



PRAKTIKUMSSKRIPT

MIKROBIELLE EXOENZYME

Kathrin Riedel

kriedel@botinst.unizh.ch

INHALTSVERZEICHNIS

1. Hintergrund	3
1.1 Organismen.....	4
1.1.1 <i>Serratia liquefaciens</i>	4
1.1.2 <i>Erwinia carotovora</i>	4
1.1.3 <i>Clostridium stercorarium</i>	4
1.1.4 <i>Bacillus subtilis</i>	5
1.2 Im Praktikum nachgewiesene Enzyme und verwendete Substrate.....	5
1.2.1 Zink-Metalloprotease aus <i>Serratia liquefaciens</i>	5
1.2.2 Triacylglycerin-Lipase aus <i>Serratia liquefaciens</i>	6
1.2.3 Polygalacturonase (Pektinase) und Cellulase aus <i>Erwinia carotovora</i>	8
1.2.4 Endo- und Exocellulase aus <i>Clostridium stercorarium</i>	9
1.2.5 Endochitinase aus <i>Serratia liquefaciens</i>	12
1.2.6 Alpha-Amylase aus <i>Bacillus subtilis</i>	12
2. Zielsetzungen und Überblick	13
2.1 Zielsetzungen.....	13
2.1 Überblick	14
3. Versuchsprotokolle	14
3.1 Qualitativer Nachweis von Enzymen.....	14
3.2 Quantitativer Nachweis von Enzymen	15
3.3 Zymogramme	17
3.4 Charakterisierung der Endoglukanase CelZ aus <i>Clostridium stercorarium</i>	18
3.5 Synergistischer Celluloseabbau durch CelZ, CelY und das Fusionsprotein CelYZ	18
4. Anhang	20
4.1 Sicherheit	20
4.1.1 Allgemeines	20
4.1.2 Maßnahmen bei Stör- und Notfällen.....	20
4.2 Medien	20
4.2.1 Agarplatten zum Nachweis hydrolytischer Enzyme.....	20
4.2.2. SDS-PAGE Gele für Zymogramme.....	21
4.4 Anforderungsprofil und Übungsfragen.....	23
4.3 Literatur und Informationssysteme im Internet.....	24

1. Hintergrund

Bakterien zeichnen sich durch ihre osmotrophe Ernährung auf, d.h. sie können nur gelöste Verbindungen aufnehmen. Proteine, Polysaccharide und Lipide können also nur dann als Energiequelle und Bausteine metabolischer Prozesse dienen, wenn sie von der Bakterienzelle in kleinere transportable Bestandteile zerlegt werden; diesem Zweck dienen hydrolytische Enzyme, die vom Organismus nach außen abgegeben (sekretiert) werden. Mikroorganismen sind zum Abbau aller natürlichen organischen Verbindungen wie z.B. Cellulose, Stärke, Chitin, Pektin, Lignin befähigt; sie gelten daher als biochemisch omnipotent. Auch in der modernen Biotechnologie kommen hydrolytische Enzyme mikrobiellen Ursprungs zum Einsatz; so sind z.B. Lipasen und Proteasen gefragte Waschmittelzusätze, während Cellulasen insbesondere in der Papierindustrie Anwendung finden.

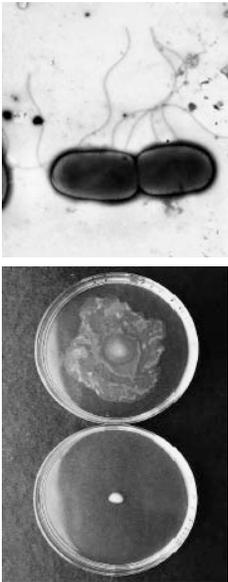
ENZYME ALS MIKROBIELLE PRODUKTE

Enzym	Ursprungsorganismus	Anwendungsbereich
Amylase	<i>Bacillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Rhizopus</i>	Stärkeverzuckerung, Gärungshilfsmittel, Textilindustrie
Cellulase	<i>Clostridium</i> <i>Trichoderma</i>	Papierindustrie Textilindustrie
Invertase	<i>Saccharomyces</i>	Verhinderung der Zucker-Kristallisation (Süßwarenindustrie)
Lipase	<i>Aspergillus</i> <i>Rhizopus</i> <i>Candida</i> <i>Burkholderia</i>	Waschmittelzusatz, Käsereifung, Verdauungshilfsmittel
Pektinase	<i>Clostridium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Sclerotinia</i>	Fruchtsaftklärung, Kakao- u. Kaffeeherstellung, Flachsrröste
Protease	<i>Bacillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Paecilomyces</i>	Waschmittelzusatz, Fleischzartmacher, Backwarenherstellung

Im Folgenden werden zunächst die verschiedenen im Praktikum verwendeten Organismen vorgestellt; daran anschließend wird auf die Reaktionsmechanismen und Substrate der untersuchten hydrolytischen Enzyme eingegangen.

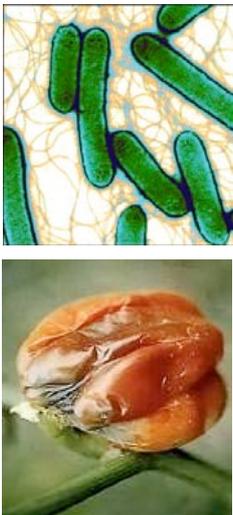
1.1 Organismen

1.1.1 *Serratia liquefaciens*



Serratia liquefaciens ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges, opportunistisch pathogenes Bakterium, das in der Natur unterschiedlichste Lebensräume, wie z.B. pflanzliche und tierische Oberflächen oder Wasser und Boden, besiedelt. Wie die meisten *Serratia*-Arten sekretiert *S. liquefaciens* ein breites Spektrum hydrolytischer Enzyme (darunter Protease(n), Lipase, Chitinase(n), und Nukleasen) ins umgebende Medium. *S. liquefaciens* MG1, der im Praktikum verwendete Stamm, zeichnet sich zudem durch eine spezielle Form der Motilität (das so genannte Schwärmen) aus, mittels derer sich die Bakterien rasch auf Oberflächen ausbreiten können. Die Expression der Protease und Chitinase, sowie die Schwärmermotilität werden durch ein Zell-Zell-Kommunikationssystem gesteuert, das auf frei diffundierbaren Signalmolekülen (*N*-Acyl-homoserinlactonen, AHL) basiert und auch als Quorum sensing bezeichnet wird.

1.1.2 *Erwinia carotovora*



Erwinia carotovora ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges Bakterium, das ebenso wie *Serratia liquefaciens* der Gattung der *Enterobacteriaceae* angehört und insbesondere als Verderber von Gemüse bekannt ist („soft rot“). Der Name dieses Bodenbewohners leitet sich von Wort „Karotte“ ab, von der es erstmals isoliert wurde. *E. carotovora* befällt jedoch auch viele andere Gemüsesorten darunter Kartoffeln, Paprika, Gurken oder Zwiebeln. *E. carotovora* produziert eine Vielzahl von extrazellulären Enzymen (Cellulasen, Pektinasen, Proteasen), die am Abbau der pflanzlichen Zellwand beteiligt sind. Die Expression dieser Enzyme wird dabei ähnlich wie in *S. liquefaciens* durch ein AHL-abhängiges Quorum sensing System reguliert.

1.1.3 *Clostridium stercorarium*

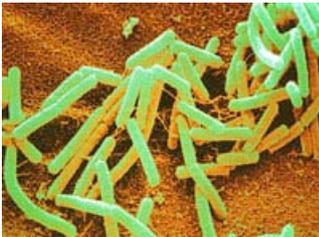


Clostridium stercorarium ist ein Gram-positives, stäbchenförmiges, Bakterium, das zu den anaeroben Sporenbildnern zählt. Seine optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 60 und 65°C. Mithilfe eines sehr einfach aufgebauten „low-complexity“ Cellulase-Systems vermag *C. stercorarium* kristalline Cellulose unter anaeroben Bedingungen vollständig abzubauen.



Die Abbildung zeigt die Zersetzung eines Filterstreifens innerhalb weniger Tage bei 60°C. Bei der Fermentation von Cellulose werden H₂, CO₂, Lactat, Acetat und Ethanol freigesetzt. *C. stercorarium* wurde deshalb für die biotechnologische Produktion von Ethanol aus cellulosehaltigen Abfallstoffen in Betracht gezogen.

