



Inst. for Genetic Engineering, Ecology, and Health (IGEEH)  
Verein für Gentechnik, Ökologie und Gesundheit (VGÖG) e.V.  
Haid-und-Neu-Str. 7  
D-76131 Karlsruhe  
Tel. +49 (0)721 9658-559  
<http://www.zgoeg.de>

**Purification and Characterization of a Glucose-I-Phosphatase from *Pantoea agglomerans***

**Research Report**

August 2002 – January 2003

Author: **Samir Mourad**

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>4</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>5</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
2.1 PHYTASEN UND PHYTINSÄURE	6
2.2 (BISHERIGE ARBEITEN ZUR) CHARAKTERISIERUNG VON PHYTASEN AUS VERSCHIEDENEN MIKROORGANISMEN	6
2.3 <i>PANTOEA AGGLOMERANS</i>	6
2.4 AUFGABENSTELLUNG	6
<b>3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>7</b>
3.1 PROTEINCHEMISCHER TEIL	7
3.1.1 <i>Phytasebildung</i>	7
3.1.2 <i>Lokalisierung der Phytase</i>	7
3.1.3 <i>Isolierung und Reinigung der Pantoea agglomerans Phytase</i>	7
3.1.3.1 Vorläufiges Reinigungsverfahren als Ansatz	8
Ammoniumsulfat-Fällung	8
CM-Sepharose	9
Mono Q FPLC	10
Mono S FPLC	10
SDS-Gelelektrophorese	11
3.1.3.2 Reinigung der P. agglomerans Phytase – 1. Durchgang	12
Ammoniumsulfat-Fällung	12
CM-Sepharose	13
Mono Q FPLC	14
Gelfiltration (S200)	15
Mono S FPLC	17
SDS-Gelelektrophorese	17
Gelfiltration (S200)	18
SDS-Gelelektrophorese – Färbung mit Silber	19
3.1.3.3 Reinigung der P. agglomerans Phytase – 2. Durchgang	19
CM-Sepharose	21
Mono Q FPLC	22
Gelfiltration (S200)	23
Mono S FPLC	25
SDS-Gelelektrophorese – Färbung mit Commassie	25
3.1.4 <i>Charakterisierung der P. agglomerans Phytase</i>	26
3.1.4.1 Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	26
3.1.4.2 N-terminale Sequenz der <i>P. agglomerans</i> Phytase	26
3.1.4.3 Aminosäureanalyse	26
3.1.4.4 Enzymologische Eigenschaften der <i>P. agglomerans</i> Phytase	27
3.1.4.4.1 Aufbewahrung der Enzympräparationen	27
3.1.4.4.2 pH-Optimum	27
3.1.4.4.3 Temperaturoptimum und Temperaturstabilität	28
3.1.4.4.3.1 Temperaturoptimum	28
3.1.4.4.3.2 Temperaturstabilität	29
3.1.4.4.4 Substratspezifität	30
3.1.4.4.5 Kinetische Konstanten ( $K_M$ , $v_{max}$ , $k_{cat}$ )	30
<b>4. MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>32</b>
4.1 MATERIALIEN	32
CHEMIKALIEN	32
4.2 METHODEN	32
4.2.1 <i>Absorptionsmessungen</i>	32
4.2.2 <i>Sterilisation von Lösungen und Geräten</i>	32
4.2.3 <i>Kultivierung von Pantoea agglomerans Zellen</i>	32
4.2.4 <i>Aufschluß von Pantoea agglomerans Zellen</i>	32
4.2.5 <i>Phytase-Aktivitätsbestimmung</i>	33
4.2.6 <i>Arbeiten mit Protein</i>	33
4.2.6.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	33
4.2.6.1.1 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese	33
4.2.6.1 Proteinszenierung	34



## Abkürzungen

AAM	Aceton-Acid-Molybdat
ac	Acetat
Da	Dalton (g/mol)
kDa	Kilo-Dalton
$\Delta E$	Extinktionsdifferenz
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
G	Erdbeschleunigung
Hac	Essigsäure
Kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertoni-Medium
<i>P.agglomerans</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSA	Rinderserumalbumin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität ( $\mu\text{mol}$ Substratumsatz / min)

## 1. Zusammenfassung

## 2. Einleitung

### **2.1 Phytasen und Phytinsäure**

### **2.2 (Bisherige Arbeiten zur) Charakterisierung von Phytasen aus verschiedenen Mikroorganismen**

### **2.3 *Pantoea agglomerans***

### **2.4 Aufgabenstellung**

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Proteinchemischer Teil

##### 3.1.1 Phytasebildung

Zunächst einmal war der Verlauf der Phytaseaktivität während des Wachstumszyklusses von *Pantoea agglomerans* von Interesse, da ein hoher Anteil an Phytase am Gesamtprotein die Aufreinigung erleichtern würde. *Pantoea agglomerans* wurde in verschiedenen Medien wachsen gelassen. Es wurde jeweils die Phytaseaktivität gemessen, um so ein möglichst optimales Medium für den weiteren Aufreinigungsvorgang zu ermitteln. Es wurden *Pantoea agglomerans*-Kulturen in folgenden Medien für 18-20 h unter aeroben Bedingungen bei 37°C wachsen gelassen:

LB

LB + 1 g/l Na-Phytat

PSM [6]

PSM + 0,5 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

PSM + 1 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

PSM + 2 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Es zeigte sich, daß keine wesentlichen Unterschiede bzgl. der Menge der gebildeten Phytase in den verschiedenen Medien besteht. Daher wurde im weiteren Verlauf lediglich LB-Medium als Medium verwendet.

##### 3.1.2 Lokalisierung der Phytase

Bei der *P. agglomerans* Phytase handelt es sich um ein intrazelluläres Enzym. Im verbrauchten Medium konnte keine Phytase nachgewiesen werden.

##### 3.1.3 Isolierung und Reinigung der *Pantoea agglomerans* Phytase

Zur Isolierung und Reinigung der Phytase wurde *P. agglomerans* Zellen verwendet, die unter aeroben Bedingungen gewachsen waren und in der stationären Phase geerntet wurden.

Zur Isolierung der Phytase wurde die *P. agglomerans* Zellwand durch Ultraschallbehandlung zerstört. Andere Methoden zur Zerstörung der Zellwand (Einfrieren/Auftauen und Lysozymverdau) brachten keine so große Ausbeute an Phytase wie die Methode der Ultraschallbehandlung.

Da weder ein ausgearbeitetes Verfahren zur Reinigung des Enzyms zur Verfügung stand, noch die physikalischen Parameter des Proteins vorlagen, wohl aber einige Erfahrungen mit anderen bakteriellen Phytasen vorhanden waren, sollte zunächst ein vorläufiges Reinigungsverfahren ansatzweise ausprobiert werden.

**3.1.3.1 Vorläufiges Reinigungsverfahren als Ansatz**  
(16.9.02-9.10.02)

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Gesamt-protein [mg]	Gesamt-aktivität [U]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Reinigungs-faktor	Ausbeute [%]
Rohextrakt	58		9 (muß mehr sein, in nichtl. Bereich gemessen)		1	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fällung	18,5		3 (muß mehr sein, in nichtl. Bereich gemessen)			33(muß mehr sein, in nichtl. Bereich gemessen)
CM-Sepharose	67		2,77			30,8
Mono Q	4		0,46 (muß mehr sein, in nichtl. Bereich gemessen)			5(muß mehr sein, in nichtl. Bereich gemessen)
Mono S	6		0,47			5

**Tabelle 1: Ansatzweises Reinigungsschema der P.agglomerans Phytase**

Ammoniumsulfat-Fällung

(siehe Protokoll vom 16.9.02/1)

## CM-Sepharose

Puffer: 20 mM Naac, pH5

Elution der CM-Sepharose mit einem Gradienten: 0-1M NaCl im gleichen Puffer. Fraktionsgröße: 10ml

Elutionsdiagramm: siehe Daten aus Protokoll 22.9.02./1

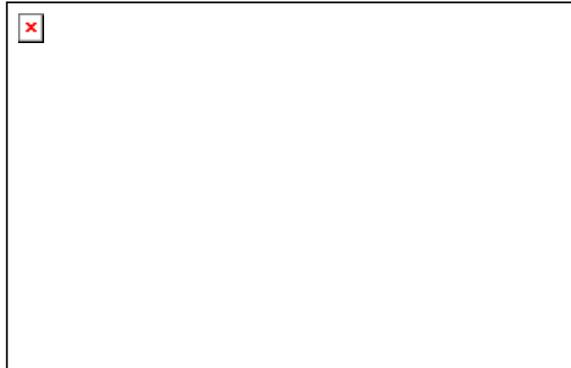


Abb.1

Zur weiteren Reinigung wurden Fraktionen 37-42 gepoolt (d.h. zusammengesüttet).  
Danach wurde zunächst auf eine Mono-S Säule gegangen, jedoch ist das Enzym vollständig durchgelaufen bereits beim Auftrag. Deshalb wurde auf eine Mono-Q Säule gegangen.

