

Abschlussbericht

**Identifizierung, Charakterisierung und Bereitstellung von
thermostabilen Cellulasen zum Einsatz in einem kombinierten Verfahren
zum thermisch-enzymatischen Aufschluss
von Cellulose für die Bioethanolerzeugung**

Thermocellulasen

AZ 13160

Prof. Dr. Garabed Antranikian

Dipl.-Biol. Barbara Piela

Technische Universität Hamburg-Harburg

Institut für Technische Mikrobiologie

August 2008

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	13160	Referat	32	Fördersumme	125.000 €
----	--------------	---------	-----------	-------------	------------------

Antragstitel **Förderschwerpunkt Biotechnologie: Identifizierung, Charakterisierung und Bereitstellung thermostabiler Cellulasen für den innovativen und umweltschonenden Ansatz des thermisch-enzymatischen Aufschlusses von Cellulose**

Stichworte Schwerpunkt-Biotechnologie, Bioabfall
Screening, Verfahren, Expression

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
2 Jahre	01.04.2006	30.06.2008	

Zwischenberichte jährlich

Bewilligungsempfänger	TuTech Innovation GmbH	Tel	040-76629-6001
		Fax	040-76629-6119
		Projektleitung	Prof. Antranikian
		Bearbeiter	Barbara Piela
	Harburger Schlossstr. 6 - 12		
	21079 Hamburg		

Kooperationspartner

- Technische Universität Hamburg-Harburg, Institut für Technische Mikrobiologie, Prof. Antranikian, Hamburg
- Technische Universität Hamburg-Harburg Institut für Thermische Verfahrenstechnik II, Prof. Brunner, Hamburg

Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

Die Konversion von nachwachsenden Pflanzenmaterialien zu Bioethanol ist häufig noch nicht wirtschaftlich genug, da effiziente Enzymsysteme fehlen, um die Cellulose zu hydrolysieren und damit für die ethanolische Gärung verfügbar zu machen. Die Zahl der kommerziell erhältlichen Cellulasen ist sehr begrenzt und in der Regel handelt es sich um Enzyme des mesophilen Pilzes *Trichoderma reesei*. Um die Cellulose für den enzymatischen Abbau zugänglich zu machen, wird meistens ein thermischer Hydrolyseschritt vorgeschaltet. Nachteil dieses Verfahrens ist die Bildung toxischer Nebenprodukte (Hydroxymethylfurfural, Furfural) und die sequentielle Vorgehensweise in zwei getrennten Schritten (thermische Hydrolyse + enzymatische Hydrolyse). In diesem Projekt soll daher ein Set geeigneter Enzymsysteme für die Bioethanolproduktion bereitgestellt werden, die die thermische und enzymatische Hydrolyse in einem Schritt bei Temperaturen zwischen 100°C - 200°C ermöglichen.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Für die kombinierte thermische und enzymatische Hydrolyse sollten neuartige Enzymsysteme aus thermophilen Mikroorganismen identifiziert, isoliert und untersucht werden. Dazu wurden Boden- und Wasserproben, die aus heißen Quellen der Azoreninsel Sao Miguel genommen wurden, für die Anreicherung cellulaseabbauender Mikroorganismen eingesetzt. Die aus den Anreicherungskulturen erstellten Microcom-Genombanken dienten als Quelle neuartiger thermostabiler Cellulasen. Zur Identifizierung weiterer cellulolytischer Enzyme wurden Reinkulturen der extremophilen Bakterien *Anaerobranca gottschalkii* und *Fervidobacterium gondwanense* untersucht. Die neu entdeckten Enzyme sollten unter Bedingungen getestet werden, wie sie im Projekt AZ 13157 ("Integriertes Verfahren zur Gewinnung von Bioethanol aus nachwachsenden Rohstoffen: Verwertung von Roggenganzpflanzen durch innovativen thermisch-enzymatischen Aufschluss bei gleichzeitiger Biokonversion zu Ethanol und vollständiger Nutzung des Ligninanteils") vorherrschen (Temperatur bis 200°C, 100 bar Druck).

Ergebnisse und Diskussion

Die auf der Azoreninsel Sao Miguel gewonnenen Boden- und Wasserproben aus heißen Quellen (60°C - 90°C) Proben wurden aerob und anaerob auf Cellulose und Hemicellulose bei 70°C angereichert. Durch Herstellung von Microcom-Genombanken aus den Anreicherungskulturen der Azorenproben wurden drei thermostabile Cellulasen durch ein aktivitätsbasiertes Screening bei 70°C identifiziert. Die für die Cellulasen kodierenden Gene wurden umkloniert und erfolgreich in *E. coli* exprimiert. Die rekombinanten Cellulasen wurden gereinigt und biochemisch charakterisiert. Durch eine vergleichende Untersuchung der Cellulasen wurde ein geeignetes Enzym ausgewählt, das durch Hochzelldichtefermentation im Großmaßstab produziert wurde. Dieses Enzym wurde im Hochtemperatur-Druckreaktor zur Hydrolyse von Roggenstroh eingesetzt.

Das Genom des thermoalkaliphilen Bakteriums *Anaerobranca gottschalkii* enthält zwei offene Leserahmen, die für putative Endoglucanasen kodieren. Die für die Endoglucanasen kodierenden Gene wurden kloniert und die rekombinanten Enzyme erfolgreich in aktiver Form in *E. coli* exprimiert.

Durch ein aktivitätsbasiertes Screening der Genbank des thermophilen anaeroben Bakteriums *Fervidobacterium gondwanense* wurde eine weitere thermoaktive Cellulase identifiziert. Das Cellulase-Gen wurde umkloniert und erfolgreich in *E. coli* exprimiert. Die Cellulase wurde anschließend für die kombinierte thermisch-enzymatische Hydrolyse von Roggenstroh eingesetzt.

Die identifizierten thermostabilen Cellulasen sind in einem breiten Temperatur- (40°C - 120°C) und pH-Bereich (pH 3 - pH 10) aktiv und nutzen ein weites Spektrum an löslichen und unlöslichen Cellulose-Substraten.

Die neu entdeckten Enzyme wurden dem Projekt AZ 13157 ("Integriertes Verfahren zur Gewinnung von Bioethanol aus nachwachsenden Rohstoffen: Verwertung von Roggenganzpflanzen durch innovativen thermisch-enzymatischen Aufschluss bei gleichzeitiger Biokonversion zu Ethanol und vollständiger Nutzung des Ligninanteils") zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden die cellulolytischen Enzyme der BiocatCollection (AZ 13131) zur Verfügung gestellt, um sie den Hochschulen und der Industrie verfügbar zu machen.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentationen

Präsentationen

Katzer, M., Stöber, N., Minow, B. and Antranikian, G. Microbial community genomics (Microcom-genomics) for discovery of novel cellulases. Poster VAAM Tagung, Osnabrück, 01.-04.04.2007.

Piela, B. and Antranikian, G. Novel thermoactive cellulases from the anaerobic thermophilic bacteria *Anaerobranca gottschalkii* and *Fervidobacterium gondwanense*. Vortrag VAAM Tagung, Osnabrück, 01.-04.04.2007.

Antranikian, G. (2008) Industrial relevance of thermophiles and their enzymes. In: Thermophiles - Biology and Technology at high temperatures. Eds. Robb, F. et al., CRC Press, Boca Raton: Taylor & Francis. S.113-160.

Projektmeeting Bioethanol (AZ 13157), 05.10.2007

Projektmeeting Bioethanol (AZ 13157), 20.04.2007

Projektmeeting Bioethanol (AZ 13157), 21.12.2006

Projektmeeting Bioethanol (AZ 13157), 12.10.2006

Fazit

Die Meilensteine des Projekts wurden weitestgehend erreicht.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vi
1. Zusammenfassung	1
2. Anlass und Zielsetzung des Projekts	2
3. Angewandte Methoden	3
4. Ergebnisse	3
4.1 Herstellung von Anreicherungskulturen und Microcom-Genombanken	3
4.2 Thermoaktive Cellulasen aus thermophilen anaeroben Bakterien	10
4.2.1 Klonierung, Expression und Charakterisierung putativer Endoglucanasen aus <i>Anaerobranca gottschalkii</i>	11
4.2.2 Klonierung, Expression und Charakterisierung der rekombinanten Cellulase aus <i>Fervidobacterium gondwanense</i>	14
5. Diskussion	23
6. Soll/Ist-Vergleich	24
7. Literatur	27
8. Präsentationen	27
9. Anlage	28

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Alignment der Aminosäuresequenz von Cel3, Cel5 und Cel17	5
Abb. 2:	Reinigung der rekombinanten Cellulasen Cel5 Cel17	6
Abb. 3:	Abhängigkeit der Aktivität von Cel3, Cel5 und Cel17 von der Temperatur	7
Abb. 4:	Abhängigkeit der Aktivität von Cel3, Cel5 und Cel17 von dem pH-Wert	8
Abb. 5:	Substratspezifität von Cel3, Cel5 und Cel17	9
Abb. 6:	Substratspezifität von Cel2 und Cel8 aus <i>A. gottschalkii</i>	12
Abb. 7:	Abhängigkeit der Aktivität von Cel2 aus <i>A. gottschalkii</i> von der Temperatur und dem pH-Wert	12
Abb. 8:	Hydrolyse von β -Glucan durch Cel2	13
Abb. 9:	Reinigung der rekombinanten Cellulase Cel14.1 aus <i>F. gondwanense</i>	15
Abb. 10:	Reinigung der rekombinanten Cellulase 6His-Cel14.1 aus <i>F. gondwanense</i>	16
Abb. 11:	Abhängigkeit der Aktivität von 6His-Cel14.1 aus <i>F. gondwanense</i> von der Temperatur und dem pH-Wert	17
Abb. 12:	Substratspezifität von 6His-Cel14.1 aus <i>F. gondwanense</i>	18
Abb. 13:	Hydrolyseprodukte von β -Glucan durch 6His-Cel14.1	19
Abb. 14:	Bildung von Cellooligosacchariden als Zwischenprodukte der Hydrolyse von β -Glucan durch 6His-Cel14.1	19
Abb. 15:	Hydrolyseprodukte von Buchenholz-Xylan durch 6His-Cel14.1	20
Abb. 16:	Hydrolyseprodukte von Roggenstroh durch 6His-Cel14.1	21
Abb. 17:	Hydrolyse von Cellooligosacchariden durch 6His-Cel14.1	22
Abb. 18:	Hydrolyse von Xylooligosacchariden durch 6His-Cel14.1	22

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Reinigung der rekombinanten Cellulase Cel5	6
Tab. 2:	Reinigung der rekombinanten Cellulase Cel17	6
Tab. 3:	Hochzelldichtefermentation von <i>E. coli</i> /pETBlue-1/cel5	10
Tab. 4:	Reinigung der rekombinanten Cellulase Cel14.1 aus <i>F. gondwanense</i>	15
Tab. 5:	Reinigung der rekombinanten Cellulase 6His-Cel14.1 aus <i>F. gondwanense</i>	16

1. Zusammenfassung

Für die kombinierte physikalische und enzymatische Hydrolyse nachwachsender Rohstoffe bei Temperaturen zwischen 100°C - 200°C sind neuartige cellulolytische Enzyme erforderlich, die unter diesen extremen Bedingungen Cellulose effizient abbauen können. Zur Identifizierung thermostabiler Cellulasen wurden zwei Strategien parallel verfolgt.

Mischkulturen, die aus heißen Quellen der Azoreninsel Sao Miguel gewonnen wurden, wurden für die Herstellung von Microcom-Genbanken genutzt, um neuartige thermostabile Cellulasen zu identifizieren. Dabei wurde der neuartige Ansatz der Microcomgenomics (Microbial Communities Genomics) genutzt, eine Kombination aus der Anreicherung von Mischkulturen auf einer ausgewählten Kohlenstoffquelle (z. B. Cellulose) und die anschließenden Herstellung einer Genombibliothek aus dem Metagenom der Mikroorganismen, die in der Lage sind, die ausgewählte Kohlenstoffquelle zu metabolisieren. Durch aktivitätsbasiertes Screening bei hohen Temperaturen (> 60°C) wurden 3 cellulolytisch aktive Klone identifiziert und isoliert. Die für die Cellulasen kodierenden Gene wurden in Expressionsvektoren umklontiert und erfolgreich in *E. coli* exprimiert. Die Reinigung der Proteine wurde ebenfalls etabliert und die Charakterisierung der Cellulasen ist abgeschlossen.

