

Zusammenfassung

Cyclodextrine (CD) sind zyklische Oligosaccharide aus sechs bis acht Glucoseeinheiten (alpha-, beta- und gamma-CD), die durch Cyclodextrin Glycosyltransferasen (CGTasen) aus Stärke und anderen Polysacchariden synthetisiert werden. Zur Herstellung von Cyclodextrinen, die in ihrem Inneren Gastmoleküle komplexieren können und deshalb vielfältige industrielle Anwendung finden, werden thermostabile CGTasen benötigt. In diesem Zusammenhang wurde die CGTase aus dem thermoalkaliphilen Bakterium „*Anaerobranca gottschalkii*“ hergestellt und charakterisiert, sowie Versuche zu ihrer Stabilisierung mittels gerichteter Evolution unternommen.

Das cgtase Gen wurde mittels PCR aus genomischer DNA isoliert und in „*Escherichia coli*“ heterolog exprimiert. Die CGTase wurde anschließend aus dem löslichen Zellextrakt über verschiedene chromatographische Methoden bis zu einer Reinheit von etwa 95 % angereichert. Die Charakterisierung mittels hydrodynamischer und spektroskopischer Methoden zeigte, dass es sich um ein monomeres Protein mit definierten Sekundärstrukturelementen und einer nativen Tertiärstruktur handelt. Die Stabilität der CGTase wurde mittels differentieller „scanning calorimetry“ und irreversibler thermischer Inaktivierung getestet. Dabei zeigte sich, dass das Enzym durch sein Substrat Stärke und Ca²⁺-Ionen extrinsisch stabilisiert wird. Eine genauere Analyse der Ergebnisse deutet darauf hin, dass die thermische Inaktivierung der CGTase auch ohne vorherige Denaturierung des Proteins erfolgen kann, weshalb als Ursache der Inaktivierung eine chemische Modifizierung des aktiven Zentrums plausibel erscheint.

Steady-state enzymkinetische Messungen der katalytischen Aktivität bei unterschiedlichen Enzym- und Substratkonzentrationen, Temperaturen und pH-Werten ergaben, dass bei allen untersuchten Reaktionsbedingungen zunächst hauptsächlich alpha-CD gebildet wird. Nach längeren Inkubationszeiten finden sich dagegen vergleichbare Mengen an alpha- und beta-CD, jedoch stets deutlich weniger gamma-CD.

Zur thermischen Stabilisierung der CGTase wurden durch „Error Prone“ PCR zwei Genbanken erstellt, wobei jeweils eine mutagenisierte Hälfte des cgtase Gens mit einer unveränderten Hälfte fusioniert war. Die Genbanken wurden im Rahmen eines neu entwickelten Screeningverfahrens auf stabilisierte CGTasen durchsucht. Dabei wurden mehrere CGTase Varianten isoliert und gereinigt. Ihre Charakterisierung zeigte jedoch, dass sie – aus bisher unverstandenen Gründen – weniger stabil als die wildtypische CGTase waren.