## Mono Q FPLC

Elutionsdiagramm: siehe Daten aus Protokoll 2.10.02./1

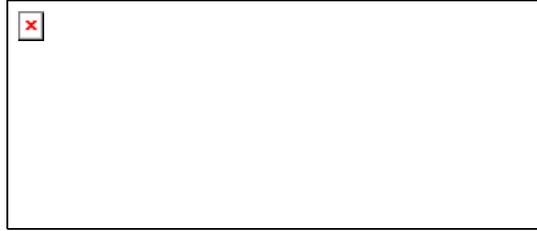


Abb.2

## Mono S FPLC

Elutionsdiagramm: siehe Daten aus Protokoll 3.10.02./3

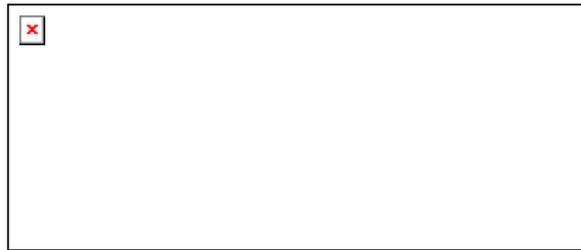


Abb.3

## SDS-Gelelektrophorese

Nach Elution der Mono S FPLC wurden die Proteine der Enzymflsg. durch einen Gellauf analysiert.

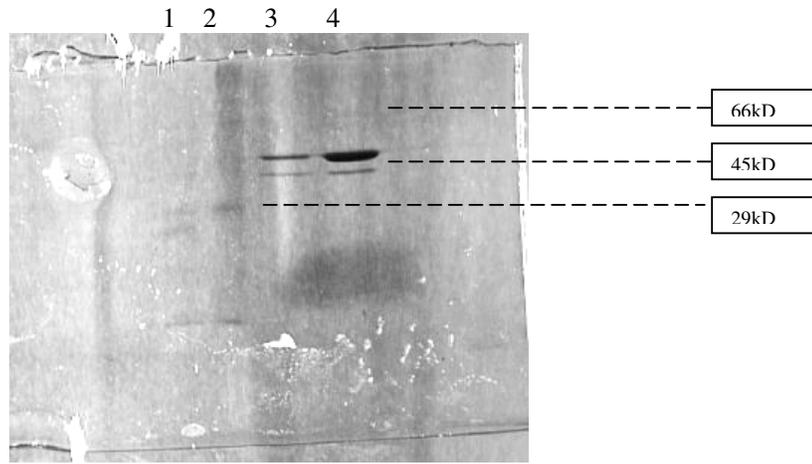


Abb.4: Polyacrylamidgelelektrophorese

Spur 1: SDS-7 Standard

Spur 2: SDS-6 Standard

Spur 3: Fraktion 4(oder 6) der Mono S (nach Durchlauf durch Mono S)

Spur 4: Fraktion 5 der Mono S (nach Durchlauf durch Mono S)

Bei den Spuren 3 und 4 ist die P.agglomerans Phytase als die obere der zwei Banden zu sehen. Dies erkennt man daran, daß bei Spur 4 die obere Bande dicker ist. Der Grund dafür ist, daß in Fraktion 5 der eluierten Mono S am meisten Phytase war. Die untere Bande ist in den beiden Spuren 3 und 4 gleich dick. Daher kann man daraus folgern, daß es sich bei der oberen um die Phytase handelt.

Die Spuren 1 und 2 dienen dazu, eine Orientierung zu bekommen, wie groß das Molekulargewicht der P. agglomerans Phytase ist. In SDS-6 und SDS-7 gibt es drei gemeinsame Banden, die folgende Molekulargewichte haben: 66kD, 45kD und 29kD. Da die Phytase in Spur 4 bzw.3 zwischen den beiden ersteren liegt, kann man folgern, daß die P. agglomerans Phytase ungefähr ein Molekulargewicht von 40-50kD hat. Damit liegt sie in der Nähe der E.coli Phytase, die 42kD Molekulargewicht hat.

Die Bande unterhalb der Phytase in Spur 3 und 4 ist das einzige Verunreinigungsprotein, welches im folgenden durch einen Gelfiltrationsschritt nach dem Reinigungsschritt mit CM-Sepharose versucht wird, wegzubekommen.

### 3.1.3.2 Reinigung der P. agglomerans Phytase – 1. Durchgang

(26.11.02-)

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [U]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Reinigungsfaktor	Ausbeute [%]
Rohextrakt	106	2200 (geschätzt)	54,13	0,025	1	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fällung	30	777	31,8	0,041	1,64	59
CM-Sepharose	100	114	21,5 (vorl. Wert)	0,188	7,52	39,7 (vorl. Wert)
Mono Q	6	9,11	4 (vorl. Wert)	0,439	17,56	7,4 (vorl. Wert)
Gelfiltration	30	4,6	4,6 (vorl. Wert)	1,5	60	11 (vorl. Wert)
Mono S	8 (davon ca. 2 verloren)	1,240 (davon 0,3 verloren)	2,47 (vorl. Wert), davon ca. 0,8 verloren	3	120	4,6 (vorl. Wert)
Gelfiltration	2		0,28			0,517

Tabelle 2: Reinigungsschema der P.agglomerans Phytase

#### Proteingehalt-Best. nach Bradford:

Eichkurve vom 28.11.02  $y = 0,82 / 25 * x + 0,1$  (x: Proteinkonz.[1µg/100µl]; y: ΔE bei 595nm)  
 $x = 30,49 * y - 3,049 \rightarrow$  Proteinkonz.[mg/ml] =  $x/100$

- CM-Seph. (1:10 verdünnt): bei 595nm ΔE=0,475
- MonoQ (1:10 verdünnt): bei 595nm ΔE=0,598
- Gelfiltration (unverdünnt): bei 595nm ΔE=0,536
- MonoS 2.2 (unverdünnt) bei 595nm ΔE=0,5846
- 2.3 (unverdünnt) bei 595nm ΔE=0,5389

	Ext.-Diff. bei 595nm	Verdünnung der Probe [wievielfach]	Proteinkonz. [mg/ml]	Vol. [ml]	Gesamtprotein [mg]	Gesamtakt. [U]	spez. Akt. [U/mg]
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fällung	0,95	100	25,9165	30	777,495	31,8	0,04090058
CM-Seph.	0,475	10	1,143375	100	114,3375	21,5	0,18803979
MonoQ	0,598	10	1,518402	6	9,110412	4	0,43905808
Gelfiltration	0,536	1	0,1329364	30	3,988092	6	1,50447883
MonoS 2.2	0,585	1	0,1478765	2	0,295753	0,8	2,70495988
MonoS 2.3	0,539	1	0,1338511	2	0,2677022	0,1	0,37354941
Werte unten verfälscht, da Bradfordsg vom 28.11. am 2.1.03 benutzt wurde (mehr als 1 Monat alt); können nur relativ untereinander verglichen werden							
Gelf2.12	0,449	1	0,1064101	2	0,2128202	0,22	1,03373646
Gelf2.13	0,428	1	0,1000072	2	0,2000144	0,18	0,8999352
Gelf2.14	0,419	1	0,0972631	2	0,1945262	0,28	1,4393948
Gelf2.15	0,384	1	0,0865916	2	0,1731832	0,06	0,34645393

Tabelle 3: Zusatztable zur Reinigungstabelle von 1.Durchgang

#### Ammoniumsulfat-Fällung

## CM-Sepharose

Elution der CM-Sepharose mit einem Gradienten: 0-1M NaCl im gleichen Puffer. Fraktionsgröße: 10ml

Extinktions-  
diff.  
Reaktionslg.-  
Blank

U/ml

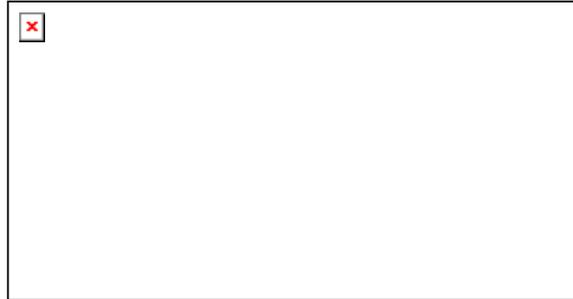


Abb.5

Fractionen 13 - 22 wurden gepoolt. Gesamtaktivität der Fractionen 13 – 22:  
Gesamtakt. [U/ml] Fractionen 13-22:  
2,151615

x 10 ml = **21,5 Unit**

## Mono Q FPLC

Zunächst wurde die Enzymlg. nach der CM-Sepharose-Elution gegen 20mM Tris-HCl, pH 7,8 umdialysiert.



Abb.6

Elution mit Gradient 0-1M NaCl. Bei Fraktion 1 beginnt der Gradient.

Fraktionen 4 - 6 wurden gepoolt. Gesamtaktivität der Fraktionen 4 - 6: 3,99 Units

## Gelfiltration (S200)

Puffer: 50 mM Na-ac, 0,2 M NaCl pH5  
Elution in Fraktionen zu 2 ml

### Elution der S200 (Gelfiltration)

16./17.12.2002

<i>Durchgang 1 (ca.2ml Enzymislg.)</i>				<i>Ext.diff.</i>	<i>Durchgang 2 (2ml Enzymislg.)</i>				<i>Ext.diff.</i>	<i>Durchgang 3 (ca. 1ml Enzymislg.)</i>				<i>Ext.diff.</i>
10	0,321	10E	0,2236	0	10	0,25	10B	0,232	0	10	0,26	10B	0,215	0
11	0,387	11E	0,2185	0,168	11	0,3	11B	0,224	0,0714	11	0,28	11B	0,212	0,0678
12	0,597	12E	0,2199	0,377	12	0,33	12B	0,216	0,1138	12	0,33	12B	0,219	0,1112
13	0,5	13E	0,2235	0,277	13	0,53	13B	0,243	0,2901	13	0,34	13B	0,219	0,1196
14	0,501	14E	0,2198	0,281	14	0,5	14B	0,218	0,284	14	0,32	14B	0,24	0,0816
15	0,348	15E	0,2124	0,136	15	0,53	15B	0,231	0,3041	15	0,3	15B	0,213	0,0902
16	0,339	16E	0,223	0,116	16	0,36	16B	0,231	0,1293	16	0,39	16B	0,23	0,1611
17	0,268	17E	0,2172	0,051	17	0,32	17B	0,227	0,0943	17	0,41	17B	0,249	0,1588
18	0,28	18E	0,2189	0,061	18	0,28	18B	0,225	0,0587	18	0,42	18B	0,24	0,1761
19		19B		0	19		19B		0	19	0,31	19B	0,263	0,0441
20		20B		0	20		20B		0	20	0,28	20B	0,249	0,0321
21		21B		0	21		21B		0	21	0,3	21B	0,223	0,0802
22		22B		0	22		22B		0	22	0,27	22B	0,226	0,0429
23		23B		0	23		23B		0	23	0,24	23B	0,238	0,0068

#### **1. Durchg.**

Summe Ext.diff.