Durch die vergleichende Untersuchung der Aktivitäten dieser drei Cellulasen bei extremen Temperaturen (50°C - 80°C), pH-Werten (pH 3 - pH 10) und der Substrat-Spezifität wurde ein für den kombinierten thermisch-enzymatischen Aufschluss geeignetes Enzym ausgewählt, das in dem Hochtemperatur-Druckreaktor zum Einsatz kam.

Zusätzlich wurden die thermophilen anaeroben Bakterien *Anaerobranca gottschalkii* und *Fervidobacterium gondwanense* ausgewählt, von denen bekannt ist, dass sie unter extremen Bedingungen wachsen und Cellulose abbauen können.

Durch Sequenzanalysen des Genoms von *A. gottschalkii* wurden zwei offene Leseraster identifiziert, die für putative Endoglucanasen kodieren. Diese Gene wurden erfolgreich kloniert und heterolog in *E. coli* exprimiert.

Durch ein aktivitätsbasiertes Screening einer Genbank von *F. gondwanense* wurde ein cellulolytisches Enzym identifiziert. Das für die Endoglucanase kodierende Gen wurde in verschiedene Expressionsvektoren kloniert und erfolgreich in *E. coli* exprimiert. Die Reinigung des Proteins wurde optimiert und die Charakterisierung ist

abgeschlossen. Die Cellulase zeigt die maximale Aktivität bei 90°C und pH 6. Für den Einsatz der Cellulase im Hochtemperatur-Druckreaktor wurde die Aktivität des Enzyms gegenüber Roggenstroh und thermisch behandelten Roggenstroh-Hydrolysaten untersucht.

Durch das aktivitätsbasierte Screening von Microcom-Genbanken der Azorenproben und der Genbank von *F. gondwanense* sowie durch Sequenzanalysen des Genoms von *A. gottschalkii* wurden cellulolytische Enzyme identifiziert, die bei extremen Temperaturen lösliche und unlösliche Cellulose-Substrate hydrolysieren können. Die neuartigen Cellulasen sind in einem breiten Temperatur- (40°C - 120°C) und pH-Spektrum (pH 3 - pH 10) aktiv und zeigen somit Eigenschaften, die für den Einsatz im Hochtemperatur-Druckreaktor erforderlich sind. Die Analysen der Aminosäuresequenzen ergaben, dass die identifizierten Cellulasen z. T. neuartige cellulolytische Enzyme mit einer geringen Identität zu bekannten Cellulasen sind.

2. Anlass und Zielsetzung des Projekts

Die Endlichkeit fossiler Rohstoffe und der weltweit steigende Ausstoß des klimaschädigenden Treibhausgases CO₂ zeigen die Notwendigkeit, sich auf den Einsatz nachwachsender Rohstoffe zur Gewinnung von Treibstoffen zu konzentrieren und die Abhängigkeit von fossilen Rohstoffen zu verringern.

Ziel des Projekts war es, thermostabile cellulolytische Enzyme zu identifizieren, die für den Einsatz in einer kombinierten thermischen und enzymatischen Hydrolyse von Roggenstroh bei Temperaturen zwischen 100°C - 200°C geeignet sind. Die für die kombinierte Hydrolyse genutzten robusten Enzyme sollten in Anreicherungskulturen der auf den Azoren gewonnen Proben und in den extremophilen Bakterien *Anaerobranca gottschalkii* und *Fervidobacterium gondwanense* identifiziert und dem Projekt AZ 13157 ("Integriertes Verfahren zur Gewinnung von Bioethanol aus nachwachsenden Rohstoffen: Verwertung von Roggenganzpflanzen durch innovativen thermisch-enzymatischen Aufschluss bei gleichzeitiger Biokonversion zu Ethanol und vollständiger Nutzung des Ligninanteils") zur Verfügung gestellt werden.

Für die enzymatische Hydrolyse cellulosehaltiger nachwachsender Rohstoffe werden in der industriellen Anwendung hauptsächlich Enzymsysteme aus dem mesophilen Pilz *Trichoderma* sp. eingesetzt. Die genutzten Enzymkomplexe sind thermolabil und

werden in einem zweistufigen Verfahren eingesetzt, bei dem der cellulosehaltige nachwachsende Rohstoff zunächst chemisch und/oder physikalisch behandelt und im Anschluss daran einer enzymatischen Hydrolyse unterzogen wird. Durch die Nutzung thermostabiler cellulolytischer Enzymsysteme während der thermischen Hydrolyse könnte auf den Einsatz von Chemikalien und Säuren verzichtet werden und der zweistufige Prozess könnte in einem Prozess-Schritt erfolgen.

3. Angewandte Methoden

- DNA-Isolierung
- Herstellung von Metagenombanken
- Aktivitätsbasiertes Screening von Genbanken
- Klonierung und Umklonierung Cellulase kodierender Gene
- Rekombinante Expression in *E. coli*
- Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten cellulolytischen Enzyme

4. Ergebnisse

4.1 Herstellung von Anreicherungskulturen und Microcom-Genombanken

Die auf der Azoreninsel Sao Miguel genommenen Boden- und Wasserproben aus heißen Quellen (40°C - 90°C) wurden sowohl aerob als auch anaerob in Mineralmedium mit Carboxymethylcellulose bzw. Hemicellulose als einziger Kohlenstoffquelle bei einer Temperatur von 70°C kultiviert. Dabei zeigten die aeroben Anreicherungskulturen FIII, FIV und FXVII und die anaeroben Anreicherungskulturen FV und FXX cellulolytische Aktivität. Aus diesen Mischkulturen wurden mit Hilfe des „ZAP Express® Predigested Vector Kits“ und des „ZAP Express® Predigested Gigapack® Cloning Kits“ (Stratagene) Microcom-Genombanken erstellt. Microcomgenomics (Microbial Communities Genomics) ist eine Kombination aus der Anreicherung von Mischkulturen auf einer ausgewählten Kohlenstoffquelle (z. B. Cellulose) und der anschließenden Herstellung einer Genombibliothek aus dem Metagenom der Mikroorganismen, die in der Lage sind, die Kohlenstoffquelle zu metabolisieren.

Ein aktivitätsbasiertes Screening der Microcom-Genombanken der Azorenproben mit AZCL-Hydroxyethyl-Cellulose als Substrat für Endoglucanasen wurde für 2 - 3 Tage bei 70°C durchgeführt. Auf diese Weise konnten drei cellulolytisch aktive Klone aus den Proben FIII (Klon 3), FV (Klon 5) und FXVII (Klon 17) identifiziert und isoliert werden.

Durch die Sequenzierung und Sequenzanalyse des Inserts von Klon 3 wurde der offene Leserahmen *cel3* identifiziert, der aus 1614 bp besteht und für das Protein Cel 3 mit einer Größe von 537 Aminosäuren und einem berechneten Molekulargewicht von 56,5 kDa kodiert. BLAST-Analysen der Aminosäuresequenz von Cel3 mit Sequenzen von charakterisierten und putativen Cellulasen ergaben eine Identität von 24% - 87%, wobei die höchste Identität von 87% zu der Endoglucanase Cella aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* ermittelt wurde. Weitere Sequenzanalysen zeigten die Zugehörigkeit von Cel3 zur Familie 9 der Glycosidhydrolasen.

Die Sequenzierung des Inserts von Klon 5 führte zur Identifizierung des offenen Leserahmens *cel5*, der eine Länge von 2268 bp hat und für das Protein Cel5 mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 85 kDa und einer Länge von 755 Aminosäuren kodiert. Die Aminosäuresequenz von Cel5 wurde mit weiteren Cellulase-Sequenzen verglichen, wobei eine Identität von 33% - 87% existiert. Die höchste Identität von 87% besteht zu der Endoglucanase CelD aus *Anaerocellum thermophilum*. Das Protein Cel5, das aufgrund der Aminosäuresequenz der Familie 5 der Glycosidhydrolasen zugeordnet wird, enthält zusätzlich eine Kohlenhydrat bindende Domäne (CBM), die Ähnlichkeiten zu den Familien 17 und 28 der CBM zeigt.

Das für das Protein Cel17 (848 Aminosäuren; 94,3 kDa) kodierende Gen *cel17*, das aus 2547 bp besteht, zeigt eine Identität von 25% - 77% zu bekannten Cellulase-Sequenzen, wobei die höchste Identität von 77% zu der Cellulase TcCel5A aus *Thermus caldophilus* besteht. Cel17 wird aufgrund von Sequenzähnlichkeiten ebenfalls der Familie 5 der Glycosidhydrolasen zugeordnet.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von Cel3, Cel5 und Cel17 miteinander zeigte, dass nur wenige Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz der drei Cellulasen vorhanden sind (Abb. 1). Es wurden somit drei neuartige und unterschiedliche Cellulasen identifiziert und isoliert.

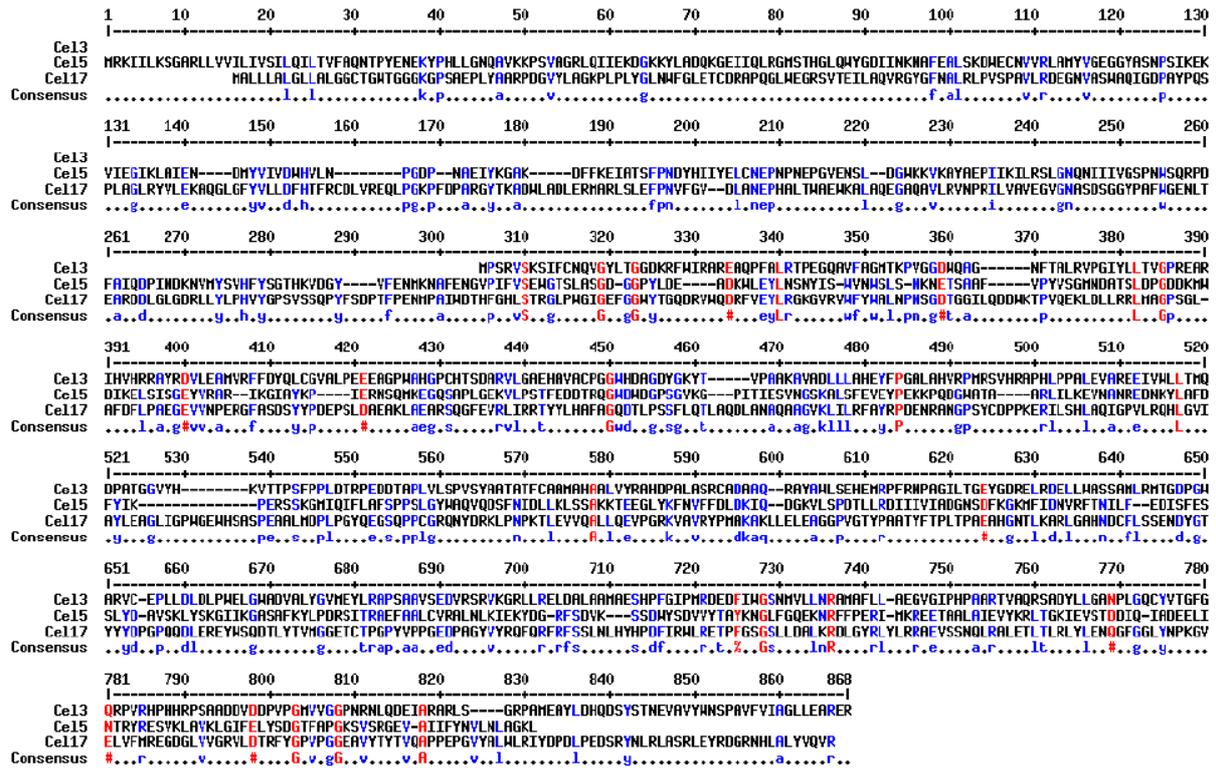


Abb. 1: Alignment der Aminosäuresequenz von Cel3, Cel5 und Cel17.

