

**Untersuchungen zum Inaktivierungsmechanismus
von mikrobiellen Lipasen
in wasserfreien Transesterifizierungen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Benjamin Franken

aus Aachen

Oktober 2008

Aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET)

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

im Forschungszentrum Jülich

Gedruckt mit der Genehmigung der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Frau Prof. Dr. Martina Pohl

Korreferent: Herr Prof. Dr. Karl-Erich Jäger

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2005 bis Juni 2008 am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Martina Pohl und Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger angefertigt.

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs 1166 "*Biocatalysis in non-conventional media (BioNoCo)*" gefördert.

Diese Dissertation wird u.a. in elektronischer Form auf dem WWW-Server der Universitäts- und Landesbibliothek Düsseldorf veröffentlicht:

**meinen Eltern, Brüdern,
Nadine und Freunden.**

**Und so sehen wir betroffen,
den Vorhang zu
und alle Fragen offen.**

Marcel Reich-Ranicki

(nach einem Zitat von Berthold Brecht aus „Der gute Mensch von Sezuan“)

Wissenschaftliche Veröffentlichungen im Rahmen dieser Promotion

Artikel in Fachjournalen

- **Franken, B., Eggert, T., Jaeger, K.-E. and Pohl, M. (2009):** Novel insights into the acetaldehyde-induced deactivation mechanism of microbial lipases. *Manuskript in Vorbereitung*

Tagungsbeiträge

- **Franken, B., Eggert, T., Jaeger, K.-E. and Pohl, M. (2007):** Novel strategy to overcome acetaldehyde inactivation of microbial lipases. Vortrag, VAAM-Jahrestagung 2007 (Osnabrück).
- **Franken, B., Eggert, T., Jaeger, K.-E. and Pohl, M. (2007):** New insights into the inactivation mechanism of microbial lipases by acetaldehyde. Posterbeitrag, Biotrans 2007 (Oviedo).
- **Franken, B., Eggert, T., Jaeger, K.-E. and Pohl, M. (2009):** Novel mechanistic insights into the inactivation mechanism of microbial lipases by acetaldehyde. Posterbeitrag, Biotrans 2009 (Bern). *In Vorbereitung*

Danksagung

Frau Prof. Dr. Martina Pohl gebührt mehr als der an dieser Stelle übliche Dank. Ich danke ihr für ihre engagierte und freundschaftliche Betreuung, für die stete Diskussionsbereitschaft und die Hilfe bei der Planung und Durchführung dieser Promotionsarbeit sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts. Es war eine große Freude, eine Wissenschaftlerin kennenzulernen, für die der Begriff „Doktormutter“ mehr als nur ein Wort ist. Vielen Dank für die schöne Zeit.

Für die freundliche Übernahme des Korreferats, die Hilfe und das stets „offene Ohr“ danke ich Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger.

Dem DFG-Graduiertenkolleg 1166 BioNoCo „*Biocatalysis in non-conventional media*“ gilt mein Dank für die Finanzierung meiner Promotionsstelle im Rahmen des mir zuerkannten Stipendiums und die vielen interessanten und lehrreichen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Veranstaltungen und Kooperationen.

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. Thorsten Eggert für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die engagierte Betreuung in der Anfangsphase meiner Promotion. Ich wünsche ihm und allen Mitarbeitern der evocatal GmbH viel Glück und Erfolg in der Zukunft.

Herrn Dr. Sanjib Kumar Karmee (Institut für technische und makromolekulare Chemie der RWTH Aachen, AK Leitner) danke ich für spontane Hilfe bei den GC/MS-Messungen und der Auswertung der Spektren.

Frau Dr. Melanie Brocker (Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich, AG Biochemie) und Frau Dr. Sabine Metzger (Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Analytisches Zentrallabor) möchte ich für die spontane, tatkräftige und unermüdliche Unterstützung bei den MALDI-TOF-MS Messungen danken.

Allen Mitarbeitern des Instituts für molekulare Enzymtechnologie danke ich für das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima während meiner gesamten Promotionszeit. Ganz besonders herzlicher Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen „Gerichtete Evolution“ und „Angewandte Enzymtechnologie“, die mir in jeder Situation mit Rat, Tat und Spaß zur Seite gestanden haben.

INHALT

1	Einleitung	1
1.1	Enzyme als Katalysatoren	1
1.2	Lipasen	3
1.2.1	Allgemeine molekulare und biochemische Eigenschaften	3
1.2.2	Die α/β -Hydrolase-Faltung.....	6
1.2.3	Lipasen versus Esterasen: Das Konzept der Grenzflächenaktivierung.....	9
1.2.3	Der Katalysemechanismus von Lipasen	12
1.3	Hydrolasen in der Biotechnologie	14
1.3.1	Lipasen in organischen Lösungsmitteln: Wichtige Konzepte und Anwendungen	15
1.3.2	Lipase-katalysierte Estersynthese.....	25
1.3.3	Inaktivierung mikrobieller Lipasen durch Acetaldehyd	29
2	Motivation und Zielsetzung	33
2.1	Motivation	33
2.2	Zielsetzung	34
3	Material und Methoden	36
3.1	Material	36
3.1.1	Geräte und Chemikalien	36
3.1.2	Bakterienstämme und Vektoren.....	38
3.2	Kultivierung und Stammhaltung von <i>E. coli</i>	39
3.3	Molekularbiologische Methoden	40
3.3.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
3.3.2	QuikChange®-PCR	40
3.3.3	Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	42
3.3.4	Alkalische Agarosegelelektrophorese von DNA.....	42