1.1.4 *Bacillus subtilis*



Bacillus subtilis ist ein Gram-positives, stäbchenförmiges Bakterium, das ubiquitär verbreitet ist und aus Wasser, Luft, Boden und in besonders großer Menge aus Komposterde isoliert werden kann. *B. subtilis* besiedelt sowohl die Rhizosphäre als auch die oberen Schichten des Bodens. Dort hat er aufgrund seiner saprophytischen Lebensweise Anteil an der Mobilisierung und Mineralisierung organischer Stoffe und deren Rückführung in die Nahrungskreisläufe. Er besitzt ein großes Arsenal an Glukan- und Protein-abbauenden Enzymen (z.B. Protease, Amylasen), die bei Bedarf aus der Zelle exportiert werden. Aufgrund seiner Fähigkeit zur Sekretion extrazellulärer Enzyme wird *B. subtilis* insbesondere für die Herstellung von Waschmittelenzymen in der biotechnologischen Industrie genutzt.



„Heubazillus überlebt Weltraumflug - Kam das Leben per Anhalter? „DLR-Forscher hatten in der zweiten Hälfte der 90er Jahre russische Satelliten mit Sporen des Heubazillus (*Bacillus subtilis*) bestückt. "Das ist der resistenteste Mikroorganismus, den man überhaupt kennt", erläuterte Horneck. Vollkommen ungeschützt starben dennoch alle Sporen im aggressiven UV-Licht der Sonne nach kurzer Zeit ab, berichtet das britische Wissenschaftsmagazin "New Scientist" (Nr. 2325, S. 13). Mischten die Wissenschaftler die Sporen jedoch mit Meteoritenpulver oder mit Boden, der den Verhältnissen auf dem Nachbarplaneten Mars nachgeahmt war, überstand ein Teil der Mikroorganismen den unwirtlichen Ausflug unbeschadet.“

1.2 Im Praktikum nachgewiesene Enzyme und ihre Substrate

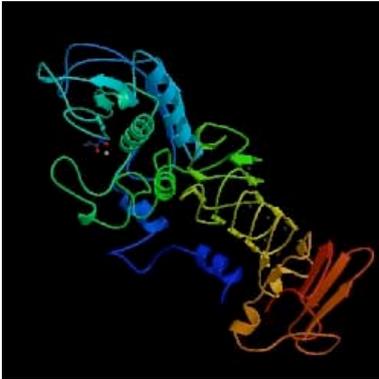
1.2.1 Zink-Metalloprotease aus *Serratia liquefaciens*

Proteasen (auch Proteinasen, Peptidasen oder proteolytische Enzyme genannt) sind Enzyme, die Proteine oder Peptide spalten können, indem sie die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren. Proteasen sind für alle Organismen lebensnotwendig und kommen daher ubiquitär vor.

Nomenklatur

- 1) Man unterscheidet **intrazelluläre** und **extrazelluläre** Proteasen, die von der Zelle ins umgebende Medium sezerniert werden.
- 2) Eine weitere Einteilung der Peptidasen unter enzymologischen Gesichtspunkten ist die in **Exopeptidasen** und **Endopeptidasen**. Exopeptidasen spalten die Polypeptidkette von den Enden her. Endopeptidasen spalten meist an sehr spezifischen Stellen innerhalb der Polypeptidkette.
- 3) **Art des aktiven Zentrums:** Peptidasen haben, wie alle Enzyme, ein aktives Zentrum, das die jeweilige Reaktion ermöglicht. Innerhalb dieser Zentren sind bestimmte Aminosäuren von

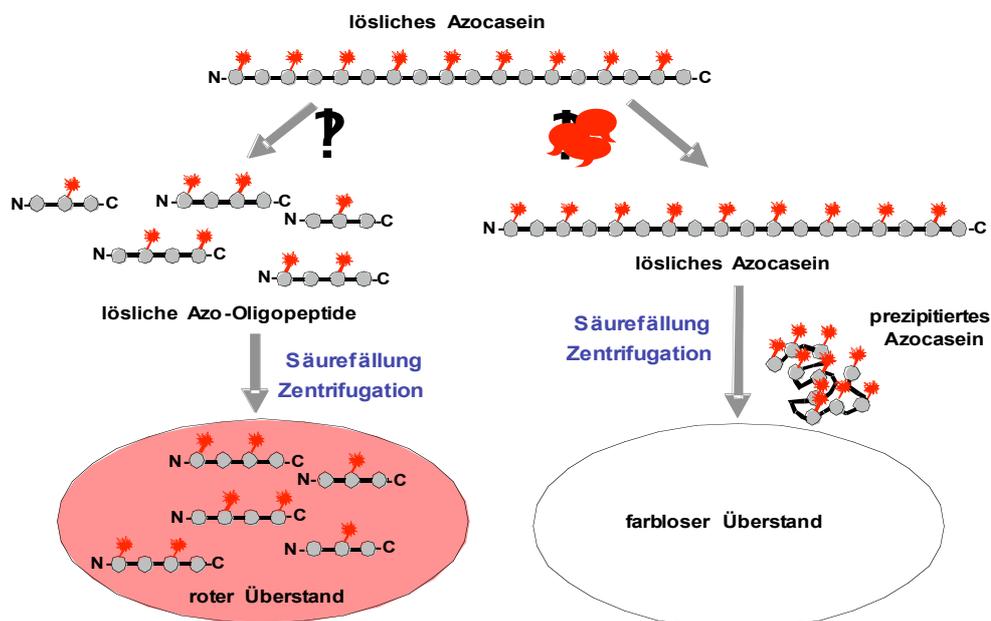
entscheidender Bedeutung für die Funktionalität. Daher werden Peptidasen anhand der chemischen Beschaffenheit ihrer katalytischen, aktiven Zentren klassifiziert (EC Nummern).



Bei der im Praktikum nachgewiesenen **Protease aus *Serratia liquefaciens*** handelt es sich um eine extrazelluläre Endopeptidase, die zur Klasse der Zink-Metalloproteasen (Aminosäuren im katalytischen Zentrum gehen einen Komplex mit zweiwertigen Zinkionen ein) gehört und insbesondere Peptid-Bindungen in Nachbarschaft hydrophober Aminosäure-Reste spaltet (EC 3.4.24.40). **Enzymparameter:** Molekulargewicht ~ 50 kDa, Temperaturoptimum ~ 40°C, pH-Optimum ~ 7,5. Die Abbildung zeigt die 3D-Struktur einer nahverwandten Protease aus *S. marcescens*.

Verwendete Substrate:

- **Casein:** Qualitativer Nachweis von Proteasen - durch den Abbau von Casein kommt es zur Hofbildung auf der ansonsten trüben Milchplatte.
- **Azocasein:** Die Kopplung von Casein an den roten Azofarbstoff ermöglicht die colorimetrische Quantifizierung der proteolytischen Aktivität.



1.2.2 Triacylglycerin-Lipase aus *Serratia liquefaciens*

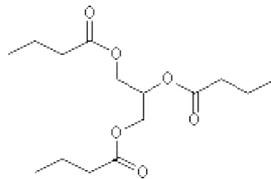
Lipasen (Triacylglycerinacylhydrolasen, EC 3.1.1.3) katalysieren die Hydrolyse und die Synthese of von Estern aus Glycerin und langkettigen Fettsäuren. Lipasen sind in der Natur weit verbreitet, kommerziell sind jedoch nur Lipasen mikrobiellen Ursprung von Interesse. So werden beispielsweise vielen Waschmitteln Lipasen zu Erhöhung der Reinigungsleistung beigemischt.



Bei der im Praktikum nachgewiesenen **Triacylglycerol-Lipase aus *S. liquefaciens*** handelt es sich um ein extrazelluläres Enzym mit einem Molekulargewicht von ~ 67 kDa. Anders als viele andere Lipasen wird die Serratia-Lipase durch einen *one-step pathway* über einen ABC-Transporter sekretiert; die Sekretionssignalsequenz ist dabei im C-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert. Die Abbildung zeigt die 3D-Struktur einer nahverwandten Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa*.