Die für die Cellulasen Cel3, Cel5 und Cel17 kodierenden Gene wurden mittels PCR amplifiziert und unter Verwendung des „pETBlue-1 AccepTor™ Vector Kits“ (Novagen) in den Expressionsvektor pETBlue™-1 ligiert. Die rekombinanten Plasmide wurden in *E. coli* Tuner™(DE3)pLacI-Zellen transformiert. Die Expression der *E. coli*-Konstrukte erfolgte bei 30°C und wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ ≈ 0,6 induziert, die Zellernte erfolgte 12 - 15 h nach der Induktion.

Die Rohextrakte der rekombinanten *E. coli*-Stämme wurden für 30 min bei 60°C inkubiert, um einen Großteil der *E. coli* Proteine zu denaturieren. Der Rohextrakt von Cel3 wurde nicht weiter behandelt, so dass die Charakterisierung der Cellulase Cel3 mit hitzegefälltem Rohextrakt erfolgte. Die rekombinante Cellulase Cel5, die am C-Terminus einen His-Tag enthält, wurde mittels Ni-NTA mit einer Ausbeute von 57% gereinigt (Abb. 2a, Tab. 1) und die Cellulase Cel17 wurde durch Anionenaustausch-Chromatographie (Q Sepharose High Performance, GE Healthcare) mit einer Ausbeute von 36% gereinigt (Abb. 2b, Tab. 2).

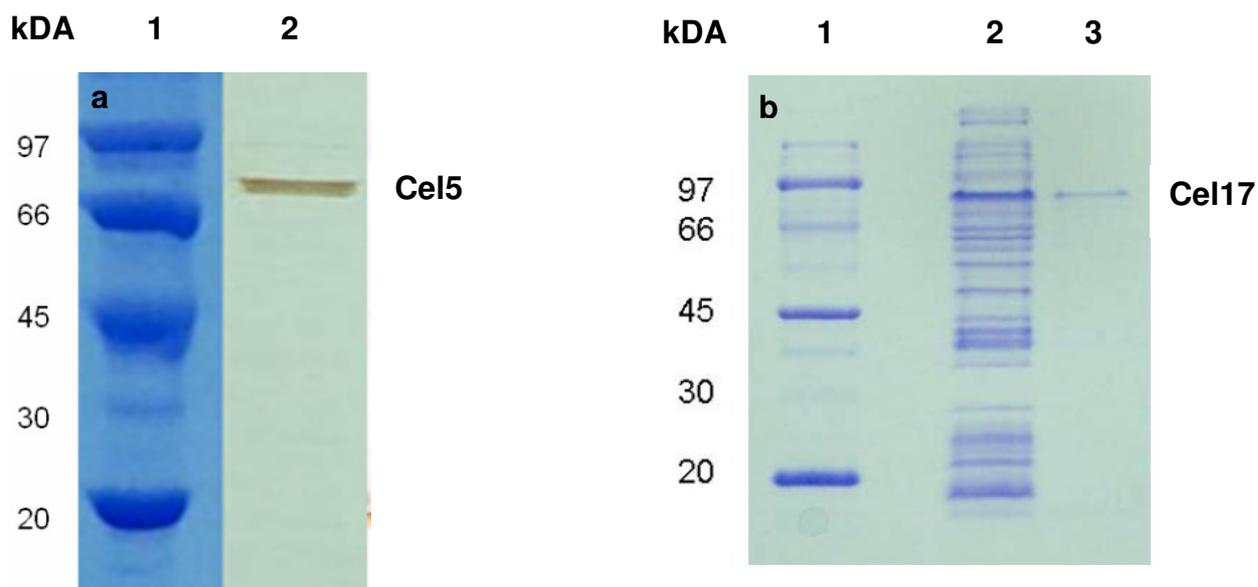


Abb. 2: Reinigung der rekombinanten Cellulasen Cel5 mittels Ni-NTA (a) und Cel17 mittels Anionenaustausch-Chromatographie (b). **a: Spur 1:** Marker, **Spur 2:** Reinigungsfraction Ni-NTA; **b: Spur 1:** Marker, **Spur 2:** Rohextrakt, **Spur 3:** Reinigungsfraction Q-Sepharose.

Tab. 1: Reinigung der rekombinanten Cellulase Cel5 mittels Ni-NTA

Fraktion	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [U]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Reinigungsfaktor	Ausbeute [%]
Rohextrakt	6386	536	0,1	1	100
Hitzefällung	1073	526	0,49	4,3	98
Ni-NTA	6,8	306	44,98	172	57

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte in 1% CMC in 40 mM Universalpuffer (pH 6,0) für 30 min bei 70°C.

Tab. 2: Reinigung der rekombinanten Cellulase Cel17 mittels Anionenaustausch-Chromatographie

Fraktion	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [U]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Reinigungsfaktor	Ausbeute [%]
Rohextrakt	12,8	7,6	0,6	1	100
Hitzefällung	2,92	7,15	2,5	4,2	94
Q-Sepahrose	0,3	2,73	9,1	15	36

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte in 1% CMC in 40 mM Universalpuffer (pH 6,0) für 30 min bei 70°C.

Untersuchungen zur Abhängigkeit der Aktivität von Cel3, Cel5 und Cel17 von der Temperatur und dem pH-Wert zeigten eine maximale Aktivität von Cel3 bei 60°C und pH 6, von Cel5 bei 70°C und pH 6 und von Cel17 bei 70°C und pH 6 (Abb. 3, 4). Zudem zeigten die Cellulasen mehr als 50% der relativen Aktivität in einem Temperatur-Bereich von 50°C - 75°C (Cel3), 55°C - 85°C (Cel5) und 55°C - 75°C (Cel17) und in einem pH-Bereich von pH 5,5 - pH 7,5 (Cel3), pH 4,5 - pH 9 (Cel5) und pH 3,5 - pH 8,5 (Cel17).

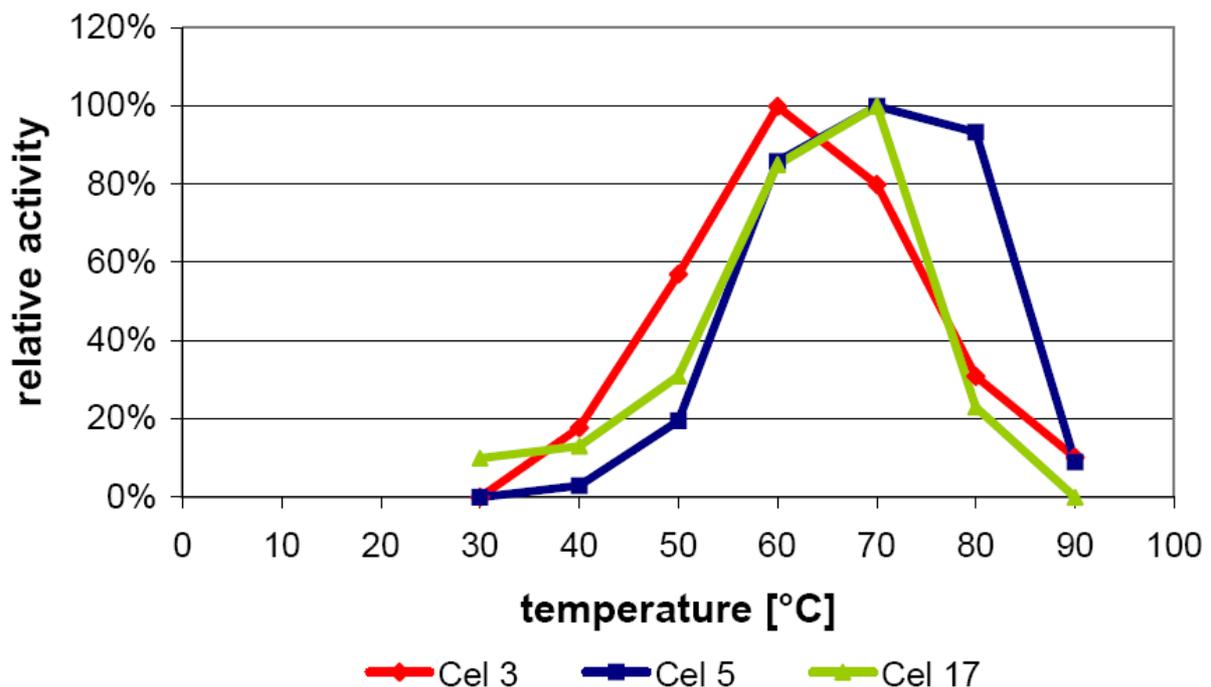


Abb. 3: Abhängigkeit der Aktivität von Cel3, Cel5 und Cel17 von der Temperatur. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte in 1% CMC in 40 mM Universalpuffer (pH 6,0) für 30 min.

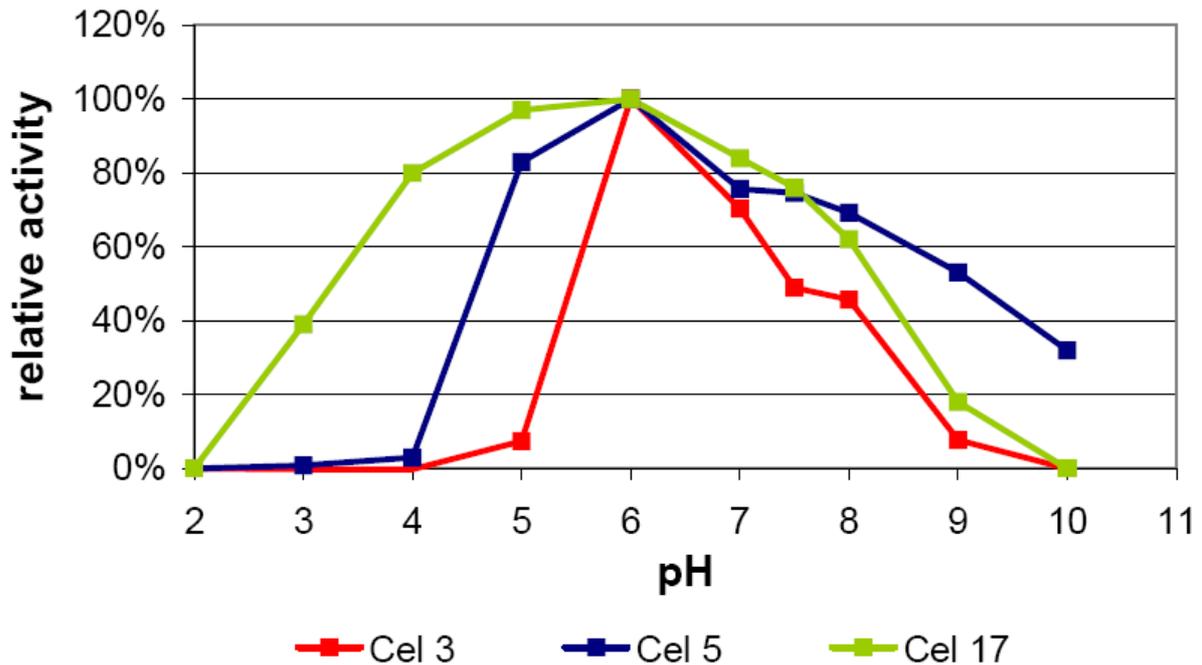


Abb. 4: Abhängigkeit der Aktivität von Cel3, Cel5 und Cel17 von dem pH-Wert. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte in 1% CMC in 40 mM Universalpuffer bei 60°C (Cel3) bzw. 70°C (Cel5, Cel17) für 30 min.