Gesamte rel. Aktiv.:

Gesamtakt.:

x 2l **2,2053 Units**

#### **2. Durchg.**

Summe Ext.diff.

1

Gesamte rel. Aktiv.:

1

Gesamtakt.:

x 2ml **2,021 Units**

#### **3. Durchg.**

Summe Ext.diff.

1

Gesamte rel. Aktiv.:

1

Gesamtakt.:

x 2ml **1,761 Units**

Bei Durchlauf 3 wurden nur ca. 1,1 ml aufgetragen. Etwas Enzymislg. (8 von den 6 ml) ist verloren gegangen.

Durchgang 1 (Reihe 1)			Durchgang 2 (Reihe 2)			Durchgang 3 (Reihe 3)		
Fraktion	Differenz Absorption bei 355 nm zw. Reaktionsprobe und Blank	U/ml	Fraktion	Differenz Absorption bei 355 nm zw. Reaktionsprobe und Blank	U/ml	Fraktion	Differenz Absorption bei 355 nm zw. Reaktionsprobe und Blank	U/ml
1	0	0	1	0	0	1	0	0
2	0	0	2	0	0	2	0	0
3	0	0	3	0	0	3	0	0
4	0	0	4	0	0	4	0	0
5	0	0	5	0	0	5	0	0
6	0	0	6	0	0	6	0	0
7	0	0	7	0	0	7	0	0
8	0	0	8	0	0	8	0	0
9	0	0	9	0	0	9	0	0
10	0	0	10	0	0	10	0	0
11	0,168	0,1262	11	0,0714	0,0536	11	0,0678	0,05092
12	0,377	0,2831	12	0,1138	0,0855	12	0,1112	0,08351
13	0,277	0,208	13	0,2901	0,2179	13	0,1196	0,08982
14	0,281	0,211	14	0,284	0,2133	14	0,0816	0,06128
15	0,136	0,1021	15	0,3041	0,2284	15	0,0902	0,06774
16	0,116	0,0871	16	0,1293	0,0971	16	0,1611	0,12099
17	0,051	0,0383	17	0,0943	0,0708	17	0,1588	0,11926
18	0,061	0,0458	18	0,0587	0,0441	18	0,1761	0,13225
19	0	0	19	0	0	19	0,0441	0,03312
20	0	0	20	0	0	20	0,0321	0,02411
21	0	0	21	0	0	21	0,0802	0,06023
22	0	0	22	0	0	22	0,0429	0,03222
23	0	0	23	0	0	23	0,0068	0,00511
24	0	0	24	0	0	24	0	0

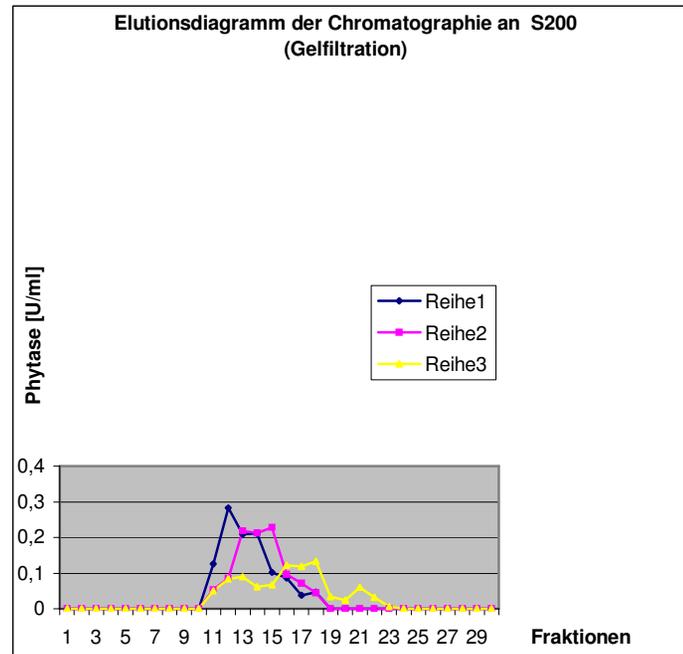


Abb.7

### Mono S FPLC

Zunächst wurde die Enzymlg. nach der S200-Elution gegen 20mM Na-ac, pH 5 umdialysiert.

Bei der Elution mit 0-1NaCl Gradienten ist das Enzym durchgelaufen. Nach erneuter Dialyse, Auftrag und Elution wurde schließlich das Enzym scharf fraktioniert. Fraktionsgröße: 2ml. Der Auftrag und die zugehörige Elution erfolgten in 2 Teilen.

#### **Erneuter Auftrag des Durchlaufs (80ml)**

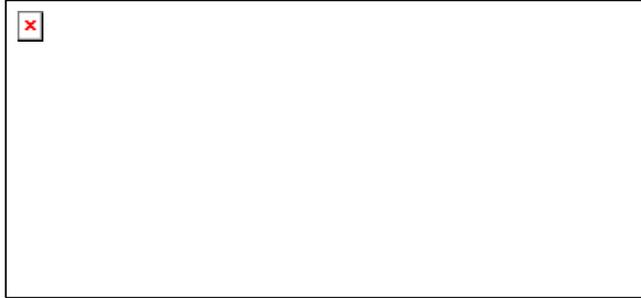


Abb.8

Es wurden jeweils die Fraktionen 2 und 3 der beiden Elutionen zur weiteren Analyse verwendet. Insgesamt sind in den diesen 4 Fraktionen noch **2,47 Units (vorläufiger Wert)**.

#### SDS-Gelelektrophorese

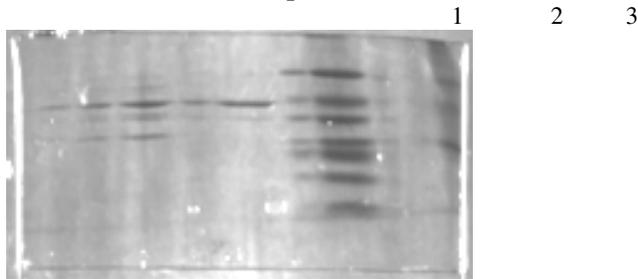
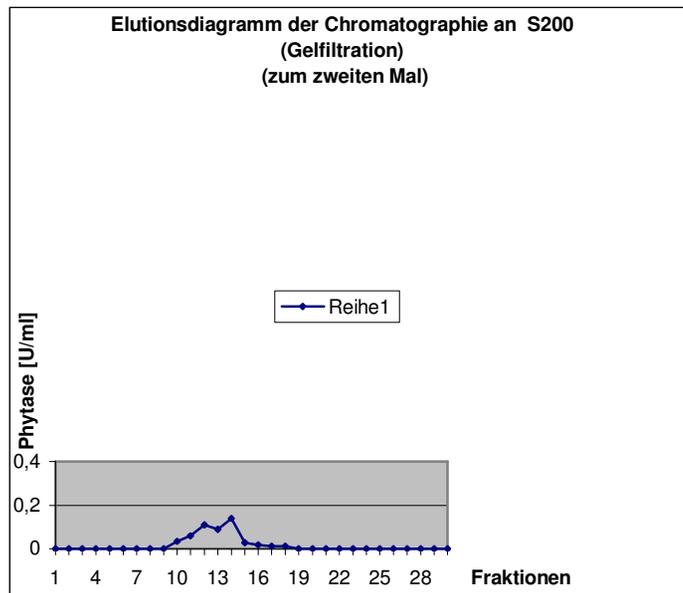


Abb.9: Unterhalb der Phytase (Spur 2) ist noch ein Störprotein. Kommt womöglich daher, daß zuviele Fraktionen bei der Gelfiltration mitgenommen wurden.