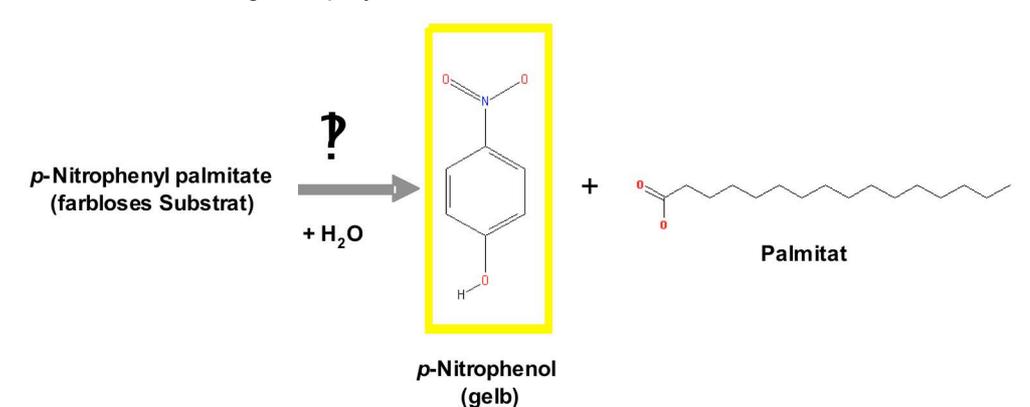
Verwendete Substrate:

- **Tributyrin:** Qualitativer Nachweis lipolytischer Aktivität – durch den Abbau von Tributyrin kommt es zu klaren Hofbildung in der ansonsten trüben Agarplatte.

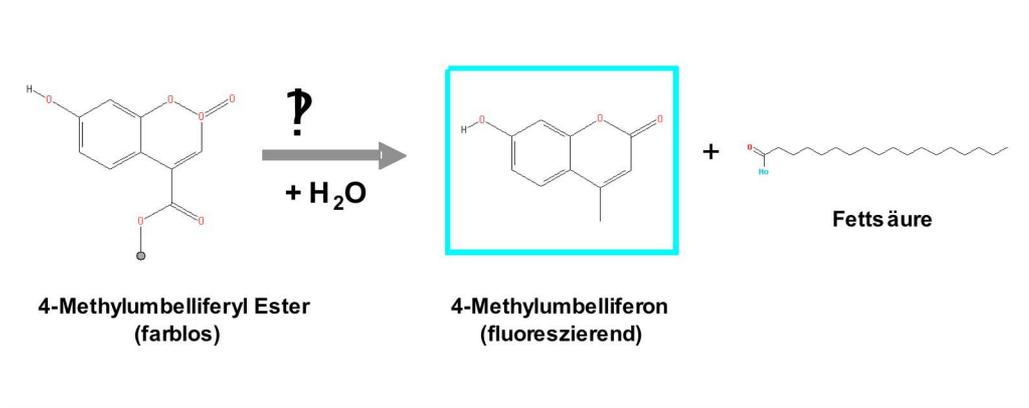


Tributyrin

- **para-Nitrophenyl-palmitat:** Die Kopplung von Palmitat an para-Nitrophenol ermöglicht die colorimetrische Quantifizierung der lipolytischen Aktivität.

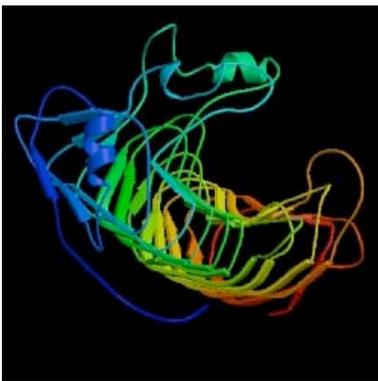


- **Methylumbelliferyl-Ester:** Qualitativer Nachweis von Lipasen im Proteingel nach Abspaltung des fluoreszierenden 4-Methylumbelliferones von Methylumbelliferyl-Estern (z.B. MU-Butyrat) durch die lipolytische Aktivität renaturierter Enzyme.



1.2.3 Polygalacturonase (Pektinase) und Cellulase aus *Erwinia carotovora*

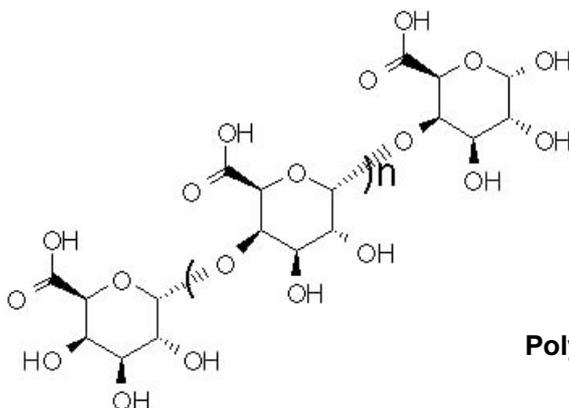
Als Pektinasen werden Polygalacturonasen (EC 3.2.1.15), Pektinmethylesterasen und Pektinlyasen bezeichnet, welche Pektin, ein Polymer der Galacturonsäure das in den primären Zellwänden und der Mittellamelle von Pflanzen vorkommt, abbauen können. Pektinasen werden in der Lebensmittelindustrie häufig zur Klärung von Fruchtsäften eingesetzt. Pektinasen werden zusammen mit anderen hydrolytischen Enzymen (Cellulase, Protease) von Pflanzen-pathogenen Bakterien zur Penetration der Wirtszellwand eingesetzt.

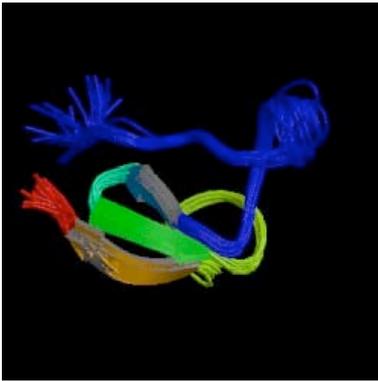


Bei der im Praktikum nachgewiesenen **Pektinase von *E. carotovora*** handelt es sich um eine extrazelluläre Polygalacturonase mit einem Molekulargewicht von ~ 24 kDa. Die Abbildung zeigt die 3D-Struktur des Enzyms.

Verwendetes Substrat für Pektinase:

- **Polygalacturonsäure:** Qualitativer Nachweis pektinolytischer Aktivität – durch Überschichtung mit Kupferacetat werden klare Abbauzonen in der ansonsten trüben Platte sichtbar.





Bei der im Praktikum nachgewiesenen **Cellulase** handelt es sich um eine **Endo-1,4- β -Glukanase** (Carboxymethyl-cellulase, EC 3.2.1.4.) mit einem Molekulargewicht von ~ 35 kDa und einem Temperaturoptimum von etwa 50°C . Die Abbildung zeigt eine verwandte Cellase aus *E. chrysanthemi*.

Verwendete Substrate und Reaktionen siehe Punkt 1.2.4.

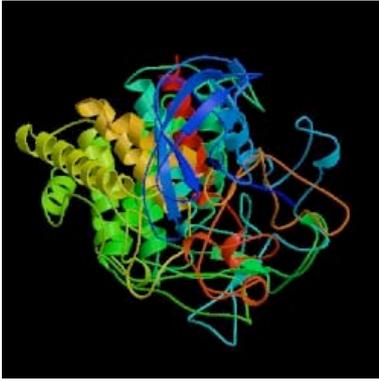
1.2.4 Endo- und Exocellulase aus *Clostridium stercorarium*

Cellulasen sind Enzyme, die die β -1,4-glucosidischen Bindungen von Cellulose, dem Hauptstrukturelement der Pflanzenzellwand und damit dem häufigsten Polymer überhaupt, hydrolysieren können. Mikroorganismen können Cellulose unter aeroben (z.B. *Trichoderma reesei*; Vertreter der Gattungen *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Erwinia* oder *Streptomyces*) oder anaeroben Bedingungen (z.B. Vertreter der Gattungen *Clostridium*, *Ruminococcus* oder *Eubacterium*) abbauen. Um kristalline Cellulose vollständig umzusetzen, sind eine Reihe von Enzymen unterschiedlicher Spezifität notwendig. Extrazelluläre **Endo-1,4- β -Glukanasen** (Carboxymethylcellulasen, EC 3.2.1.4.) hydrolysieren die glykosidische Bindung innerhalb amorpher Regionen der Cellulosefaser und setzen dadurch langkettige Oligosaccharide mit neuen reduzierenden und nicht-reduzierenden Enden frei. Die ebenfalls außerhalb der Zelle vorliegenden **Exo-1,4- α -Glukanasen** (Cellobiohydrolasen, EC 3.2.1.91) spalten meist vom nicht-reduzierenden Ende der Cellulosekette Cellobiose- bzw. kurzkettige Cellodextrin-Einheiten ab. Beim Abbau von Cellulose kommt es häufig zu einer synergistischen Interaktion der Einzelkomponenten, d.h. dass die Gesamtaktivität der Enzymkombination größer ist als die Summe der Einzelaktivitäten.