Zur Bestimmung der Substratspezifität der rekombinanten Cellulasen (Abb. 5) wurden sowohl lösliche als auch unlösliche Cellulose-Substrate verwendet. Sowohl Cel3, als auch Cel5 und Cel17 zeigten die höchste Aktivität gegenüber Carboxymethylcellulose. Aber auch die unlöslichen Substrate Cellulose-Pulver und Avicel wurden durch die drei Cellulasen hydrolysiert. Zudem war Cel5 in der Lage, dass unlösliche Substrat Cellulose-Acetat zu hydrolysieren.

Die Aktivität von Cel3, Cel5 und Cel17 wurde durch Mg^{2+} -, Mn^{2+} - und Na^{+} -Ionen nicht beeinflusst, wohingegen Cr^{2+} -, Cu^{2+} -, Fe^{3+} - und Ni^{2+} -Ionen einen inhibierenden Einfluss auf die Aktivität der drei rekombinanten Cellulasen zeigten. Dabei wurde die Aktivität von Cel5 im Vergleich zu der Aktivität von Cel3 und Cel17 am geringsten beeinflusst, so zeigte Cel5 noch mehr als 50% der relativen Aktivität in Gegenwart der o. g. Ionen, Cel3 und Cel17 zeigten jedoch weniger als 50% der relativen Aktivität bzw. wurden z. T. vollständig durch die o. g. Ionen gehemmt.

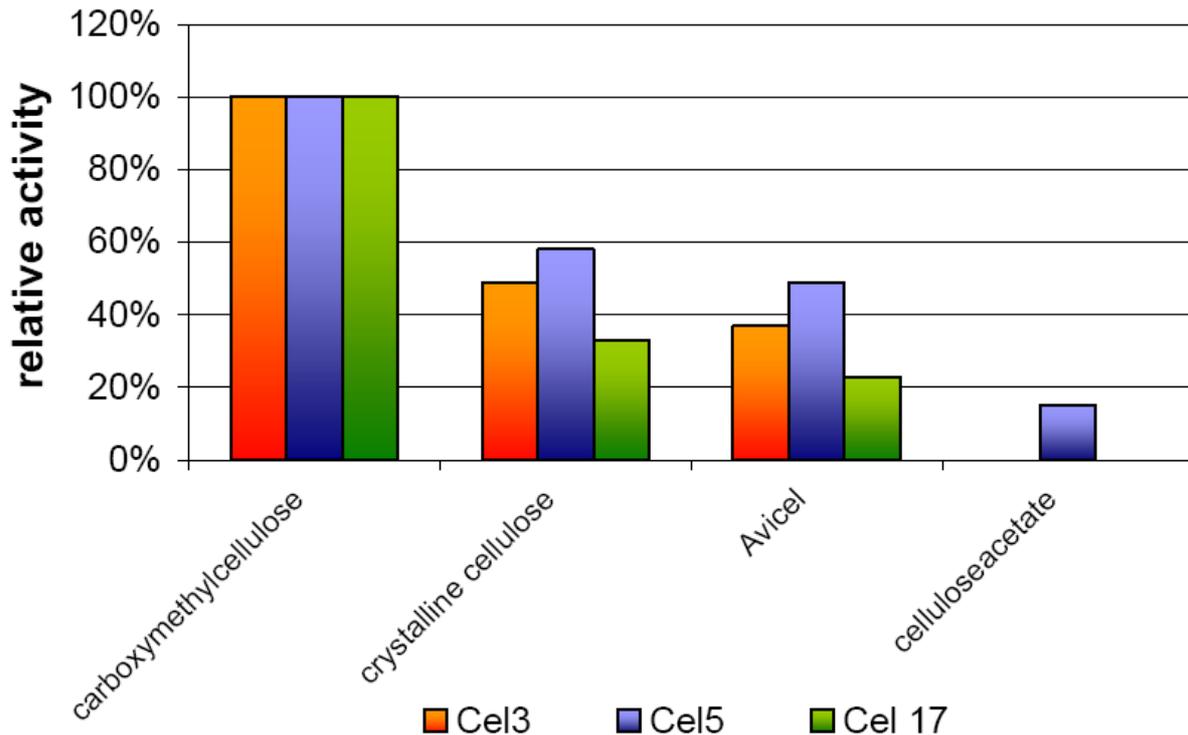


Abb. 5: Substratspezifität von Cel3, Cel5 und Cel17. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte in 1% Substrat in 40 mM Universalpuffer (pH 6) bei 60°C (Cel3) bzw. 70°C (Cel5, Cel17) für 30 min.

Um ein geeignetes Enzym für den Einsatz im Hochtemperatur-Druckreaktor (Institut für Thermische Verfahrenstechnik, TUHH) auswählen zu können, wurden die Eigenschaften der drei cellulolytischen Enzyme miteinander verglichen. Dabei zeichnete sich die rekombinante Cellulase Cel5 aufgrund ihrer Eigenschaften als geeignetes Enzym aus. So zeigte Cel5 eine maximale Aktivität bei 70°C und war in der Lage, alle untersuchten löslichen und unlöslichen Cellulose-Substrate zu hydrolysieren. Auch die hohe relative Aktivität in Gegenwart verschiedener Metalle und die einfache Reinigung mittels Ni-NTA, die zu einer hohen Ausbeute führte, zeichneten Cel5 aus.

Zur Herstellung der rekombinanten Cellulase Cel5 wurden Hochzelldichtefermentationen des rekombinanten *E. coli*-Stammes im 2L-Maßstab durchgeführt, durch die eine 160-fache Steigerung der Enzymproduktion erzielt wurde (Tab. 3).

Tab. 3: Hochzelldichtefermentation von *E. coli*/pETBlue-1/cel5

	Optische Dichte OD₆₀₀	Aktivität Cel5 [U/l]	Produktivität
Schüttelkolben (LB-Medium)	3,4	1.460	1
2 l Fermentation (Horn-Mineralmedium)	~200	234.000	160

Die Aktivität von Cel5 gegenüber dem Substrat Roggenstroh wurde im Institut für Thermische Verfahrenstechnik (TUHH) untersucht. Dazu wurden 100 U Cel5 in 40 mM Universalpuffer (pH 6) zusammen mit 7% Roggenstroh in 40 mM Universalpuffer (pH 6) bei einer Temperatur von 70°C bzw. 90°C, einem Druck von 60 bar und einer Verweilzeit von 90 min in dem Hochtemperatur-Druckreaktor inkubiert. Als Kontrolle diente 7% Roggenstroh in 40 mM Universalpuffer (pH 6), das ebenfalls unter den o. g. Bedingungen im Reaktor behandelt wurde. Die Analyse der Hydrolyseprodukte erfolgte mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie und der Säule Aminex HPX-42A (Biorad), die eine Auftrennung von Oligosacchariden bis zu einem Polymerisationsgrad (DP) von 11 ermöglicht.

Es zeigte sich, dass unter den getesteten Bedingungen keine signifikanten Mengen an Roggenstroh durch Cel5 zu kleineren Oligosacchariden umgesetzt wurden. Da mit der verwendeten Säule der Nachweis von Oligosacchariden lediglich bis zu DP 11 möglich ist, ist anzunehmen, dass die Cellulase Cel5 das Roggenstroh hydrolysiert, die Hydrolyseprodukte aber nicht durch die HPLC-Analyse nachgewiesen werden können.

4.2 Thermoaktive Cellulasen aus thermophilen anaeroben Bakterien

Für die Identifizierung weiterer Enzymsysteme aus thermophilen Mikroorganismen wurden Untersuchungen mit Reinkulturen der extremophilen Bakterien *Anaerobranca gottschalkii* und *Fervidobacterium gondwanense* durchgeführt, von denen bekannt ist, dass sie Cellulose abbauen können (Prowe & Antranikian, 2001; Andrews & Patel, 1996).

4.2.1 Klonierung, Expression und Charakterisierung putativer Endoglucanasen aus *Anaerobranca gottschalkii*

Das Genom des thermoalkaliphilen Bakteriums *Anaerobranca gottschalkii* ist partiell sequenziert (Antranikian *et al.*, 2008) und durch Sequenzanalysen konnten die Gene *cel2* und *cel8* identifiziert werden, die für zwei putative Endoglucanasen kodieren. Das Gen *cel2* kodiert für ein Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 38 kDa und 348 Aminosäuren. Das Gen *cel8* kodiert für ein Protein von 327 Aminosäuren und einem kalkulierten Molekulargewicht von 36,1 kDa. Ein Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen von Cel2 und Cel8 miteinander ergab eine Identität von 40,4% und zeigte, dass die hypothetischen Endoglucanasen sich in ihrer Aminosäuresequenz deutlich voneinander unterscheiden.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz von Cel2 mit Aminosäuresequenzen weiterer Cellulasen zeigte Identitäten von 43% - 58%, wobei die größte Identität von 46% zu der bekannten Endoglucanase CelM aus *Clostridium thermocellum* vorliegt.

Die BLAST-Analyse der Sequenz von Cel8 ergab Identitäten von 39% - 61% mit der höchsten Identität von 55% zu der charakterisierten Endoglucanase CelM aus *Clostridium thermocellum*. Neben den Sequenzähnlichkeiten zu Cellulasen bzw. Endoglucanasen zeigten Cel2 und Cel8 auch Sequenzähnlichkeiten zu putativen Aminopeptidasen.

Die für Cel2 und Cel8 kodierenden Gene wurden amplifiziert, in den Expressionvektor pETBlue™-1 kloniert und die rekombinanten Enzyme Cel2 und Cel8 wurden in *E. coli* Tuner™(DE3)pLacI-Zellen erfolgreich exprimiert.

Die Untersuchung der Substratspezifität der rekombinanten Enzyme zeigte, dass Cel2 und Cel8 unlösliche Cellulose-Substrate wie Avicel, Cellulose-Pulver und Cellulose-Acetat gegenüber löslichen Cellulose-Substraten wie Carboxymethyl- und Hydroxyethyl-Cellulose bevorzugen (Abb. 6). Somit wäre eine wichtige Voraussetzung geschaffen, um sehr komplexe Cellulose-Substrate effizient abzubauen.

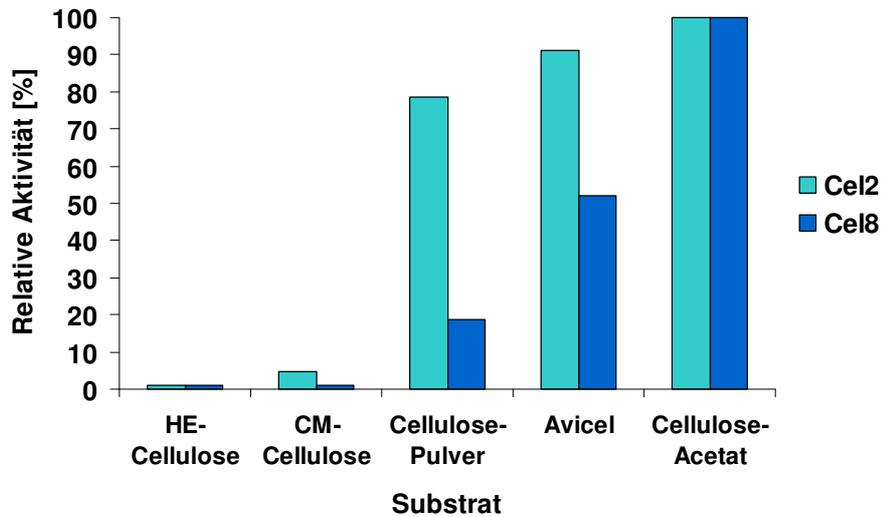


Abb. 6: Substratspezifität von Cel2 und Cel8 aus *A. gottschalkii*. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte in 1% Substrat in 50 mM K_2HPO_4 bei 50°C für 60 min.

Das rekombinante Enzym Cel2 hat ein Temperaturoptimum von 50°C und ist in dem Temperaturbereich von 30°C - 80°C aktiv, wobei die relative Aktivität von Cel2 bei 80°C über 50% beträgt (Abb. 7a). Cel2 ist in dem pH-Bereich von pH 4 - 10 aktiv, mit einem Optimum bei pH 9,0 (Abb. 7b).