Zum 2. Mal Gelfiltration  
Gelfiltration (S200)

Durchgang 1 (Reihe 1)

Fraktion	Differenz Absorption bei 355 nm zw. Reaktionsprobe und Blank	U/ml
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0,05768	0,0347
11	0,09848	0,0592
12	0,18446	0,1108
13	0,14857	0,0893
14	0,23183	0,1393
15	0,04667	0,028
16	0,02982	0,0179
17	0,01811	0,0109
18	0,01856	0,0112
19	0	0
20	0	0



Reaktionszeit: 35-40 Minuten

Extinktion      Blank

0,31768	
0,3584751	
0,4444584	0,26
0,4085735	
0,4918306	
0,3066653	
0,2898166	
0,2781143	
0,2785606	

Abb.10 Puffer: 50 mM Naac, 0,2 M NaCl, pH5  
 Elution in Fraktionen zu 2 ml

Nach Bradfordtest von Fraktionen 12 bis 15 (siehe Zusatztabelle zur Reinigungstabelle vom 1.Durchgang) wird in Fraktion 14 ein reines Enzym erwartet. Da nur noch wenig Enzym vorhanden ist, soll nur wenig protein auf dem Gel laufen gelassen werden (ca. 50 µl Enzymslg., was ca. 5000 ng Protein entspricht). Die Färbung sollte dann eine Silber-Färbung und nicht eine Comassie-Färbung sein. Dadurch kann der Rest der Enzymslg. zur Charakterisierung genommen werden.

### SDS-Gelelektrophorese – Färbung mit Silber

Es wurden die Fraktionen 12 bis 14 auf einem SDS-Gel aufgetragen und zusätzlich SDS-Standards 6 und 7. Die Banden von Standard 7 sind schwach auf dem Bild zu erkennen. Es wurde offensichtlich zuviel Volumen von den Standardproben aufgetragen.

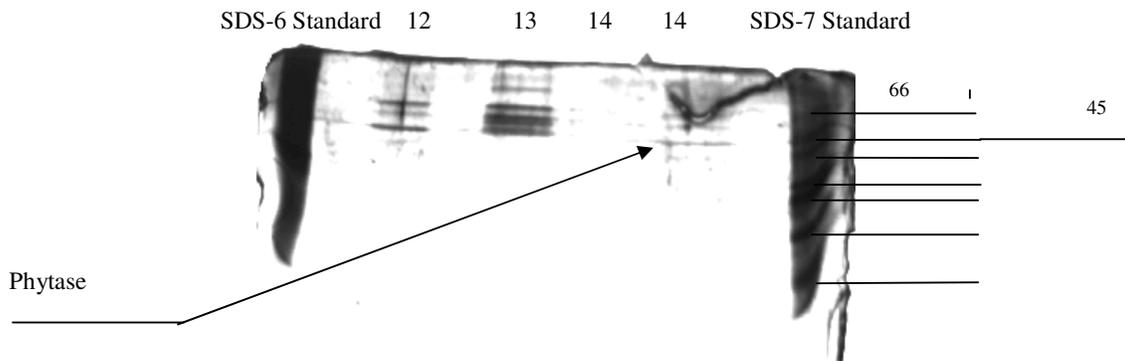


Abb.11: SDS-Gel mit Silberfärbung nach „zum 2. Mal Gelfiltration mit S200“ – Fraktionen 12,13 und 14

In Spur von Fraktion 14 sind schwach mehrere Banden zu erkennen. Es könnte sein, daß diese beim Auftragen der Proben von Fraktion 13 fälschlicherweise rüberdiffundiert sind. Deshalb wurde nocheinmal ein Gel gemacht werden, wo lediglich Fraktion 14 und Standard 6 (jedoch eine kleinere Menge als bisher) aufgetragen wurde.

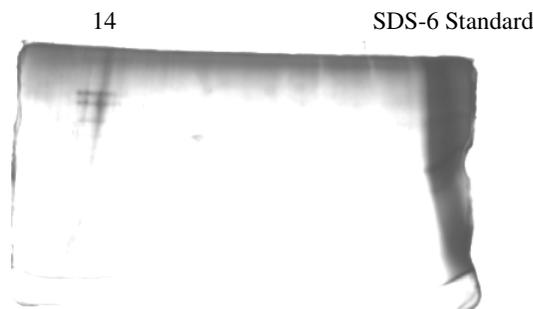


Abb.12: SDS-Gel mit Silberfärbung nach „zum 2. Mal Gelfiltration mit S200“ – nur Fraktion 14

Mit Fraktion 14 wird im folgenden charakterisiert.

#### **3.1.3.3 Reinigung der P. agglomerans Phytase – 2. Durchgang** (ca. 13.12.02-)

es wurden 30 l kultiviert (teilweise mit 1 g/l Phytat)  
 2.Druchgang – Rohextrakt (Reaktionszeit: 35 min.) – Extinktionen und Blank  
 Phytasetest mit der Enzymslg. aus den ersten 25 l  
 rohextr1 1,1356848  
 rohextr2 1,2739429  
 rohextrB 0,3491281

rohextrB 0,3475858  
 -> ca. 78 Unit

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [U]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Reinigungsfaktor	Ausbeute [%]
Rohextrakt	246	938	102,5	0,10928	1	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fällung	108	817	82,43	0,10089	0,9228	80,4
CM-Sepharose	100	58,7	59,4	1,01193	9,3	52,1
Mono Q, Frakt. 11	2		1,46			1,42
Gelfiltration	10	0,3326	1,83	5,5021	50	1,79
Mono S	2	0,07296	0,9	12,3355	113	0,9

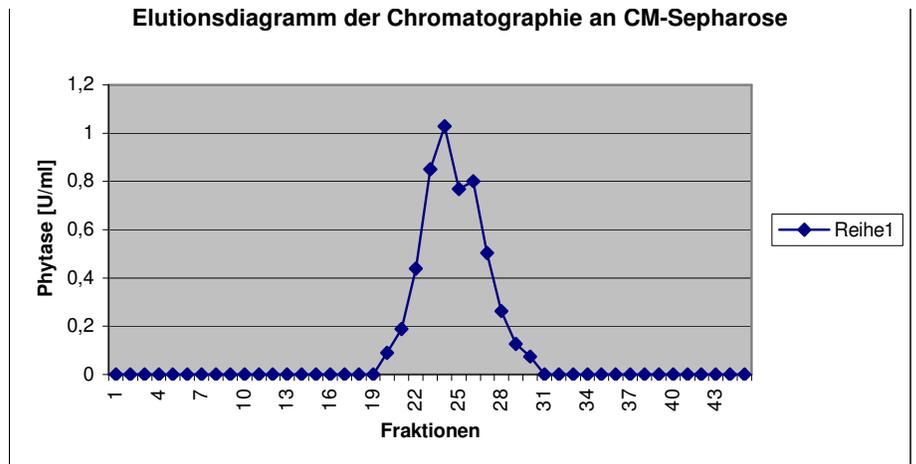
**Tabelle 4: Reinigungsschema der P.agglomerans Phytase – 2. Durchgang (Unterschiede zum 1. Durchgang und zum ansatzweisen Reinigungsschema: die ersten 4 Reinigungsschritte wurden nun mit bidest Wasser gemacht; MonoQ und Mono S mit flacherem Gradienten)**

## CM-Sepharose

Puffer: 20 mM Naac, pH 5

Elution der CM-Sepharose mit einem Gradienten: 0-1M NaCl im gleichen Puffer. Fraktionsgröße: 10ml

	Extinktions- diff. Reaktionslg.- Blank	U/ml
13	0	0
14	0	0
15	0	0
16	0	0
17	0	0
18	0	0
19	0	0
20	0,12	0,0901
21	0,25	0,1878
22	0,5857	0,4399
23	1,134	0,8516
24	1,369	1,0281
25	1,0223	0,7677
26	1,067	0,8013
27	0,67	0,5032
28	0,349	0,2621
29	0,17	0,1277
30	0,1	0,0751



spez. Gesamtakt. [U/ml] Fraktionen 20-30:  
5,134587

Abb.13: CM-Sepharose Eluat (2.Durchgang)

Fraktionen 20-30 wurden gepoolt. Gesamtaktivität der Fraktionen 20-30:  
Gesamtakt. [U/ml] Fraktionen 20-30:  
5,13459

x 10 ml = **51,346 Unit**

## Mono Q FPLC

Zunächst wurde die Enzymlg. nach der CM-Sepharose-Elution gegen 20mM Tris-HCl, pH 7,8 umdialysiert. Im Gegensatz zum 1. Durchgang wurde nach Auftrag der Enzymlösung anstatt mit einem 0-1 M NaCl-Gradienten nun mit einem 0-0.2 M NaCl-Gradienten, d.h. einem flacheren Gradienten, eluiert.

Fraktion	Differenz Absorption bei 355 nm zw. Reaktionsprobe und Blank	U/ml
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0,44	0,28
10	0,56	0,36
11	1,13	0,73
12	0,9	0,58
13	1	0,64
14	0,61	0,25
15	0,4	0,16
16	0	0
17	0	0
18	0	0

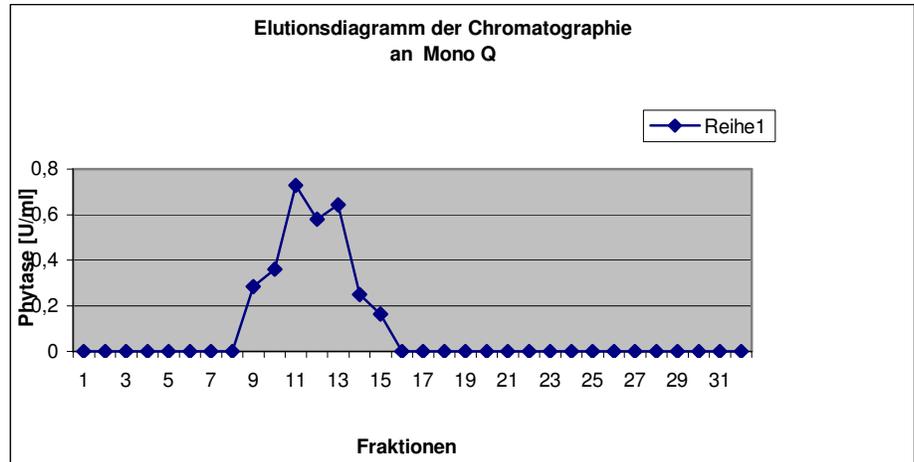


Abb.14: Elutionsdiagramm 2.Durchgang, Mono Q

Fraktionen 11, 12 und 13 wurden einzeln zur Gelfiltration über die S200 gegeben.

