics of *Desulfotomaculum* species. *Arch.Microbiol.* 143:203-208
- Klenk HP et al. (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* [published erratum appears in Nature 1998 Jul 2;394(6688):101]. *Nature* 390:364-370
- Knierim D (2004) ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetasen aus *Archaeoglobus fulgidus* Stamm 7324.
- Koch R, Spreinat A, Lemke K, Antranikian G (1991) Purification and properties of a hyperthermoactive α -amylase from the archaeobacterium *Pyrococcus woesei*. *Arch.Microbiol.* 155:572-578
- Koch R, Zabłowski R, Spreinat A, Antranikian G (1990) Extremely thermostable amylolytic enzyme from the archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *FEMS Microbiol.Lett.* 71:21-26
- Koga S, Yoshioka I, Sakuraba H, Takahashi M, Sakasegawa S, Shimizu S, Ohshima T (2000) Biochemical characterization, cloning, and sequencing of ADP-dependent (AMP-forming) glucokinase from two hyperthermophilic Archaea, *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *J.Biochem.(Tokyo)* 128:1079-1085
- Kunow J, Linder D, Stetter KO, Thauer RK (1994) F₄₂₀H₂: quinone oxidoreductase from *Archaeoglobus fulgidus*. Characterization of a membrane-bound multisubunit complex containing FAD and iron-sulfur clusters. *Eur.J.Biochem.* 223:503-511
- Kuriki T, Imanaka T (1999) The Concept of the α -Amylase Family: Structural Similarity and Common Catalytic Mechanism. *J.Biosci.Bioeng.* 87:557-565
- Kuriki T, Tsuda M, Imanaka T (1992) Continuous Production of Panose by Immobilized Neopullulanase. *Journ.Ferm.Bioeng.* 73:198-202

- Laderman KA, Davis BR, Krutzsch HC, Lewis MS, Griko YV, Privalov PL, Anfinsen CB (1993) The purification and characterization of an extremely thermostable alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *J.Biol.Chem.* 268:24394-24401
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Langworthy TA, Pond JL (1986) Archaeobacterial ether lipids and chemotaxonomy. *System.Appl.Microbiol.* 7:253-257
- Lee HS, Kim MS, Cho HS, Kim JI, Kim TJ, Choi JH, Park C, Oh BH, Park KH (2002) Cyclomaltodextrinase, neopullulanase, and maltogenic amylase are nearly indistinguishable from each other. *J.Biol.Chem.* 277:21891-21897
- Leuschner C, Antranikian G (1995) Heat-stable enzymes from extremely thermophilic microorganisms. *World J.Microbiol.Biotechnol.* 11:95-114
- Leveque E, Janecek S, Haye B, Belarbi A (2000) Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme Microb.Technol.* 26:3-14
- Lillestol R, Lien T und Birkeland NK (2000) Lateral gene transfer in hyperthermophiles: Is the glutamate dehydrogenase gene in *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324 transferred from a *Thermococcus* sp? 2nd NorFA Workshop on Biology of Thermophiles.
- Lytovchenko A, Sweetlove L, Pauly M, Fernie AR (2002) The influence of cytosolic phosphoglucomutase on photosynthetic carbohydrate metabolism. *Planta* 215:1013-1021
- MacGregor EA, Janecek S, Svensson B (2001) Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochim.Biophys.Acta* 1546:1-20
- Maino VC, Young FE (1974) Regulation of glucosylation of teichoic acid. I. Isolation of phosphoglucomutase in *Bacillus subtilis* 168. *J.Biol.Chem.* 249:5169-5175
- Miller (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal.Chem.* 31:426
- Milstein C (1961a) Inhibition of phosphoglucomutase by trace metals. *Biochem.J.* 79:591-596
- Milstein C (1961b) The mechanism of activation of phosphoglucomutase by chelating agents. *Biochem.J.* 79:584-590
- Mukund S, Adams MWW (1995) Glyceraldehyde-3-phosphate ferredoxin oxidoreductase, a novel tungsten-containing enzyme with a potential glycolytic role in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J.Biol.Chem.* 270:8389-8392
- Najjar VA (1955) Phosphoglucomutase from muscle. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, pp 294-299
- Naught LE, Tipton PA (2001) Kinetic mechanism and pH dependence of the kinetic parameters of *Pseudomonas aeruginosa* phosphomannomutase/phosphoglucomutase. *Arch.Biochem.Biophys.* 396:111-118
- Niehaus F, Bertoldo C, Kahler M, Antranikian G (1999) Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 51:711-729