3.3.5	Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i>	43
3.4	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	44
3.4.1	Hochzelldichte-Kultivierung.....	44
3.4.2	Zellaufschluss durch Ultraschall.....	46
3.5	Quantitative Proteinbestimmung	47
3.6	Chromatographische Reinigung von BSLB	48
3.6.1	IMAC an Ni-NTA-Agarose.....	48
3.6.2	Gelfiltrationschromatographie an Sephadex™ G-25-Medium.....	49
3.7	Lyophilisierung	49
3.8	Proteinmodifikationen	50
3.8.1	Modifikation mit Acetaldehyd unter nicht-wässrigen Bedingungen.....	50
3.8.2	Modifikation von BSL-B mit Methylacetimidat.....	50
3.8.3	Modifikation von BSL-B mit Acetaldehyd unter wässrigen Bedingungen.....	51
3.8.4	Modifikation mit 2,4-Hexadienal unter wässrigen Bedingungen	51
3.8.5	Modifikation von Rinderserumalbumin (BSA) mit Acetaldehyd unter wässrigen Bedingungen	52
3.9	Enzymaktivitätstests	53
3.9.1	Tributyrinplattentest.....	53
3.9.2	<i>para</i> -Nitrophenylpalmitat-Test (pNPP-Test).....	53
3.10	2,4-Dinitrophenylhydrazin-Test (DNPH-Test)	54
3.11	Proteinfällung mittels Trichloressigsäure (TCA-Fällung)	56
3.12	Elektrophoretische Verfahren	57
3.12.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
3.12.2	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	58
3.13	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	58
3.14	MALDI-TOF	58

3.15	Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)	59
4	Ergebnisse und Diskussion	60
4.1	Die Sensitivität mikrobieller Lipasen gegenüber Acetaldehyd kann über den <i>pH-memory</i> Effekt gesteuert werden.....	60
4.2	BSL-B besitzt keinen Lysinrest der für die katalytische Aktivität essentiell ist	63
4.3	Die Acetaldehyd-induzierte Inaktivierung von BSL-B beruht nicht auf der Aggregation/Präzipitation des Enzyms	65
4.4	Acetaldehyd induziert eine Verschiebung des isoelektrischen Punkts und die Bildung intermolekularer <i>cross-links</i>	66
4.5	Die Inaktivierungsgeschwindigkeit von BSL-B ist abhängig von der Enzymkonzentration	70
4.6	Acetaldehyd bildet unter wässrigen und nicht-wässrigen Bedingungen farbige, Protein-gebundene Verbindungen	77
4.7	Aldolkondensation von Acetaldehyd führt zur Bildung α,β -ungesättigter Aldehyde	81
4.8	α,β -ungesättigte Aldehyde bilden stabile Michael-Addukte mit BSA und BSL-B	83
4.9	2,4-Hexadienal inaktiviert BSL-B.....	85
4.10	Die Maskierung primärer Aminogruppen führt zu einer Stabilisierung der BSL-B.....	86
4.11	MALDI-TOF-Analyse Acetaldehyd-modifizierter BSL-B-Proben	92
5	Zusammenfassung.....	94
5	Abstract	96
6	Literaturverzeichnis	98
Anhang	111
	Mathematische Formeln für den <i>pNPP</i> -Test	111
	Henderson-Hasselbalch-Gleichung	111
	Primersequenzen	111
	Berechnete pK_s -Werte der ϵ -Aminogruppen in Lipasen.....	113

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A. dest	destilliertes Wasser
a_w	thermodynamische Wasseraktivität
BSA	Rinderserumalbumin
BSL-A	<i>Bacillus subtilis</i> Lipase A
BSL-B	<i>Bacillus subtilis</i> Lipase B
CLEA	<i>cross linked enzyme aggregate</i>
CLEC	<i>cross linked enzyme crystal</i>
CMC	kritische Micellarkonzentration
CRL	<i>Candida rugosa</i> Lipase
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	Dinitrophenylhydrazin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss (<i>enantiomeric excess</i>)
GC/MS	gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie
h	Stunde
HZD	Hochzelldichte
IEF	isoelektrische Fokussierung
IMAC	immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactosid
kDa	Kilodalton
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
L	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Nährmedium
$\log P$	negativer dekadischer Logarithmus des Wasser/Oktanol-Verteilungskoeffizienten
M	molar
MALDI-TOF-MS	matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisierungs-Flugzeit-Massenspektrometrie
min	Minute
mL	Milliliter
mU	Milliunit (Enzymeinheit)
NaDoc	Natriumdesoxycholat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p.A.	<i>per analysis</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFL	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Lipase
pNPP	<i>para</i> -Nitrophenylpalmitat
<i>rac</i>	Racemat
ROL	<i>Rhizopus oryzae</i> Lipase
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
Sdp	Siedepunkt
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
w/v	Masse pro Volumen