### Gelfiltration (S200)

Puffer: 50 mM Na-ac, 0,2 M NaCl pH5  
Elution in Fraktionen zu 2 ml

<i>MonoQ, Fraktion11</i>				<i>MonoQ, Fraktion12</i>				<i>MonoQ, Fraktion13</i>						
			<i>Ext.diff.</i>				<i>Ext.diff.</i>				<i>Ext.diff.</i>			
1	0,211	0,25	0	1	0,23	0,25	0	1						
2	0,225	0,25	0	2	0,29	0,25	0,04	2						
3		0,25	0	3	0,31	0,25	0,055	3						
4	0,328	0,25	0,078	4	0,34	0,25	0,089	4						
5	0,433	0,25	0,183	5	0,38	0,25	0,127	5						
6	0,433	0,25	0,183	6	0,35	0,25	0,103	6						
7	0,442	0,25	0,192	7	0,45	0,25	0,204	7						
8	0,542	0,25	0,292	8	0,47	0,25	0,222	8						
9	0,62	0,25	0,37	9	0,48	0,25	0,225	9						
10	0,75	10E	0,25	0,5	10	0,52	10B	0,25	0,273	10	0	10B	0	0
11	0,903	11E	0,25	0,653	11	0,66	11B	0,25	0,408	11	0	11B	0	0
12	1,033	12E	0,25	0,783	12	0,73	12B	0,25	0,485	12	0	12B	0	0
13	0,908	13E	0,25	0,658	13	0,81	13B	0,25	0,557	13	0	13B	0	0
14	0,82	14E	0,25	0,57	14	0,82	14B	0,25	0,567	14	0	14B	0	0
15	0,58	15E	0,25	0,33	15	0,66	15B	0,25	0,409	15	0	15B	0	0
16	0,477	16E	0,25	0,227	16	0,76	16B	0,25	0,51	16	0	16B	0	0
17	0,379	17E	0,25	0,129	17	0,54	17B	0,25	0,286	17	0	17B	0	0
18	0,343	18E	0,25	0,093	18	0,45	18B	0,25	0,196	18	0	18B	0	0
19	0,322	19E	0,25	0,072	19	0,41	19B	0,25	0,165	19	0	19B	0	0
20	0,318	20E	0,25	0,068	20	0,38	20B	0,25	0,131	20	0	20B	0	0
21	0,33	21E	0,25	0,08	21	0,36	21B	0,25	0,108	21	0	21B	0	0
22	0,295	22E	0,25	0,045	22	0,36	22B	0,25	0,114	22	0	22B	0	0
23	0,384	23E	0,25	0,134	23	0,35	23B	0,25	0,1	23	0	23B	0	0
24	0,363		0,25	0,113	24	0,34		0,25	0,089	24				
25	0,281		0,25	0,031	25	0,31		0,25	0,059	25				

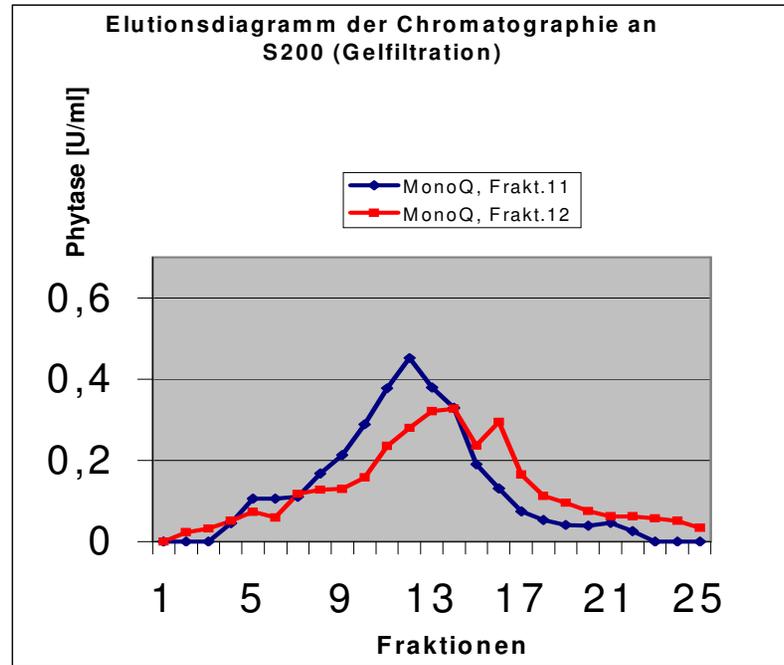
**1. Durchg.**

**2. Durchg.**

**3. Durchg.**

Bei Durchlauf 3 (MonoQ-Eluat, Fraktion 13) wurde nur ca. 0,4 ml aufgetragen. 1,6 ml Enzymllsg. ist verloren gegangen.

Durchgang 1 (Reihe 1)			Durchgang 2 (Reihe 2)		
Fraktion	Differenz Absorption bei 355 nm zw. Reaktionsprobe und Blank	U/ml	Fraktion	Differenz Absorption bei 355 nm zw. Reaktionsprobe und Blank	U/ml
1	0	0	1	0	0
2	0	0	2	0,04	0,0231
3	0	0	3	0,055	0,0318
4	0,078	0,04506	4	0,089	0,0514
5	0,183	0,10572	5	0,127	0,0734
6	0,183	0,10572	6	0,103	0,0595
7	0,192	0,11092	7	0,204	0,1178
8	0,292	0,16869	8	0,222	0,1282
9	0,37	0,21375	9	0,225	0,13
10	0,5	<b>0,28885</b>	10	0,273	0,1577
11	0,653	<b>0,37723</b>	11	0,408	0,2357
12	0,783	<b>0,45233</b>	12	0,485	0,2802
13	0,658	<b>0,38012</b>	13	0,557	0,3218
14	0,57	<b>0,32928</b>	14	0,567	0,3276
15	0,33	0,19064	15	0,409	0,2363
16	0,227	0,13114	16	0,51	0,2946
17	0,129	0,07452	17	0,286	0,1652
18	0,093	0,05373	18	0,196	0,1132
19	0,072	0,04159	19	0,165	0,0953
20	0,068	0,03928	20	0,131	0,0757
21	0,08	0,04622	21	0,108	0,0624
22	0,045	0,026	22	0,108	0,0624
23	0	0	23	0,1	0,0578
24	0	0	24	0,089	0,0514
25	0	0	25	0,059	0,0341
26	0	0	26	0	0
27	0	0	27	0	0



MonoQ11, Gelf10-14  
1,82782 U

Abb.: 2. Durchgang Gelfiltration Eluat

Fraktionen 10-14 wurden gepoolt.

### Mono S FPLC

Zunächst wurde die Enzymflsg. nach der S200-Elution (Fraktionen 10-14) gegen 20mM Na-ac, pH 5 umdialysiert.

An der MonoS wurde die Elution mit einem 0-0.2 NaCl Gradienten durchgeführt. Fraktionsgröße: 2ml

Fraktion	Differenz Absorption bei 355 nm zw. Reaktionsprobe und Blank	U/ml
1	0	0
2	1,2	0,45
3	0,15	0,06
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

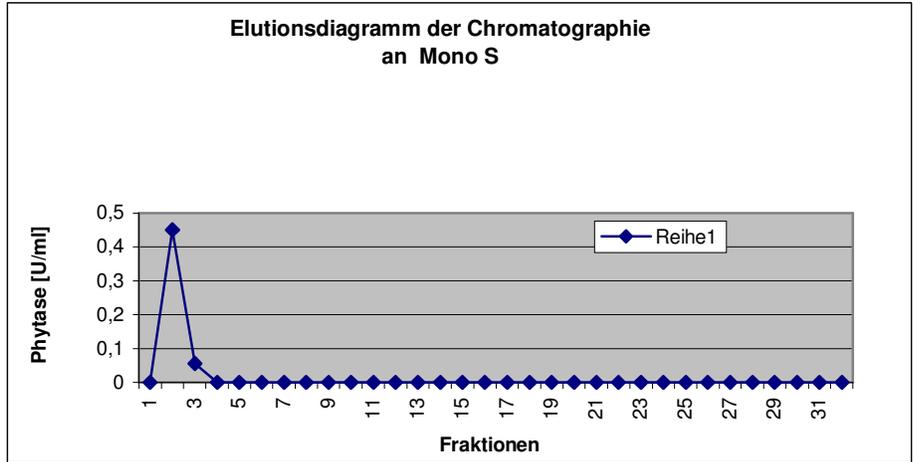


Abb.14: Elutionsdiagramm 2.Durchgang, Mono S

Abb.