- Ollivier B, Cord-Ruwisch R, Hatchikian EC, Garcia JL (1988) Characterization of *Desulfovibrio fructosovorans* sp. nov. Arch.Microbiol. 149:447-450
- Podkovyrov SM, Burdette D, Zeikus JG (1993) Analysis of the catalytic center of cyclomaltodextrinase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E. FEBS Lett. 317:259-262
- Palm D, Goerl R, Burger KJ (1985) Evolution of catalytic and regulatory sites in phosphorylases. Nature 313:500-502
- Park KH, Kim TJ, Cheong TK, Kim JW, Oh BH, Svensson B (2000) Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the α -amylase family. Biochim.Biophys.Acta 1478:165-185
- Rashid N, Cornista J, Ezaki S, Fukui T, Atomi H, Imanaka T (2002) Characterization of an archaeal cyclodextrin glucanotransferase with a novel C-terminal domain. J.Bacteriol. 184:777-784
- Rashid N, Kanai T, Atomi H, Imanaka T (2004) Among multiple phosphomannomutase gene orthologues, only one gene encodes a protein with phosphoglucomutase and phosphomannomutase activities in *Thermococcus kodakaraensis*. J.Bacteriol. 186:6070-6076
- Ray WJ, Jr., Burgner JW, Post CB (1990) Characterization of vanadate-based transition-state-analogue complexes of phosphoglucomutase by spectral and NMR techniques. Biochemistry 29:2770-2778
- Ray WJ, Jr., Peck EJ, Jr. (1972) Phosphomutase. In: Boyer (ed) The Enzymes. Vol. VI. pp 407-477
- Ray WJ, Jr., Post CB (1990) The oxyvanadium constellation in transition-state-analogue complexes of phosphoglucomutase and ribonuclease. Structural deductions from electron-transfer spectra. Biochemistry 29:2779-2789
- Ray WJ, Jr., Puvathingal JM (1990) Characterization of a vanadate-based transition-state-analogue complex of phosphoglucomutase by kinetic and equilibrium binding studies. Mechanistic implications. Biochemistry 29:2790-2801
- Ray WJ, Jr., Roscelli GA (1964) A kinetic study of the phosphoglucomutase pathway. J.Biol.Chem. 239:1228-1236
- Ray WJ, Jr., Roscelli GA (1966) Activation and inhibition in the phosphoglucomutase system. J.Biol.Chem. 241:2596-2602
- Reher M (2004) Zuckerstoffwechsel in hyperthermophilen und extrem acidophilen Archaea: Charakterisierung der Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin Oxidoreduktase aus *Pyrobaculum aerophilum* und Enzyme des Glucoseabbaus in *Picrophilus torridus*.
- Reichstein B (2001) Zuckerstoffwechsel von hyperthermophilen Archaea. Enzyme des Glucoseabbaus in *Aeropyrum pernix*. Institut für Allgemeine Mikrobiologie, CAU Kiel.
- Rose TM, Henikoff JG, Henikoff S (2003) CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. Nucleic Acids Res. 31:3763-3766
- Rüdiger A, Jorgensen PL, Antranikian G (1995) Isolation and characterization of a heat-stable pullulanase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. Appl.Environ.Microbiol. 61:567-575

- Sakuraba H, Yoshioka I, Koga S, Takahashi M, Kitahama Y, Satomura T, Kawakami R, Ohshima T (2002) ADP-dependent glucokinase/phosphofructokinase, a novel bifunctional enzyme from the hyperthermophilic Archaeon *Methanococcus jannaschii*. *J.Biol.Chem.* 277:12495-12498
- Sambrook S, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2 edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Sandman K, Reeve JN (2001) Chromosome packaging by archaeal histones. *Adv.Appl.Microbiol.* 50:75-99
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 74:5463-5467
- Schäfer T, Schönheit P (1991) Pyruvate metabolism of the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. Acetate formation from acetyl-CoA and ATP synthesis are catalysed by an acetyl-CoA synthetase (ADP-forming). *Arch.Microbiol.* 155:366-377
- Schäfer T, Schönheit P (1992) Maltose fermentation to acetate, CO₂ and H₂ in the anaerobic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: evidence for the operation of a novel sugar fermentation pathway. *Arch.Microbiol.* 158:188-202
- Schäfer T, Schönheit P (1993) Gluconeogenesis from pyruvate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: involvement of reactions of the Embden-Meyerhof pathway. *Arch.Microbiol.* 159:354-363
- Schinzel R, Nidetzky B (1999) Bacterial alpha-glucan phosphorylases. *FEMS Microbiol.Lett.* 171:73-79
- Schinzel R, Palm D, Schnackerz KD (1992) Pyridoxal 5'-phosphate as a 31P reporter observing functional changes in the active site of *Escherichia coli* maltodextrin phosphorylase after site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 31:4128-4133
- Schönheit P, Keweloh H, Thauer RK (1981) Factor F₄₂₀ degradation in growing *Methanobacterium thermoautotrophicum* during exposure to oxygen. *FEMS Microbiol.Lett.* 12:347-349
- Schönheit P, Schäfer T (1995) Metabolism of hyperthermophiles. *World J.Microbiol.Biotechnol.* 11:26-57
- Schröder C, Selig M, Schönheit P (1994) Glucose fermentation to acetate, CO₂ and H₂ in the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*: involvement of the Embden-Meyerhof pathway. *Arch.Microbiol.* 161:460-470
- Schwartz M (1987) The maltose regulon. In: Neidhardt FC (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, 2nd edn. ASM Press, Washington DC, pp 1482-1498
- Selig M, Xavier KB, Santos H, Schönheit P (1997) Comparative analysis of Embden-Meyerhof and Entner-Doudoroff glycolytic pathways in hyperthermophilic archaea and the bacterium *Thermotoga*. *Arch.Microbiol.* 167:217-232
- Shackelford GS, Regni CA, Beamer LJ (2004) Evolutionary trace analysis of the alpha-D-phosphohexomutase superfamily. *Protein Sci.* 13:2130-2138

