



Sparkling Science >

Wissenschaft ruft Schule  
Schule ruft Wissenschaft

Kevin Pichler

**Von nachwachsenden Rohstoffen  
zu wertvollen Synthesebausteinen**

Maturaarbeit SS 2009

betreut von

**Mag. Beate Bulfon**

Bundesrealgymnasium/Bundesrealgymnasium St. Veit/Glan

**Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. rer. nat. Robert Mach**

Technische Universität Wien

BMWF Schriftenreihe:  
Matura- und Bakkalaureatsarbeiten  
im Rahmen des Programms Sparkling Science  
Heft 1 2009

[www.bmwf.gv.at](http://www.bmwf.gv.at)

**BM.W.F**<sup>a</sup>

Bundesministerium für Wissenschaft  
und Forschung

Verfasst im Rahmen des Forschungsprojektes  
**„Grüne Chemie“**  
**Nachhaltige Strategien in der Wissenschaft**

PROJEKTLEITENDE EINRICHTUNG

Technische Universität Wien  
Fakultät für Technische Chemie  
Projektleitung: A.o Univ.-Prof. DI Dr. Marko D. Mihovilovic  
Kontakt: mmihovil@pop.tuwien.ac.at

WISSENSCHAFTLICHER KOOPERATIONSPARTNER

Universität für Bodenkultur Wien, IFA Tulln  
Department für Agrarbiotechnologie, Analytikzentrum

BETEILIGTE SCHULEN

Gymnasium und Realgymnasium Sachsenbrunn, GRg17  
Parhamergymnasium, BG/BRG St. Veit an der Glan, Wiedner  
Gymnasium – Sir Karl Popper Schule, HTL Rosensteingasse,  
BRG Feldkirchen, BG/BRG Villach, BG/BRG Wenzgasse,  
Technologisches Gewerbemuseum Wien, BG/BRG 11 Geringergasse,  
Grg11 Gottschalkgasse, BG/BRG Tulln a. d. Donau, BG/BRG  
Fichtnergasse, BRG Kandlgasse, BG/BRG Hagenmüllergasse,  
HTL Dornbirn



BM Johannes Hahn

### **Österreichs Nachwuchsförderung ist einzigartig in Europa**

Spitzenwissenschaft ist gewissermaßen wie Spitzensport – die Basis wird in der Nachwuchsförderung gelegt. Daher ist es mir ein großes Anliegen, Neugier und Faszination für Wissenschaft und Forschung bei Kindern und Jugendlichen bereits möglichst früh zu wecken!

Mit dem Forschungsprogramm „Sparkling Science“, das vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung 2007 aus der Taufe gehoben wurde, beschreiten wir einen unkonventionellen und in Europa einzigartigen Weg, um unseren wissenschaftlichen Nachwuchs zu fördern.

In sämtlichen Forschungsvorhaben, die im Rahmen des Programms gefördert werden, arbeiten Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler partnerschaftlich mit Jugendlichen zusammen. Dabei schauen die Jugendlichen den Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern nicht nur über die Schulter, sondern arbeiten selbst aktiv mit. Die Schülerinnen und Schüler bringen in ihrer Rolle als Juniorkolleginnen und Juniorkollegen zusätzliche Fragestellungen und Denkanstöße ein, sie wirken an der Konzeption und Durchführung von Untersuchungen mit, machen Befragungen, erheben Daten, interpretieren diese gemeinsam mit den Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern und stellen die Ergebnisse an Schulen, Universi-

täten und sogar bei wissenschaftlichen Tagungen vor. Die jungen Nachwuchsforscherinnen und Nachwuchsforscher lernen also bereits sehr früh das vielfältige Spektrum von Wissenschaft und Forschung kennen.

Die Zusammenarbeit von Wissenschaft und Schule bringt für beide Seiten einen großen Mehrwert: Die Wissenschaft profitiert, weil die Jugendlichen innovative Ideen und erfrischende Beiträge einbringen, die dann in neue wissenschaftliche Erkenntnisse einfließen. Die Jugendlichen bekommen einen einzigartigen Zugang zu neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen und erwerben Kompetenzen in den Bereichen Teamarbeit, Projektplanung und Projektpräsentation. Sorgfältig und eigenverantwortlich an komplexen Themenstellungen zu arbeiten und sich dabei auch mutig in Neuland vorzuwagen, sind dabei nicht nur entscheidende Basiskompetenzen für wissenschaftliches Arbeiten. Es sind Schlüsselfertigkeiten für erfolgreiche Karrieren in sämtlichen Berufsfeldern der modernen Arbeitswelt.

Ganz besonders freut es mich als Wissenschaftsminister, wenn Forschungsbeiträge unserer „Sparkling Science“ Teilnehmerinnen und Teilnehmer über das Stadium von ersten wissenschaftlichen Gehversuchen hinaus wachsen und die Gestalt eigenständiger, kleiner Forschungsberichte annehmen. Eine der wichtigsten Grundregeln wissenschaftlichen Arbeitens besteht schließlich darin, Forschungsergebnisse zu publizieren und damit für andere Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler bzw. der Öffentlichkeit zugänglich zu machen. Das Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung gibt daher eine eigene Publikationsreihe für jene Forschungsergebnisse heraus, die im Rahmen von Maturaprojekten und Bakkalaureatsarbeiten aus „Sparkling Science“ entstehen.

Ich danke allen Beteiligten an „Sparkling Science“ für ihr Engagement und wünsche Ihnen viel Freude mit den folgenden Seiten. Sie können sich nun selbst von den erstaunlichen und beeindruckenden Ergebnissen überzeugen!

Herzlich

Johannes Hahn  
Bundesminister für Wissenschaft und  
Forschung





Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. rer. nat. Robert L. Mach

Die Verwendung nachwachsender Rohstoffe stellt unter dem Gesichtspunkt der Nachhaltigkeit einen Schlüsselbereich der Technologieentwicklung dar. Sinnvoll ist deren Einsatz besonders dann, wenn die Syntheseleistung der Natur optimal genutzt werden kann, d. h. wenn nur wenige biotechnologische Veredelungsschritte nötig sind, um industriell verwertbare Stoffe zu erhalten.

Biotechnologisch werden derartige Veredelungsschritte durch die Anwendung von Enzymen und Mikroorganismen erreicht. In der Weißen Biotechnologie, die sich mit Produktionsverfahren von chemischen Grundstoffen beschäftigt, kommen vor allem genetisch verbesserte Mikroorganismen zum Einsatz. Diese ermöglichen eine nachhaltige Steigerung der Produktionseffizienz, indem der benötigte Biokatalysator (entweder ein isoliertes Enzym oder der gentechnisch veränderte Organismus als Ganzzellkatalysator) in Mengen hergestellt wird, die die Effizienz natürlicher Organismen um mehrere Zehnerpotenzen übersteigen kann. Besonders zukunftssträchtig erscheint dabei die Kombination der Nutzung von nachwachsenden Rohstoffquellen mit der Weißen Biotechnologie zur Etablierung einer nachhaltigen und v. a. erdölunabhängigen, chemischen Industrie.

Die Projektgruppe, welche sich in meinem Arbeitsbereich mit derartigen Problemstellungen beschäftigt, ist ein junges, fünfköpfiges Team bestehend aus der Leiterin, Dr. Astrid Mach-Aigner, zwei DoktorandInnen, DI Marion Pucher und DI Matthias Steiger, einer Diplomandin, Rita Gorsche, und einem Erasmus Studenten, Jens Kroll.

Ziel der Forschungen ist es, aus Holzbestandteilen oder aus Chitin über einen mehrstufigen, biokatalytisch unterstützten Prozess Synthesebausteine für die chemische bzw. pharmazeutische Industrie herzustellen. Vereinfacht ausgedrückt wird als erster Schritt versucht, sich die Abbauleistung von filamentösen Pilzen, welche im Stande sind eben diese Biopolymere in ihre monomeren Einzelbausteine zu zerlegen, zu Nutze zu machen. Die so gewonnenen, monomeren Zuckereinheiten können nun einerseits als Ausgangsstoff für eine weitere chemische Modifikation dienen, um daraus Treibstoffadditive herzustellen oder sie werden in entsprechend gentechnisch veränderten Pilzen in einem Ganzzellkatalyseverfahren zu Feinchemikalien weiter metabolisiert. Zwei typische Beispiele dafür sind die Erzeugung von Furan (ein hochoktaniger Treibstoffzusatz) aus Zellulose und Xylan oder die Gewinnung der pharmakologisch bedeutenden Substanz N-Acetylneuraminsäure (Ausgangsstoff für die Synthese des Grippetherapeutikums Relenza) aus Chitin. In den ausgewiesenen Projekten werden nun die unterschiedlichsten Arbeitsschritte, die für eine derartige Prozessentwicklung notwendig sind, durchgeführt.

Im Zuge des Sparkling Science Programms werden die Teilnehmer in meinem Arbeitsbereich in alle wesentlichen, eingangs beschriebenen Projektschritte integriert. Die überblicksartige Integration in das Gesamtprojekt soll erreichen, dass bei den TeilnehmerInnen ein hohes Interesse an den noch sehr neuen Forschungsgebieten Bioorganische Chemie und Weiße Biotechnologie geweckt wird. Wir hoffen, so eine Begeisterung für die wissenschaftliche Forschung zu wecken und vielleicht gar zukünftige Teammitarbeiter rekrutieren zu können.

Robert Mach  
Technische Universität Wien





Mag. Beate Bulfon

Im Februar 2008 wurde ich in einem privaten Gespräch mit Herrn Univ.Ass. DI Dr. Michael Schnürch gefragt, ob ich mir vorstellen könnte, am Projekt „Sparkling Science“ der technischen Universität Wien teilzunehmen.

Als Chemielehrerin des Bundesgymnasiums und Bundesrealgymnasiums St.Veit/Glan freute ich mich, dass SchülerInnen unserer Schule – obwohl sehr weit weg von der Bundeshauptstadt – die Möglichkeit hatten, in den Sommerferien in ein derartiges Forschungsprojekt eingebunden zu werden und dann darüber eine schriftliche Arbeit zu verfassen.

Als mir die Themen bekannt waren, ermittelte ich die prinzipielle Bereitschaft der Schüler und Schülerinnen. Obwohl noch kein genaues Konzept vorlag, waren einige (auch Mädchen!) von der Idee begeistert.

Der Schulalltag brachte es mit sich, dass zwei Realgymnasiasten der 7. Klasse und eine Gymnasiastin der 8. Klasse das Vorhaben konkretisierten, sich in den Ferien an eine wis-

senschaftliche Arbeit heranzuwagen. Fördernd war sicherlich auch die tatkräftige Unterstützung der TU Wien bei der Quartiersuche, was naturgemäß für SchülerInnen aus dem Bundesländerbereich ein mittelgroßes bis großes Hindernis (auch finanziell) darstellt.

Im Juli und August „köpften“ die drei Nachwuchsforscher im wahrsten Sinn des Wortes in die von Herrn A.o. Univ.-Prof. DI Dr. Marko D. Mihovilovic mit großem Engagement und – wie mir meine Schüler und meine Schülerin einhellig berichteten mit herausragender persönlicher Betreuung – in die Laborarbeit. Dafür sei Herrn Professor an dieser Stelle herzlich gedankt.