### SDS-Gelelektrophorese – Färbung mit Commassie

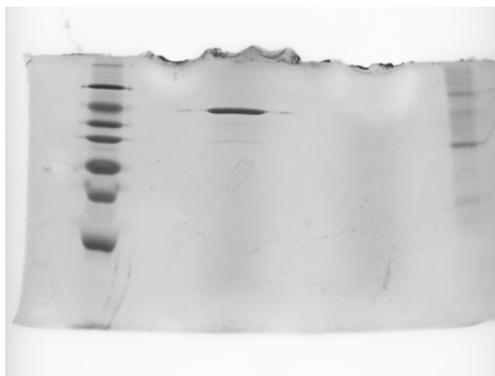


Abb.11: SDS-Gel mit Commassie-Färbung 2.Durchg., MonoS, Fraktion 2; SDS Standards 6 und 7

### **3.1.4 Charakterisierung der *P. agglomerans* Phytase**

#### **3.1.4.1 Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Von den zwei Fraktionen, die während der Kationenaustauschchromatographie an Mono S erhalten wurden, war bei einem 10%igen Polyacrylamidgellauf (siehe Abbildung 4) eine Bande in Fraktion 5 dicker als eine Bande auf selber Höhe in Fraktion 4 (oder 6). Da die Aktivität in Fraktion 5 höher war als die in Fraktion 4 (oder 6), wurde daraus geschlossen, daß es sich bei dieser Bande um die Phytase handelt. Ein Vergleich mit zwei Standards ergab, daß die Phytase ein Molekulargewicht von ca. 42 kDa haben muß (in jedem Fall zwischen 40 und 50 kDa).

#### **3.1.4.2 N-terminale Sequenz der *P. agglomerans* Phytase**

Ziel der N-terminalen Sequenzierung war es, Daten über die *P. agglomerans* Phytase zu erhalten, die zur Ableitung spezifischer Sonden für die Klonierung des Phytasegens herangezogen werden können. Die aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten DNA-Sequenzen können als Oligonukleotide synthetisiert und anschließend als Hybridisierungsprobe zur Identifizierung und Isolierung des Phytasegens eingesetzt werden. Die Notwendigkeit der Klonierung des Phytasegens ergab sich aus den sehr geringen Mengen an Enzym, die in *P. agglomerans* synthetisiert werden, die für einen technischen Einsatz unzureichend sind.

#### **3.1.4.3 Aminosäureanalyse**

Für die Aminosäureanalyse wurde die Bande des SDS-Gels ausgeschnitten.

### 3.1.4.4 Enzymologische Eigenschaften der *P. agglomerans* Phytase

#### 3.1.4.4.1 Aufbewahrung der Enzympräparationen

Die Enzymlösung ließ sich gut bei +4°C halten. Jedoch ging die Aktivität der aufgereinigten Phytase dauerhaft verloren, wenn sie bei -20°C gelagert und dann schnell bei Raumtemperatur aufgetaut wurde.

#### 3.1.4.4.2 pH-Optimum

Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Dephosphorilierung von Phytat erfolgte mit der Enzympräparation „1. Durchgang, Fraktion 14 nach erneuter Gelfiltration“ (siehe Abb.12). In der Enzympräparation waren, wie aus Abb.12 hervorgeht, außer der Phytase 2 weitere Proteine. Die Enzympräparation hatte ein Volumen von 1,5 ml und eine Volumenaktivität von 0,139 U/ml (vgl. Abb.10).

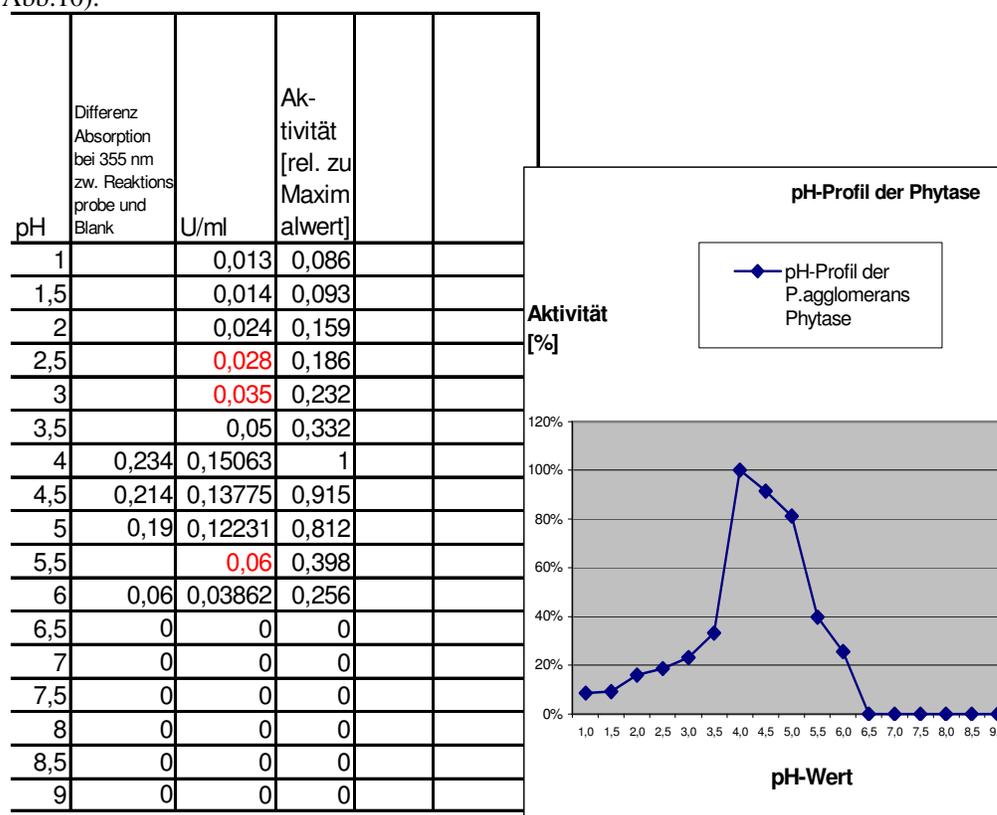


Abb.14: pH-Profil der Phytase

Aktivität bei pH 4,0 wurde 100% gesetzt.

Puffer: pH 1-3,5 Glycin-HCl, pH 3,5-6 Naac, pH 6,5 Tris-Hac, pH 7-9 Tris-HCl jeweils 0,1 M, Phytatkonzentration: 3,6 mM

Enzymkonzentration im Test: 110 mU/ml bei pH 5 (unverdünnte Enzymlg. aus 1.D., Gelf.2, Fraktion 12)

Temperatur bei den Tests: 37°C

Aus Abbildung 14 geht hervor, daß das pH-Optimum für die Phytathydrolyse bei pH 4,0 liegt. Die Aktivität nimmt zu höheren und niedrigeren pH-Werten hin rasch ab. Oberhalb von pH 6,5 ist das Enzym vollständig inaktiv.

### 3.1.4.4.3 Temperaturoptimum und Temperaturstabilität

#### 3.1.4.4.3.1 **Temperaturoptimum**

Das Temperaturprofil der Phytase wurde von 15 bis 80°C ermittelt, wobei die Enzym-lsg. 1.D.Gelf.2, Fraktion 13 unverdünnt wurde (in 50 mM Naac-Puffer)