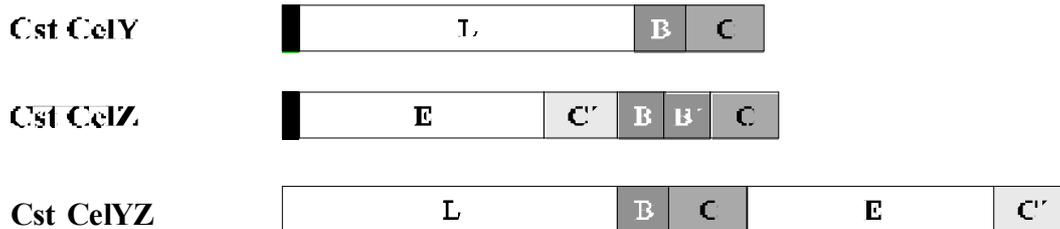


Bei der im Praktikum verwendeten **Endoglucanase CelZ** aus *C. stercorarium* handelt es sich um eine extrazelluläres Enzym mit einem Molekulargewicht von ~ 110 kDa. Das Enzym kann sowohl lösliche Carboxymethyl-cellulose (CMC) als auch mikrokristalline Cellulose (Avicel) abbauen. Die Abbildung zeigt die 3D-Struktur eines nahe verwandten Enzyms aus *C. thermocellum*.

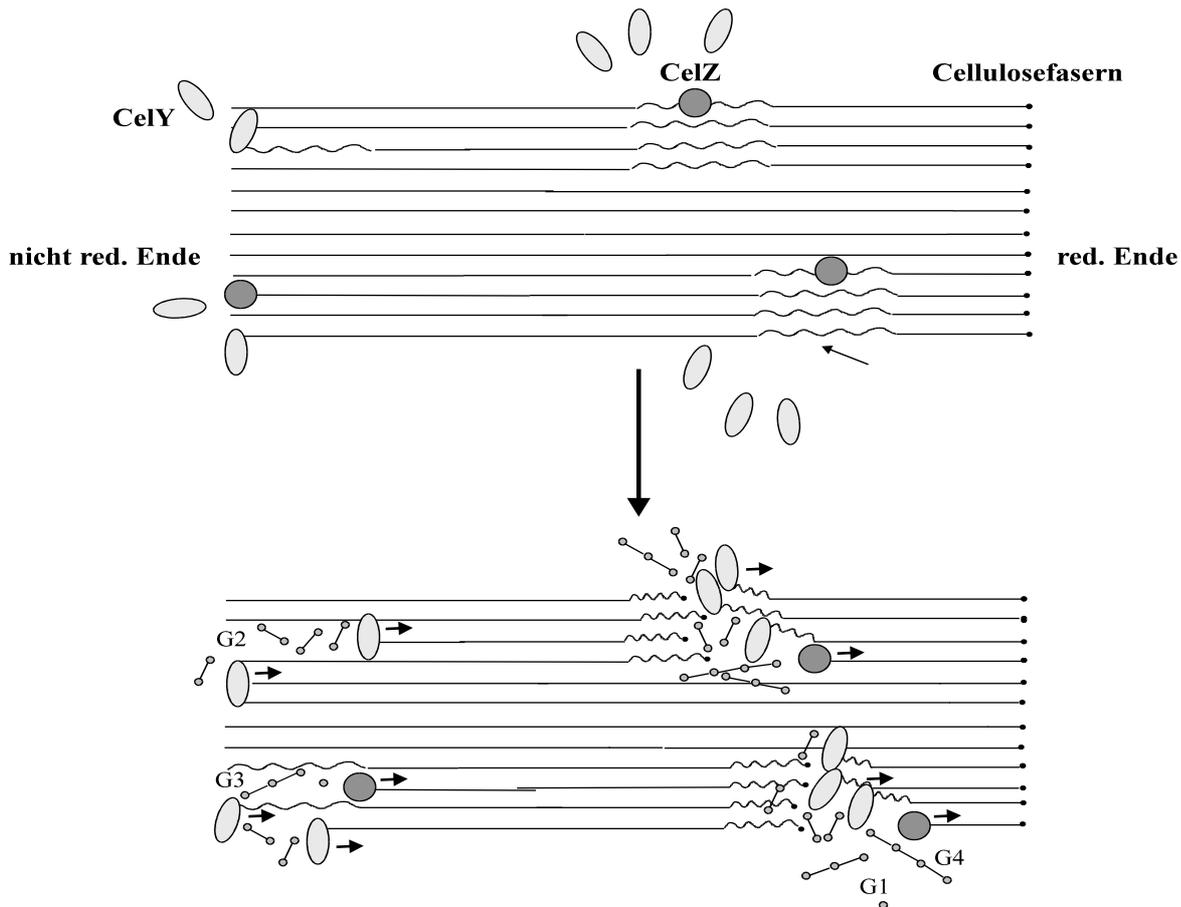
Bei der im Praktikum verwendeten **Exoglucanase CelY** aus *C. stercorarium* handelt es sich um ein extrazelluläres Enzym mit einem Molekulargewicht von 100 kDa. Es spaltet im Wesentlichen kristalline Cellulose. Die Abbildung zeigt die 3D-Struktur eines nah verwandten Enzyms aus *C. thermocellum*.



Hydrolytische Enzyme weisen in der Regel eine modular aufgebaute Multidomänenstruktur auf, die neben katalytisch aktiven Protein-Bereichen meist auch für die Substratbindungen verantwortliche Regionen beinhaltet. Die Cellulasen CelZ und CelY aus *C. stercorarium* setzen sich aus einem N-terminalen Signalpeptid, katalytischen Domänen (der Familie L bzw. E), Cellulose-Bindungsdomänen (C), Thermostabilisierungsdomänen (C') und B-Domänen zusammen, über deren Funktion bisher nur spekuliert werden kann. Die unterste Zeile zeigt ein Fusionsprotein aus CelY und CelZ, das kristalline Cellulose besonders effizient abbauen kann.



Der Celluloseabbau in *C. stercorarium* zeichnet sich durch das synergistische Zusammenwirken von CelY und CelZ aus. Neben der endoglukanolytischen Bereitstellung neuer nicht-reduzierender Enden für CelY bewirkt CelZ zusätzlich eine Art Auflockerung der Cellulose, die es CelY erleichtert das freigewordene amorphe Substrat exoglukanolytisch abzubauen.



Verwendete Substrate:

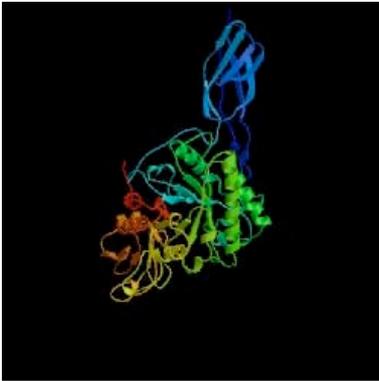
- **Carboxymethylcellulose (CMC):** wasserlösliche Cellulosepräparation mit kurzem Polymerisationsgrad und 0,7%iger Substitution der OH-Gruppen mit Carboxymethyl-Ether
- **Avicel:** wasserunlösliche, mikrokristalline Cellulosepräparation, die sowohl amorphe als auch kristalline Bereiche enthält

Kongorot färbt lösliche, höherkettige Glukane mit β -1,4-verknüpften Glukose-Einheiten wie z.B. CMC. Die beim enzymatischen Substratabbau entstehenden kurzkettigen Dextrine werden hingegen nicht gefärbt. Qualitativer Nachweis von Cellulasen auf Agarplatten und im Zymogramm.

DNSA-Test: Wirken glykanolytische Enzyme auf ihr polymeres Substrat ein, entstehen Bruchstücke mit reduzierenden Enden, deren Konzentration mit Hilfe des DNSA-Tests bestimmt werden kann. Die entstandenen reduzierenden Zucker reduzieren unter Einwirkung von Phenol und Na_2SO_3 die Nitrogruppen der Dinitrosalicylsäure, wobei ein Farbumschlag von gelb nach braun eintritt. Die Intensität der Farbänderung ist der Reduktionskraft des Reaktionsansatzes direkt proportional. Quantitativer Nachweis von Cellulasen. Quantifizierung cellulolytischer Aktivität.