Besonders Kevin Pichler, dessen Arbeit „Von nachwachsenden Rohstoffen zu wertvollen Synthesebausteinen“ in vorliegender Schriftenreihe zu lesen ist, zeigte ohne Voraussetzung, jedoch tatkräftig unterstützt und fachlich betreut von Herrn a.o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Robert Mach, dass auch ein Schüler einer „normalen“ AHS durch ein Projekt wie „Sparkling Science“ zu herausragender Leistung angespornt werden kann.

Kevin, ein ausgezeichnete Schüler, betrachtete die Möglichkeit der Forschung an einer renommierten Universität Österreichs als persönliche Herausforderung und verzichtete darauf, seine Arbeit als Fachbereichsarbeit für die Reifeprüfung vorzulegen. Für ihn war die vorliegende Projektarbeit also eine „Fleißaufgabe“. Für mich als seine Chemielehrerin war es eine Freude, eine Arbeit dieser Qualität zu lesen und meinem Schüler Kevin Pichler helfend zur Seite stehen zu können.

Die Wissenschaft rief die Schule und die Schule antwortete mit Begeisterung.

Die Schule ruft die Wissenschaft nun, dieses Projekt weiterzuführen zum Wohle der von der Öffentlichkeit leider zu oft stiefmütterlich behandelten Chemie.

Mag. Beate Bulfon  
BG/BRG St.Veit/Glan





„Sparkling Science“ Projekt

# Von nachwachsenden Rohstoffen zu wertvollen Synthesebausteinen

ausgeführt am Institut für  
Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften  
der Technischen Universität Wien

unter der Anleitung von

**Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. rer. nat. Robert Mach**

durch

**Kevin Pichler**

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	2
Vorwort .....	5
Kurzfassung.....	6
1 Einleitung und theoretische Hintergründe.....	7
1.1 <i>Trichoderma reesei</i> .....	7
1.1.1 Vorkommen und Entdeckung.....	7
1.1.2 Eigenschaften .....	7
1.1.3 Verwendung.....	8
1.2 Abbausysteme für Cellulose und Xylan in <i>T. reesei</i> .....	9
1.2.1 Cellulose und Xylan .....	9
1.2.2 Cellulasen und Xylanasen .....	10
1.3 Hygromycinresistenz .....	10
1.4 Ziel dieser Arbeit.....	11
2 Methoden .....	12
2.1 Kultivierung.....	12
2.2 Transformation mit der Gene Gun.....	12
2.3 Isolation genomischer DNA .....	14
2.4 Southern Blot.....	14
2.4.1 Blotting (Kapillarblot).....	15
2.4.2 Hybridisierung.....	15
2.4.3 Posthybridisierungswaschungen, immunologische Detektion und Entwickeln des Films.....	15
2.5 „ <i>real-time</i> “ PCR (Polymerasekettenreaktion).....	16
2.6 Enzymaktivitätsmessung .....	17
2.6.1 Xylanaseaktivität.....	17
2.6.2 Cellulaseaktivität.....	18
2.6.3 $\beta$ -Glucosidase-Messung .....	19
2.7 Fermentation .....	20
3 Resultate .....	23
3.1 Ergebnisse vom Southern Blot .....	23
3.2 Untersuchung der Transkription mittels „ <i>real-time</i> “ PCR .....	24
3.3 Einfluss des Hygromycinresistenzgens auf die Enzymbildung .....	25

3.4	Fermentation .....	28
3.4.1	Wachstumsverhalten .....	28
3.4.2	Enzymaktivitäten .....	28
4	Diskussion .....	33
4.1	Einfluss des Hygromycinresistenzgens auf die Enzyymbildung .....	33
4.2	Auswirkungen des konstitutiv aktivierten Xylanaserregulatorgens .....	34
5	Zusammenfassung .....	35
6	Anhang .....	36
6.1	Verwendete Stämme .....	36
6.2	Medien und Lösungen .....	36
6.3	Literaturverzeichnis .....	38



## Vorwort

Als naturwissenschaftlich begeisterter Schüler wurde mein Interesse natürlich sofort geweckt, als ich vom Sparkling Science Projekt hörte. Nach anfänglichen Organisationsschwierigkeiten und Zeitverzögerungen kam dann doch ein Projekt zustande, sodass meinem Praktikum an der Technischen Universität Wien nichts mehr im Wege stand. So reiste ich nach Wien, wo mein Praktikum am 7. Juli 2008 mit einem Einweisungsgespräch beginnen sollte. Bereits am 8. Juli startete für mich der Laboralltag. Ich führte also in der Zeit vom 8. bis zum 31. Juli, dem Ende des Praktikums, gemeinsam mit einer weiteren Projektteilnehmerin und meinen Laborkollegen zahlreiche Experimente durch, um den Forschungsfortschritt voranzutreiben. Es war für mich eine sehr interessante Zeit und ich denke, dass ich dabei einiges gelernt habe. Das schönste war aber, dass ich nun einen Einblick in den Laboralltag bekommen habe und weiß, wie die aktuelle Forschung abläuft.

Aufmerksam gemacht auf das Sparkling Science Programm wurde ich in der Schule durch meine Chemieprofessorin Frau Mag. Beate Bulfon. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bei ihr bedanken. Danken möchte ich auch meiner Familie, die mich ermutigt hat, bei dem Projekt mitzumachen, und mir die Teilnahme ermöglicht hat. Ganz besonderer Dank gilt aber vor allem meinen zwei Betreuern Marion Pucher und Matthias Steiger. Danke für die wunderbare Betreuung und die interessanten Labortage, aber auch für die Hilfe nach dem Praktikum, wie zum Beispiel das Korrekturlesen dieser Arbeit. Ich bedanke mich hiermit auch bei Astrid und Robert Mach, sowie bei allen anderen Beteiligten des Sparkling Science Projekts für ihre Unterstützung.

## Kurzfassung

Die Arbeiten im Zuge dieses Sparkling Science Projektes beschäftigen sich mit dem Abbau von „Nicht-Stärke-Biopolymeren“ (v.a. Cellulose und Xylan), zu ihren jeweiligen monomeren Einheiten (z.B.: Glucose, Xylose). Diese Monomere dienen ihrerseits wiederum als Ausgangssubstrate für die Synthese hochwertiger Chemikalien. Dabei sollen alle Umsetzungsprozesse biokatalytisch, entweder durch gereinigte Enzyme oder durch Ganzzellkatalysten, durchgeführt werden. Zu diesem Zweck werden gentechnisch veränderte Stämme des filamentösen Pilzes *Trichoderma reesei* verwendet. Diese sollen vermehrt Enzyme bilden, welche die besagten Polymere zu ihren monomeren Komponenten zu zerlegen vermögen. Ziel dieses Projektes ist es also, Prozesse zu entwickeln, durch welche auf biokatalytischem Wege aus nachwachsenden Rohstoffen hochwertige Chemikalien hergestellt werden.

Im Zuge dieser Arbeit wurden also gentechnisch veränderte Organismen mittels Transformation hergestellt und in weiteren Schritten auf ihre Leistungsfähigkeit bei der Enzymproduktion untersucht. Außerdem konnten verschiedene Eigenschaften in Abhängigkeit vom Locus des bei der Transformation verwendeten Plasmids im Pilzgenom sowie von unterschiedlichen Kohlenstoffquellen bei der Kultivierung bzw. bei der Fermentation festgestellt werden.

## **1. Einleitung und theoretische Hintergründe**

### **1.1. *Trichoderma reesei***

#### **1.1.1 Vorkommen und Entdeckung**

Der Weichfäulepilz *Trichoderma reesei* ist die anamorphe Form von *Hypocrea jecorina*, und gehört zu einer Gruppe von 104 Spezies filamentöser Pilze, welche in 16 „clades“ gegliedert sind. Durch ihre metabolische Vielfaltigkeit können sie zahlreiche Habitate bewohnen und sind daher weltweit in nahezu allen Bodenarten aber auch in anderen Lebensräumen vertreten. Ihre wichtigste Aufgabe besteht dabei in der Verwertung pflanzlicher Biomasse. Wegen ihres aeroben und mesophilen Lebensstils findet man sie aber vor allem in tropischen und gemäßigten Klimazonen, wo pro Gramm Boden 10-1000 kultivierbare Einheiten gefunden werden können [Bauer, 2005; Steiger, 2007].

Die Entdeckung von *T. reesei* erfolgte während des zweiten Weltkriegs auf den Solomon Inseln im Südpazifik. Ein Forschungsprogramm sollte die schnelle Verrottung von Textilien wie z.B. von Uniformen oder Baumwollzelten aufklären. M. Mandels und Elwyn T. Reese gelang es, einen Pilz für die auftretenden Schäden verantwortlich zu machen, dessen hohe sekretorische Kapazität an cellulolytischen Enzymen die Zersetzung der Textilien bewirkte. Als erster Stamm von Bedeutung konnte QM6a isoliert werden, dessen Abkömmling QM9414 häufig verwendet wird. Zunächst wurde QM6a jedoch fälschlicher Weise entweder als *Trichoderma viride* oder als *Trichoderma koningii* bezeichnet, bis Simmons (1977) feststellte, dass es sich dabei um eine eigene Spezies handelt, und er benannte ihn zu Ehren seines Entdeckers mit *Trichoderma reesei* [Steiger, 2007].

#### **1.1.2 Eigenschaften**

*Trichoderma spp.* besitzen ein breites Spektrum an verwertbaren Substraten. Bei Stickstoffquellen kann vom Ammoniak bis zum Protein fast alles metabolisiert werden, nur die Verwertung von Nitrat ist üblicherweise schlecht und sehr speziesabhängig. Bei Kohlenstoffquellen reicht die Verwendbarkeit von allgemeinen Zuckern über Polymere (Cellulose, Xylan) bis hin zu Kohlenwasserstoffen.

Mit *Trichoderma* wird die anamorphe, asexuelle Lebensform bezeichnet. Einigen Arten konnte auch eine teleomorphe, sexuelle Lebensform zugewiesen werden. So konnte *Trichoderma reesei* eindeutig die teleomorphe Form *Hypocrea jecorina* zugeordnet werden.

Kolonien von *T. reesei* weisen ein schnelles Wachstum auf (5,5 – 7 cm/4 d, 21 °C, Agarplatten mit 2 % Malzextrakt). Auf Agarplatten mit 2 % Malzextrakt scheiden sie ein gelbes Pigment aus. Die Sporenbildung erfolgt phialidisch und zeigt sich in kleinen, verstreuten, gelb-grünlichen Büscheln. Sporenträger weisen schwache Verzweigungen auf, wobei primäre Äste länger und stärker verzweigt sind als sekundäre. Die Phialiden sind zylindrisch oder manchmal auch leicht aufgebläht, die schwach grünlichen Konidien haben eine ellipsoide Form [Steiger, 2007].

### **1.1.3 Verwendung**

Auf Grund seiner hohen sekretorischen Fähigkeit an cellulolytischen sowie hemicellulolytischen Enzymen findet *Trichoderma reesei* in vielen Industriebereichen Anwendung. Ein weiterer Vorteil bei *T. reesei* ist, dass der Pilz über eine trennbare Regulation des Enzymhaushalts verfügt, das heißt, er kann bei geeigneter Anzucht xylanolytische Enzyme bilden ohne dabei auch cellulolytische Enzyme zu produzieren. Dieser Effekt wird vor allem in der Papierindustrie genutzt, wodurch eine kostspielige Trennung der Xylanasen von den Cellulasen entfällt. Die Verwendung von Hemicellulasen für den Bleichprozess von Papier ermöglicht eine Reduktion der verwendeten Menge an Chlor und damit auch eine Verminderung der umweltbelastenden Abfälle [Bauer, 2005].