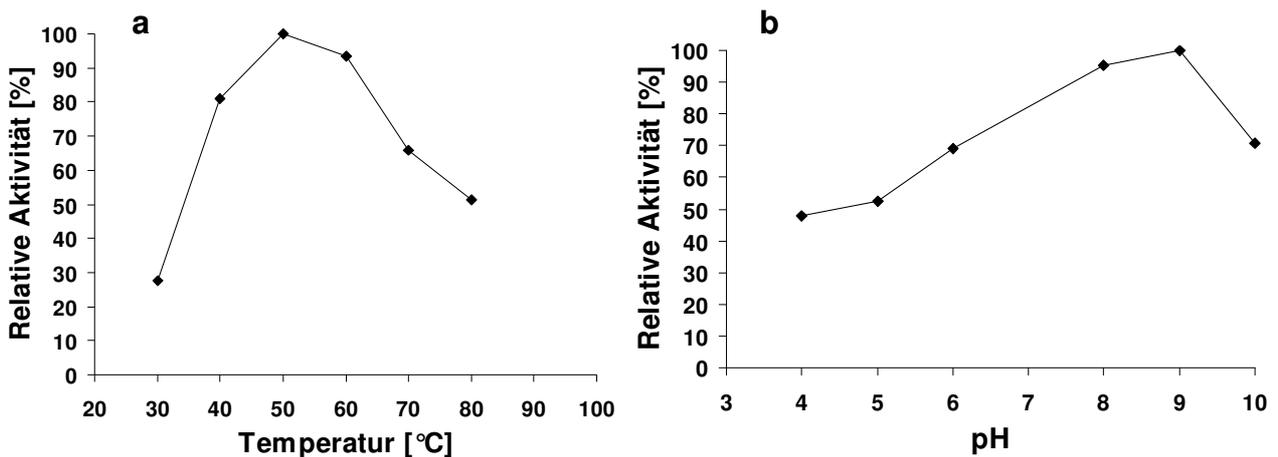


Abb. 7a und b: Abhängigkeit der Aktivität von Cel2 aus *A. gottschalkii* von der Temperatur (a) und dem pH-Wert (b). Die Bestimmung der Aktivität erfolgte in 1% Avicel in 50 mM K_2HPO_4 (pH 8) für 60 min (a) bzw. in 1% Avicel in 120 mM Universalpuffer bei 50°C für 60 min (b).

Zur Bestimmung der Hydrolyseprodukte von Cel2 wurden verschiedene Cellulose-Substrate wie β -Glucan, Carboxymethylcellulose, Avicel und Cellulose-Pulver für 17,5 h bei 50°C mit Cel2 inkubiert. Die Bestimmung der Hydrolyseprodukte wurde mittels HPLC durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass Cel2 das β -(1 \rightarrow 3/1 \rightarrow 4)-glycosidisch verknüpfte Substrat β -Glucan zu Oligosacchariden mit einem Polymerisationsgrad von 2 - 7 hydrolysiert (Abb. 8). Die Analyse der Hydrolyseprodukte der weiteren getesteten Substrate zeigte keine Bildung von Oligosacchariden, daher ist anzunehmen, dass Cel2 Produkte bildet, die größer als DP 11 sind und mittels HPLC nicht detektiert werden können. Des Weiteren wurde die Aktivität von Cel2 gegenüber Roggenstroh untersucht. Da auch hier kein Nachweis von gebildeten Oligosacchariden mittels HPLC erbracht werden konnte, wurde auf den Einsatz von Cel2 im Hochtemperatur-Druckreaktor zunächst verzichtet.

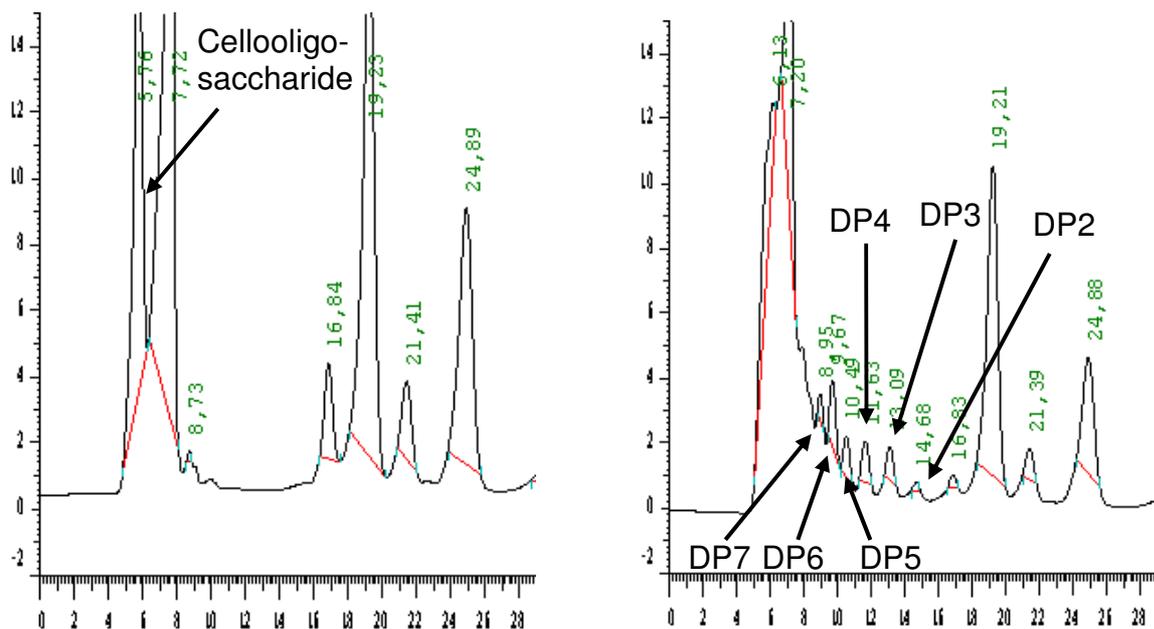


Abb. 8: Hydrolyse von β -Glucan durch Cel2. Die Inkubation erfolgte für 17,5 h bei 50°C.

4.2.2 Klonierung, Expression und Charakterisierung der rekombinanten Cellulase aus *Fervidobacterium gondwanense*

Das thermophile, obligat anaerobe Bakterium *Fervidobacterium gondwanense*, das optimal bei einer Temperatur von 65°C - 68°C und bei pH 7 wächst, ist in der Lage, Carboxymethylcellulose abzubauen (Andrews & Patel, 1996). Aus der genomischen DNA von *F. gondwanense* wurde eine Genbibliothek mit Hilfe des „ZAP Express® Predigested Vector Kits“ und des „ZAP Express® Predigested Gigapack® Cloning Kits“ (Stratagene) erstellt. Es folgte ein aktivitätsbasiertes Screening mit AZCL-Hydroxyethyl-Cellulose als Substrat für Endoglucanasen und 4-Nitrophenyl β -D-cellobiosid als Substrat für Exoglucanasen (Cellobiohydrolasen). Durch das Screening der Genbibliothek bei 70°C wurde ein Klon (Klon 14.1) mit Endoglucanase-Aktivität identifiziert und isoliert; die Aktivität einer Exoglucanase wurde jedoch nicht beobachtet.

Die DNA des Inserts von Klon 14.1 wurde sequenziert und durch Sequenzanalysen konnte ein offenes Leseraster identifiziert werden, das für eine Cellulase kodiert. Das für die Cellulase Cel14.1 aus *F. gondwanense* kodierende Gen hat eine Länge von 1065 bp und codiert somit für ein Protein mit einer Länge von 354 Aminosäuren und einem kalkulierten Molekulargewicht von 38,5 kDa. Eine mit Hilfe des Programms SignalP 3.0 durchgeführte Analyse der Aminosäuresequenz ergab eine 27 Aminosäuren lange putative Signalsequenz am N-Terminus des Proteins, was für eine Lokalisierung der Cellulase außerhalb der Zelle spricht. Analysen der Aminosäuresequenz zeigten, dass die Cellulase Cel14.1 Familie 5 der Glycosid-Hydrolasen zugehörig ist und dass das Protein keine Kohlenhydrat bindende Domäne enthält.

Die Aminosäuresequenz von Cel14.1 wurde mit bekannten und putativen Cellulase-Sequenzen verglichen. Dabei zeigte sich, dass zwischen den verschiedenen Cellulase-Sequenzen Identitäten von 26% - 76% existieren. Die größte Identität mit 76% zeigte sich zwischen Cel14.1 und einer putativen Glycosid-Hydrolase aus *Fervidobacterium nodosum*. Zu der charakterisierten Cellulase CelH aus *Clostridium thermocellum* zeigt Cel14.1 eine Identität von 39%.

Das für die Cellulase kodierende Gen *cel14.1* wurde ohne Sequenz für das Signalpeptid mittels PCR amplifiziert und mit Hilfe des „pETBlue-1 AccepTor™ Vector Kits“ (Novagen) in den Expressionsvektor pETBlue™-1 integriert. Das rekombinante Plasmid wurde in *E. coli* Tuner™(DE3)pLacI-Zellen transformiert. Die

Überexpression von *cel14.1* erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG zu der Kultur bei einer $OD_{600} \approx 0,6$. Die Zellernte wurde 4-5 h nach der Induktion durchgeführt. Der Rohextrakt des rekombinanten *E. coli*-Stammes wurde für 30 min bei 60°C inkubiert und im Anschluss durch Anionenaustausch-Chromatographie (Q Sepharose High Performance, GE Healthcare) und Adsorptions-Chromatographie (Ceramic Hydroxyapatite, Biorad) aufgetrennt. Das Protein Cel14.1 konnte mit diesen Reinigungsschritten erfolgreich gereinigt werden (Abb. 9), wobei die Ausbeute 5,4% und die spezifische Aktivität 278,5 U/mg beträgt (Tab. 4).

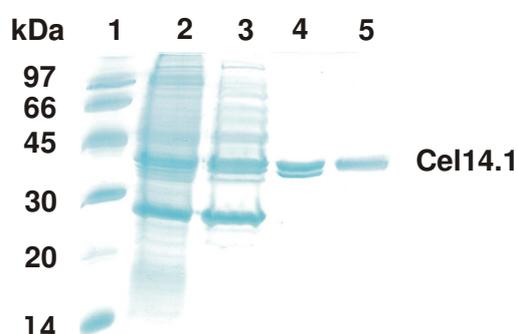


Abb. 9: Reinigung der rekombinanten Cellulase Cel14.1 aus *F. gondwanense* mittels Ionenaustausch- und Adsorptions-Chromatographie. **Spur 1:** Marker, **Spur 2:** Rohextrakt, **Spur 3:** hitzegefällter Rohextrakt, **Spur 4:** Reinigungsfraktion Q-Sepharose, **Spur 5:** Reinigungsfraktion Hydroxyapatit

Tab. 4: Reinigung der rekombinanten Cellulase Cel14.1 aus *F. gondwanense* mittels Anionenaustausch- und Adsorptions-Chromatographie

Fraktion	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [U]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Reinigungsfaktor	Ausbeute [%]
Rohextrakt	119	5437	45,5	1	100
Hitzefällung	52	4263	78,4	1,7	78
Q-Sepharose	9,1	2279	249,2	5,5	41,9
Hydroxyapatit	1,1	291	278,5	6,1	5,4

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte in 0,5% β -Glucan in 50 mM Na-Acetat (pH 6,0) für 15 min bei 90°C.

Zur Steigerung der Reinigungsausbeute von Cel14.1 wurde das für die Cellulase kodierende Gen in einen Expressionsvektor kloniert, der eine Sequenz für einen N-terminalen His-Tag trägt. Dazu wurde *cel14.1* durch PCR amplifiziert, in den Expressionsvektor pQE-30 (Qiagen) ligiert und in *E. coli* M15[pREP4] exprimiert. Die Reinigung von 6His-Cel14.1 mittels Ni-NTA Agarose (Abb. 10) führte zu einer Reinigungsausbeute von 51,5% und einer spezifischen Aktivität von 478,3 U/mg (Tab. 5). Durch die Reinigung mittels Ni-NTA konnte die Reinigungsausbeute im Vergleich zu der Anionenaustausch- und Adsorptions-Chromatographie zehnfach gesteigert werden.

