

**Autodisplay von Cellulasen auf *Pseudomonas putida*, *Zymobacter palmae* und
Zymomonas mobilis - ein Ganzzell-Ansatz zur vereinfachten Hydrolyse von
Cellulose**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

in der NRW Graduate School of Chemistry

im Fachbereich Chemie und Pharmazie

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Iasson Elias Philippos Tozakidis

aus Lippstadt

- 2016 -

Dekan:	Prof. Dr. Andreas Heuer
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Joachim Jose
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Henning D. Mootz
Tag der mündlichen Prüfung:	20.07.2016
Tag der Promotion:	20.07.2016

Schriftenreihe der Reiner Lemoine-Stiftung

Iasson Elias Philippos Tozakidis

**Autodisplay von Cellulasen auf *Pseudomonas putida*,
Zymobacter palmae und *Zymomonas mobilis***

Ein Ganzzell-Ansatz zur vereinfachten Hydrolyse von Cellulose

D 6 (Diss. Universität Münster (Westfalen))

Shaker Verlag
Aachen 2016

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Münster (Westfalen), Univ., Diss., 2016

Copyright Shaker Verlag 2016

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-4685-4

ISSN 2193-7575

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel sind in der Dissertation angegeben.

Diese Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Münster, den 31.05.2016

Iasson Elias Philippos Tozakidis

Inhaltsverzeichnis

I Zusammenfassung	1
II Einleitung	3
1 Biotreibstoffe als Alternative zu Rohöl-basierten Treibstoffen	3
2 Cellulose als Rohstoff für Biokraftstoffe der zweiten Generation	4
2.1 Chemische Struktur	5
2.2 Assoziation mit anderen Polymeren	6
2.3 Enzymatischer Abbau	7
3 Konzepte zur Transformation von Cellulose	12
3.1 Grundlegender Ablauf	12
3.2 Prozessführung	14
4 Ethanologene Bakterien	18
4.1 <i>Zymomonas mobilis</i>	18
4.2 <i>Zymobacter palmae</i>	20
5 Oberflächenpräsentation mit Autodisplay	21
5.1 Mechanistische Aspekte	22
5.2 Biotechnologische Anwendungen	23
5.3 AIDA-I und MATE	24
III Ziele der Arbeit	26
IV Material und Methoden	27
1 Materialien	27
1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial	27
1.2 Chemikalien	29
1.3 Bakterienstämme	31
1.4 Oligonukleotide	32
1.5 Plasmide	33
1.6 Enzyme	34
1.7 Nährmedien	34

1.8 Puffer und Lösungen	35
1.9 Reagenziensätze	37
1.10 Software	37
2 Methoden	38
2.1 Grundlegende mikrobiologische Arbeiten	38
2.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren	40
2.3 Arbeiten mit Proteinen	43
2.4 Analytik der Esteraseaktivität	45
2.5 Analytik der Cellulaseaktivität	46
2.6 Prüfung der Oberflächenpräsentation	47
V Experimente und Ergebnisse	50
1 Autodisplay der Esterase EstA zur Konzeptprüfung	50
1.1 Konstruktion eines geeigneten Plasmids zur Proteinexpression	50
1.2 Expression des MATE-EstA Fusionsproteins	52
1.3 Prüfung der Oberflächenpräsentation	54
1.4 Untersuchung der Esteraseaktivität ganzer Zellen	58
2 Autodisplay der bakteriellen β -Glucosidase BglA	61
2.1 Konstruktion und Expression von MATE-BglA	61
2.2 Prüfung der Oberflächenpräsentation	63
2.3 Untersuchungen zur hydrolytischen Aktivität von BglA	65
3 Autodisplay der bakteriellen Endocellulase Cel5A	69
3.1 Konstruktion und Expression von MATE-Cel5A	69
3.2 Prüfung der Oberflächenständigkeit	71
3.3 Untersuchungen zur hydrolytischen Aktivität von Cel5A	73
4 Autodisplay der bakteriellen Exocellulase CelK	77
4.1 Konstruktion und Expression von MATE-CelK	78
4.2 Prüfung der Oberflächenständigkeit	79
4.3 Untersuchungen zur hydrolytischen Aktivität von CelK	81
5 Kombinierte Anwendung der Ganzzellkatalysatoren auf Filterpapier	84

6 Temperaturabhängigkeit der Glukose-Aufnahme von <i>P. putida</i>	90
7 Wiederverwendbarkeit und Temperaturstabilität der Ganzzellkatalysatoren.....	91
VI Diskussion.....	93
1 Autodisplay der Esterase EstA zur Konzeptprüfung	93
2 Autodisplay der bakteriellen Cellulasen BglA, CelK und Cel5A	98
2.1 Temperaturprofile der Ganzzellkatalysatoren	99
2.2 Abbau von Filterpapier	101
2.3 Kompatibilität anderer β -Glucosidasen mit MATE	105
VII Fazit und Ausblick	108
Literaturverzeichnis	111
Anhang	127
1 Abkürzungsverzeichnis	127
2 DNA- und Aminosäure-Sequenzen	128
3 Plasmidkarten	135
4 Veröffentlichungen	136
5 Lebenslauf	138