

Teilnehmer: Sandra Kusel

Expression and purification of recombinant Phenylalanine Ammonia-Lyase from *Petroselinum crispum* with and without His-tag

Betreuer: Mag. Dr. Herbert Angleitner

The use of enzymes in industrial processes could be of economically interest, due to the high substrate and reaction specificity. The consumption of chemicals and therefore the environmental impact could be reduced. This thesis focuses on the expansion of the substrate scope of phenylalanine ammonia lyase from parsley (*Petroselinum crispum*) (short: PcPAL) towards bulkier substrates and the subsequent testing of the mutants in a whole-cell screening with modified amino acids. With the help of microbiological methods, a plasmid containing the gene of PAL was selectively altered in its amino acid sequence at the active site. This modified plasmid was then transferred into *E. coli*, multiplied and the enzyme was then isolated and purified. The mutation was confirmed by DNA sequencing. In addition, by adding the protease TEV (*tobacco etch virus*), the N-terminal His-tag was removed and the enzyme without His-tag was again isolated and purified. In the case of the tested substrates, o-, m- and p-methyl trans cinnamic acid, no significant change in the conversion rate compared to the unmodified enzyme was determined.

Aufgrund der hohen Substrat- und Reaktionsspezifität von Enzymen könnte es wirtschaftlich interessant sein, Enzyme in chemischen und pharmazeutischen Produktionen einzusetzen. Dabei könnten Chemikalien eingespart und die Umweltbelastung vermindert werden.

Diese Arbeit konzentriert sich auf die Erweiterung des Substratspektrums der Phenylalanine-Ammoniak-Lyase, stammend aus der Petersilie (*Petroselinum Crispum*) (kurz: PcPAL) und die anschließende Testung der Mutanten im Ganz-Zell-Screening mit modifizierten Aminosäuren.

Mit Hilfe von mikrobiologischen Methoden wurde ein Plasmid mit dem Gen der Phenylalanin-

Ammoniak-Lyase in ihrer Aminosäuresequenz am aktiven Zentrum gezielt verändert. Dieses modifizierte Plasmid wurde anschließend in ein *E. coli* überführt, vermehrt und das Enzym isoliert und gereinigt. Die Mutation wurde mittels DNA-Sequenzierung bestätigt. Zusätzlich wurde mit Hilfe der Protease TEV (*tobacco etch virus*) das am N-terminal stehende His-Tag des Enzymes entfernt, erneut isoliert und gereinigt.

Im Falle der im Ganz-Zell-Screening eingesetzten Substrate, o-, m- und p-Methyl-(E)-Zimtsäure, ergab sich keine signifikante Änderung in der Umwandlungsrate verglichen mit dem unveränderten Enzym.