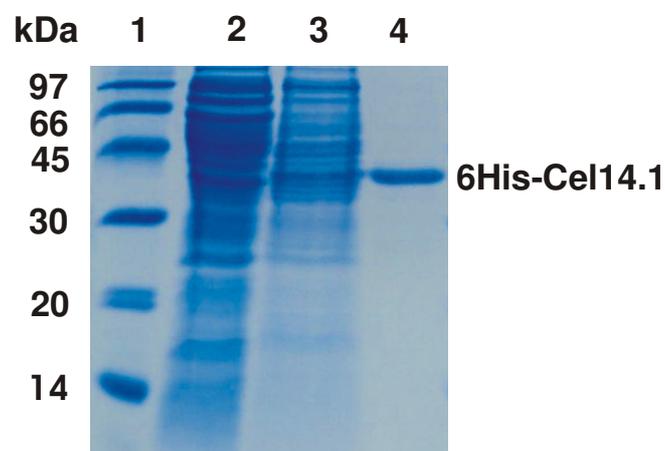


Abb. 10: Reinigung der rekombinanten Cellulase 6His-Cel14.1 aus *F. gondwanense* mittels Ni-NTA Agarose **Spur 1:** Marker, **Spur 2:** Kontrolle, **Spur 3:** Rohextrakt, **Spur 4:** Reinigungsfraction Ni-NTA

Tab. 5: Reinigung der rekombinanten Cellulase 6His-Cel14.1 aus *F. gondwanense* mittels Ni-NTA Agarose

Fraktion	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [U]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Reinigungsfaktor	Ausbeute [%]
Rohextrakt	12,89	253,1	19,64	1	100
Ni-NTA	0,27	130,4	478,3	24,4	51,5

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte in 0,5% β -Glucan in 50 mM Na-Acetat (pH 6,0) für 15 min bei 90°C.

Die rekombinante Cellulase 6His-Cel14.1 zeigte mehr als 50% der relativen Aktivität in einem Temperatur-Bereich von 70 °C - 105 °C mit einer maximalen Aktivität bei 90 °C (Abb. 11a) und in einem pH-Bereich von pH 5,5 - pH 7 mit einer maximalen Aktivität bei pH 6 (Abb. 11b).

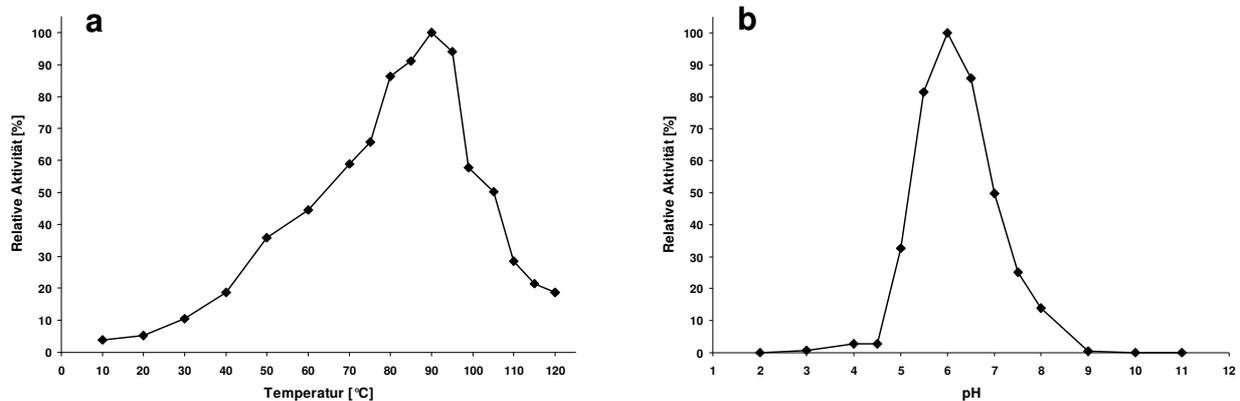


Abb. 11a und b: Abhängigkeit der Aktivität von 6His-Cel14.1 aus *F. gondwanense* von der Temperatur und dem pH-Wert. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte in 0,5% β -Glucan in 50 mM Na-Acetat (pH 6,0) für 15 min (a) bzw. in 0,5% β -Glucan in 120 mM Universalpuffer für 15 min bei 90 °C (b).

Die Cellulase 6His-Cel14.1 zeigte die höchste Aktivität gegenüber β -Glucan. Im Vergleich dazu zeigte 6His-Cel14.1 gegenüber Carboxymethylcellulose und Hydroxyethylcellulose eine Aktivität von 67% bzw. 39%. Die unlöslichen Substrate Cellulose-Pulver, Avicel und Cellulose-Acetat wurden dagegen mit einer wesentlich geringeren Aktivität hydrolysiert. Neben der Aktivität gegenüber löslichen Cellulose-Substraten zeigte 6His-Cel14.1 die Aktivität einer Xylanase und hydrolysierte die Substrate Haferspelzen-Xylan, Birkenholz-Xylan und Buchen-Xylan (Abb. 12).

Die Aktivität von 6His-Cel14.1 wurde durch Ca^{2+} -, Cr^{2+} -, K^+ -, Mg^{2+} -, Na^+ -Ionen nicht beeinflusst. Dagegen inhibierten Al^{3+} -, Co^{2+} -, Cu^{2+} -, Fe^{3+} -, Ni^{2+} -Ionen die Aktivität von 6His-Cel14.1. Die Gegenwart von 1% CHAPS, 10% Triton X 100 bzw. 10% Tween 80 hatte keinen Einfluss auf die Aktivität von 6His-Cel14.1.

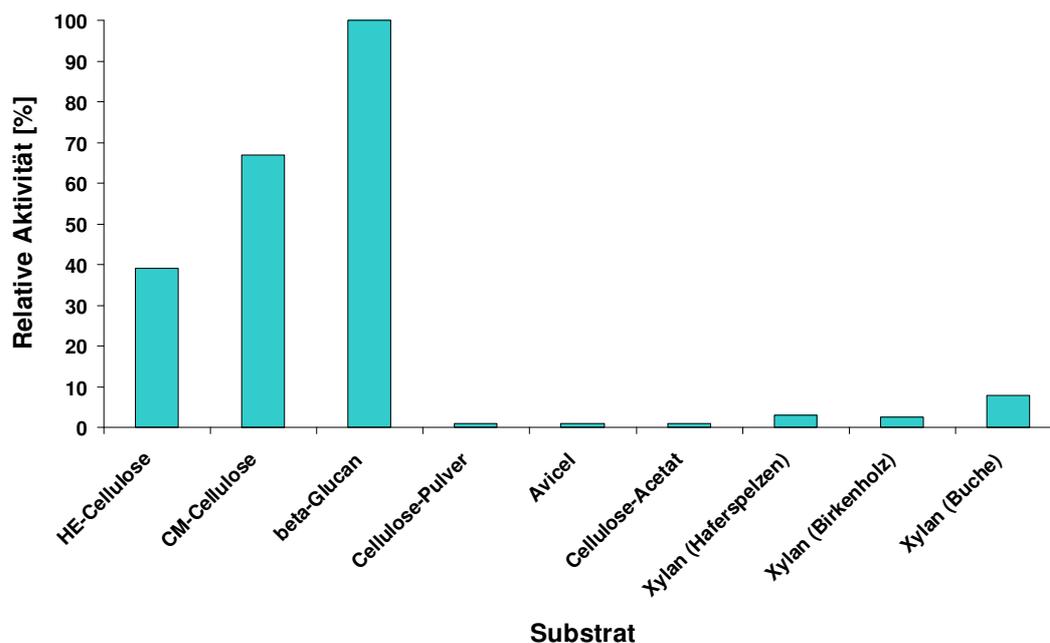


Abb. 12: Substratspezifität von 6His-Cel14.1 aus *F. gondwanense*.

Die Bestimmung der Hydrolyseprodukte von 6His-Cel14.1 erfolgte durch Inkubation des Enzyms mit verschiedenen Cellulose- und Xylan-Substraten und anschließender Analyse der Produkte mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie. Zur Messung der Hydrolyseprodukte wurde die Säule Aminex HPX-42A (Biorad) verwendet, mit der eine Auftrennung von Oligosacchariden bis zu einem Polymerisationsgrad (DP) von 11 möglich ist.

Es konnte gezeigt werden, dass 6His-Cel14.1 die β -(1 \rightarrow 3/1 \rightarrow 4)-glycosidisch verknüpften Substrate β -Glucan (Abb. 13) und Lichenan vollständig zu Glucose, Cellobiose und Cellotriose hydrolysiert, wobei als Zwischenprodukte Cellooligosaccharide von DP 2 bis DP 7 gebildet wurden (Abb. 14). Das β -(1 \rightarrow 4)-glycosidisch verknüpfte Substrat Carboxymethylcellulose hingegen wurde zu Glucose und Cellobiose hydrolysiert. Die Untersuchung der Hydrolyseprodukte unlöslicher Cellulose-Substrate zeigte keine Bildung von Mono-, Di- bzw. Oligosacchariden durch 6His-Cel14.1, so dass anzunehmen ist, dass das Enzym Hydrolyseprodukte bildete, die größer als DP 11 sind und somit nicht durch die HPLC detektiert werden können.

Die Analyse der Hydrolyseprodukte aus Xylanen zeigte die Bildung von Xylobiose, Xylotriose und Xylotetraose aus Buchenholz- (Abb. 15), Birkenholz- und Haferspelzen-Xylan.

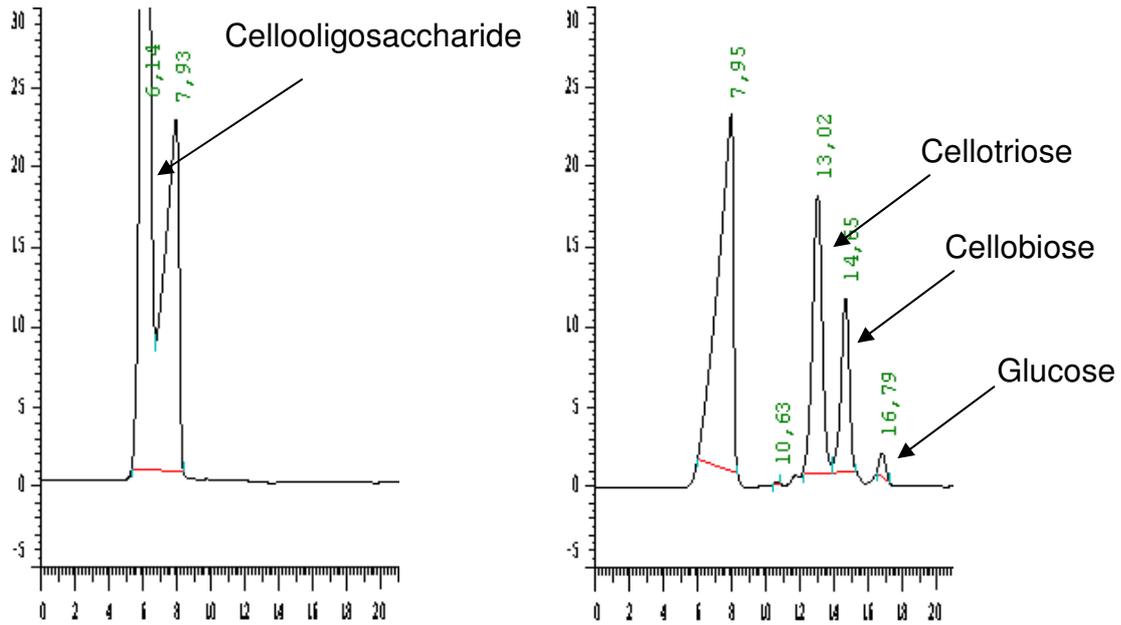


Abb. 13: Hydrolyseprodukte von β -Glucan nach Inkubation von 0,5% Substrat mit 6His-Cel14.1 für 17 h bei 80 °C.