1.2.5 Endochitinase aus *Serratia liquefaciens*

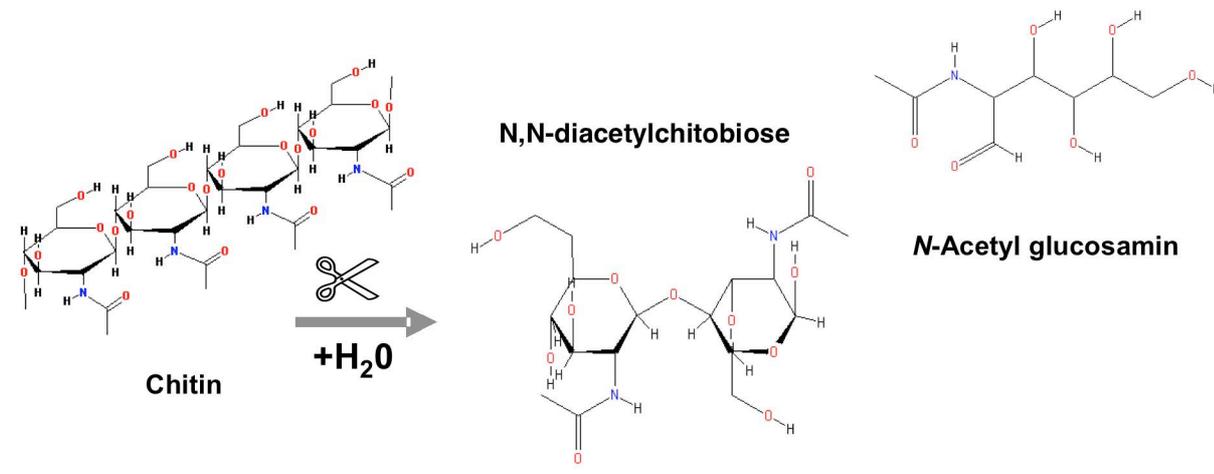
Als Chitinasen werden Enzyme bezeichnet, die die 1,4- β -Bindungen des Polymeren aus *N*-Acetyl-D-glucosamin (Chitin) hydrolysieren können und dabei *N,N*-diacetylchitobiose freisetzen (EC 3.2.1.14). Chitin ist eines der Hauptbestandteile der Zellwand von Pilzen und des Exoskeletts von Arthropoden (Krebse, Insekten, Tausendfüssler, Spinnentiere) und einiger anderer Tiere.



Bei der im Praktikum nachgewiesenen **Endochitinase aus *S. liquefaciens*** handelt es sich um eine extrazelluläre Chitinase mit einem Molekulargewicht von ~ 56 kDa. Die Abbildung zeigt die 3D-Struktur eines nah verwandten Enzyms aus *S. marcescens*.

Verwendetes Substrat:

- **Säuregequollenes Chitin:** Qualitativer Nachweis chitinolytischer Aktivität – nach längerer Inkubationszeit werden klare Abbauzonen in der ansonsten trüben Platte sichtbar.



1.2.6 Alpha-Amylase aus *Bacillus subtilis*

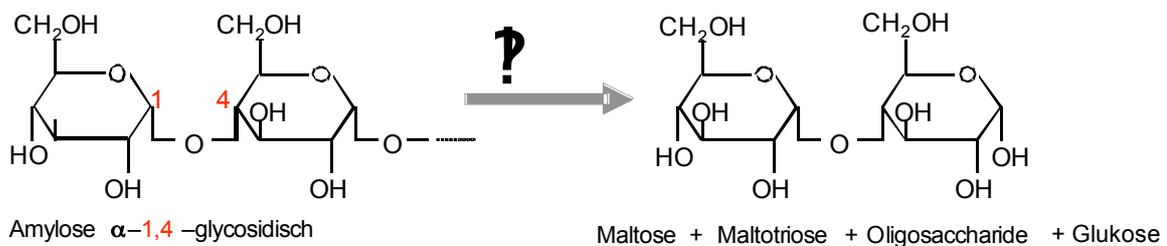
Als Amylasen werden Enzyme bezeichnet, die Stärke (den Hauptspeicherstoff der Pflanzen bestehend aus Amylose und Amylopektin) spalten und abbauen können. Viele Bakterien produzieren α -Amylasen (EC 3.2.1.1), die die $\alpha(1-4)$ -Glycosidbindung der Amylose spalten. Dadurch entstehen Dextrine und daraus Maltose, Glucose und verzweigte Oligosaccharide. β -Amylasen (EC 3.2.1.2) spalten vom Kettenende her jeweils ein Maltosemolekül nach dem anderen ab. Sie kann daher umso besser wirken, je mehr Kettenenden durch die α -Amylase bereits entstanden sind. Sie kommen nur bei Pflanzen vor. Biotechnologisch hergestellte Amylasen (aus Bakterien bzw. Pilzkulturen) werden häufig als Mehlbehandlungsmittel eingesetzt, wenn das Mehl zu wenig Gasbildungsvermögen aufweist.



Bei der im Praktikum nachgewiesenen α -Amylase von *B. subtilis* handelt es sich um ein extrazelluläres Enzym mit einem Molekulargewicht von ~ 41 kDa, einem Temperaturoptimum von 65°C und einem pH-Optimum von 6,5. Die Abbildung zeigt seine 3D-Struktur.

Verwendete Substrate:

- **Lösliche Stärke:** Nach Überschichtung der Stärkeplatte mit Lugol'scher Lösung ($\text{KJ} \cdot \text{J}_2$), die mit Stärke einen tiefblauen Komplex bildet entsteht ein farbloser Hof bei Stärkeabbau.



2. Zielsetzungen und Überblick

2.1 Zielsetzungen

Im Rahmen des Praktikums sollen verschiedene Exoenzym-produzierende Mikroorganismen hinsichtlich ihrer proteolytischen, lipolytischen, chitinolytischen, amylolytischen und cellulolytischen Aktivität untersucht werden. Im **ersten Teil des Kurses (Tag 1)** werden zunächst verschiedene Enzymaktivitäten mithilfe von Farbstoff- oder Fluoreszenz-markierten Substraten qualitativ und quantitativ nachgewiesen. An drei ausgewählten Beispielen wird zudem der Nachweis proteolytischer, cellulolytischer und lipolytischer Aktivität im SDS-Gel (Zymogramm) demonstriert. Im **zweiten Teil des Kurses (Tag 2)** sollen charakteristische Parameter (Temperatur- und pH-Optimum) einer gereinigten Cellulase aus *Clostridium stercoarium* bestimmt und das Zusammenwirken verschiedener Cellulasen beim Abbau kristalliner Cellulose untersucht werden.

2.2 Überblick

TAG 1 – Qualitativer und quantitativer Nachweis von Enzymen

- Eingangsgespräch (Test)
- Qualitativer Nachweis verschiedener Enzyme auf speziellen Agarplatten
- Quantifizierung verschiedener Enzyme mithilfe chromogener Substrate
- Ansetzen der Zymogramme

TAG 2 – Charakterisierung von Enzymen

- Auswertung der Zymogramme
- Charakterisierung der Endocellulase CelZ aus *Clostridium stercorarium*
- Synergistischer Abbau von Cellulose durch CelZ und CelY und ein CeYZ Fusionsprotein
- Abschließende Besprechung und Interpretation der Ergebnisse

3. Versuchsprotokolle

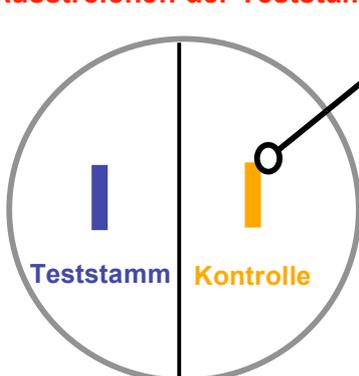
!!! Verhaltensregeln beim Arbeiten mit Mikroorganismen siehe Anhang 4.1 !!!