Auch in der Textilindustrie spielen Enzyme eine bedeutende Rolle. So werden für die Herstellung von stoned-washed Jeans Cellulasepräparate verwendet, durch welche der Jeansfarbstoff Indigo aus den obersten Schichten des Materials herausgelöst werden kann. Dieses enzymatische Verfahren löste das mechanische „Waschen“ mit Bimsstein ab, da neben anderen Vorteilen die Maschinen weniger belastet werden, aber auch die Umwelt ohne die Freisetzung von Bimssteinpulver geschont wird. Cellulasen werden allerdings auch zur Glättung von Cellulosefasern eingesetzt, wobei kleine Härchen, die nach dem Webvorgang aus der Faser hervorstehen, durch



die Enzyme entfernt werden. Dadurch werden sowohl die Textur, als auch die Griffigkeit und Färbereigenschaften der Textilien entscheidend verbessert.

Aber auch in der Lebensmittelindustrie finden diese Enzyme Verwendung, wie zum Beispiel bei der Herstellung von Olivenöl. Dadurch werden bessere Ausbeuten bei der Kaltpressung sowie eine Verbesserung der Qualität des Öls erzielt. Auch bei der Futtermittel- und Spirituosenherstellung werden Xylanasen eingesetzt.

Eine weitere Anwendung solcher Enzyme könnte in Zukunft auch die Herstellung von Biotreibstoffen (Ethanol) sein. Auf der Suche nach erneuerbaren Energien ist es naheliegend, dass Kohle und Erdöl in Zukunft durch Biomasse ersetzt werden. Durch *Trichoderma* Enzyme sollen Biopolymere verzuckert und durch anschließende Fermentation weiter verarbeitet werden [Steiger, 2007]. Das Problem dabei ist derzeit noch der hohe Kostenfaktor, der eine weitgehende industrielle Nutzung in Grenzen hält.

All diese Anwendungsmöglichkeiten für *Trichoderma* Enzyme machen eine weitere Verbesserung der Enzymproduktion des Pilzes interessant.

## **1.2 Abbausysteme für Cellulose und Xylan in *T. reesei***

### **1.2.1 Cellulose und Xylan**

Organismen wie *Trichoderma reesei* haben die Fähigkeit, Biopolymere in ihre monomeren Einheiten zu zerlegen und zu metabolisieren. Cellulose ist als Hauptbestandteil von pflanzlichen Zellwänden das häufigste und bedeutendste Biopolymer. Es besteht aus einer Vielzahl von  $\beta$ -1,4-verknüpften Glucoseeinheiten. Das zugehörige Dimer wird Cellobiose genannt.

Xylane, auch Holzgummi genannt, sind Polymere mit dem Grundbaustein D-Xylose, welche  $\beta$ -1,4-verknüpft sind. Sie zählen zu den Polyosen (Hemicellulosen) und weisen eine kürzere Kettenlänge als Cellulose auf. Je nach Herkunft kann Xylan mit verschiedenen Substituenten auf unterschiedliche Art und Weise versehen sein. In Hartholz treten zum Beispiel neben  $\alpha$ -1,2-verknüpfter 4-O-Methyl-D-Glukuronsäure und  $\alpha$ -1,2- bzw.  $\alpha$ -1,3-verknüpfter L-Arabinofuranose auch Xylane mit Acetylresten

vor allem an Position 2 und 3 Xylopyranosylreste auf. Des Weiteren sind in Getreide L-Arabinofuranosylreste an Position 5 mit Ferulasäure oder p-Cumarsäure verestert [Steiger, 2007].

### **1.2.2 Cellulasen und Xylanasen**

Am celluloseabbauenden Enzymsystem von *T. reesei* sind mehrere Arten von Enzymen beteiligt. Zunächst sind es Endoglukanasen, die Cellulose zu Glukooligosacchariden hydrolisieren und das Polymer im Inneren und eher an den amorphen Bereichen angreifen. Dadurch entstehen für die Cellobiohydrolasen mehr Angriffsorte, da diese Enzyme jeweils von den Enden des Polymers Cellobioseeinheiten abspalten. Die Cellobiose wird schließlich von  $\beta$ -Glukosidasen hydrolisiert, wodurch Glukosemonomere freigesetzt werden.

Für den Abbau der Xylane ist auf Grund deren komplexeren Aufbaus eine größere Zahl an Enzymen nötig, da neben der Xylosegrundstruktur auch die unterschiedlichen Substituenten abgespalten werden müssen. Für einen Abbau sind mindestens eine Endo-1,4-D-Xylanase und eine  $\beta$ -Xylosidase für die Hauptkette, sowie eine  $\alpha$ -Glukuronidase und eine Acetylxylanesterase für die Seitenketten erforderlich [Steiger, 2007]. Die erforderliche Zusammensetzung zusätzlich benötigter Enzyme hängt von der Art des Pflanzenmaterials ab [Bauer, 2005].

### **1.3 Hygromycinresistenz**

Da *Trichoderma reesei* mittels Gene Gun Transformation gentechnisch verändert werden soll, ist es von großer Bedeutung, die transformierten Stämme von den nicht-transformierten unterscheiden zu können. Dafür wird bei der Transformation ein zusätzliches Markerplasmid verwendet, welches den Pilz gegen Hygromycin B resistent machen soll. Hygromycin B ist ein aminoglycosidisches Antibiotikum, welches von der Bakterienart *Streptomyces hygrosopicus* produziert wird. Auf Grund ihrer hemmenden Wirkung auf die Proteinsynthese von Bakterien, Pilzen und höheren eukaryotischen Zellen wirkt die Substanz auf diese Organismen toxisch [<http://www.hygromycin.net/>]. Dem Nährmedium, auf welchem sich die zu transformierenden Pilzsporen befinden, wird nun Hygromycin B zugegeben, sodass nicht-transformierte Pilze nicht überleben können. Bei denen, die erfolgreich

transformiert werden, ist nun auch das Hygromycinresistenzgen im Genom vorhanden, sodass diese Pilze wachsen können.

Die Wirkung des Hygromycinresistenzgens beruht darauf, dass dieses Gen für die Kinase Hygromycin B Phosphotransferase (HPT) kodiert. HPT katalysiert die Phosphorylierung von Hygromycin B und macht dieses dadurch inaktiv [<http://www.hygromycin.net/> (06.01.2009)]. Stämme mit einem Hygromycinresistenzgen können also auf Nährmedien mit Hygromycin B wachsen, das Wachstum ist daher ein Indikator für eine erfolgreiche Transformation.

#### **1.4 Ziel dieser Arbeit**

Im Zuge dieser Arbeit sollen nun solche gentechnisch veränderten Organismen hergestellt werden und anschließend auf ihre veränderten Eigenschaften hin untersucht werden. Dafür sollen zunächst durch Transformation neue Plasmide in das Pilzgenom eingebracht werden, anschließend deren tatsächliche Präsenz im Genom sowie ihre Funktionstüchtigkeit mittels Southern Blot und „*real-time*“-PCR getestet werden, und dann durch Enzymmessung und Fermentation untereinander verglichen werden.

Dabei soll auch geklärt werden, wie sich die Einbringung eines neuen Plasmids in das Pilzgenom auswirkt, oder wie verschiedene Kohlenstoffquellen von transformierten Stämmen verwertet werden können.

## 2 Methoden

### 2.1 Kultivierung

Die Kultivierung von *Trichoderma reesei* erfolgt auf Platten mit Malzextrakt (MEX)-Medium und die Stämme werden bei 28 °C bis zur Sporulation inkubiert (etwa eine Woche). Sporulierende Platten werden bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt [Bauer, 2005]. Die Überimpfung auf neue Platten erfolgt steril, indem man einen kleinen Teil einer bewachsenen Platte aussticht und auf eine neue Platte setzt. Für die Anzucht in einer Flüssigkultur wird ein Teil der Oberfläche einer sporulierenden Platte mit einem Spatel abgeschabt und in 1 ml einer NaCl (0,8%)-Tween 80 (0,05%)-Lösung suspendiert. Das geschieht in einem sterilen Bereich um Kontaminationen zu vermeiden. Um die Sporen vom Myzel zu trennen wird die gesamte Suspension über Glaswolle filtriert. Die Endkonzentration im Medium soll  $1 \times 10^8$  Sporen pro Liter betragen, daher müssen die Sporen für die jeweilig benötigte Menge ausgezählt werden. Die Auszählung erfolgt mikroskopisch auf einem speziellen Objektträger mit einem Raster aus einigen Feldern zu je 16 Kästchen darauf. Mit der Formel  $\frac{n \cdot 10^8}{0,0025 \cdot 0,01 \cdot f}$  (wobei n die durchschnittliche Anzahl der Sporen in einem Feld mit 16 Kästchen und f die Zahl der Kästchen pro Feld, in diesem Fall also 16, ist) wird die Anzahl der Sporen pro Milliliter Suspension berechnet. Anschließend wird die benötigte Menge an Sporensuspension in ein Mandels-Andreotti (MA)-Medium in einem Erlenmeyerkolben überimpft. Der Kolben wird sodann bei 30° C und unter ständigem Schütteln in einem Inkubationsschüttler inkubiert.

Geerntet wird indem man das Myzel über Miracloth abfiltriert, mit Wasser wäscht und in Filterpapier trocken presst. Das Myzel wird anschließend je nach weiterer Verwendung entweder (gefrier)getrocknet oder zur Lagerung in flüssigem Stickstoff (-196 °C) aufbewahrt. Der flüssige Überstand kann ebenfalls aufgefangen und für spätere Enzymaktivitätsmessungen verwendet werden.

### 2.2 Transformation mit der Gene Gun

Bei der Transformation mit der Gene Gun soll ein bestimmtes Plasmid mittels Wolframpartikel in die Zellkerne von Pilzsporen gelangen um die Eigenschaften des Pilzes zu verändern. Zur Selektion der transformierten Zellen von den nicht-

transformierten wird die toxische Substanz Hygromycin B verwendet. Gleichzeitig wird bei der Transformation ein zusätzliches Plasmid für Hygromycin-Resistenz benutzt.

Für die Transformation wird eine Sporensuspension vorbereitet und mittels Drigalskyspatel zentral auf Platten mit Malzextrakt (MEX)-Medium (mit Hygromycin B) ausgestrichen.