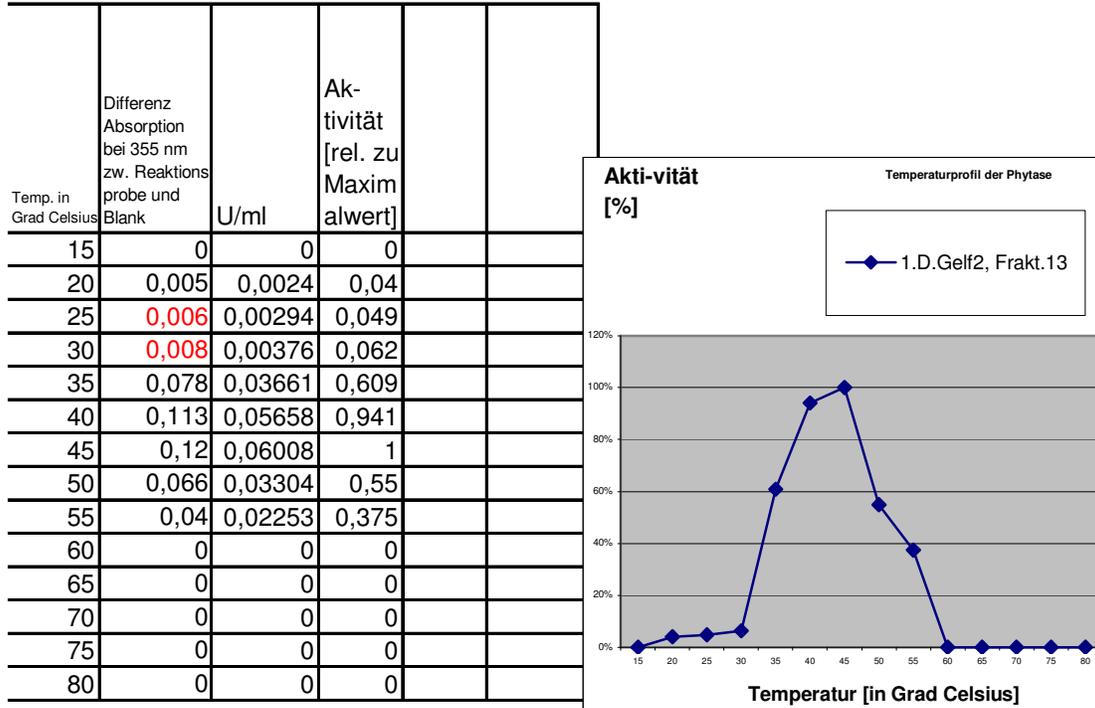
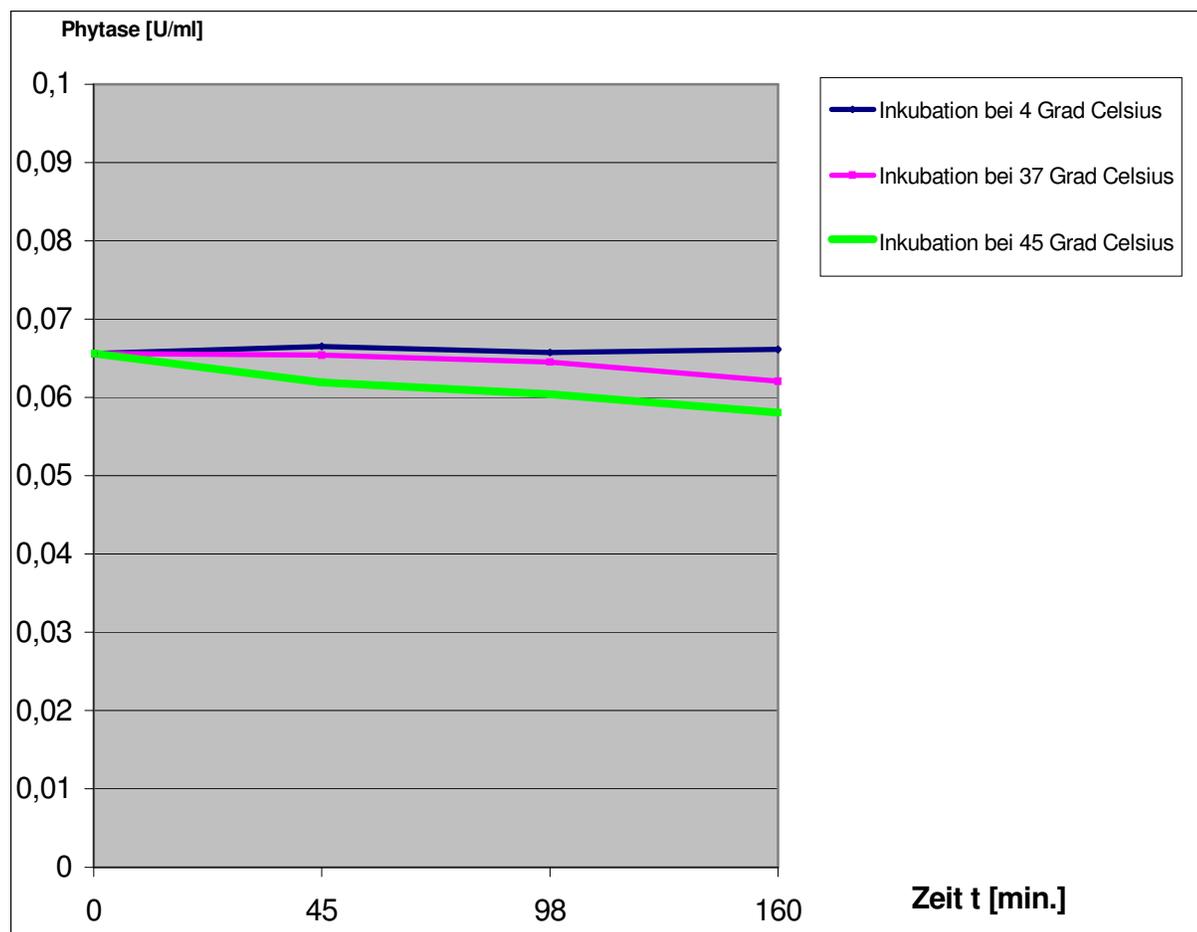


Abb.15: Temperaturprofil der Phytase

### 3.1.4.4.3.2 Temperaturstabilität

Zeit t [min.]	T=4 Grad Celsius		T=37 Grad Celsius		T=45 Grad Celsius	
	Differenz Absorption bei 355 nm zw. Reaktionsprobe und Blank	U/ml	Differenz Absorption bei 355 nm zw. Reaktionsprobe und Blank	U/ml	Differenz Absorption bei 355 nm zw. Reaktionsprobe und Blank	U/ml
0	0,5	0,065571	0,5	0,065571	0,5	0,06557
45	0,58	0,066555	0,57	0,065408	0,54	0,06197
98	0,53	0,065749	0,52	0,064508	0,5	0,06039
160	0,49	0,06615	0,46	0,0621	0,43	0,05805



#### 3.1.4.4 Substratspezifität

Das Substratspektrum der P. agglomerans Phytase in Tabelle ... wiedergegeben.

<b>Substrat</b>	<b>Rel. Aktivität[%]</b>
Phytat	100
p-Nitrophenylphosphat	93
1-Naphthylphosphat	36
2-Naphthylphosphat	87
2-Glycerophosphat	20
Glucose-6-phosphat	107
AMP	6
ATP	23
NADP	4
Pyridoxalphosphat	14
GTP	26

Tabelle ...: Substratspektrum der P. agglomerans Phytase bei pH 4,1

Die Aktivität mit Phytat als Substrat wurde 100% gesetzt.

Temp.: 37°C, Substratkonz. 1mM, beim Phytasetest wurde direkt 350µl unverdünnt mit der Enzymlg. zusammengegeben.

#### 3.1.4.4.5 Kinetische Konstanten ( $K_M$ , $v_{max}$ , $k_{cat}$ )

Die kinetischen Messungen wurden bei 37°C in 0,1 M Natriumacetat-HCL pH 4,0 mit der gereinigten Proteinlösung aus dem 2. Durchgang durchgeführt. Die Substratkonzentration wurde zwischen 0,109375 mM und 7 mM variiert.

Phytat-konzentration (Substrat-konz.) [mM]	Absorption bei 355 nm zw. Reaktionsprobe und Blank	U/ml
0,109375	0,134	0,100634
0,21875	0,314	0,235814
0,4375	0,58	0,43558
0,875	1,197	0,898947
1,75	2,057	1,544807
3,5	2,22	1,66722
7	1,865	1,400615

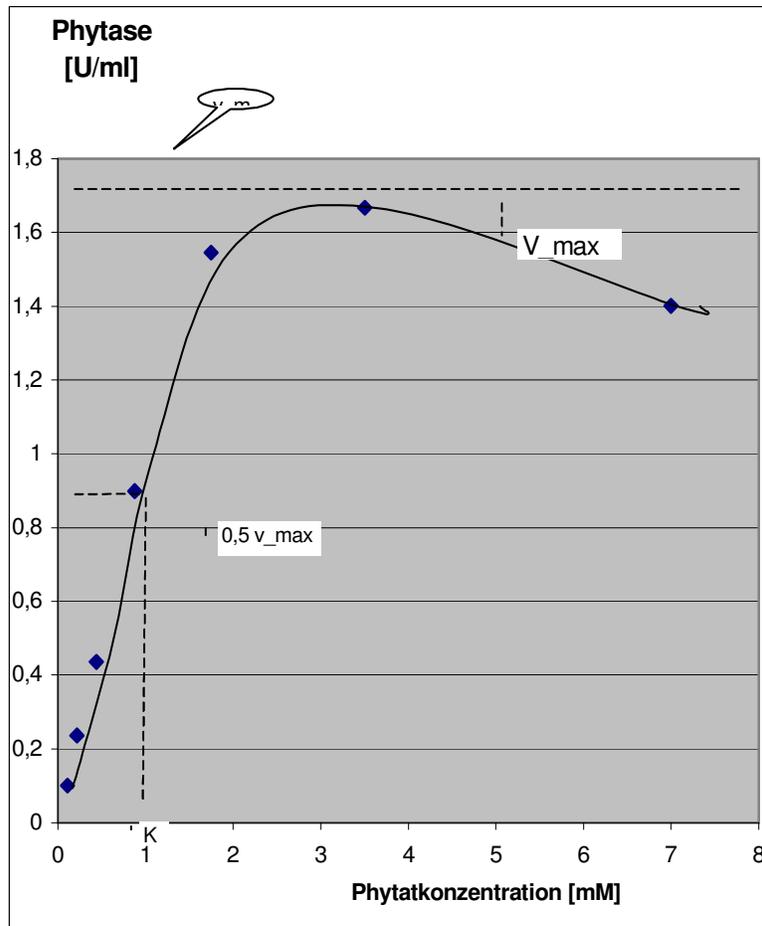


Abb.: Abhängigkeit der Aktivität der Phytase von der Substratkonzentration

Kinetische Daten	Phytat pH 4.0
$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	4500
$V_{\text{max}}$ [U/mg]	
$K_{\text{cat}}$	

## 4. Materialien und Methoden

### 4.1 Materialien

#### Chemikalien

Casein  
Hefeextrakt  
Na-Acetat  
Phytat (Dodecanatriumsalz)

### 4.2 Methoden

#### 4.2.1 Absorptionsmessungen

Für alle Absorptionsmessungen wurden 1cm Küvetten (2 ml) verwendet.

#### 4.2.2 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Medien, Lösungen ohne hitzestabile oder flüchtige Substanzen, sowie Glas- und Kunststoffmaterialien wurden falls nötig vor der Benutzung 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

#### 4.2.3 Kultivierung von *Pantoea agglomerans* Zellen

Ausgehend von einer 20-24 Stunden inkubierten Vorkultur des entsprechenden *P. agglomerans* Stammes in 5 ml LB-Flüssigmedium wurden zur Bestimmung des besten Mediums zur Phytasebildung jeweils 50 ml verschiedener Medien (PSM, PSM + 0,5 g/l, PSM + 1 g/l, PSM + 2g/l) angeimpft und bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Das Bakterienwachstum wurde gegebenenfalls bei 578 nm verfolgt. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden den Bakterienkulturen zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und gemäß 5.2.4 aufgeschlossen.