3.1 Qualitativer Nachweis von Enzymen

- | | | |
|-------------|----------------------------------|-----------------------------|
| ➤ Lipase | (<i>Serratia liquefaciens</i>) | Tributyryl-Platten |
| ➤ Chitinase | (<i>Serratia liquefaciens</i>) | Chitin-Platten |
| ➤ Protease | (<i>Serratia liquefaciens</i>) | Milch-Platten |
| ➤ Pektinase | (<i>Erwinia carotovora</i>) | Polygalacturonsäure-Platten |
| ➤ Cellulase | (<i>Erwinia carotovora</i>) | Cellulose-Platten |
| ➤ Amylase | (<i>Bacillus subtilis</i>) | Stärke-Platten |

Zusammensetzung der Agarplatten siehe Anhang 4.2

Ausstreichen der Teststämmen für die jeweils andere Gruppe



Die Platte wird zunächst in zwei Hälften geteilt: auf der linken Hälfte wird der entsprechende Teststamm mittels Impföse ausgestrichen (ca. 1 cm langer Strich). Auf der rechten Hälfte wird als Negativkontrolle ein *Escherichia coli* Laborstamm, der keine extrazellulären Enzyme produziert, ausgestrichen.

Auswertung bereits inkubierter Platten

- Stärke-Platten mit Lugol'scher Lösung überschichten
 - Polygalacturonsäure-Platten mit 10% Kupferacetat überschichten
 - Cellulose-Platten mit 0,5% Kongorot überschichten, 1 min einwirken lassen, abgießen und mit 1 M Natriumchloridlösung entfärben, dabei die Lösung mehrmals wechseln
- !!! Vorsicht Kongorot ist krebserregend – mit Handschuhen arbeiten !!!**
- Ergebnisse protokollieren; Unklarheiten können mit dem jeweiligen Betreuer diskutiert werden

3.2 Quantitativer Nachweis von Enzymen

- Lipase (*Serratia liquefaciens*) 4-Nitrophenol-Palmitat
- Protease (*Serratia liquefaciens*) Azocasein
- Cellulase (*Erwinia carotovora*) Carboxymethylcellulose, DNSA

Ansetzen der Enzymtests

1) LIPASE

Material

- Substratlösung** 1 Volumen 0,3% (w/v) *p*-Nitrophenyl palmitat in Isopropanol + 9 Volumen 0,2% (w/v) Natriumdesoxycholat und 0,1% (w/v) Gummi Arabicum in 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 8,0
- Enzymlösung** sterilfiltrierter Kulturüberstand von *S. liquefaciens*; Negativ-Kontrolle sterilfiltrierter Kulturüberstand von *E. coli*, Nullwert LB-Medium
- Abstoppen** 1 M Natriumcarbonat-Lösung

Versuchsansatz Doppelansätze

- Mischen von 100 µl Kulturüberständen bzw. 100 µl LB-Medium mit 900 µl Substratlösung in 2 ml Eppendorfreaktionsgefäßen (Cap)
- 15 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT)
- Zentrifugation für 5 min bei 12.000 rpm
- Überstände in Küvetten überführen und 1 ml Natriumcarbonatlösung zugeben, mischen
- Photometrisches Vermessen der Absorption bei 410 nm gegen die Nullprobe (LB-Wert)

2) PROTEASE

Material

Substratlösung	2% Azocasein in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
Enzymlösung	sterilfiltrierter Kulturüberstand von <i>S. liquefaciens</i> ; Negativ-Kontrolle sterilfiltrierter Kulturüberstand von <i>E. coli</i> , Nullwert LB-Medium
Fällung	10% Trichloressigsäure
Kontrastierung	1 M Natriumhydroxid-Lösung

Versuchsansatz Doppelansätze

- Mischen von 150 µl Kulturüberständen bzw. 150 µl LB-Medium mit 250 µl Substratlösung in 2 ml Eppendorfreaktionsgefässen (Cap)
- 3 h Inkubation bei 40°C
- Zugabe von 1,2 ml 10% Trichloressigsäure
- 15 min Inkubation bei RT
- Zentrifugation für 5 min bei 12.000 rpm
- 600 µl der Überstände in Küvetten überführen und 750 µl Natriumcarbonatlösung zugeben, mischen
- photometrisches Vermessen der Absorption bei 440 nm gegen die Nullprobe (LB-Wert)

3) CELLULASE

Material

Substratlösung	1% (w/v) Carboxymethylcellulose in H ₂ O
Enzymlösung	sterilfiltrierter Kulturüberstand von <i>E. carotovora</i> ; Negativ-Kontrolle sterilfiltrierter Kulturüberstand von <i>E. coli</i> , Nullwert LB-Medium
Reaktionspuffer	1 M Tris/HCl, pH 7,5
DNSA-Lösung	3,5-Dinitrosalicylsäure 10 g Phenol 2 g Dinatriumsulfit 0,5 g Kalium-Natrium-Tartrat 200 g ad 1000 ml mit NaOH (1%)

Versuchsansatz Doppelansätze

- 250 µl Substratlösung mit 25 µl 1 M Tris/HCl, pH 7,5 und 225 µl Kulturüberständen bzw. LB-Medium in 2 ml Caps mischen
- 3 h bei 40°C inkubieren
- Zugabe von 750 µl DNSA-Reagenz, Caps mit eine Kanüle oben anstechen
- 15 min im Wasserbad kochen
- Überstand in Küvetten überführen
- photometrisches Vermessen der Absorption bei 575 nm gegen die Nullprobe (LB-Wert)

3.3 Zymogramme

- Lipase (*Serratia liquefaciens*) Methylumbelliferyl-Butyrat
- Protease (*Serratia liquefaciens*) Azocasein
- Cellulase (*Erwinia carotovora*) Carboxymethylcellulose, Kongorot

Die Gele werden jeweils am ersten Praktikumstag angesetzt und dann am zweiten Praktikumstag inkubiert und ausgewertet.

Auftrennung der Proteine im Kulturüberstand mittels SDS-PAGE (siehe Anhang 4.2.2)

Hierzu werden 50-fach aufkonzentrierte Überstände von *S. liquefaciens* und *E. carotovora* auf 3 SDS-PAGE Gele aufgetragen (Gel 1 – Cellulase-Zymogramm / Gel 2 – Protease-Zymogramm / Gel 3 – linke Hälfte Lipase-Zymogramm, rechte Hälfte Coomassie-Färbung der Proteine im Überstand). Zur Detektion von Proteinen mit proteolytischer oder cellulolytischer Aktivität in der SDS-PAGE (Zymogramm) wurden in die Trenngelmatrix 0,1% (w/v) der entsprechenden gelösten Substrate (Azocasein oder CMC) einpolymerisiert. Zur Detektion lipolytischer Aktivität wird das renaturierte Proteingel nachträglich mit 0,01 M Methylumbelliferylbutyrat überschichtet.

Renaturierung von Proteinen im SDS-Gel

Die durch die denaturierende PAGE inaktivierten Enzyme müssen vor der eigentlichen Inkubation zunächst renaturiert werden. Die Wahl der Puffer richtet sich nach dem pH-Optimum des jeweils zu renaturierenden Proteins. Der Zusatz von Isopropanol erleichtert das Auswaschen von SDS.

Material

Renaturierungspuffer I 25% (v/v) Isopropanol in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5

Renaturierungspuffer II 50 mM Tris/HCl, pH 7,5

Arbeitsprotokoll

- Gel nach der Elektrophorese 2 x wechselweise in Renaturierungspuffer I bzw. II unter leichtem Schwenken 10 min bei RT inkubieren, den Abschluß bildet Puffer II
- Inkubation des Gels ÜN bei 4°C in Renaturierungspuffer II (die lange Renaturierung ist nicht bei allen Enzymen notwendig, empfiehlt sich jedoch immer bei unbekanntem Renaturierungsverhalten)

Inkubation und Gelfärbung

- nach **Renaturierung der Proteine** Inkubation unter optimalen Bedingungen (pH, Temperatur) z.B. in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 3 h bei 40°C; Inkubationszeit je nach Aktivität des Enzyms variabel
- zur **Visualisierung der Lipase** das Gel mit 0,01 M Methylumbelliferyllösung überschichten, in Frischhaltefolie packen und ca. 15 min bei 30°C inkubieren, anschließend unter UV (Handlampe) betrachten – lipolytische Enzyme können anhand ihrer blauen Fluoreszenz lokalisiert werden

- zur **Visualisierung der Cellulase** das Carboxymethylcellulose-Gel 10 min mit 0,5% Kongorot färben und schließlich mit 1 M NaCl entfärben - die glukanalytischen Enzyme lassen sich anhand des hellen Hofes im ansonsten rot-gefärbten Gel lokalisieren
- zur **Visualisierung der Protease** das Azocasein-Gel mit 1 M NaOH überschichten – die proteolytischen Enzyme lassen sich anhand des hellen Hofes im ansonsten orange-gefärbten Gel lokalisieren

3.4 Charakterisierung der Endoglukanase CelZ aus *Clostridium stercorarium*

Enzyme zeichnen sich durch bestimmte biochemische Parameter wie Substratspektrum, Temperaturoptimum, Temperatur-Stabilität und pH-Optimum aus. Die in *E. coli* rekombinant exprimierte Endocellulase CelZ wurde mittels Affinitätschromatographie gereinigt; im Rahmen des Praktikums sollen nun beispielhaft Temperatur- und pH-Optimum des Enzyms ermittelt werden.

