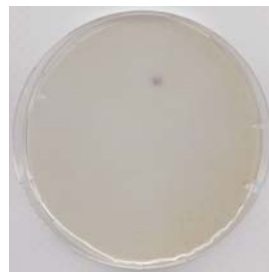


# Screenen, zuiveren en karakteriseren van nieuwe oxidases

## Stage voorstel

Onderzoeksgroep: Biotechnologie (GBB)

Project begeleider: Ir. E.W. van Hellemond  
Nijenborgh 4 (kamer 5114.0106)  
9747 AG Groningen  
tel.: 050-3633540  
email: [e.w.van.hellemond@rug.nl](mailto:e.w.van.hellemond@rug.nl)



### Omschrijving onderzoeksgroep

Het onderzoek van de groep Biotechnologie richt zich op het verkrijgen van inzichten in de biochemie en enzymologie van microbiële transformaties van synthetische verbindingen en op het ontwikkelen van verbeterde biokatalysatoren voor zulke transformaties. De groep richt zich op het ophelderen van catabole routes in micro-organismen die milieuschadelijk stoffen afbreken (bv. gechlorineerde oplosmiddelen, pesticiden). Verder worden er enzymologische en *protein engineering* studies verricht op microbiële enzymen die kunnen worden toegepast als biokatalysatoren in de (enantioselectieve) synthese van fijn-chemicaliën.

### Achtergrond informatie

Oxidoreductases zijn enzymen die tijdens de reactie die ze katalyseren elektronen overdragen van de electronendonor (het substraat) naar de electronenacceptor. De meeste oxidoreductases hebben NADH of NADPH nodig als electronenacceptor. **Oxidases** vormen een uitzondering hierop omdat zij zuurstof kunnen gebruiken als electronenacceptor, wat tijdens de reactie wordt gereduceerd tot waterstof peroxide ( $H_2O_2$ ). Het gebruik van zuurstof als electronenacceptor heeft meerdere voordelen ten opzichte van andere electronenacceptoren. Zuurstof is goedkoop, milieuvriendelijk en aanwezig in de lucht, waardoor het gebruik van oxidases een goed alternatief is voor chemische oxidatie. Daarnaast zijn oxidases erg regio- en enantioselectieve enzymen waardoor ze reacties kunnen katalyseren die via chemische routes niet of slecht mogelijk zijn<sup>1</sup>. Daarom is het interessant om nieuwe oxidases te vinden.

### Doel stage

Er zijn verschillende methoden om nieuwe enzymen te vinden. Eén hiervan is om direct te screenen op de enzymatische activiteit van die nieuwe enzymen. In het geval van oxidases kun je screenen op hun eigenschap dat zij  $H_2O_2$  kunnen vormen. In ons lab hebben we een methode ontwikkeld waarbij we kolonies die  $H_2O_2$  vormen kunnen onderscheiden van kolonies die dat niet kunnen. Met deze methode krijgen kolonies die  $H_2O_2$  maken een paarse kleur (zie figuur) terwijl kolonies die dat niet doen hun normale kleur behouden. De paarse kolonies brengen klaarblijkelijk een gen tot expressie wat codeert voor een oxidase. Tijdens deze stage ga je met behulp van deze methode organismen screenen op de aanwezigheid van nieuwe oxidases. Van nieuw gevonden oxidases worden de genen vervolgens gekloneerd in expressievector om deze tot overexpressie te brengen. Op die manier kunnen de enzymen gezuiverd worden en gekarakteriseerd.

### Te gebruiken technieken

Het eerste gedeelte van het project zal bestaan uit het screenen van verschillende organismen op de aanwezigheid van nieuwe oxidases. Dit zijn vooral veel microbiologische technieken (transformatie en uitplaten van genenbanken en doorkweken van positieve kolonies). Vervolgens zullen geïdentificeerde genen in een expressievector gekloneerd worden (m.b.v. PCR, DNA digestie en ligatie reacties, etc.). De gekloneerde genen zullen tot overexpressie worden gebracht in *Escherichia coli* en de geproduceerde enzymen zullen gezuiverd worden (kolomchromatografie, SDS-PAGE). Eenmaal gezuiverd, zullen de enzymen biochemisch gekarakteriseerd worden. Hierbij zal men gebruik maken van technieken zoals spectrofotometrische assays, HPLC en gelfiltratie.

### Literatuur

1. Burton. (2003) Oxidizing enzymes as biocatalysts. TIBTECH 21(12):543-54