Im nächsten Schritt werden 10-15 mg Wolframpartikel eingewogen und anschließend dreimal mit 1 ml Ethanol sowie zweimal mit 1 ml sb (steriles, bidestilliertes Wasser) gewaschen. Die gereinigten Partikel werden in 200 µl sb aufgenommen und in vier Aliquote aufgeteilt. Danach erfolgt die Präzipitation der DNA auf die Wolframpartikel. Dafür kommt eine Mischung aus den beiden Plasmiden (eigentliches Plasmid und Marker-Plasmid) sowie 70 µl einer Spermidin-CaCl<sub>2</sub>-Lösung in jedes Aliquot. Die Suspension wird sofort 3 min am Vibrationsschüttler durchmischt und danach für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wird die Suspension abzentrifugiert, der Überstand verworfen, die Partikel sanft in 250 µl EtOH<sub>abs</sub> resuspendiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Anschließend wird die Gene Gun vorbereitet. Um Kontaminationen und dadurch Hintergrundwachstum auf den Platten zu vermeiden findet der gesamte Vorgang in einer Reinraumwerkbank statt. Zunächst werden alle benötigten Materialien mit Ethanol gewaschen und getrocknet. Dann werden die Makrocarrier in die dafür vorgesehenen Halterungen eingespannt und jedes Aliquot der Partikelsuspension wird auf je fünf Makrocarrier gleichmäßig verteilt. Sobald die Partikel getrocknet sind kann mit dem Schießen begonnen werden. Dafür wird pro Schuss ein Makrocarrier und eine Rupture Disk verwendet. Auf dieser soll sich ein mittels Heliumgasflasche erzeugter Druck aufbauen und diese bei 900 psi ( $\approx$  62 bar) durchbrechen, sodass die Partikel vom darunterliegenden Makrocarrier durch den austretenden Druck weiter auf die Platte mit den Sporen geschossen werden. Wenn alles vorbereitet ist wird eine Platte mit Sporen in die Vakuumkammer der Gene Gun gestellt und die Luft aus dieser abgesaugt. Anschließend wird der Druck über der Rupture Disk aufgebaut und die Partikel werden auf die Platte geschossen. Ein kleines Stahlgitter (Stopping

Screen) verhindert dabei, dass der Makrocarrier beim Schuss mit auf die Platte gedrückt wird.

Nach der Transformation werden die Platten bis zum Auskeimen im Brutschrank gelagert.

### **2.3 Isolation genomischer DNA**

Myzel wird aus einer Flüssigkultur geerntet, das heißt über Miracloth abfiltriert und gut mit Filterpapier getrocknet. Anschließend wird ein Teil davon zu einer Rolle geformt und in einem gelöcherten Eppendorf Reaktionsgefäß (ERG) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das verbleibende Myzel wird in Alufolie verpackt und ebenfalls eingefroren. Parallel werden eine Reibschale, eine Pinzette und ein Spatel bei  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorgekühlt. Dann wird das zuvor tiefgefrorene Myzel in der Reibschale zerrieben und in  $700\text{ }\mu\text{l}$  einer DNA Salzlösung mit 2% Mercaptoethanol ( $14\text{ }\mu\text{l}$ ) in einem ERG aufgenommen und gut geschüttelt. Es folgt eine Inkubation von 30 min bei  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Danach werden  $400\text{ }\mu\text{l}$  basisches Phenol dazugegeben und das Ganze wird geschüttelt bis keine Phasentrennung mehr zu sehen ist.

Das gleiche passiert nach der Zugabe von  $400\text{ }\mu\text{l}$  Chloroform/Isoamylalkohol (49:1). Nach zehnmütigem Zentrifugieren wird die obere wässrige Phase in ein neues ERG überführt. Dieser Vorgang wiederholt sich und nach dem erneuten Überführen der wässrigen Phase wird die DNA-Lösung mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt, 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und danach 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das verbliebene DNA-Pellet wird mit  $500\text{ }\mu\text{l}$  96%igem Ethanol gewaschen und wieder 5 min zentrifugiert. Zuletzt wird die DNA in  $50\text{-}100\text{ }\mu\text{l}$  Tris-EDTA (TE)-Puffer gelöst.

### **2.4 Southern Blot**

Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Methode, einzelne Gensequenzen in einem komplexen DNA-Gemisch (in diesem Fall aus dem gesamten Genom einer Zelle) nachzuweisen. Der Southern Blot wird deshalb verwendet, um zu überprüfen, ob sich das bei der Transformation verwendete Plasmid auch tatsächlich bzw. vollständig im Pilzgenom befindet.

Grundsätzlich kann man den Southern Blot in drei Abschnitte gliedern:

#### **2.4.1 Blotting (Kapillarblot)**

Zunächst werden die mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnittenen DNA-Proben auf ein Agarosegel aufgetragen. Anschließend wird eine Gelelektrophorese durchgeführt um die unterschiedlich langen DNA-Fragmente aufzutrennen. Danach wird die DNA auf dem Gel nacheinander mit einer Denaturierungslösung sowie einer Neutralisierungslösung behandelt. Danach folgt der Transfer auf eine Membran. Dafür wird eine Glasplatte mit einem Filterpapier darauf in eine Wanne mit  $20\times$  SSC darin gelegt. Das Filterpapier taucht in die Flüssigkeit ein und saugt somit die Salzlösung auf. Auf dem Papier liegt das Gel und darauf liegt die Membran. Darüber werden noch ein paar Schichten Filterpapier und Zellstoff gelegt um die Saugwirkung zu erzeugen. Ganz oben auf den Stapel kommen noch eine Glasplatte und ein Gewicht zum Beschweren. Dieser Vorgang dauert dann einige Stunden (über Nacht) und danach erfolgt die Fixierung der DNA auf der Membran. Dabei wird die Membran im UV-Crosslinker mit UV-Licht bestrahlt.

#### **2.4.2 Hybridisierung**

Die Hybridisierung erfolgt in einem Wärmeschrank, in dem sich das Gefäß mit der Flüssigkeit und der Membran darin ständig dreht damit diese nicht austrocknet. Zunächst wird die Membran 30 min mit einer Prähybridisierungslösung behandelt. Danach wird die denaturierte Sonde dazugegeben. Mit dieser Hybridisierungslösung wird die Membran über Nacht bei  $51\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Sonde ist eine einzelsträngige DNA-Sequenz die sich nur am gesuchten DNA-Fragment anlagern kann, daher bleiben alle anderen DNA-Fragmente einzelsträngig. Unspezifisch gebundene Sonde wird nach der Hybridisierung gewaschen. Zu diesem Zweck wird die Membran  $2\times 15$  min mit  $0,5\times$ SSC &  $0,1\%$  SDS bei  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  gewaschen.

#### **2.4.3 Posthybridisierungswaschungen, immunologische Detektion und Entwickeln des Films**

Als nächstes wird die Membran 1-5 min mit Waschpuffer gewaschen und danach wird dieser durch eine Blocking Solution ersetzt, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Nach 30 min Inkubationszeit bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  wird die Blocking Solution entfernt und die Membran wird 30 min mit der Antibody Solution

inkubiert. Nach Abnahme der Antibody Solution wird noch 2×15 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend wird der Detection Buffer für 2-5 min dazu gegeben. Die jeweils eingesetzten Flüssigkeitsmengen variieren mit der Größe der Membran. Anschließend muss CSPD ready-to-use auf die Membran getropft werden, worauf diese sofort in Klarsichtfolie luftblasenfrei verpackt und 5 min bei Raumtemperatur in der Filmkassette inkubiert wird. Danach erfolgt noch eine 10-minütige Inkubation bei 37 °C um die Lumineszenzreaktion zu starten.

Der Röntgenfilm ist extrem lichtempfindlich und das Auflegen und Entwickeln des Films muss daher unbedingt in einer Dunkelkammer (bei Rotlicht) erfolgen. Nach dem Belichten wird der Film nacheinander in eine Entwicklerlösung, eine Stopplösung und eine Festigungslösung getaucht. Danach wird er noch mit Wasser gewaschen und getrocknet. Je nach Vorhandensein des gesuchten DNA-Fragments sind dann unterschiedlich viele Banden am Film zu erkennen.

### **2.5 „real-time“ PCR (Polymerasekettenreaktion)**

Die PCR ist ein Verfahren zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten mittels DNA-Polymerase. Bei der „real-time“ PCR kann dabei zusätzlich noch eine Quantifizierung der DNA vollzogen werden. Die PCR wird daher eingesetzt um festzustellen, ob eine transformierte Zelle das transformierte Gen auch annimmt, das heißt, dass sie die DNA in mRNA transkribieren und folglich diese in Proteine translatieren kann.

Zur Vorbereitung der PCR wird zunächst für jede Probe eine Mischung aus 12,5 µl Supermix, 0,4 µl *taqman xyr1* (TaqMan-Sonde), 0,4 µl *taqxyr1 f* (Forward Primer), 0,4 µl *taqxyr1 r* (Reverse Primer) und 8,8 µl sb hergestellt. Bei der Herstellung dieser Mischung sowie für weitere Schritte bei der Vorbereitung der PCR werden Pipetten mit sterilen Spitzen mit Filtereinsatz verwendet um Kontaminationen zu vermeiden. In einer Reinraumwerkbank werden die DNA-Proben in eine Mikrotiterplatte als Reaktionsgefäß vorgelegt und sodann die vorbereitete Mischung hinzugefügt. Dabei wird die Probe durch mehrmaliges Auf- und Absaugen mit der Pipette gut vermischt. Außerdem gibt es einen Blindwert (mit Wasser statt Probe) und eine „no-amplification“-Kontrolle bestehend aus 2 µl Probe und 0,5 µl 0,5%igem SDS. Dann wird die Mikrotiterplatte mit einer Verschlussfolie verschlossen und in den Thermoblock mit optischem Detektionssystem gestellt. Die Messung kann gestartet



werden sobald das gewünschte PCR-Programm sowie die Anordnung der Proben in der Platte und die Art des verwendeten Fluorophors festgelegt worden sind.

Der Vorgang der Messung teilt sich in drei Schritte, welche mehrmals wiederholt werden: Zuerst werden die Proben auf 95 °C aufgewärmt, damit die DNA denaturiert, das heißt, dass sich die Doppelstränge trennen. Im nächsten Schritt lagern sich die Primer an der zu amplifizierenden DNA an und im letzten Schritt füllt die Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden aus der Lösung auf. Die Temperaturen der letzten beiden Schritte sind von der jeweiligen Beschaffenheit der verwendeten Primer bzw. der verwendeten Polymerase abhängig. Gleichzeitig lagert sich auch die TaqMan-Sonde an der DNA an. Wenn nun die Polymerase an dieser Sonde vorbei kommt um den Gegenstrang zu synthetisieren, wird diese abgebaut und ein an ihr gebundener Fluorophor freigesetzt. Das optische Detektionssystem kann ab einer gewissen Konzentration einen Anstieg der Fluoreszenz erkennen. Der Zyklus, bei dem dieser Anstieg gemessen wird, wird durch den  $C^T$ -Wert ausgedrückt. Je nach Betrag des  $C^T$ -Wertes kann dann auf eine größere bzw. kleinere Konzentration geschlossen werden. Eine anschließende Gelelektrophorese gibt Auskunft über die Größe der amplifizierten DNA-Sequenzen.

## **2.6 Enzymaktivitätsmessung**

### **2.6.1 Xylanaseaktivität**

Für die Messung der Xylanaseaktivität wird der Enzymtest Xylazyme AX (Megazyme, Bray, Irland) verwendet. Dieses Testsystem beruht darauf, dass bei der Hydrolyse der Substratablette ein wasserlöslicher, blauer Farbstoff freigesetzt wird, durch welchen bei einer Photometermessung ein Anstieg der Absorbanz bei 590 nm Wellenlänge bewirkt wird.

Vorbereitend werden je 450 µl der zu messenden Proben mit 50 µl 250 mM Na-Acetat-Puffer in einer Glaseprouvette versetzt. Bei zu hoher Enzymaktivität der Proben kann die Probenmenge reduziert werden, jedoch muss die Endkonzentration des Na-Acetat-Puffers bei einem Gesamtvolumen von 500 µl immer auf 25 mM eingestellt werden.