##### LB-Flüssigmedium

10 g/l Casein (Pepton aus Casein)  
5 g/l Hefeextrakt  
5 g/l NaCl (Kochsalz)  
mit Natronlauge (NaOH) auf pH 7.5 einstellen

PSM (aus [Yoon et. al. 1996])

#### 4.2.4 Aufschluß von *Pantoea agglomerans* Zellen

## **Einfrieren/Auftauen**

Nachdem die Zellen durch 15 minütiges Zentrifugieren bei 3000g (bei der Institutszentrifuge entsprechend Tabelle 4000 U/min) gesammelt wurden, wurde der das überstehende Medium abgegossen. Danach wurden die Zellen 20 Minuten unter -80°C eingefroren. Hierauf wurden die Zellen unter Zimmertemperatur 20 Minuten lang aufgetaut. Diese Einfrier/Auftau-Prozedur wurde dreimal wiederholt.

Daraufhin wurde etwas (für 1g Zellmasse ca. 50 ml) Puffer (0,1 M Na-Acetat, pH5) hinzugegeben, wobei die erhaltene Suspension unter 30 Minuten bei 10000 U/min zentrifugiert wurde. Die nun nicht mehr benötigten Zelltrümmer sammelten sich am Boden. Der Überstand wurde für weitere Arbeiten eingesetzt. Da sich in diesem Überstand das Enzym Phytase befindet, wird er im folgenden **Enzymlsg.** genannt.

### **4.2.5 Phytase-Aktivitätsbestimmung**

Die quantitative Bestimmung der Phytaseaktivität erfolgte über die Ermittlung des freigesetzten Orthophosphats bei 37°C. Eine kontinuierliche Verfolgung der Umsetzung war nicht möglich, da das Sichtbarmachen der Phosphatfreisetzung durch Zugabe der AAM-Lösung zur Denaturierung der Phytase führt. Der Standard-Testansatz zur Bestimmung der Phytaseaktivität hatte folgende Zusammensetzung:

250µl 0,1M Na-ac, pH 5 (Puffer)  
100µl 3,6mM Na-Phytat, pH 5 (Substratlsg.)  
50µl Enzymlsg.

Nach einer fünfzehnminütigen Vorinkubation von Puffer und Substrat bei 37°C in 2ml Eppendorfgefäßen wurde die Enzymreaktion durch Zugabe der Enzymlsg. (siehe 5.2.4) gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten erfolgte der Nachweis des freigesetzten Phosphats nach einer modifizierten Ammoniummolybdatmethode [Breitenbach et. al. 1976]. Dem Testgemisch wurden 1,5 ml frisch hergestellte AAM-Lösung und 100µl einer 1M Citronensäurelsg. Zugesetzt. Eventuell auftretende Trübungen konnten durch Zentrifugation entfernt werden. Gemessen wurde die Extinktion bei 355nm. Die Referenz („blank“) besaß die gleiche Zusammensetzung, die Reihenfolge der Zugabe war jedoch unterschiedlich. Nach 45minütiger Inkubation von Puffer und Substrat erfolgte zunächst die Zugabe der AAM-Lösung und anschließend die der Enzymlösung. Abschließend wurde die 1M citronensäure zugesetzt. Diese Reihenfolge ist unbedingt einzuhalten, um bei der Referenz eine enzymatische Reaktion auszuschließen und eventuell vorhandenes Orthophosphat in der Enzymlösung (z.B. aus dem früheren Nährmedium zu erfassen).

### **4.2.6 Arbeiten mit Protein**

#### **4.2.6.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen**

##### **4.2.6.1.1 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von Proteinen und Proteinfragmenten nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS [Laemmli 1970]. Die Elektrophorese wurde in vertikalen Apparaturen der Größe 90 x 90 x 1 mm durchgeführt. Zunächst wurde das Trenngel-Polymerisationsgemisch bis 2/3 der Fläche in die Apparatur gegossen und sofort vorsichtig mit 0,1%iger SDS-Lösung überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation (ca. 1 Stunde) wurde die Flüssigkeitsschicht über dem Trenngel abgegossen und durch das Sammelgel-Polymerisationsgemisch ersetzt. Dann wurde die Taschenschablone luftblasenfrei eingeführt (mit glatter Seite an die Glasplatte) und das Sammelgel für mindst. 1 Stunde sich selbst zur Polymerisation überlassen.

Die lyophilisierten (gefriergetrockneten), nun kristallförmigen; Proteinproben wurden mit 54 µl Probenpuffer und 6 µl Bromphenolblau übergossen, danach 5 Minuten bei 90°C denaturiert, auf Raumtemperatur abgekühlt und in die zuvor mit Tris-Glycin-Reservoirpuffer gespülten Geltaschen aufgetragen.

#### **4.2.6.1 Proteinsequenzierung**

Das folgende ist [Nelson et. al. 2001], S.148f. entnommen.

Für die Aufklärung der Primärstruktur von Proteinen gibt es unterschiedliche Verfahren. Eine Methode besteht in der Hydrolyse des Proteins und der Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung. Mit der Hydrolyse allein kann allerdings die Sequenz der Aminosäuren im Protein nicht identifiziert werden.

Ein Verfahren, das häufig zusammen mit der Hydrolyse eingesetzt wird, besteht in der **Markierung und Identifizierung des amino-terminalen Aminosäurerests**. Zu diesem Zweck entwickelte Sanger das Reagenz 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol (FDNB). Weitere Reagenzien sind zur Markierung von aminoterminalen Resten sind Dansylchlorid und Dabsylchlorid, deren Derivate leichter nachgewiesen werden können als Dinitrophenylderivate. Nach Markierung des amino-terminalen Rests mit einem dieser Reagenzien wird das Polypeptid zu den einzelnen Aminosäuren hydrolysiert, und die markierte Aminosäure wird identifiziert. Da bei der Hydrolyse das Polypeptid zerstört wird, kann mit diesem Verfahren die Sequenz eines Polypeptids über den aminoterminalen Rest hinaus nicht bestimmt werden. Es kann jedoch die Anzahl der chemisch unterschiedlichen Polypeptide in einem Protein nachgewiesen werden – vorausgesetzt, die Proteine tragen unterschiedliche amino-terminale Reste.

Für die Sequenzierung eines vollständigen Polypeptids wird gewöhnlich die chemische Methode von Pehr Edman eingesetzt. Beim **Edman-Abbau** werden nur die aminoterminalen Reste eines Peptids markiert und entfernt; alle anderen Peptidbindungen bleiben intakt. Das Peptid wird mit Phenylisothiocyanat umgesetzt und der amino-terminale Rest wird letztendlich als Phenylthiohydantoinderivat entfernt. Nach der Entfernung und Identifizierung des amino-terminalen Rests kann der so entstandene neue amino-terminale Rest unter Anwendung derselben Reaktionsschritte markiert, entfernt und identifiziert werden. Dieses Verfahren wird wiederholt, bis die gesamte Sequenz identifiziert ist. Der Edman-Abbau wird im sog. **Sequenator** durchgeführt, der die Reagentien im richtigen Verhältnis mischt, die Produkte trennt, identifiziert und die Ergebnisse aufzeichnet. Häufig kann mit nur Mikrogramm Protein die komplette Aminosäuresequenz ermittelt werden.

Die Polypeptidlänge, die anhand des Edman-Abbaus genau sequenziert werden kann, hängt von der Wirksamkeit der einzelnen chemischen Schritte ab. Moderne Sequenatoren erreichen eine Wirksamkeit von über 99% pro Zyklus und ermöglichen so eine Sequenzierung von über 50 aufeinanderfolgenden Aminosäureresten eines Polypeptids.

Große Proteine werden in kleinere Fragmente geteilt, die dann mit dem Edman-Abbau sequenziert werden.

Eine andere Möglichkeit zur Sequenzierung von Aminosäuresequenzen sind Methoden basierend auf der Massenspektrometrie.

## 5. Literaturverzeichnis

1. [Breitenbach et. al. 1976] Breitenbach M., chromatogr. Synth. Biol. Polym. 2, 271-276 (1976)
2. [Greiner 1993] Greiner, R. (1993). Reinigung, Charakterisierung und Überexpression einer Phytase aus *Escherichia coli* ATCC 33965, Dissertation, Institut für Biochemie der Universität Stuttgart.
3. [Greiner et. al. 1997] Greiner, Haller, Konietzky, Jany (1997). Purification and Characterization of a Phytase from *Klebsiella terrigena*, Archives of Biophysics and Biochemistry, 341 No.2, 201-206
4. [Nelson et. al. 2001] Nelson, Cox. Lehninger Biochemie. 3. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 2001
5. [Sajidan 2002] Sajidan, A. (2002). Molekulare Charakterisierung einer Phytase (*Myo*-Inositol Hexakisphosphate Hydrolase) und von Phosphatasen aus Bakterienisolaten indonesischer Reisfelder (*Klebsiella pneumoniae*)
6. [Yoon et.al.1996] Yoon,S.J. et.al. (1996).Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp.4, and enzymatic properties of phytase enzyme, Enzyme Microb. Technol.,1996, vol.18, 449-454
7. [Laemmli 1970] Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227, 680-685