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung		Seite
1.1	Lipase-katalysierte Hydrolyse eines Triacylglycerols	4
1.2	α/β -Hydrolase-Faltungsmotiv	6
1.3	Das katalytische Zentrum einer Lipase am Beispiel der Lipase aus <i>C. rugosa</i>	8
1.4	Gegenüberstellung der klassischen Michaelis-Menten-Kinetik und der Kinetik einer grenzflächenaktivierbaren Lipase	10
1.5	Die <i>Candida rugosa</i> Lipase im geschlossenen und offenen Zustand	11
1.6	Der katalytische Mechanismus der lipasekatalysierten reversiblen Hydrolyse eines Fettsäureesters und irreversiblen Umesterung eines Vinylester	12
1.7	Faktoren, die zur Verminderung der Enzymaktivität in organischen Lösungsmitteln führen	20
1.8	Anteil der Hydrolasen bzw. Lipasen an biokatalysierten Prozessen im industriellen Maßstab	24
1.9	Lipasekatalysierte Reaktionen unter wässrigen und nicht-wässrigen Bedingungen	26
1.10	Lipasekatalysierte Estersynthese	28
1.11	Irreversible Lipase-katalysierte Estersynthesen	29
1.12	Acetaldehyd-induzierte Schiffbasenbildung an Protein-gebundenen primären Aminogruppen	30
1.13	Arretierung der Deckeldomäne der <i>C. rugosa</i> Lipase durch Lys ₇₅	32
3.1	Prinzip der ortsspezifischen Mutagenese nach dem QuikChange-Verfahren	41
3.2	Modifikation eines Proteins mit Methylacetimidat	50
3.3	Hydrolyse von <i>para</i> -Nitrophenylpalmitat zu <i>para</i> -Nitrophenolat und Palmitinsäure	53
3.4	DNPH-Test zum Nachweis carbonylierter Proteine	55
4.1	Inaktivierung der Lipasen aus <i>P. fluorescens</i> (Amano AK), <i>R. oryzae</i> (Amano F-AP15) und <i>C. rugosa</i> (Sigma Typ VII) in Abhängigkeit von der Acetaldehydkonzentration nach der Lyophilisierung bei pH 6 und pH 10	61
4.2	Inaktivierung der BSL-A und -B durch steigende Acetaldehydkonzentrationen in Toluol nach der Lyophilisierung bei pH 6 und pH 10	63
4.3	Tributyrylplattentest der BSL-B Punktmutanten an allen Lysinresten	64
4.4	Acetaldehyd-induzierte Aggregation und Inaktivierung der BSL-B unter wässrigen Bedingungen	65
4.5	IEF der BSL-B nach der Inkubation für 24 h bei 37 °C mit (+) bzw. ohne (-) 500 mM Acetaldehyd	67
4.6	SDS-PAGE der BSL-B nach der Inkubation mit steigenden Acetaldehydkonzentrationen (0 – 500 mM) für 24 h bei 37 °C	68
4.7	Acetaldehyd-induzierte Lipaseinaktivierung in Abhängigkeit der Enzymkonzentration und verschiedener dominierender Inaktivierungsmechanismen	71
4.8	Hydrolytische Restaktivität von BSL-B-Proben verschiedener Konzentration (25 – 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) nach zweistündiger Inkubation mit 500 mM Acetaldehyd	72
4.9	Verfärbung der Enzymlyophilisate aus <i>C. rugosa</i> (Sigma Typ VII, CRL), <i>P. fluorescens</i> (Amano AK, PFL), <i>R. oryzae</i> (Amano F-AP15, ROL), BSL-A und BSL-B nach Inkubation mit 500 mM Acetaldehyd in Toluol	77

4.10	Basen- und aminosäurekatalysierte Aldolkondensation von Acetaldehyd zu α,β -ungesättigten Aldehyden	80
4.11	Michael-Addition (A) und Schiffbasenbildung (B) zwischen einer primären Aminogruppe und dem α,β -ungesättigten Aldehyd Crotonaldehyd	81
4.12	Extraktion der in Gegenwart von 10 mM NaOH (+ NaOH) bzw. 10 mM Glycin (+ Glycin) gebildeten farbigen Verbindungen aus einem wässrigen Ansatz mit 500 mM Acetaldehyd mittels Dichlormethan	82
4.13	Veränderung der log <i>P</i> -Werte α,β -ungesättigter Aldehyde durch Michael-Addition an Glycin	83
4.14	DNPH-Test zum Nachweis proteingebundener Carbonylgruppen	84
4.15	Hydrolytische Restaktivität der BSL-B nach der Inkubation mit steigenden 2,4-Hexadienalkonzentrationen von 0 – 50 mM in Glycin/NaOH-Puffer für 24 h bei 37 °C	86
4.16	Acetaldehydinaktivierung verschiedener BSL-B-Proben nach der Reaktion der proteingebundenen primären Aminogruppen (N-Terminus und Lysinseitenketten) mit bzw. ohne Methylacetimidat	89
5.1	Postulierter Inaktivierungsmechanismus mikrobieller Lipasendurch Acetaldehyd	95
5.2	Postulated inactivation mechanism of microbial lipases by acetaldehyde	97

Tabelle		Seite
1.1	Einteilung organischer Lösungsmittel nach ihrem log <i>P</i> -Wert	21
1.2	Industrielle lipasekatalysierte Prozesse in organischen Lösungsmitteln	25
1.3	Einfluss verschiedener Ester auf die relative Reaktionsgeschwindigkeit lipasekatalysierter Estersynthesen	28
3.1	Zusammensetzung der Stammlösungen zur Durchführung einer HZD-Kultivierung	45
3.2	Zusammensetzung der HZD-Kultivierungsmedien	46
4.1	pI-Werte verschiedener BSL-B-Varianten	67
4.2	Ergebnisse der DLS-Messungen mit BSL-B-Proben verschiedener Konzentration (100 – 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	74
4.3	Einfluss verschiedener Komponenten auf die Bildung farbiger Verbindungen und Test der Bindungsfähigkeit dieser Verbindungen an BSA	78
4.4	Zusammensetzung der verschiedenen Versuchsansätze	88