Die vorbereiteten Ansätze werden in einem Wasserbad bei 40 °C temperiert. Anschließend wird eine Blindprobe für die später folgende Photometermessung vorbereitet. Dafür wird eine Stopplösung (Trizma-Base-Lösung, 2%, pH~9) vor der Reaktionstablette dazugegeben, damit kein Farbstoff freigesetzt wird. Danach wird jeder Probe eine Xylazyme-Tablette zugegeben und die Reaktion wird nach exakt zehn Minuten durch Zugabe von 10 ml 2% Trizma-Base-Lösung gestoppt. Dann wird jede Probe geschüttelt und fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor sie durch einen Trichter mit Filterpapier abfiltriert wird.

Die Messung am Photometer erfolgt bei 590 nm Wellenlänge in einer Kunststoffküvette. Gemessen wird gegen die Blindprobe, das heißt die Extinktion wird mit der Blindprobe auf 0 gestellt. Der Grad der Blaufärbung und damit die Extinktion im Photometer sind direkt proportional zur Enzymaktivität. Die Menge der im Ansatz enthaltenen Xylanaseaktivität berechnet sich nach folgender Regressionsgeraden:

$$mUnits/Ansatz = 46,8 \cdot Absorbanz + 0,5$$

## 2.6.2 Cellulaseaktivität

### 2.6.2.1 Enzymtest Cellazyme C (Megazyme)

Die Durchführung dieses Enzymtests erfolgt analog zur Durchführung des Tests Xylazyme AX (Megazyme), wie in 2.6.1 beschrieben. Auch das Prinzip, das diesem Test zu Grunde liegt ist dasselbe. Die Cellulaseaktivität berechnet sich nach folgender Regressionsgerade:

$$mUnits/Ansatz = 232,6 \cdot Absorbanz + 5,0$$

### 2.6.2.2 Messung nach Methode der reduzierenden Zucker

Dieses Testsystem misst die Konzentration von reduzierenden Zuckern in einer Probe. Da beim Abbau der polymeren Cellulose (durch Cellulasen) Oligosaccharide freigesetzt werden, erhöht sich beim Abbau auch der Anteil der freien reduzierenden Enden. Daher kann diese Messung zur Feststellung der Cellulaseaktivität in einer Probe herangezogen werden.

Zuerst wird 1 ml einer Substratlösung bestehend aus 1 % Carboxymethylcellulose (CMC) mit 0,5 ml der zu untersuchenden Probe in einer Eprovette vermischt und 15 min bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Dann wird die Enzymreaktion durch die Zugabe von 1 ml 2,5 M NaOH gestoppt. Um die Färbereaktion zu initiieren werden 3 ml einer DNS-Lösung dazu pipettiert. Anschließend wird die Eprovette abgedeckt, 5 min in siedendes Wasser gestellt und danach 5 min im Eisbad abgekühlt. Anschließend werden 15 ml destilliertes Wasser zugegeben und gut mit dem Ansatz vermischt. Für jede Probe wird der gesamte Vorgang doppelt ausgeführt. Anschließend erfolgt eine Extinktionsmessung mit dem Photometer bei 540 nm Wellenlänge gegen einen Blindwert. Allerdings besitzt jeder Ansatz eine eigene Blindprobe, da bereits in den Proben eine bestimmte Ausgangskonzentration an reduzierenden Zuckern vorliegt. Für die Herstellung der Blindproben wird die Stopplösung vor der Probe in der Eprovette vorgelegt. Die Absorbanzwerte werden wie folgt umgerechnet:

$$(Abs + 0,0275) \cdot 0,4133 = mgGlc/assay$$

Zur Berechnung der Enzymaktivität müssen die mg Glucose noch in Units (= µmol umgesetztes Substrat pro Minute) umgerechnet werden.

### 2.6.3 β-Glucosidase-Messung

Bei dieser Messung wird durch die enzymatische Umsetzung von p-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranosid bei entsprechender Enzymaktivität nach Zugabe einer Stopplösung eine Gelbfärbung erkennbar.

Der Ansatz für die Messung, bestehend aus 1,1 ml 50 mM Citratpuffer (pH 5), 100 µl Probe (mit bzw. ohne Myzel) und 100 µl p-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranosidlösung, wird in einer Eprovette vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 50 °C im Wasserbad wird die Reaktion mit 2 ml einer 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung gestoppt. Bei hoher Enzymaktivität muss die Probe mit Citratpuffer verdünnt bzw. die Inkubationsdauer verkürzt werden. Die Messung am Photometer erfolgt bei 405 nm gegen einen Blindwert (Stopplösung wird vor der Substratlösung zugegeben). Mit Hilfe folgender Formel erfolgt die Berechnung der Enzymaktivität in U/ml (= µMole gebildetes

Produkt pro min):  $\frac{\Delta E \cdot \Sigma vol}{\epsilon \cdot d \cdot ml \cdot min}$

$\Delta E$	Extinktionsdifferenz
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
d	Schichtdicke der Küvette (1 cm)
ml	Volumen der eingesetzten Probe
min	Inkubationsdauer (in min)
$\Sigma_{\text{vol}}$	Gesamtvolumen des Ansatzes

## **2.7 Fermentation**

Ziel der Fermentation ist einerseits der direkte Vergleich zweier bzw. mehrerer Stämme unter optimalen Wachstumsbedingungen und andererseits die Auswertung der Eigenschaften (Enzymaktivität, Wachstum, ...) eines Stammes in Abhängigkeit der eingesetzten Kohlenstoffquelle. Außerdem dient die Fermentation zur Gewinnung der von *T. reesei* erzeugten Enzyme.

### **Aufbau eines Fermenters**

Der Fermenter besteht aus einem doppelwandigen Glasgefäß, in dessen Innerem sich eine Rührwelle befindet. Der Mantel des Gefäßes wird an einen Wasserkreislauf angeschlossen und dient zur Temperierung des im Fermenter befindlichen Mediums. Während des Betriebes ist der Behälter dicht verschlossen, um Kontamination jeglicher Art zu vermeiden. Nur zwei Metallröhrchen führen in das Innere des Gefäßes, einerseits um Säure bzw. Base zuzugeben, andererseits um Proben zu entnehmen. Der Fermenter ist außerdem mit einem speziellen Filter an eine Luftversorgung angeschlossen, um das Fermentationsmedium mit Sauerstoff zu sättigen. Durch einen Rückflusskühler soll verdunstete Flüssigkeit wieder kondensiert und zurückgeleitet werden. Zusätzlich befinden sich noch eine Sauerstoffsonde, ein pH-Meter sowie eine Temperatursonde im Inneren des Behälters. Diese sind zusammen mit der gesamten Anlage an einen Computer angeschlossen, das heißt, dass sämtliche Vorgänge während der Fermentation via Computer überwacht und gesteuert werden können. Der gesamte Aufbau befindet sich dabei in einer Plexiglaswanne, um auslaufende Flüssigkeiten (z.B. bei Beschädigung des Glasgefäßes) auffangen zu können. Das ist besonders bei gentechnisch veränderten Organismen wichtig, da diese nach Beendigung des Versuches durch Hitzebehandlung (Autoklavieren) abgetötet werden müssen.

### **Anzucht einer Kultur**

Für die Anzucht eines Stammes in einer Fermentation wird ein Fermentationsmedium verwendet. Die genaue Zusammensetzung ist dem Kapitel 6.1.2 (Medien und Lösungen) zu entnehmen. Dieses Medium wird in den fertig zusammengestellten Fermenter gefüllt und das verschlossene Gefäß wird zum Sterilisieren in den Autoklaven gestellt. Dabei ist allerdings darauf zu achten, dass das Medium im Inneren des Fermenters durch das doppelwandige Gefäß besonders wärmeisoliert ist, sodass die notwendige Temperatur von 121 °C nur sehr langsam erreicht werden kann. Aus diesem Grund sollte als Referenzgefäß ebenfalls ein doppelwandiges Gefäß verwendet werden, da sonst die Betriebszeit nicht ausreichend lange ist, um wirklich alle Keime abzutöten.

Nachdem der Fermenter abgekühlt ist kann mit dem Überimpfen der Sporen begonnen werden. Dafür wird der Bereich um das Loch, durch welches die Sporen in den Fermenter gelangen, nochmals gründlich desinfiziert. Nach dem Überimpfen kann dann der Fermenter in Betrieb genommen werden. Nach etwa 24 Stunden sind erste Myzelteile zu erkennen.

### **Ablauf einer Fermentation**

Zuerst wird der Mantel des Fermentationsgefäßes mit Wasser gefüllt, der Befehl dazu wird via Computer gegeben. Anschließend wird die gewünschte Temperatur von 30 °C einprogrammiert, welche das System durch Aufwärmen bzw. Kühlen des Mantels aufrecht erhält (die Messung der Temperatur erfolgt durch die Temperatursonde). Sodann wird die Umdrehungsrate der Rührwelle auf 500 Umdrehungen pro Minute eingestellt und die Luftzufuhr aktiviert. Auch der optimale pH-Wert des Mediums (pH 4,5) kann festgelegt und bei Bedarf durch Zugabe von Säure oder Base korrigiert werden. Alle diese Vorgänge werden ständig vom Computer überwacht und auch aufgezeichnet, damit der Verlauf der Fermentation nachvollziehbar ist. Die dabei erstellten Diagramme geben auch Auskunft über den Verlauf des Pilzwachstums im Medium.

Sobald sich eine Kultur im Medium befindet werden in regelmäßigen Abständen Proben gezogen. Dieser Vorgang läuft natürlich steril ab, um Verunreinigungen des Mediums zu vermeiden. Dafür werden mittels einer sterilen Spritze einige Milliliter

vom Inhalt des Behälters durch einen Schlauch herausgezogen. Der Schlauch wird dann sofort mit Ethanol desinfiziert und eine neue Spritze wird angesteckt. Die Flüssigkeit von der Spritze wird durch einen Glastrichter mit einer Einlage aus Miracloth in ein verschraubbares Reaktionsgefäß abfiltriert. Anschließend werden die gezogenen Proben auf Kontaminationen (z.B. durch Bakterien) bzw. auf Enzymaktivität untersucht oder zur Lagerung eingefroren.

### 3 Resultate

#### 3.1 Ergebnisse vom Southern Blot

Um zu untersuchen ob und wo bzw. wie oft sich eine bestimmte DNA-Sequenz im jeweiligen Genom befindet wurden beim Southern Blot insgesamt drei Membranen vorbereitet: Eine mit den QHR (1-7) Stämmen, eine mit den Stämmen  $\Delta xyr1$ , 15/1/2, 15/1/3, 15/2/1, 16/1/1 und 16/1/2 (die Zahlen bezeichnen lediglich die überimpften Kolonien der transformierten Stämme), und eine weitere Membran für den Stamm Ace2 Retransformante (RT) und die beiden Transformantenstämme 12 und 22.

Am entwickelten Röntgenfilm waren auf allen Membranen Banden zu erkennen. Besonders auffallend bei den Banden auf der Membran mit den QHR-Stämmen war vor allem, dass bei allen Stämmen, mit Ausnahme des Stammes QHR 5, zwei Banden zu erkennen waren, welche sich alle auf gleicher Höhe befanden. Einzig beim Stamm QHR 5 waren zwei Banden etwas weniger weit vorgerückt. Diese DNA-Fragmente waren also größer als die der anderen Stämme, das heißt, dass das gesuchte DNA-Fragment beim Restriktionsverdau an einer anderen Stelle geschnitten wurde und sich daher an einem anderen Locus im Pilzgenom befand. Außerdem war bei diesem Stamm noch eine dritte, relativ dicke Bande erkennbar. Auch die zwei Banden des Stammes QHR 6 waren dicker als die der anderen Stämme. Dabei könnte es sich um überlagerte, also doppelte Banden handeln, was darauf schließen lässt, dass sich das Plasmid in doppelter Ausführung im Genom befand.