- Siebers B, Klenk HP, Hensel R (1998) PP_i-dependent phosphofructokinase from *Thermoproteus tenax*, an archaeal descendant of an ancient line in phosphofructokinase evolution. *J.Bacteriol.* 180:2137-2143
- Smith LD, Budgen N, Bungard SJ, Danson MJ, Hough DW (1989) Purification and characterization of glucose dehydrogenase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Biochem.J.* 261:973-977
- Stams AJ, Veenhuis M, Weenk GH, Hansen TA (1983) Occurrence of polyglucose as a storage polymer in *Desulfovibrio* species and *Desulfobulbus propionicus*. *Arch.Microbiol.* 136:54-59
- Stetter KO (1988) *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov., sp. nov.: a new taxon of extremely thermophilic archaeobacteria. *System.Appl.Microbiol.* 10:172-173
- Stetter KO (1996) Hyperthermophilic procaryotes. *FEMS Microbiol.Rev.* 18:149-158
- Stetter KO (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett.* 452:22-25
- Stetter KO, Fiala G, Huber R, Seegerer A (1990) Hyperthermophilic microorganisms. *FEMS Microbiol.Rev.* 75:117-124
- Stetter KO, Lauerer G, Thomm M, Neuner A (1987) Isolation of extremely thermophilic sulfate reducers: evidence for a novel branch of archaeobacteria. *Science* 236:822-824
- Swan MK, Solomons JT, Beeson CC, Hansen T, Schönheit P, Davies C (2003) Structural evidence for a hydride transfer mechanism of catalysis in phosphoglucose isomerase from *Pyrococcus furiosus*. *J.Biol.Chem.* 278:47261-47268
- Thauer RK, Kunow J (1995) Sulfate-reducing Archaea. In: *Biotechnology Handbook*. Plenum Publishing Company Ltd., London, pp 33-48
- Thiemann V, Donges C, Prowe SG, Sterner R, Antranikian G (2004) Characterisation of a thermoalkali-stable cyclodextrin glycosyltransferase from the anaerobic thermoalkaliphilic bacterium *Anaerobranca gottschalkii*. *Arch.Microbiol.* 182:226-235
- Thomm M (1996) Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation. *FEMS Microbiol.Rev.* 18:159-171
- Tonkova A (1998) Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme Microb.Technol.* 22:678-686
- Trinkerl M, Breunig A, Schauder R, König H (1990) *Desulfovibrio termitidis* sp. nov., a carbohydrate-degrading sulfate-reducing bacterium from the hindgut of a termite. *System.Appl.Microbiol.* 13:372-377
- Tuininga JE, Verhees CH, Van der Oost J, Kengen SW, Stams AJ, De Vos WM (1999) Molecular and biochemical characterization of the ADP-dependent phosphofructokinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J.Biol.Chem.* 274:21023-21028
- Van der Maarel MJ, Uitdehaag JC, Leemhuis H, Dijkhuizen L (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *J.Biotechnol.* 94:137-155