1 EINLEITUNG

1.1 Enzyme als Katalysatoren

Enzyme (Biokatalysatoren) sind Eiweißmoleküle, die in allen lebenden Organismen vorkommen und für die Gesamtheit der Stoffwechselprozesse innerhalb der Zelle verantwortlich sind. Sie setzen die Aktivierungsenergie für (bio)chemische Reaktionsabläufe herab und führen somit zu einer Beschleunigung der Stoffumwandlung (Biotransformation). Die hervorstechendsten Eigenschaften von Enzymen sind ihre *katalytische Aktivität* und ihre *Regio-* bzw. *Enantioselektivität*. Nahezu alle bekannten Enzyme sind Proteine, es gibt jedoch auch katalytisch aktive RNA-Moleküle (sog. Ribozyme) ¹. In der Praxis sind jedoch sowohl Ribozyme als auch katalytische Antikörper kaum relevant, da ihre katalytischen Aktivitäten bislang noch weit hinter denen der Enzyme und chemischen Katalysatoren zurückbleiben ².

Die katalytische Aktivität von Enzymen wurde bereits vor ca. 7000 - 8000 Jahren zur Herstellung von Käse, Brot, Bier und Wein genutzt ³. Trotz der intensiven, aber empirischen Nutzung biokatalytischer Aktivität waren sich die antiken Kulturen dennoch über die Existenz von Mikroorganismen und der darin enthaltenen Enzyme nicht im Klaren ⁴. Man hielt diese, wie viele andere Vorgänge in der Natur, für Reaktionen, die von selbst ablaufen. 1783 beobachtete der italienische Biologe Lazzaro Spallanzani, dass Magensaft, den er Falken entnommen hatte, Fleisch verdaut. In diesem Experiment vollzog Spallanzani wahrscheinlich zum ersten Mal bewusst eine biochemische Reaktion außerhalb eines Lebewesens nach. Kurz nach dieser Beschreibung eines chemischen Katalyse-Phänomens wurden die ersten Biokatalysatoren entdeckt. Im Jahre 1833 zeigten die französischen Chemiker Anselme Payen und Jean-Francois Persoz, dass sich die Spaltung von Stärke zu Glucose sehr schnell und ohne Kochen durchführen ließ, wenn sie anstatt verdünnter Salzsäure einen Stoff benutzten, den sie aus keimender Gerste gewonnen hatten. Dieser Stoff, den sie *Diastase* (heute *α -Amylase*) nannten, war das erste bekannte Enzym ⁵, wurde jedoch zu dieser Zeit zusammen mit anderen ähnlichen Stoffen als *Ferment* bezeichnet.

Der Begriff *Katalyse* (vom griechischen *katálysis* – die Auflösung, Abschaffung, Aufhebung) wurde in der Folge für diese, in diesem und anderen Berichten beschriebene, eigentümliche Klasse chemischer Erscheinungen von dem Sekretär der schwedischen Akademie der Wissenschaften, Jöns Jacob Berzelius, 1835 eingeführt ^{6,7}. Berzelius beschrieb in seinen

Ausführungen die heterogene und homogene Katalyse und befasste sich ansatzweise bereits mit der Energetik (Aktivierungsenergie), jedoch fehlte der Hinweis auf die durch den Katalysator bedingte Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit. Erste Einsichten über die thermodynamischen Prozesse während der Katalyse lieferte einige Jahre später Wilhelm Ostwald und prägte somit den modernen Katalysator-Begriff:

"Katalyse ist die Beschleunigung eines langsam verlaufenden chemischen Vorgangs durch die Gegenwart eines fremden Stoffes." (1894) "Ein Katalysator ist jeder Stoff, der, ohne im Endprodukt einer chemischen Reaktion zu erscheinen, ihre Geschwindigkeit verändert." (1901)

Demnach sind Katalysatoren Stoffe, die in den Reaktionsmechanismus eingreifen, aber selbst durch die Reaktion nicht verbraucht werden. Sie treten in der Bruttogleichung nicht auf. Der Katalysator verändert durch Absenken der Aktivierungsenergie die Reaktionsgeschwindigkeit, jedoch nicht die Gleichgewichtslage.

Parallel zu der Prägung und genaueren Definition der Begriffe *Katalyse* und *Katalysator* regte der deutsche Physiologe Wilhelm Kühne 1876 an, nur für jene Prozesse den Begriff *Fermente* zu benutzen, die einen Lebensvorgang erforderten. Dagegen sollten die außerhalb der Zelle arbeitenden Fermente mit *Enzyme* (vom griechischen *en zymē* – in der Hefe) bezeichnet werden, da sie in ihrer Wirkung den Fermenten der Hefe ähnlich waren. In den folgenden Jahren wurde dann, durch den vom deutschen Chemiker Eduard Buchner 1897 geführten Beweis, dass Enzyme auch in Abwesenheit lebender Zellen funktionieren und die Vergabe des ersten Patents für einen enzymatischen Prozess 1894 an Jokichi Takamine, der Grundstein für die Anwendung von Enzymen in der Industrie und der organischen Synthese gelegt ⁸. Jedoch wurde erst im Jahre 1965 der erste, vollständig auf isolierten Enzymen beruhende, industrielle Prozess vorgestellt. Hierbei handelte es sich um eine Umsetzung von Stärke in Glukosesirup durch eine bakterielle α -Amylase und eine Glukoamylase aus Pilzen ⁹.