Die Stämme von der zweiten Membran ( $\Delta xyr1$ , 15/1/2, 15/1/3, 15/2/1, 16/1/1 und 16/1/2) wiesen alle jeweils zwei Banden auf, die sich alle auf gleicher Höhe befanden.

Die dritte Membran (Ace2 RT, 12, 22) war am Film allerdings sehr stark schwarz gefärbt, sodass kaum etwas mit Sicherheit zu erkennen war. Der Southern Blot wurde daher für diese Membran wiederholt. Interessant war aber, dass am neu entwickelten Film nur beim Stamm Ace2 RT zwei Banden zu erkennen waren. Die anderen Stämme wiesen je nur einen Bande auf. Dieses Ergebnis gibt keine klare Auskunft über die Präsenz des Plasmids im Genom.

Daher wurden diese Stämme in späteren Versuchen auf Enzymaktivität untersucht.

### 3.2 Untersuchung der Transkription mittels „real-time“ PCR

In diesem Experiment wurden die Stämme QM9414,  $\Delta xyr1$ , QHR 1 und die Transformantenstämme 15/1/2, 15/1/3 und 16/1/1 verwendet.  $\Delta xyr1$  ist der Stamm QM9414 ohne dem Xylanase-Regulator-Gen *xyr1*, die Transformantenstämme enthalten eine mutierten Version des Xylanase Regulators (die Zahlen bezeichnen nur die überimpften Kolonien). Ziel der „real-time“ PCR war es nun zu untersuchen, ob die Transformantenstämme das mutierte Gen auch akzeptieren und *xyr1*-Transkript gebildet wird. Die Stämme QM9414 und QHR 1 (QM9414 mit eingebrachter Hygromycinresistenz) waren dabei die Positivkontrollen, da der Stamm QM9414 *xyr1*-Transkript bilden muss.  $\Delta xyr1$  war die Negativkontrolle, da diesem Stamm das *xyr1*-Gen fehlt und somit keine mRNA gebildet werden kann.

Diese PCR durchlief 45 Zyklen, das heißt die DNA wurde  $2^{45}$ -mal vervielfältigt. Für jeden Stamm wurden drei Replikate angesetzt. Eingesetzt wurde dabei pro Ansatz eine Mischung aus 12,5  $\mu$ l Supermix, 0,4  $\mu$ l *taqman xyr1* (TaqMan-Sonde), 0,4  $\mu$ l *taqxyr1 f* (Forward Primer), 0,4  $\mu$ l *taqxyr1 r* (Reverse Primer) und 8,8  $\mu$ l PCR-Wasser sowie 2,5  $\mu$ l DNA-Probe.

Nach Ablauf der Zyklen ergaben sich folgende  $C_T$ -Werte:

Stamm	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3
QM9414	29,0	28,9	28,9
$\Delta xyr1$	30,5	30,4	30,0
QHR 1	32,1	32,1	32,0
15/1/2	28,2	28,2	28,3
15/1/3	26,7	26,7	26,7
16/1/1	29,8	30,1	30,2

Besonders eigenartig ist hier, dass alle  $C_T$ -Werte relativ nahe beieinander liegen und auch bei der Negativkontrolle, beim Blindwert und bei der no-amplification-Kontrolle ein Amplikon gebildet wurde. Das ist wahrscheinlich auf eine Verunreinigung einer der Reagenzien zurückzuführen. Diese Ergebnisse sind daher nicht aussagekräftig.



### 3.3 Einfluss des Hygromycinresistenzgens auf die Enzymbildung

Ziel der folgenden Experimente ist es, herauszufinden, wie viel an Enzymen von den Stämmen QM9414 und QHR (1-7) unter gleichen Wachstumsbedingungen gebildet wird.

Die zu untersuchenden Stämme wurden in Flüssigkulturen kultiviert und verschiedenen Enzymtests unterzogen.

#### Xylanase-/Cellulaseaktivität

Für diese Messungen wurden die Stämme in einer Flüssigkultur (30 ml) auf 1 % Xylan kultiviert. Untersucht wurden jeweils die Proben (ohne Myzel) nach 48 und 72 Stunden Kultivierungszeit.

Für die 48-Stunden-Proben wurden jeweils 12 ml aus den Kolben entnommen und über Miracloth filtriert. Als Enzymtest wurden die Testsysteme Xylazyme AX und Cellazyme C (Megazyme) herangezogen (Durchführung siehe 2.6 Enzymaktivitätsmessung).

#### Überstände der Proben (nach 48 h, ohne Myzel):

QM9414	QHR 1	QHR 2	QHR 3	QHR 4	QHR 5	QHR 6	QHR 7
8,9 ml	11,0 ml	11,1 ml	10,5 ml	10,6 ml	9,4 ml	10,6 ml	10,9 ml

Bei der Messung der Xylanaseaktivität zeigten nur die Stämme QM9414 und QHR 5 eine Blaufärbung, daher wurde die Absorbanz auch nur bei diesen beiden Proben gemessen.

#### Ergebnis:

Stamm	Menge [ $\mu$ l]	Verdünnung [1:x]	Absorbanz	Enzymaktivität [mUnits/ml]
QM9414	100	10	0,446	2177
QHR 5	100	10	0,325	1611

Bei der Cellulase-messung konnte bei gar keiner Probe eine Blaufärbung erkannt werden. Daher wurde auch keine Extinktionsmessung durchgeführt.

Für die Enzymmessung nach 72 Stunden wurde der gesamte restliche Kolbeninhalt (ohne Myzel) verwendet.

**Überstände der Proben (nach 72 h, ohne Myzel):**

QM9414	QHR 1	QHR 2	QHR 3	QHR 4	QHR 5	QHR 6	QHR 7
8,6 ml	11,8 ml	9,9 ml	10,9 ml	11,4 ml	8,7 ml	10,5 ml	10,5 ml

Auch nach 72 Stunden zeigen nur die Stämme QM9414 und QHR 5 Enzymaktivität. Außerdem war wieder bei keinem Stamm Cellulaseaktivität erkenntlich.

**Ergebnis der Extinktionsmessung:**

Stamm	Menge [ $\mu$ l]	Verdünnung [1:x]	Absorbanz	Enzymaktivität [mUnits/ml]
QM9414	100	20	0,596	5759
QHR 5	100	20	0,423	4139

**Gebildete Myzelmasse in den Proben (Trockengewicht):**

	QM9414	QHR 1	QHR 2	QHR 3	QHR 4	QHR 5	QHR 6	QHR 7
48 h	0,050 g	0,010 g	0,010 g	0,010 g	0,010 g	0,042 g	0,010 g	0,013 g
72 h	0,048 g	0,008 g	0,008 g	0,008 g	0,008 g	0,050 g	0,006 g	0,004 g

**$\beta$ -Glucosidaseaktivität**

Zur Bestimmung der  $\beta$ -Glucosidaseaktivität (s. Kapitel 2.6) wurden die zu messenden Stämme in Mandels-Andreotti (MA)-Medium mit 1 % Lactose kultiviert. Pro Stamm wurden nach 48 h jeweils zwei Proben gezogen, einmal mit und einmal ohne Myzel.

**Überstände der Proben (mit bzw. ohne Myzel):**

	QM9414	QHR 1	QHR 2	QHR 3	QHR 4	QHR 5	QHR 6	QHR 7
mit M.	4,10 ml	4,25 ml	4,30 ml	4,20 ml	4,25 ml	4,40 ml	4,30 ml	4,25 ml
ohne M.	3,60 ml	3,50 ml	3,50 ml	3,50 ml	3,50 ml	3,50 ml	3,50 ml	3,40 ml

Bei der Messung mit Myzel konnte bei allen Proben eine Gelbfärbung festgestellt werden und die Extinktion wurde mit dem Photometer gemessen.

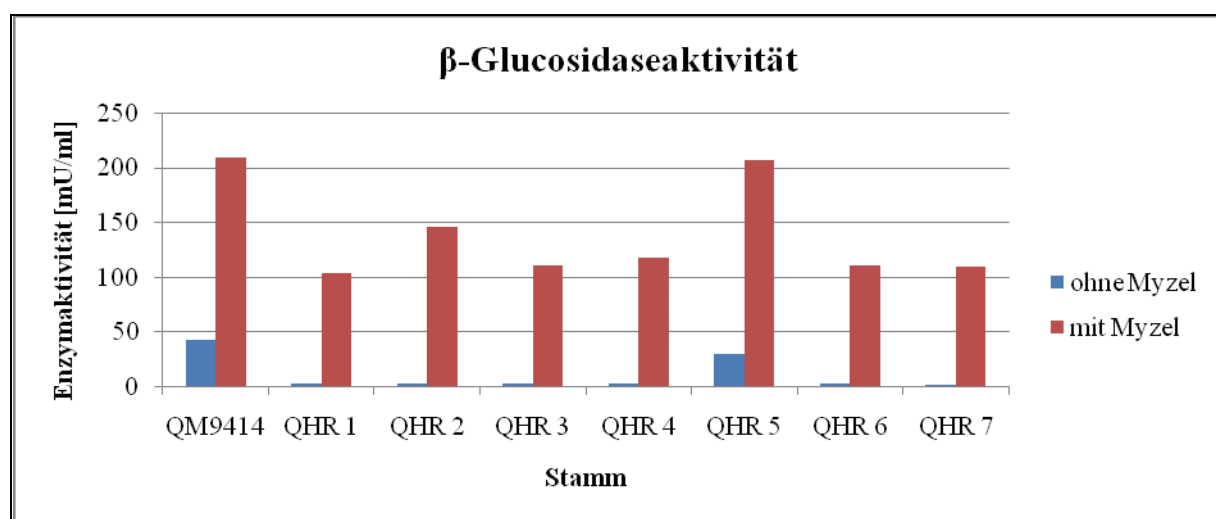
**Ergebnis:**

Stamm	Menge [ml]	Inkubationszeit [min]	Absorbanz	Enzymaktivität [mUnits/ml]
QM9414	0,1	6	0,703	209
QHR 1	0,1	10	0,583	104
QHR 2	0,1	10	0,821	146
QHR 3	0,1	10	0,619	110
QHR 4	0,1	10	0,661	118
QHR 5	0,1	6	0,694	206
QHR 6	0,1	10	0,619	110
QHR 7	0,1	10	0,616	110

Bei der Aktivitätsmessung ohne Myzel zeigten besonders die Proben der Stämme QM9414 und QHR 5 eine Gelbfärbung, die restlichen Proben waren nur leicht gefärbt.

**Ergebnis der Extinktionsmessung:**

Stamm	Menge [ml]	Inkubationszeit [min]	Absorbanz	Enzymaktivität [mUnits/ml]
QM9414	0,1	30	0,728	43
QHR 1	0,1	30	0,062	4
QHR 2	0,1	30	0,051	3
QHR 3	0,1	30	0,051	3
QHR 4	0,1	30	0,052	3
QHR 5	0,1	30	0,503	30
QHR 6	0,1	30	0,052	3
QHR 7	0,1	30	0,047	3



Zu erkennen ist auch hier, dass von den Stämmen QM9414 und QHR 5 deutlich mehr Enzyme gebildet werden.