Bestimmung des Temperaturoptimums

Doppelansätze; Nullwert mit H₂O

Zur Bestimmung des Temperatur-Optimums wird das gereinigte Enzyme mit Carboxymethylcellulose für 2 h bei verschiedenen Temperaturen inkubiert (siehe 3.2 CELLULASE). Die Aktivität wird anschließend mittels DNSA-Test quantifiziert.

Reaktionsansatz	Enzym-Lösung oder	10 µl
	1 M Tris/HCl, pH 6,0	25 µl
	1 %ige CMC-Lösung	250 µl
	H ₂ O	215 µl

Inkubationstemperaturen

Raumtemperatur, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C und 90°C

Bestimmung des Temperaturoptimums

Doppelansätze; Nullwert mit H₂O

Für die Bestimmung des pH-Bereiches mit optimaler enzymatischer Aktivität werden Reaktions-Puffer mit im jeweiligen Bereich ausreichender Pufferkapazität verwendet. Der pH-Wert der verwendeten Puffer wurde bei 70°C eingestellt (Inkubationstemperatur von CelZ). Die Aktivität wird bei 70°C mit dem Substrat Carboxymethylcellulose nach einer Inkubationszeit von 2 h mittels DNSA-Test bestimmt (siehe 3.2 CELLULASE).

Verwendete Puffersysteme

pH 3,0 - 6,0	Succinat-Puffer
pH 6,0 - 10,0	Tris/HCl-Puffer
pH 10,0 - 13,0	Glycin/NaOH-Puffer

Reaktionsansatz	Enzym-Lösung oder H ₂ O	10 µl
	jeweiliger Puffer 1M	25 µl
	1 %ige CMC-Lösung	250 µl
	H ₂ O	215 µl

Auswertung der Ergebnisse

Die gemessenen Enzymaktivitäten werden jeweils auf den Maximalwert bezogen, in Prozent umgerechnet und als Diagramm dargestellt. Die Ergebnisse werden mit den Betreuern diskutiert.

3.5 Synergistischer Celluloseabbau durch CelZ, CelY und das Fusionsprotein CelYZ

Zur Demonstration des synergistischen Zusammenwirkens der Endoglukanase CelZ und der Exoglukanase CelY beim Abbau mikrokristalliner Cellulose wird der Abbau von Avicel durch die Einzelenzyme und die Kombination beider Enzyme untersucht. Zudem soll gezeigt werden, dass die räumliche Nähe der katalytischen Domänen wesentlichen Einfluss auf den Synergismus hat – hierzu wird der Abbau von Avicel durch ein Fusionsprotein aus beiden Enzymen analysiert. Alle Enzyme wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Im Reaktionsansatz werden jeweils äquivalente Mengen der Enzyme eingesetzt. Da die Inkubationszeit beim Abbau mikrokristalliner Cellulose den Rahmen des Praktikums sprengen würde, wurden die Reaktionsansätze am Vortag von den Betreuern angesetzt.

Reaktionsansätze Doppelansätze - Nullwert H₂O

Enzym-Lösung	x µl CelY oder CelZ oder CelY und CelZ oder CelYZ
1 M Tris/HCl, pH 6,0	50 µl
2 %ige Avicellösung	500 µl
H ₂ O	(450 - x) µl

- Inkubation für 24 h bei 70°C
- Zentrifugation für 5 min bei 12.000 rpm
- 500 µl Überstand abheben und in neues 2 ml Cap überführen
- 750 µl DNSA-Reagenz zugeben
- Inkubation des Ansatzes für 15 min im 100°C Wasserbad
- nach dem Abkühlen die Absorption bei 575 nm im Photometer bestimmen

Auswertung

Die Summe der Aktivitäten der Einzelenzyme soll mit der Aktivität der Enzymkombination und der des Fusionsproteins verglichen werden. Der *degree of synergism* (DSE-Wert) ist definiert als der Quotient aus synergistischem Substratabbau und der Summe der Einzelaktivitäten. Man spricht nur dann von synergistischem Zusammenwirken zweier Enzyme, wenn ihr DSE-Wert größer 1 ist.

$$\text{DSE} = \frac{\text{Glukose-Äquivalente E1 + E2}}{\text{Glukose-Äquivalente E1 + Glukose-Äquivalente E2}}$$

E1 = Endoglukanase CelZ

E2 = Exoglukanase CelY

4. Anhang

4.1 Sicherheit

NOTRUF 112

Obwohl es sich bei den Stämmen, mit denen im Rahmen dieser Praktikums gearbeitet werden soll, lediglich um Bakterien mit geringem bis mäßigem Risiko für Mensch und Umwelt handelt, müssen bestimmte Verhaltensregeln eingehalten werden.

4.1.1 Allgemeines

In erster Linie sollten die **Grundregeln guter mikrobiologischer Technik** eingehalten werden, insbesondere:

- kein Essen, Trinken oder Rauchen im Labor!
- bei sterilen Arbeiten (z.B. Animpfen) **wenn möglich** neben der offenen Flamme (Bunsenbrenner) arbeiten
- die Bildung von Aerosolen vermeiden, Sauberkeit am Arbeitsplatz und im Labor (am Ende **jedes** Praktikumsstages müssen alle Flächen mit 70%igem EtOH gründlich desinfiziert werden)
- bei **allen** Arbeiten sind **Schutzkittel** zu tragen (bei Spritzgefahr auch Schutzbrille), bei Bedarf (Umgang mit Gefahrstoffen) auch Handschuhe, die Schutzbekleidung darf nicht außerhalb der Arbeitsräume getragen werden (Labormantel sollte nach dem Praktikum gewaschen werden!)
- feste Abfälle (Pipettenspitzen, Caps etc.) in feste Abfallbehälter, die regelmäßig ausgeleert werden sollten
- flüssige Abfälle in bedeckte Glasgefäße, die deutlich beschriftet werden müssen
- nach dem Arbeiten Geräte, Gefäße, Arbeitsplatz und Hände desinfizieren
- bei Verschütten von Bakterienkultur: **sofort** den kontaminierten Bereich sperren und einen der Betreuer benachrichtigen, desinfizieren, alle Abfälle autoklavieren
- Türen und Fenster geschlossen halten

!!! Zutritt zu den Praktikumsräumen haben nur Personen, die von den Betreuern oder durch von ihm autorisierte Dritte hierzu ermächtigt wurden !!!!

4.1.2 Maßnahmen bei Stör- und Notfällen

- bei Verschütten von Flüssigkulturen Flächendesinfektion mit 70% EtOH nach Anleitung des Betreuers - Warnung an die anderen Mitarbeiter
- bei Hautkontakt - Desinfektion mit 70% EtOH
- bei Augenkontakt - Augendusche
- beim Verschlucken - rasch möglichst viel Wasser trinken, kein Erbrechen auslösen,
- Notarzt!
- beim Einatmen - Betroffenen an die frische Luft bringen. Notarzt !
- bei Verletzungen und allen außergewöhnlichen Vorkommnissen Betreuer verständigen

Ansprechpartner: Dr. Kathrin Riedel (kriedel@botinst.unizh.ch / 0044 634 8227)

4.2 Medien und Lösungen

4.2.1 Agarplatten zum Nachweis hydrolytischer Enzyme

Luria-Broth (LB)-Medium

Caseinhydrolysat	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	4 g
H ₂ O	ad 1000 ml

LB-Agar: wie oben, aber mit 15 g / l Agar

ABC-Minimal-Medium

Komponente A:	(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g
	Na ₂ HPO ₄	60 g
	KH ₂ PO ₄	30 g
	NaCl	30 g
	H ₂ O	ad 1000 ml

Komponente B:	1 M MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2 ml
	0.5 M CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.2 ml
	0.01 M FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0.3 ml
	H ₂ O	ad 900 ml

Komponente C: 1 M NaCitrat oder 20% Glukose 10 ml / l

Die drei Lösungen A, B, und C werden getrennt voneinander autoklaviert. Anschließend werden pro Liter Medium 900 ml B, 100 ml A und 10 ml C steril gemischt. Wenn Agarplatten benötigt werden, pro Liter Medium 20 g Agar in Lösung B mitautoklavieren!