Trotz dieser Entwicklungen verlief die Erforschung der Enzyme auf chemischer und biologischer Seite zunächst getrennt, da Enzyme experimentell nicht ausreichend zugänglich waren. Erst die Entwicklung der rekombinanten DNA-Technologie und des *Protein Engineering* in den letzten 20 Jahren, ermöglichten eine Ausweitung der industriellen Anwendung von Enzymen ¹⁰⁻¹². Es wird geschätzt, dass nicht weniger als 50 % der heute kommerziell

erhältlichen Enzyme mit Hilfe dieser Methoden verändert wurden¹³. Die traditionellen Anwendungsgebiete für Enzyme (Lebensmittel-, Futtermittel-, Waschmittel-, Textil- und Gerbereiindustrie) konnten auf diese Weise in den letzten Jahren um den pharmazeutischen und Feinchemikalien-Sektor erweitert werden¹⁴⁻¹⁷. Der vielversprechendste und herausforderndste Bereich der Enzymtechnologie ist jedoch heutzutage die Anwendung von Enzymen in der organischen Synthesechemie insbesondere zum Aufbau chiraler Bausteine¹⁸⁻²⁰.

Die mit Abstand am häufigsten verwendeten Enzyme in diesem Bereich sind die Lipasen (Triacylglycerolhydrolasen, EC 3.1.1.3)²¹⁻²⁴. Lipasen sind im Allgemeinen vielseitige Enzyme, die eine Vielzahl an Substraten (z.B. aliphatische, alizyklische, bizyklische und aromatische Ester, Thioester und aktivierte Amine), unter Beibehaltung einer hohen Regio-, Chemo- und Enantioselektivität akzeptieren⁴. Die Stabilität der meisten Lipasen in organischen Lösungsmitteln ebnete darüberhinaus den Weg für ihre Anwendung in der organischen Synthese. Diese und andere Eigenschaften, die im Folgenden angesprochen werden sollen, sorgten dafür, dass Lipasen heutzutage eine Schlüsselposition im industriellen Enzymsektor einnehmen²⁵⁻²⁹.

1.2 Lipasen

1.2.1 ALLGEMEINE MOLEKULARE UND BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN

Lipasen sind Triacylglycerolhydrolasen (EC 3.1.1.3), die bevorzugt wasserunlösliche Triacylglycerole in Di- und Monoacylglycerole sowie Glycerol und Fettsäuren hydrolysieren (Abbildung 1.1). Ihr natürliches Vorkommen erstreckt sich über das gesamte Organismenreich. In Eukaryoten befinden sie sich sowohl innerhalb von Organellen (z.B. Lysosomen), als auch im extrazellulären Milieu und spielen eine entscheidende Rolle im Metabolismus bzw. bei der Absorption und dem Transport von Lipiden. In einfachen Eukaryoten und Bakterien können Lipasen ebenfalls sowohl intra- als auch extrazellulär lokalisiert sein. Sekretierte Lipasen werden hierbei in der Regel zum Abbau von Nährstoffen benötigt, jedoch können diese in einigen pathogenen Mikroorganismen (z.B. *Candida albicans*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* sp. und *Helicobacter pylori*) auch als Virulenzfaktoren agieren³⁰⁻³².

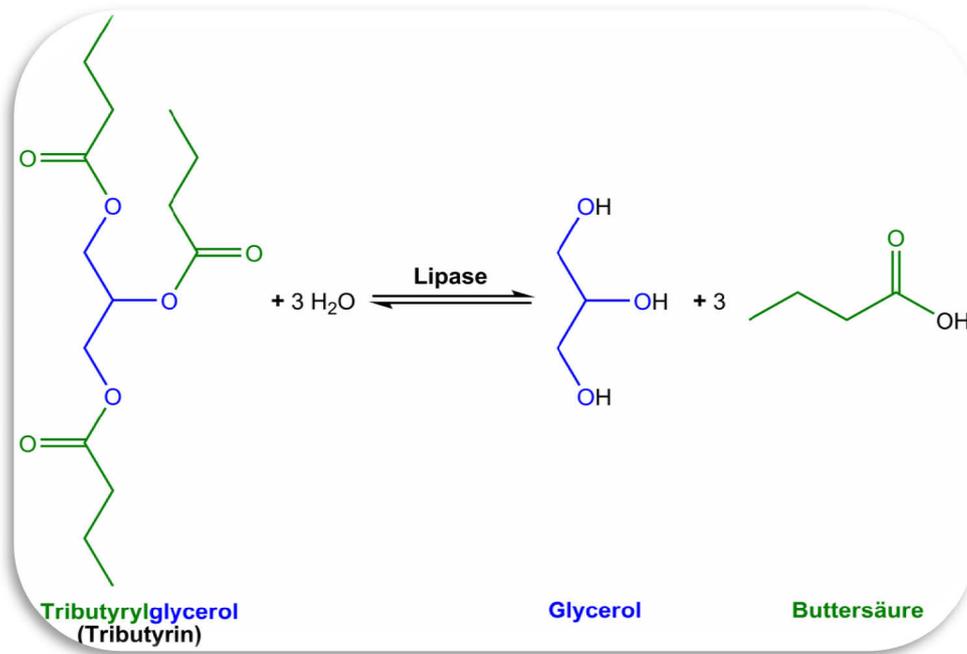


Abbildung 1.1 Lipase-katalysierte Hydrolyse eines Triacylglycerols am Beispiel von Tributyrin