- Van der Oost J, Schut G, Kengen SW, Hagen WR, Thomm M, De Vos WM (1998) The ferredoxin-dependent conversion of glyceraldehyde-3-phosphate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* represents a novel site of glycolytic regulation. *J.Biol.Chem.* 273:28149-28154
- Verhees CH, Huynen MA, Ward DE, Schiltz E, De Vos WM, Van der Oost J (2001) The phosphoglucose isomerase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* is a unique glycolytic enzyme that belongs to the cupin superfamily. *J.Biol.Chem.* 276:40926-40932
- Vorholt JA, Kunow J, Stetter KO, Thauer RK (1995) Enzymes and coenzymes of the carbon monoxide dehydrogenase pathway for autotrophic CO₂ fixation in *Archaeoglobus lithotrophicus* and the lack of carbon monoxide dehydrogenase in the heterotrophic *A. profundus*. *Arch.Microbiol.* 163:112-118
- Wächtershäuser G (1988) Before enzymes and templates: theory of surface metabolism. *Microbiol.Rev.* 52:452-484
- Wächtershäuser G (1992) Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 58:85-201
- Wada H, Snell EE (1961) The Enzymatic Oxidation of Pyridoxine and Pyridoxamine Phosphates. *J.Biol.Chem.* 236:2089-2095
- Wendorff D (2002) Enzyme des Zuckerstoffwechsels von hyperthermophilen Archaea: Reinigung und Charakterisierung der Glucose-6-Phosphat Isomerase aus *Aeropyrum pernix*.
- Widdel F, Hansen TA (1992) The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W und Schleifer KH (eds) *The Prokaryotes*, Vol.1, 2nd edn. Springer-Verlag, New York, pp 583-624
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Bacteriol.Rev.* 51:221-271
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87:4576-4579
- Woese CR, Olsen GJ (1986) Archaeobacterial phylogeny: perspectives on the urkingdom. *System.Appl.Microbiol.* 7:161-177
- Xavier KB, Peist R, Kossmann M, Boos W, Santos H (1999) Maltose metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*: purification and characterization of key enzymes. *J.Bacteriol.* 181:3358-3367
- Yu JP, Ladapo J, Whitman WB (1994) Pathway of glycogen metabolism in *Methanococcus maripaludis*. *J.Bacteriol.* 176:325-332
- Zellner G, Messner P, Kneifel H, Winter J (1989a) *Desulfovibrio simplex* spec. nov., a new sulfate-reducing bacterium from a sour whey digester. *Arch.Microbiol.* 152:329-334
- Zellner G, Stackebrandt E, Kneifel H, Messner P, Sleytr UB, Conway de Macario E, Zabel H-P, Stetter KO, Winter J (1989b) Isolation and characterization of a thermophilic, sulfate reducing Archaeobacterium, *Archaeoglobus fulgidus* strain Z. *System.Appl.Microbiol.* 11:151-160

9 Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ADP-GLK	ADP-abhängige Glucokinase
AMP	Adenosinmonophosphat
A. bidest.	Zweifach deionisiertes Wasser
ACD	ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase
bp	Basenpaare
CDase	Cyclodextrinase
CGTase	Cyclodextrin-Glucanotransferase
CoA	Coenzym A
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTE	Dithioerythritol
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GAPOR	Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin-Oxidoreduktase
GTase	Glucanotransferase
h	Stunde
IPTG	Isopropylthiogalactosid
K_m	Michaeliskonstante
MA	Maltogene Amylase
Mal-P	Maltodextrin-Phosphorylase
min	Minute
NPase	Neopullulanase
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFK	Phosphofruktokinase
PGI	Phosphoglucoseisomerase
PGluM	Phosphoglucomutase
P_i	Anorganisches Phosphat
PP_i	Pyrophosphat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TCA	Trichloroacetic acid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit des Substratumsatzes
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Masse pro Volumen

Symbole für den Nukleinsäurecode

A	Desoxyadenosin	G	Desoxyguanosin
C	Desoxycytidin	T	Desoxythymidin

Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. P. Schönheit für die Überlassung des Themas, für die Betreuung und Förderung und für hilfreiche Diskussionen.

Herrn Dr. R. Schmidt von der Universität Osnabrück, Fachbereich Mikrobiologie, danke ich für die N-terminale Aminosäure-Sequenzierung der gereinigten Enzyme des Stärkeabbaus aus *Archaeoglobus fulgidus*.

Herrn Preidel danke ich für die Massenkultivierung von *Archaeoglobus fulgidus* Stamm 7324.

Den Arbeitsgruppen Kristjansson und Holst danke ich für die Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit danken.

Lebenslauf

Antje Labes

geb. am: 6. Dezember 1974

Staatsangehörigkeit: deutsch

Wohnort: Kiel

Schulbildung

1981-1990 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule

1990-1994 Gymnasium

Juni 1994 Allgemeine Hochschulreife

Studium

Oktober 1994 – März 1997 Studium der Biologie an der Freien Universität zu Berlin

April 1999 – März 2000 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Januar 1999 Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Botanik und Biochemie

März 1999 – März 2000 Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Schönheit mit dem Thema: „Zuckerstoffwechsel von hyperthermophilen Archaea: Stärkeabbau im hyperthermophilen, sulfatreduzierenden Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*“

Oktober 2000 Beginn der experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Schönheit.

Seit Oktober 2000 wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Prof. Dr. P. Schönheit am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.