### 3.4 Fermentation

Im folgenden Experiment wurden die Stämme QM9414 und nx7 in Bezug auf das Wachstumsverhalten und die Enzymproduktion mittels Fermentation verglichen. Da es mit den neuen Fermentern anfangs Probleme gab wurde die Fermentation zuerst mit älteren Fermentern durchgeführt. Danach wurde eine weitere Fermentation mit den neuen Fermentern gemacht.

#### 3.4.1 Wachstumsverhalten

Nach einer Fermentation auf 1 % CMC wurde das gebildete Myzel der Stämme von den Medien herausgefiltert und die jeweiligen Massen des getrockneten Myzels bestimmt.

Stamm	QM9414	nx7
Masse	1,395 g	2,012 g

Diese Massenverteilung zeigt, dass im Zuge der Fermentation von nx7 eindeutig mehr Myzel gebildet wurde.

Aus den Sauerstoffkurven war ersichtlich, wie bei den einzelnen Stämmen das Wachstum verlief. Bei QM9414 setzte der Wachstumsschub etwas früher ein, bei nx7 war er aber stärker. Auch eine geringfügige Änderung des pH-Wertes war ein Zeichen für Wachstum. Bei beiden Stämmen konnte man jedoch eine kleine Unregelmäßigkeit bei den Sauerstoffkurven erkennen. Der Sauerstoffgehalt der Lösung stieg dabei kurzzeitig wieder an, bevor er weiter sank, ein Hinweis darauf, dass etwas das Wachstum der Pilze gestört hat.

#### 3.4.2 Enzymaktivitäten

##### ***Xylanaseaktivitätsmessung von QM9414 bei der ersten Fermentation (1 % Xylan):***

Zeit	Menge [µl]	Verdünnung [1:x]	Extinktion	Enzymaktivität [mUnits/ml]
40 h	250	4	0,562	435
48 h	250	10	0,397	779
72 h	250	100	0,396	7773
90 h	250	100	0,691	13296

**Xylanaseaktivitätsmessung von nx7 bei der ersten Fermentation (1 % Xylan):**

Zeit	Menge [ $\mu$ l]	Verdünnung [1:x]	Extinktion	Enzymaktivität [mUnits/ml]
40 h	125	1	0,456	178
48 h	250	2	0,582	225
72 h	250	10	0,209	427
90 h	250	50	0,217	2211

QM9414 zeigt bei diesen Messungen eindeutig die höhere Aktivität bei der Bildung von Xylanasen.

**Xylanaseaktivitätsmessung von QM9414 bei der zweiten Fermentation (1 % CMC):**

Zeit	Menge [ $\mu$ l]	Verdünnung [1:x]	Extinktion	Enzymaktivität [mUnits/ml]
40 h	250	1	0,621	120
48 h	250	1	0,955	182
65 h	250	2	0,687	264

**Xylanaseaktivitätsmessung von nx7 bei der zweiten Fermentation (1 % CMC):**

Zeit	Menge [ $\mu$ l]	Verdünnung [1:x]	Extinktion	Enzymaktivität [mUnits/ml]
40 h	250	1	0,217	44
48 h	250	1	0,937	179
65 h	250	2	0,950	363

Zu beobachten ist, dass QM9414 bei der Fermentation auf CMC anfangs mehr Enzymaktivität als nx7 aufweist und später von diesem übertroffen wird.

Mit den Proben der zweiten Fermentation wurden auch Messungen zur Bestimmung der Cellulasenaktivität unternommen. Allerdings zeigte der Enzymtest Cellazyme C (Megazyme) keine bzw. nur sehr geringe Enzymaktivität. Daher wurden die Proben auch nach Methode der reduzierenden Zucker (s. Kapitel 2.6) auf Aktivität untersucht.

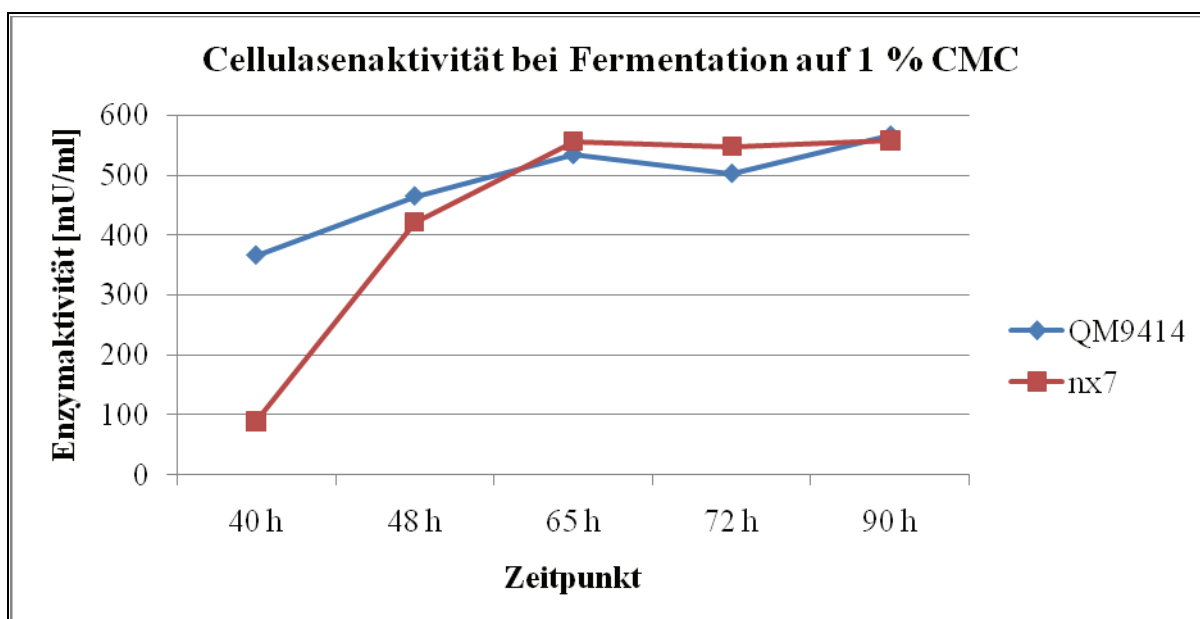
**Cellulasenmessung (red. Zucker) von nx7:**

Zeit/Probe	Extinktion	Mittelwert	mgGlc/assay	Enzymaktivität [mU/ml]
40h/BW1	0,000	0,001	0,121	90
...../BW2	0,001			
...../P1	0,023	0,023		
...../P2	0,023			
48h/BW1	0,120	0,123	0,570	422
...../BW2	0,126			
...../P1	0,342	0,331		
...../P2	0,320			
65h/BW1	0,202	0,199	0,751	556
...../BW2	0,196			
...../P1	0,500	0,482		
...../P2	0,464			
72h/BW1	0,001	0,001	0,740	548
...../BW2	0,001			
...../P1	0,272	0,280		
...../P2	0,287			
90h/BW1	0,012	0,023	0,754	558
...../BW2	0,034			
...../P1	0,311	0,307		
...../P2	0,303			

(Zur Erläuterung: BW...Blindwert, P...Probe)

**Cellulasenmessung (red. Zucker) von QM9414:**

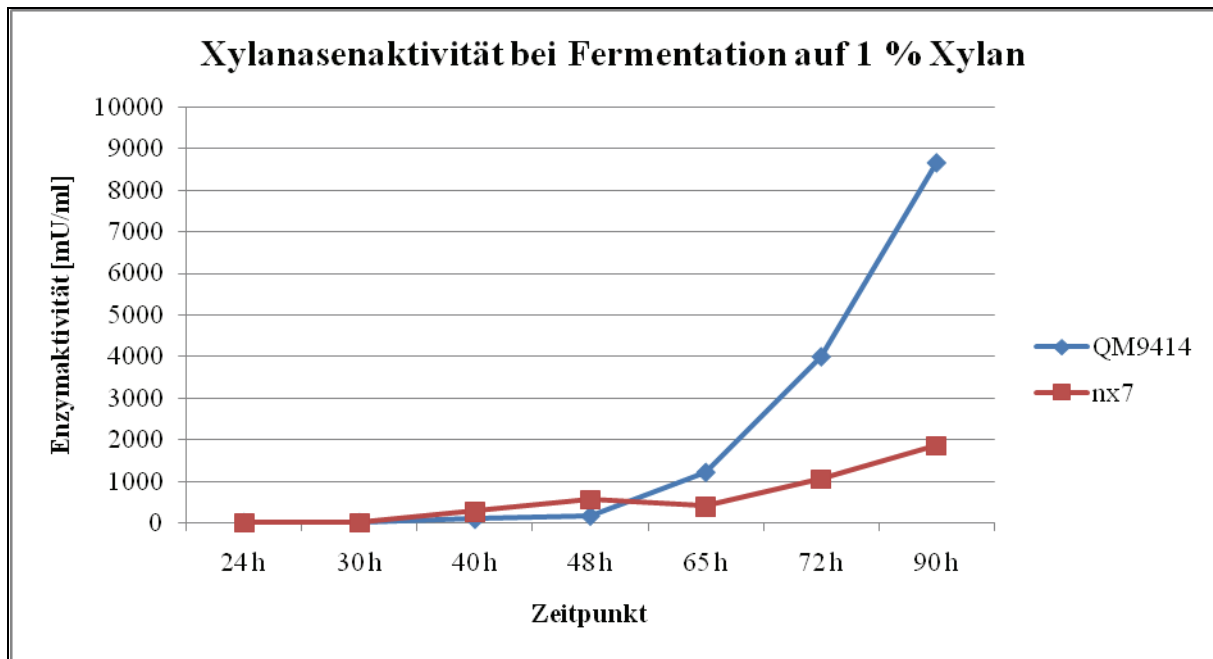
Zeit/Probe	Extinktion	Mittelwert	mgGlc/assay	Enzymaktivität [mU/ml]
40h/BW1	0,104	0,106	0,494	366
...../BW2	0,107			
...../P1	0,293	0,282		
...../P2	0,271			
48h/BW1	0,162	0,166	0,627	464
...../BW2	0,169			
...../P1	0,394	0,397		
...../P2	0,400			
65h/BW1	0,202	0,197	0,720	533
...../BW2	0,192			
...../P1	0,481	0,467		
...../P2	0,453			
72h/BW1	-0,009	-0,007	0,677	502
...../BW2	-0,005			
...../P1	0,242	0,246		
...../P2	0,249			
90h/BW1	0,000	0,002	0,763	565
...../BW2	0,004			
...../P1	0,304	0,290		
...../P2	0,276			



Auch bei der Cellulasenaktivität ist zu erkennen, dass QM9414 zunächst schneller mit der Enzymproduktion beginnt, später aber von nx7 übertroffen wird.