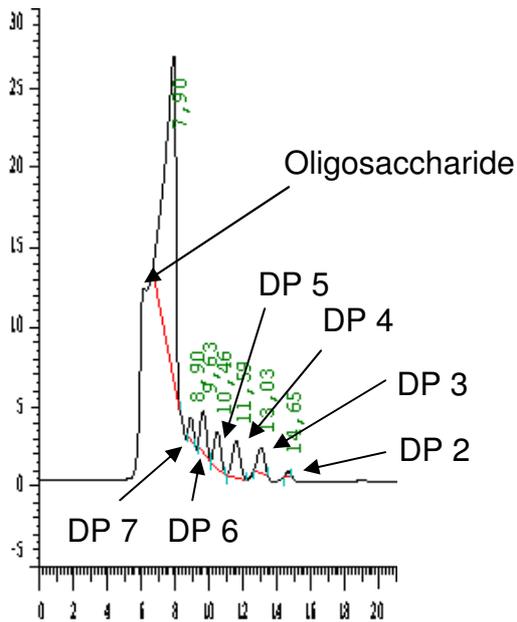


Abb. 14: Bildung von Cellooligosacchariden als Zwischenprodukte der Hydrolyse von β -Glucan nach Inkubation von 0,5% Substrat mit 6His-Cel14.1 für 30 min bei 100 °C.

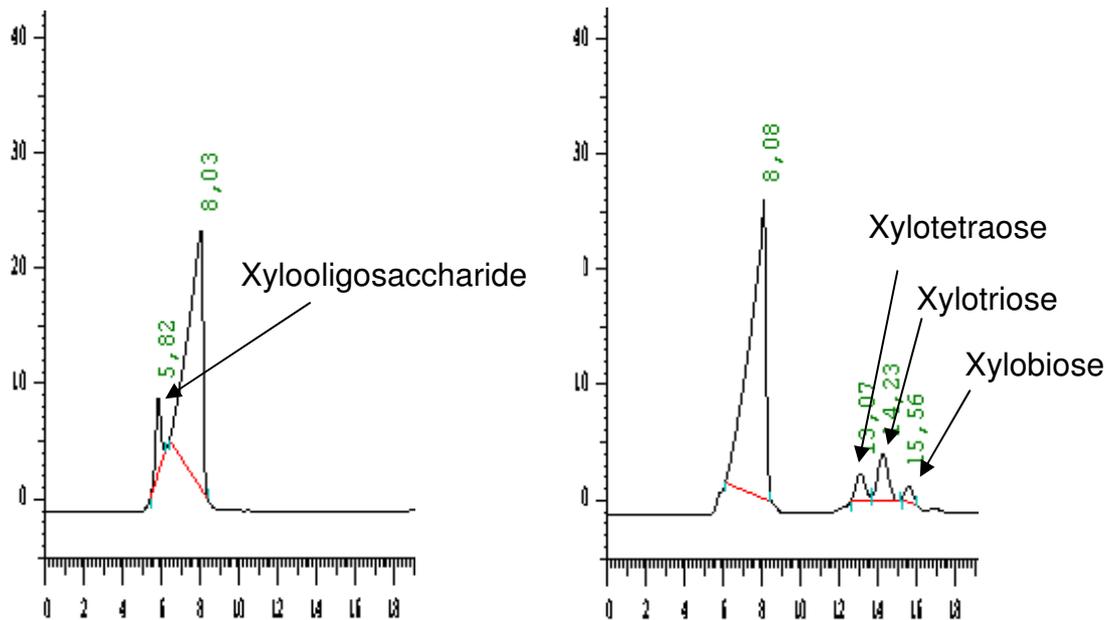


Abb. 15: Hydrolyseprodukte von Buchenholz-Xylan nach Inkubation von 0,5% Substrat mit 6His-Cel14.1 für 17 h bei 80°C.

Die Cellulase Cel14.1, die sowohl Cellulose- als auch Xylan-Substrate zu Mono-, Di-, Tri- und Tetrasacchariden abbaut, wurde auf die Aktivität gegenüber Roggenstroh untersucht. Dazu wurden 5% Roggenstroh in 50 mM Na-Acetat (pH 6) mit 6His-Cel14.1 für 17 h bei 80°C inkubiert. Die Analyse der Hydrolyseprodukte erfolgte durch HPLC und zeigte, dass die löslichen Oligosaccharide (Abb. 16a) durch 6His-Cel14.1 hydrolysiert wurden und zur Bildung von Cellobiose als Hydrolyseprodukt führten (Abb. 16b). Neben der Erhöhung der Cellobiose-Konzentration wurde die Bildung keines weiteren Hydrolyseprodukts beobachtet, so dass anzunehmen ist, dass die gebildeten Hydrolyseprodukte größer als DP 11 sind bzw. 6His-Cel14.1 das unlösliche Substrat Roggenstroh nicht hydrolysieren kann.

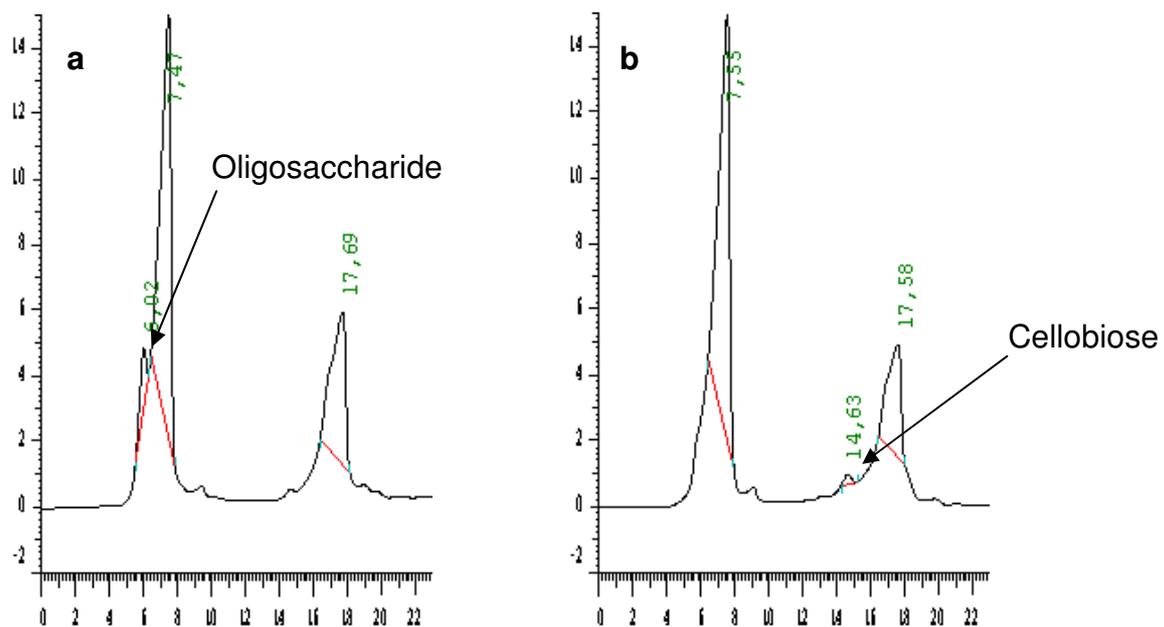


Abb. 16a und b: Hydrolyseprodukte von Roggenstroh nach Inkubation von 5% Substrat mit 6His-Cel14.1 für 17 h bei 80 °C.

Zur Überprüfung der Aktivität von 6His-Cel14.1 gegenüber thermisch hydrolysierter Roggenstrohproben wurden zwei Hydrolysate als Substrat eingesetzt, die einen hohen Anteil an Cellooligosacchariden bzw. Xylooligosacchariden aufwiesen. Wie aus den Abb. 17 und 18 ersichtlich wird, führte die Gegenwart von 6His-Cel14.1 nicht zu einer Erhöhung der Mono-, Di-, Tri- und Tetrasaccharide. Möglicherweise ist die fehlende Aktivität von 6His-Cel14.1 gegenüber den hydrolysierten Roggenstrohproben darin begründet, dass durch die thermische Hydrolyse des Roggenstrohs unerwünschte Nebenprodukte gebildet wurden, die auf die Aktivität von 6His-Cel14.1 einen inhibierenden Effekt haben.

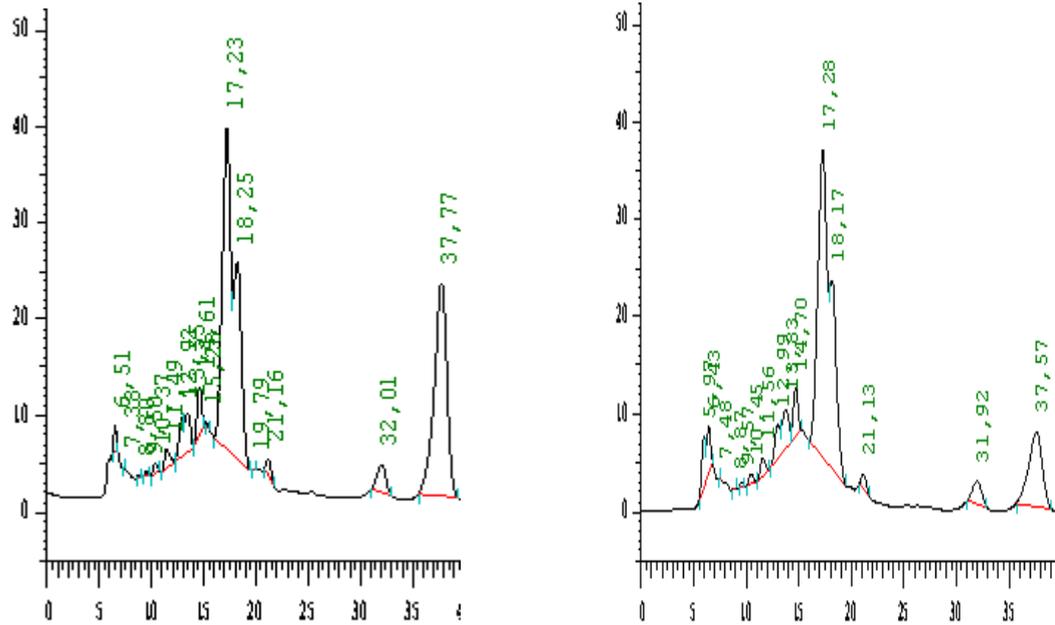


Abb. 17: Hydrolyse von Cellulooligosacchariden aus thermisch hydrolysiertem Roggenstroh nach Inkubation mit 6His-Cel14.1 für 17 h bei 80°C.

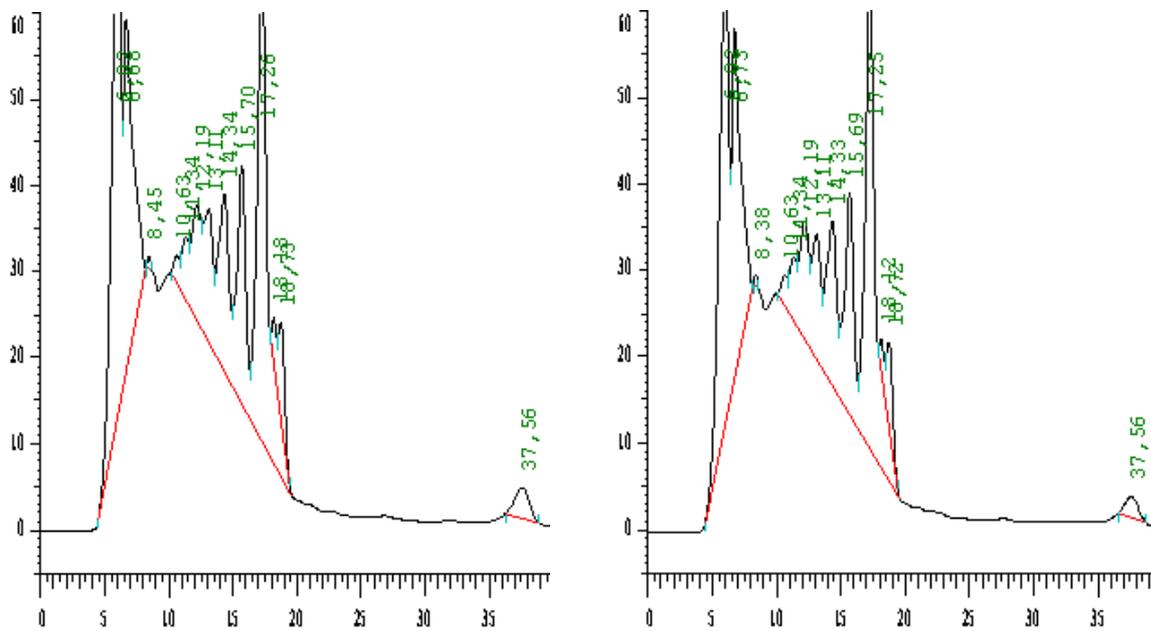


Abb. 18: Hydrolyse von Xylooligosacchariden aus thermisch hydrolysiertem Roggenstroh nach Inkubation mit 6His-Cel14.1 für 17 h bei 80°C.