Aufgrund der hohen strukturellen Stabilität, der einfachen Produktion durch Fermentation und der leichten Reinigung aus dem Kulturüberstand, wird den lipolytischen Enzymen aus Bakterien und Pilzen das größte Potential als industrielle Biokatalysatoren beigemessen. Daher wundert es nicht, dass inzwischen eine Vielzahl an mikrobiellen Lipasen kommerziell erhältlich ist. Die meisten bakteriellen Lipasen stammen hierbei aus *Pseudomonas Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Bacillus* und *Chromobacterium* species. Häufig verwendete Pilz-Lipasen hingegen werden vorwiegend aus *Candida*, *Humicola*, *Penicillium*, *Yarrowia*, *Mucor*, *Rhizopus* und *Aspergillus* sp. gewonnen²¹. Eines der wenigen Enzyme aus einem höheren Eukaryoten mit industrieller Relevanz ist die Schweinepankreaslipase³³. Andere Säugetier-Lipasen sind im Hinblick auf die industrielle Anwendung eher unbedeutend, jedoch Gegenstand intensiver medizinischer Forschung zur Entwicklung von neuen Medikamenten bzw. der Identifizierung neuer Wirkorte^{16,29}. In diesen Fällen werden bevorzugt rekombinante Enzyme verwendet, um aufwendige Reinigungsverfahren zu umgehen. So wird z.B. rekombinante humane Magenlipase zur Behandlung von Pankreasinsuffizienzen in der Medizin eingesetzt³⁴. Pflanzenenzyme, wie z.B. die aus Papaya, Pampelmuse, *Euphorbia*, *Veronia* und insbesondere aus keimendem Saatgut (Rizinus-, Ölpalmsamen, Ölsaaten und Raps) sind aufgrund ihrer ungewöhnlichen Fettsäureselektivitäten in der Biokatalyse ebenfalls von besonderem Interesse³⁵. Diese große Ursprungs-, zelluläre Lokalisations- und Funktionsvielfalt spiegelt sich in einem beachtlichen

Grad an biochemischer Variabilität wider. So können sich Lipasen unterschiedlicher Ursprünge und sogar Isoenzyme, die von ein und demselben Organismus produziert werden, stark in ihrer molekularen Masse, den Temperatur- bzw. pH-Optima und den Substratspezifitäten unterscheiden³⁶.

Lipasen weisen ein weites Spektrum bezüglich ihrer Temperaturoptima auf, das für Enzyme mesophiler Organismen zwischen 30 °C und 60 °C liegt. In jüngster Zeit sind jedoch auch Enzyme aus extremophilen Mikroorganismen identifiziert worden, die mit Temperaturoptima von über 70 °C (z.B. *Bacillus thermocatenulatus* Lipase) oder hohen Aktivitäten bei sehr niedrigen Temperaturen, wie im Falle antarktischer Pseudomonaden oder *Moraxella* sp., das Spektrum stark erweitert haben³⁷. Diese ermöglichen es, dass diese Lipasen, ohne vorherige Adaptation durch rekombinante DNA-Technologien oder *Protein Engineering*, in Hoch- bzw. Niedrigtemperaturprozessen (z.B. Waschmittel- und Lebensmittelindustrie) eingesetzt werden können^{38,39}.

Die pH-Optima der meisten Lipasen liegen im neutralen bis leicht alkalischen pH-Bereich. In manchen Fällen können diese jedoch auch in pH-Bereichen von über pH 9,0 (*Pseudomonas* und *Bacillus* Lipasen) liegen⁴⁰. Seltener hingegen sind Lipasen mit einem pH-Optimum im sauren pH-Bereich. Eines der wenigen Beispiele stellt die bakterielle Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* SIK W1, mit einem pH-Optimum von 4,8, dar^{26,41}. Jedoch zeichnen sich insbesondere bakterielle Lipasen häufig durch sehr breite pH-Aktivitäts- und pH-Stabilitätsspektren aus²⁶. So sind z.B. die Lipasen aus *Bacillus stearothermophilus* SB-1, *Bacillus atrophaeus* SB-2 und *Bacillus licheniformis* SB-3 über einen weiten pH-Bereich (pH 3-12) hinweg äußerst aktiv⁴². Andere bakterielle Lipasen hingegen weisen hohe Stabilitäten zwischen pH 4 und pH 11 auf^{43,44}.

Die molekularen Massen der bisher bekannten lipolytischen Enzyme liegen zwischen weniger als 20 kDa - für die Lipasen A und B aus *Bacillus subtilis* und die Cutinase aus *Fusarium solani pisi* - und mehr als 60 kDa, wie z.B. denen aus *Candida rugosa* und *Geotrichum candidum*⁴⁵⁻⁴⁷. Trotz der großen Massenunterschiede ist nahezu allen Lipasen gemeinsam, dass sie zum einen jeweils aus einer einzigen Proteinkette aufgebaut sind und zum anderen ein einheitliches Faltungsmotiv, die sog. α/β -Hydrolase-Faltung aufweisen.