Tributylin-Agar

LB-Agar dem 1% (v/v) Tributyrin zugesetzt wurden.

Chitin-Agar

Minimalmedium-Agar mit Glukose als C-Quelle und 0,1% säuregequollenem Chitin aus Krabbenschalen (2 h Inkubation mit HCl_{konz}, mehrmaliges Waschen mit H₂O, pH mit NaOH auf 7,0 einstellen).

Milch-Agar

LB-Agar dem 2% (w/v) Magermilchpulver zugesetzt wurden.

Polygalacturonsäure-Agar

Minimalmedium-Agar dem als C-Quelle anstatt von Glukose oder Citrat 0,2% (w/v) Polygalacturonsäure zugegeben werden.

Carboxymethylcellulose-Agar

LB-Agar dem 0.01 % Carboxymethylcellulose zugesetzt werden.

Stärke-Agar

1,0% (w/v) Caseinhydrolysat, 1,0% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) di-Kaliumhydrogen-phosphat, 0,3% (w/v) lösliche Stärke und 1,5% (w/v) Agar.

4.2.2 SDS-PAGE Gele für Zymogramme**Material****Acrylamid-Stammlösung**

Fertige Lösung 30 % (w/v) Acrylamid
0,8 % (w/v) Bisacrylamid (Applichem)

Ammoniumpersulfat (APS)

10 % (w/v) APS in H₂O
Lagerung in Aliquots bei -20°C

Trenngel-Puffer (TG)

Tris Bas 18,2 g
SDS 10% (w/v) 4 ml
H₂O ad 100 ml
pH 8,8 mit HCl einstellen

TEMED

Tetramethylethylendiamin

Abdicht-Agarose

1% (w/v) in H₂O

Sammelgelpuffer (SG)

Tris Base 6,1 g
SDS 10% (w/v) 4 ml
H₂O ad 100 ml
pH 6,8 mit HCl einstellen

Pipettierschema für 3 diskontinuierliche Gele bestehend aus Trenngel und Sammelgel

Gel	Acrylamid (ml)	Gelpuffer (ml)	H ₂ O (ml)	Substrat (ml)	APS/TEMED (µl)
5 % SG	3,34	5 (SG-Puffer)	11,6	/	150 / 15
12 % TG	16	10 (TG-Puffer)	14	/	250 / 25
12 % TG (Azocasein)	16	10 (TG-Puffer)	10	4 2% Azocasein	250 / 25
12 % TG (CMC)	16	10 (TG-Puffer)	14	4 1% CMC	250 / 25

Probenauftrag und Elektrophorese

Auftragspuffer (4-fach)

Glycerin	7,5 ml
β -Mercaptoethanol	2,5 ml
SDS	1,2 g
Bromphenolblau (1%)	200 μ l
Tris Base	0,4 g
H ₂ O	ad 50 ml
pH 6,8 mit HCl einstellen	

Elektrophorese-Puffer (10-fach)

Tris Base	30,3 g
Glycin	144,1 g
SDS	10,0 g
H ₂ O	ad 1000 ml

- Gelplatten in die Elektrophorese-Apparatur einspannen, darauf achten, dass Pufferkammern dicht abschließen
- Anoden und Kathodenkammer mit 1-fach Elektrophorese-Puffer füllen
- Gelkamm vorsichtig entfernen
- Proben im Verhältnis 3:1 mit Auftragspuffer mischen und 3-5 min bei 100°C im Wasserbad denaturieren
- Proben in die Taschen auftragen (max. 20 μ l pro Tasche)
- Gellauf bei 30-40 mA
- die Elektrophorese ist beendet, wenn die Bromphenolblau-Front die untere Gelkante erreicht hat (ca. 1,5 h)

Coomassie-Färbung

Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue (Serva Blue R)	1,5 g
Methanol	455 ml
Eisessig	80 ml
H ₂ O	ad 1000 ml

Entfärber

Methanol	250 ml
Eisessig	300 ml
H ₂ O	ad 5000 ml

- Färbung der Gele für 15 min im 60°C-Wasserbad (Plastikbehälter)
- Entfärben der Gele mit Entfärber unter Zugabe eines Küchenpapiers zur Farbstoff-Adsorption für mindestens 30 min im 60°C-Wasserbad

4.3 Anforderungsprofil und Übungsfragen

- Vor Beginn der Laborarbeiten wird in einem kurzem Eingangsgespräch geprüft, ob Sie sich mittels Praktikumsskript und angegebener Hintergrundliteratur ausreichend auf das Praktikum vorbereitet haben.
- Während des Praktikums werden von Ihnen in einem Laborbuch Ablauf und Ergebnisse der Experimente protokolliert.
- Gegen Ende des 2. Praktikumstages werden die Ergebnisse von Ihnen zusammen mit den Betreuern zusammengefasst und interpretiert.
- Jede Gruppe verfasst einen schriftlichen Bericht, der die Ergebnisse der Experimente darstellt und interpretiert. Eine Anleitung zu Aufbau und Format der Berichte finden Sie im Internet z.B. unter www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio-132_05/docs/berichtformat.html

Übungsfragen:

- Was versteht man unter dem Begriff „Exoenzym“?
- Nennen Sie einige Beispiele für Biopolymere; wie werden Sie abgebaut?
- Nennen Sie einige Beispiele für industriell genutzte bakterielle Enzyme und ihre Ursprungsorganismen?
- Nennen Sie ein Beispiel für ein lebensmittelverderbendes Bakterium, welche Enzyme spielen dabei eine Rolle?
- Wie können mikrobielle Enzyme im Labor qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden (nennen Sie Enzym, Substrat und beschreiben Sie das Nachweisverfahren)?
- Was versteht man unter synergistischem Zusammenwirken von Enzymen, nennen Sie ein Beispiel?
- Erklären Sie den Begriff „Zymogramm“?
- Welche Verhaltensregeln gelten grundsätzlich bei der Arbeit mit Mikroorganismen im Labor?

4.4 Literatur und Informationssysteme im Internet

Brock Biology of Microorganisms (11. Ausgabe, Pearson Education International)

von Michael T. Madigan, John M. Martinko, Thomas D. Brock

Unit I Kapitel 2.4:	Physiologische Diversität – Ernährungsformen von Mikroorganismen
Unit I Kapitel 3:	Chemische Grundlagen – Makromoleküle
Unit I Kapitel 5.3:	Kultivierung von Mikroorganismen
Unit I Kapitel 5.5:	Katalyse und Enzyme
Unit II Kapitel 12.11:	Enterobacteriaceae (<i>Erwinia</i> sp.; <i>Serratia</i> sp.)
Unit II Kapitel 12.20:	Gram-positive Endosporenbildner (<i>Bacillus</i> sp.; <i>Clostridium</i> sp.)
Unit IV Kapitel 19.9:	Kohlenstoff-Kreislauf (Überblick)
Unit IV Kapitel 19.11:	Kohlenstoff-Kreislauf im Pansen
Unit V Kapitel 29.1:	Mikroorganismen als Lebensmittelverderber
Unit VI Kapitel 30.1:	Industriell genutzte Mikroorganismen (Überblick)
Unit VII Kapitel 30.9:	Enzyme als industrielle Produkte
Unit VII Kapitel 31.1:	Genetic Engineering (Überblick)

Enzymes at work

Broschüre zur industriellen Anwendung von Enzymen

http://www.novozymes.com/library/Downloads/Publications/Enzymes_2004.pdf

BRENDA Enzym Informationssystem

Informationen zu

- Nomenclature Reaction & Specificity Functional Parameters
- Isolation & Preparation
- Stability Enzyme Structure Disease & References
- Application & Engineering

<http://www.brenda.uni-koeln.de/>

EXPASY Enzym Informationssystem

Enzyme Nomenklatur und weitere Links

<http://www.expasy.org/enzyme/>