5. Diskussion

Es wurden aerobe und anaerobe Mischkulturen aus den Azoren-Proben auf verschiedenen cellulosehaltigen Substraten angereichert und zur Herstellung von Microcom-Genombanken genutzt. Durch ein aktivitätsbasiertes Screening konnten drei Cellulasen identifiziert werden. Die für die Cellulasen kodierenden Gene wurden in Expressionsvektoren umklontiert und heterolog in *E. coli* exprimiert. Die Proteine wurden gereinigt und biochemisch charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass die Cellulase Cel5 aufgrund ihrer Eigenschaften für den Einsatz im Hochtemperatur-Druckreaktor geeignet ist. Das Enzym wurde unter verschiedenen Parametern im Reaktor auf die Fähigkeit der Hydrolyse von Roggenstroh untersucht. Die Bildung von kleinen Oligosacchariden bis zu einem Polymerisationsgrad von 11 aus Roggenstroh durch Cel5 konnte nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise bildet die Cellulase Hydrolyseprodukte, die größer als DP 11 sind und somit nicht mit der verwendeten HPLC-Säule nachgewiesen werden können. Da die Säule Aminex HPX-42A die einzige Säule ist, die eine Auftrennung von Oligosacchariden zu einem hohen Polymerisationsgrad ermöglicht, gibt es derzeit keine Alternative, um die Hydrolyseprodukte mittels HPLC nachzuweisen.

Im Rahmen der Charakterisierung von Cel14.1 konnte gezeigt werden, dass die Cellulase lösliche Substrate wie β -Glucan, Lichenan und Carboxymethylcellulose zu Mono-, Di- und Trisacchariden abbaute. Auch die vollständige Hydrolyse von verschiedenen Xylanen durch Cel14.1 zu Xylobiose, Xylotriose und Xylotetraose wurde verzeichnet. Da diese Cellulase jedoch nicht in der Lage war, Mono-, Di- und Trisacchariden aus den thermisch hydrolysierten Roggenstrohproben zu bilden, ist eine Hemmung der Aktivität von Cel14.1 durch mögliche Nebenprodukte, die während der thermischen Hydrolyse gebildet wurden, wahrscheinlich. Es wäre daher sinnvoll, die Roggenstroh-Hydrolysate auf ihre Zusammensetzung hin zu untersuchen, um mögliche Inhibitoren identifizieren zu können.

Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um die vollständige Hydrolyse von Roggenstroh zu erreichen. Die Cellulasen Cel3 und Cel17 aus den Azoren-Mischkulturen und Cel2 aus *A. gottschalkii* sind gute Kandidaten für die kombinierte thermisch-enzymatische Hydrolyse von Roggenstroh.

Es wäre sinnvoll, neuartige Exoglucanasen und β -Glucosidasen zu identifizieren und zu isolieren, da es denkbar ist, dass der gesamte cellulolytische Enzymkomplex in der Lage ist, das komplexe Polymer Roggenstroh zu hydrolysieren.

Die für die kombinierte thermische und enzymatische Hydrolyse geeigneten cellulolytischen Enzymsysteme wurden dem DBU-Projekt AZ 13157 und der BiocatCollection (AZ 13131) zur Verfügung gestellt.

6. Soll/Ist-Vergleich

Die Meilensteine des Projekts wurden weitestgehend erreicht. Für die Herstellung von Anreicherungs- und Reinkulturen wurden die auf den Azoren gewonnen Proben sowohl aerob als auch anaerob auf verschiedenen Cellulose-Substraten angereichert. Der Einsatz von Microcomgenomics erwies sich dabei als sehr erfolgreich, so konnten durch die kombinierte Anreicherung und Herstellung von Metagenombanken aus Mischkulturen drei neuartige cellulolytische Enzyme identifiziert werden. Auf die Isolierung von celluloseabbauenden Reinkulturen wurde verzichtet, da durch das Screening der Microcom-Genombanken die Cellulasen bereits in rekombinanter Form identifiziert und isoliert wurden und somit gewährleistet wurde, dass die Proteine erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden. Alternativ dazu wurde die Reinkultur des thermoalkaliphilen Bakteriums *Anaerobranca gottschalkii* auf cellulolytische Aktivität untersucht, wobei eine weitere Cellulase identifiziert werden konnte. Die Untersuchung von Enzymmischungen wurde nicht durchgeführt, da die identifizierten Cellulasen Endoglucanase-Aktivität zeigen und die weiteren, am Celluloseabbau beteiligten Enzyme (Exoglucanase, β -Glucosidase) bislang nicht identifiziert werden konnten.

Zur Identifizierung weiterer cellulolytischer Enzyme wurde eine Genbank aus dem thermophilen Bakterium *Fervidobacterium gondwanense* erstellt, deren Screening zur Identifizierung einer weiteren rekombinanten Cellulase führte. Die Reinigung und Charakterisierung des Enzyms wurde ebenfalls erfolgreich abgeschlossen.

6. Soll/Ist-Vergleich

	Quartal							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Herstellung von Anreicherungs- und Reinkulturen								
Aerobe und anaerobe Anreicherung auf verschiedenen Substraten	✓							
Bestimmung der Biodiversität								
Isolierung von Reinkulturen								
Stammcharakterisierung								
Enzymcharakterisierung		✓	✓	✓				
Herstellung von Genbanken								
Genbanken aus Reinkulturen			✓	✓	✓			
Screening nach rekombinanten Cellulasen				✓	✓	✓		
Charakterisierung der Enzyme					✓	✓	✓	✓
Testung von Enzymmischungen								

Microcomgenomics								
Microcom-Genbanken aus Mischkulturen			✓	✓	✓	✓		
Screening nach rekombinanten Cellulasen				✓	✓	✓	✓	
Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten Enzyme					✓	✓	✓	✓
Untersuchung von Enzymmischungen								
Thermisch-enzymatischer Aufschluss								
Auswahl geeigneter Enzymsysteme					✓	✓	✓	✓
Parametervariation im Hochtemperatur-Druckreaktor						✓	✓	✓
Umklonierung der Enzyme					✓	✓	✓	✓
Fermentation im Großmaßstab							✓	✓

7. Literatur

Antranikian, G., Ruepp, A., Gordon, P., Ballschmiter, M., Zibat, A., Sensen, CW., Frishman, D., Liebl, W., Klenk, HP. (2007) Rapid access to genes of biotechnology useful enzymes by partial genome sequencing: the thermoalkaliphile *Anaerobranca gottschalkii*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 16: 81-90.

Prowe, SG. and Antranikian, G. (2001) *Anaerobranca gottschalkii* sp. nov., a novel thermoalkaliphilic bacterium that grows anaerobically at high pH and temperature. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51: 457-465.

Andrews, KT. and Patel, BK. (1996) *Fervidobacterium gondwanense* sp. nov., a new thermophilic anaerobic bacterium isolated from nonvolcanically heated geothermal waters of the Great Artesian Basin of Australia. Int. J. Syst. Bacteriol., 46(1): 265-269.

8. Präsentationen

Katzer, M., Stöber, N., Minow, B. and Antranikian, G. Microbial community genomics (Microcomgenomics) for discovery of novel cellulases. Poster VAAM Tagung, Osnabrück, 01.-04.04.2007.

Piela, B. and Antranikian, G. Novel thermoactive cellulases from the anaerobic thermophilic bacteria *Anaerobranca gottschalkii* and *Fervidobacterium gondwanense*. Vortrag VAAM Tagung, Osnabrück, 01.-04.04.2007.

9. Anlagen

Microbial Community Genomics (Microcomgenomics) for discovery of novel cellulases

M. Katzer, N. I. Stößer, B. Minow and G. Antranikian

Institute of Technical Microbiology, Hamburg University of Technology, Hamburg, Germany

The use of microbial communities as source of genomic DNA for the construction of metagenomic libraries enables discovery of novel biocatalysts that are present in natural habitats. A combination of enrichment techniques and subsequent metagenomics of the enriched microbial community “Microcomgenomics” was carried out for the isolation of novel genes and the corresponding enzymes. This approach exploits the genetic diversity of mixed cultures when grown on selected carbon sources, such as cellulose and hemicellulose.

Water and soil samples from hot springs (60-90°C) were collected from Sao Miguel (Azores, Portugal) and enriched on different carbon sources including cellulose and xylan. The enrichment cultures were grown under aerobic as well as anaerobic conditions. Gene libraries were constructed using lambda ZAP[®] Vector (Stratagene) after isolation of DNA from the microbial community and screening was performed on AZCL HE-Cellulose and Xylan plates.

Two cellulase encoding genes were cloned with and without His-Tag in *E coli* Tuner[™] (DE3) cells. The gene *cel5* 2268 bp long encodes a protein with a molecular mass of 85 kDa (755 amino acids). The cellulase gene *cel5* exhibits 87 % identity to *cel D* from *Anaerocellum thermophilum*. Another gene *cel 3* (1614 bp long, molecular mass 59 kDa) showed 87.5 % identity to the endoglucanase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*.

Both recombinant enzymes are active with carboxymethylcellulose and crystalline cellulose between 40 and 80°C and pH of 4-9. Maximal activity was measured at 60°C (Cel 3.2) and 70°C (Cel 5.1).

**Novel thermoactive cellulases from the anaerobic thermophilic bacteria
Anaerobranca gottschalkii and *Fervidobacterium gondwanense***

Barbara Piela and Garabed Antranikian

Institute of Technical Microbiology, Hamburg University of Technology, Hamburg, Germany

Cellulose, the most abundant organic polymer in nature, is hydrolysed by the synergistic action of different enzymes including endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases. Aiming at finding robust thermoactive cellulases we focussed on two thermophilic anaerobic bacteria, the thermoalkaliphile *Anaerobranca gottschalkii* [1] and the extreme thermophile *Fervidobacterium gondwanense*.

The genome of *Anaerobranca gottschalkii* was found to contain two open reading frames, which were designated as *cel2* and *cel8*. The ORF *cel2* encodes the endoglucanase Cel2, which consists of 348 amino acids and has a molecular mass of 38 kDa. The amino acid sequence of Cel2 exhibits 49.6% identity to the sequence of an endoglucanase of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. The second endoglucanase Cel8 has a molecular mass of 36.1 kDa and consists of 327 amino acids. Analysis of the amino acid sequence of Cel8 revealed 58% identity to a cellulase of *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis*. Both open reading frames have been cloned and successfully expressed in *Escherichia coli*.

Furthermore, a thermoactive cellulase was found by screening the gene library of the extreme thermophile *Fervidobacterium gondwanense*. The cellulase encoding gene shows low similarities to other endoglucanases (36.3% identity to an endoglucanase of *Thermotoga maritima*).

Further information regarding substrate specificity and kinetic properties of the selected thermoactive cellulases will be presented.

[1] Prowe, SG. and Antranikian, G. (2001) *Anaerobranca gottschalkii* sp. nov., a novel thermoalkaliphilic bacterium that grows anaerobically at high pH and temperature. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51: 457-65.