1.2.2 DIE α/β -HYDROLASE-FALTUNG

Obwohl die bisher bekannten Lipasen eine hohe Sequenzdiversität zeigen, gehören alle in ihrer dreidimensionalen Struktur aufgeklärten Lipasen (z.B. die humane Pankreaslipase, die Lipasen aus dem Pilz *Candida rugosa* und die bakteriellen Lipasen aus *Bacillus subtilis*) einer gemeinsamen Strukturfamilie, der sog. α/β -Hydrolase-Familie, an⁴⁸⁻⁵¹. Die ursprüngliche Beschreibung dieser Faltung geht auf eine Studie zurück, in der die Strukturen einer Vielzahl von, sich in ihrer Aminosäuresequenz und Substratspezifität stark unterscheidenden Hydrolasen verglichen worden sind. Eine dieser Strukturen war die der Lipase aus dem Milchscheimpilz *Geotrichum candidum*⁵². Kernstück dieser Faltung ist die sog. kanonische α/β -Hydrolase-Faltung (Abbildung 1.2)⁵²⁻⁵⁴.

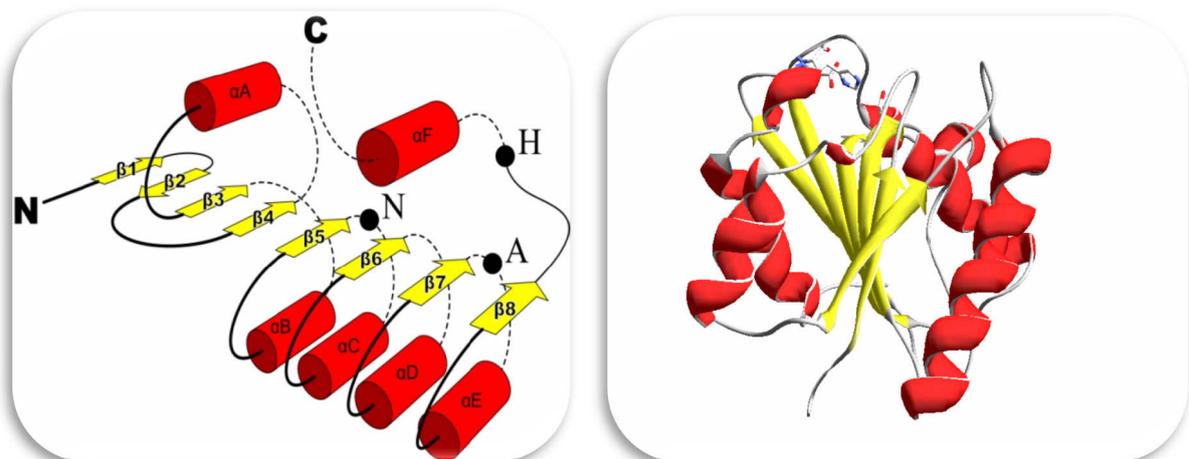


Abbildung 1.2 α/β -Hydrolase-Faltungsmotiv. Die kanonische α/β -Hydrolase-Faltung (links) und die dreidimensionale Struktur der *Bacillus subtilis* Lipase A (BSL-A) (PDB-ID: 1isp; rechts). In beiden Darstellungen sind die Stränge des zentralen β -Faltblatts gelb und die flankierenden α -Helices rot eingefärbt. Die konservierten Positionen des Nukleophils Serin, der sauren Aminosäure Aspartat/Glutamat und des Histidins der katalytischen Triade innerhalb der kanonischen α/β -Hydrolase-Faltung sind durch die Buchstaben **N** (Nukleophil), **A** (saure Aminosäure) und **H** (Histidin) markiert. **N** und **C** bezeichnen den N- und C-Terminus des Proteins.

Es handelt sich dabei um eine größtenteils parallele zentrale β -Faltblatt-Struktur, die von sechs α -Helices (αA - αE) umgeben ist. Das β -Faltblatt besteht aus sieben parallelen ($\beta 1$ und $\beta 3$ - $\beta 8$) und einem antiparallelen ($\beta 2$) Strang. Die Stränge $\beta 3$ - $\beta 8$ sind ihrerseits durch die sechs α -Helices, die sich auf beiden Seiten des Faltblattes anordnen, miteinander verbunden (Abbildung 1.2).

Das aktive Zentrum sämtlicher α/β -Hydrolasen enthält eine katalytische Triade die aus einem nukleophilen Aminosäurerest, einem sauren Aminosäurerest und einem Histidinrest aufgebaut ist. Dieser Aufbau der katalytischen Triade erinnert zwar an den in Serinproteasen, jedoch unterscheidet sie sich in der α/β -Hydrolase durch ihre Reihenfolge: Nukleophil-Säure-Histidin⁵². Die katalytische Triade in Lipasen besteht aus Serin, Aspartat oder Glutamat und Histidin, wobei das Serin stets inmitten des hochkonservierten Pentapeptids G-X-S-X-G (Lipase-Konsensusmotiv) liegt. Dieses Konsensusmotiv wird in der PROSITE-Datenbank⁵⁵ unter der Nummer PS00120 ([LIV]-{KG}-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-S-{YAG}-G-[GSTAC]) geführt und identifiziert ein Protein eindeutig als Lipase.