**Xylanasenmessung nach Fermentation von QM9414 und nx7 auf 1 % Xylan:**

<b>QM9414</b>				
Zeitpunkt	Menge [µl]	Verdünnung [1:x]	Absorbanz	Enzymaktivität [mU/ml]
24 h	250	1	0,008	5
30 h	250	1	0,015	6
40 h	250	1	0,427	84
48 h	250	1	0,838	160
65 h	25	1	0,628	1212
72 h	250	100	0,194	3992
90 h	250	100	0,443	8653
<b>nx7</b>				
Zeitpunkt	Menge [µl]	Verdünnung [1:x]	Absorbanz	Enzymaktivität [mU/ml]
24 h	250	1	0,006	5
30 h	250	1	0,011	6
40 h	125	1	0,695	267
48 h	125	1	1,491	565
65 h	125	1	1,032	394
72 h	250	10	0,549	1064
90 h	250	10	0,973	1857



Bei dieser Fermentation zeigte der Stamm nx7 zwischenzeitig mehr Xylanaseaktivität, gegen Ende aber wies QM9414 eine höhere Enzymaktivität auf. Bei der 65-Stunden-Probe ist zu erkennen, dass die Aktivität von nx7 zurückgegangen ist und erst später wieder ansteigt, wohingegen die Aktivität von QM9414 ohne Unterbrechung zunimmt.



## 4 Diskussion

### 4.1 Einfluss des Hygromycinresistenzgens auf die Enzymbildung

Während man bei der Transformation mit der Gene Gun ohnehin nur eine relativ geringe Ausbeute transformierter Stämme erhält, spielen dennoch einige weitere Faktoren eine Rolle dabei, ob vom Pilz die gewünschten Enzyme produziert werden oder nicht.

Die Experimente haben gezeigt, dass nicht alle QHR-Stämme die gleiche Enzymaktivität aufweisen. Unabhängig von der verwendeten Kohlenstoffquelle war es neben QM9414 nur der Stamm QHR 5 der vermehrt Enzyme gebildet hat. Sowohl bei den Xylanasen, als auch bei  $\beta$ -Glucosidase hatten diese beiden Stämme mit Abstand die größte Enzymaktivität, wobei vom Stamm QM9414 noch etwas mehr an Enzymen gebildet wurde als von QHR 5. Das Nachlassen der Enzymbildung bei den QHR-Stämmen muss also etwas mit dem eingebrachten Hygromycinresistenzgen zu tun haben. Aber warum konnte nun bei QHR 5 Enzymaktivität nachgewiesen werden, bei den anderen QHR-Stämmen aber nicht? Die Antwort auf diese Frage findet sich wahrscheinlich in den Ergebnissen vom Southern Blot (siehe 3.1 Ergebnisse vom Southern Blot). Es zeigte sich dabei eindeutig, dass sich das Hygromycinresistenzgen bei QHR 5 an einer anderen Stelle im Genom befand, als bei den übrigen QHR-Stämmen. Offenbar ist der Locus, an dem sich das eingebrachte Plasmid im Genom befindet, von großer Bedeutung für die Enzymproduktion. Da bei der Transformation das Plasmid in das Genom hineingeschossen wird, ist es durchaus möglich, dass dadurch eine bereits bestehende DNA-Sequenz beschädigt oder unterbrochen wird. Handelt es sich dabei um die Sequenz, die für den Enzymhaushalt verantwortlich ist, so wird dieser beeinflusst. Interessant ist allerdings, dass sich das eingebrachte Plasmid bei allen QHR-Stämmen (mit Ausnahme von QHR 5) am gleichen Locus im Genom befand. Diese Stelle wird offenbar bei der Transformation bevorzugt, sodass sich das eingebrachte Plasmid bei den meisten transformierten Stämmen genau dort befindet. Warum das so ist, und weshalb QHR 5 eine Ausnahme bildet, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. QHR 5 zeichnet sich außerdem noch dadurch aus, dass er das Hygromycinresistenzgen in doppelter Ausführung in sich trägt. Ob bzw. wie sich das auf seine Eigenschaften auswirkt ist noch nicht völlig geklärt.

#### **4.2 Auswirkungen des konstitutiv aktivierten Xylanaserregulatorgens**

Dem Stamm nx7 enthält einen konstitutiv aktivierten Xylanaserregulatorgens, wodurch seine Enzymproduktion verbessert werden sollte. Das konstitutiv aktivierte Xylanaserregulatorgen bewirkt, dass Xyr1 immer, unabhängig von den Kultivierungsbedingungen, gebildet wird. Um zu überprüfen, in welchem Maße sein Enzymhaushalt dadurch verändert wurde, wurde er mittels Fermentation mit dem Stamm QM9414 verglichen.

Die beiden Stämme wurden in zwei Fermentationen miteinander verglichen. Bei der ersten Fermentation war die Kohlenstoffquelle Xylan, bei der zweiten Fermentation war CMC die Kohlenstoffquelle. Im Zuge der Fermentation auf 1 % Xylan konnte bei QM9414 eindeutig die stärkere Xylanaseaktivität festgestellt werden. Von Beginn an war bei QM9414 ein stärkeres Wachstum zu erkennen, und auch der Enzymgehalt im Fermentationsmedium war bei QM9414 zu jedem Messungszeitpunkt der Fermentation größer als bei nx7.

Bei der Fermentation auf 1 % CMC wies QM9414 bis 48 Stunden nach Beginn der Fermentation die stärkere Enzymaktivität auf (sowohl bei Xylanasen, als auch bei Cellulasen). Ab der 65-Stunden-Probe war aber zu erkennen, dass nx7 mehr Enzyme als QM9414 produzierte. Auch die gebildete Myzelmasse war nach Ablauf der Fermentation bei nx7 deutlich größer als beim Wildtyp.

Der Stamm nx7 kann offenbar Xylan weniger gut verwerten als QM9414. Auf CMC zeigt er jedoch, nach einem leicht verzögerten Wachstum, die größere Enzymaktivität. Der Stamm mit dem konstitutiv aktivierten Xylanaserregulatorgen kommt also mit dem Abbau von CMC besser klar, wohingegen er Xylan weniger gut abbauen kann. Bei der Kohlenstoffquelle Xylan kommt es im Vergleich zu QM9414 zu einer verminderten Bildung von Xylanasen, während bei der Kohlenstoffquelle CMC vergleichsweise mehr Xylanasen, aber auch Cellulasen, gebildet werden. Die konstitutive Aktivierung von *xyr1* beeinflusst die Enzymproduktion also noch nicht optimal, das heißt, dass die Enzyymbildung durch weitere Experimente optimiert werden muss.

## 5 Zusammenfassung

Mit *Trichoderma reesei* ist ein Pilz entdeckt worden, welcher Enzyme zu bilden vermag, die ihrerseits Polymere in deren monomere Komponenten zerlegen können. Dieser Organismus wird auf gentechnischem Wege so verändert, dass diese Enzyme vermehrt produziert werden. Ein so erhaltener Stamm kann dann in einer Fermentation angezüchtet werden, um die gewünschten Stoffe zu gewinnen. Auf diese Weise sollen also aus nachwachsenden Rohstoffen Ausgangssubstrate für die Synthese hochwertiger Chemikalien hergestellt werden.

Dieses Verfahren ist vor allem deshalb wichtig, weil andere Prozesse zur Gewinnung dieser Chemikalien viel aufwändiger und dadurch auch sehr teuer sind.

Allerdings konnten auch Probleme festgestellt werden, welche die Enzymproduktion des Pilzes beeinflussen, wie zum Beispiel die Auswirkungen der Einbringung eines neuen Gens in das Pilzgenom, oder die Funktion des konstitutiv aktivierten Xylanase-regulators *xyl1*. Daher müssen die Eigenschaften des Pilzes und auch der Aufbau des Genoms durch weitere Experimente untersucht werden, um die Enzymproduktion zu optimieren.

## 6 Anhang

### 6.1 Verwendete Stämme

Im Rahmen dieses Projektes wurden folgende Stämme von *Trichoderma reesei* verwendet:

- QM9414, ein Abkömmling des Wildtypstammes von *T. reesei*
- Die Stämme QHR 1-7, QM9414-Stämme mit eingebrachter Hygromycinresistenz
- $\Delta xyr1$ , ein Abkömmling des Stammes QM9414, aus dem das Xylanaseregulatorgen *xyr1* entfernt wurde
- nx7, ein Stamm mit einem konstitutiv aktivierten Xylanaseregulator Xyr1

Alle verwendeten Stämme wurden vom Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften der Technischen Universität Wien zur Verfügung gestellt.

### 6.2 Medien und Lösungen

#### Malzextrakt (MEX)-Medium

Zusammensetzung für 100 ml:

2 g Agar-Agar
3 g Malzextrakt (MEX)

#### Mandels-Andreotti (MA)-Medium

Zusammensetzung für 1000 ml:

20 ml 50× Spurenelementlösung
500 ml Mineralsalzlösung
480 ml 0,1 M Phosphat-Citrat-Puffer

darin gelöst:

10 g/l Kohlenstoffquelle
1 g/l Pepton
0,3 g/l Harnstoff
(20 g/l Agar-Agar)

**Phosphat-Citrat-Puffer:** 500 ml einer Lösung von 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (35,6 g/l) werden mit 0,2 M Citronensäure (42 g/l) auf pH 5 eingestellt.

**Mineralsalzlösung:**

- 2,8 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (21,19 mM)
- 4,0 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (29,16 mM)
- 0,6 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (2,43 mM)
- 0,8 g/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (5,44 mM)

**50× Spurenelementlösung:**

- 250 mg/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (0,9 mM)
- 85 mg/l  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,31 mM)
- 70 mg/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (0,24 mM)
- 100 mg/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (0,68 mM)

### Fermentationsmedium

*Zusammensetzung für 1000 ml:*

- 2,8 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 4,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 1,0 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- 0,5 g NaCl
- 20 ml 50× Spurenelementlösung
- 1 g Pepton
- 0,5 g Tween 80
- 10 Tropfen Glanapon
- 10 g Kohlenstoffquelle

### Sporensuspensionslösung

*Gelöst in dest. Wasser:*

- 0,8 % NaCl
- 0,05 % Tween 80

### Waschpuffer (Southern Blot)

Lösung von 0,1 M Maleinsäure und 0,15 M NaCl auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren. Anschließend 0,3% (v/v) Tween 20 zugeben.

### **Blocking Solution (SB)**

1× Working Solution durch Verdünnung von 10× Blocking Solution (Southern Blot) 1:10 mit Maleinsäurepuffer herstellen.

**Maleinsäurepuffer:** Lösung von 0,1 M Maleinsäure und 0,15 M NaCl auf pH 7,5 einstellen.

### **Detection Puffer (SB)**

Lösung von 0,1 M Tris-HCl und 0,1 M NaCl auf pH 9,5 einstellen.

### **Antibody Solution (SB)**

Anti-Digoxigenin-AP 5 min zentrifugieren (10000 rpm) und 1:10000 (75mU/ml) (aus Überstand) mit 1× Blocking Solution verdünnen.

## **6.3 Literaturverzeichnis**

[Bauer, 2005]

Bauer, G.: Untersuchungen zur Regulation der Expression des *xyr1*-Gens (kodierend für Xylanase Regulator 1) aus *Trichoderma reesei*

Diplomarbeit an der Technischen Universität, Wien, 2005.

[Steiger, 2007]

Steiger, M.: Der Aktivator Xyr1 und seine Bedeutung für den Laktosemetabolismus von *Trichoderma reesei*

Diplomarbeit an der Technischen Universität, Wien, 2007.

<http://www.hygromycin.net/> (06.01.2009).





Sparkling Science >

Wissenschaft ruft Schule  
Schule ruft Wissenschaft

BM.W\_F<sup>a</sup>

[www.bmwf.gv.at](http://www.bmwf.gv.at)

Bundesministerium für Wissenschaft  
und Forschung