Das Lipase-Konsensusmotiv befindet sich stets innerhalb einer stark gekrümmten, rigiden Schleife des Peptidrückgrats direkt im Anschluss an den $\beta 5$ -Strang; dem sog. *nukleophilen Ellenbogen*^{52,56}. Durch die hohe Rigidität dieser Anordnung wird das Serin in energetisch ungünstigen Torsionswinkeln Φ und Ψ gehalten und führt somit zu einer optimalen Ausrichtung des Nukleophils, das auf diese Weise sowohl für das katalytische Histidin als auch das Substrat frei zugänglich ist. Darüberhinaus ist der nukleophile Ellenbogen an der Bildung der sog. *Oxyanionentasche* beteiligt, die üblicherweise von zwei Rückgrat-Amidfunktionen gebildet wird, von denen eine der Aminosäure entstammt, die dem Nukleophil in der Sequenz nachfolgt, und die andere zu einer Aminosäure gehört, die in den meisten Fällen zwischen αA und $\beta 3$ liegt (Abbildung 1.3). Die Oxyanionentasche dient der Stabilisierung der im Katalysemechanismus (1.2.3) gebildeten ionischen Zwischenstufen (tetraedrisches Intermediat 1 und 2)⁵⁷⁻⁵⁹.

Der katalytisch aktive saure Aminosäurerest – Aspartat oder Glutamat – liegt in dem Prototyp der α/β -Hydrolase hinter dem $\beta 7$ -Strang (Abbildung 1.2) und ist in der dreidimensionalen Struktur so ausgerichtet, dass eine Wasserstoff-Brückenbindung zum katalytischen Histidinrest gebildet und Elektronendichte abgezogen werden kann⁵². Die topologische Position der sauren Aminosäure ist jedoch vergleichsweise variabel und tritt z.B. in der humanen Pankreaslipase bereits nach dem $\beta 6$ -Strang auf⁵⁰. In anderen Fällen kann auch die Wasserstoff-Brückenbindung zwischen der sauren Aminosäure und Histidin nicht direkt, sondern über ein Wassermolekül vermittelt werden⁶⁰. Die dritte Aminosäure der Triade – das katalytische Histidin – liegt in einer Schleife hinter dem $\beta 8$ -Strang, wobei Länge und Konformation dieser Schleife variabel sind⁵².

Die genannten strukturellen Eigenschaften bilden die gemeinsamen Merkmale aller α/β -Hydrolasen. Darüberhinaus besitzen die meisten α/β -Hydrolasen zusätzliche Strukturelemente, die in manchen Fällen sogar ganze Domänen bilden und jedem Enzym seine charakteristischen Eigenschaften verleihen^{53,54}. Andererseits gibt es unter den α/β -Hydrolasen auch Vertreter, denen sogar einige der genannten strukturellen Konsensusmerkmale fehlen^{48,60-63}. In diesem Zusammenhang sind die lipolytischen Enzyme LipA und B aus *B. subtilis* zu nennen, die im Folgenden näher beschrieben werden.

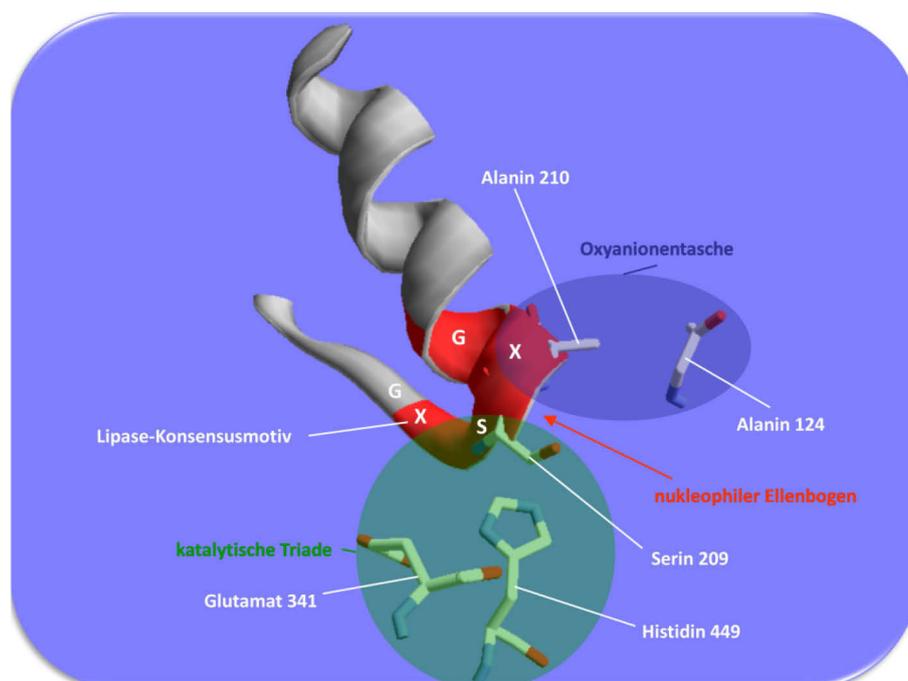


Abbildung 1.3 Das katalytische Zentrum einer Lipase am Beispiel der Lipase aus *C. rugosa* (PDB-ID: 1crl). Grün unterlegt ist die katalytische Triade mit Serin 209, Glutamat 341 und Histidin 449; Blau unterlegt ist die Oxyanionentasche mit Glycin 124 und Alanin 210; Rot eingefärbt der nukleophile Ellenbogen mit dem Lipase-Konsensusmotiv G-X-S-X-G.

Die biochemischen Eigenschaften und dreidimensionalen Strukturen – die Kristallstruktur von BSL-A wurde 2001, und ein Homologiemodell der, zu 74 % identischen, BSL-B 2002 veröffentlicht^{45,48} – verdeutlichen, warum diese beiden Enzyme bis heute in vielerlei Hinsicht als Besonderheit gelten⁶⁴⁻⁶⁹. Mit molekularen Massen von 19,3 (BSL-A) bzw. 19,5 kDa (BSL-B) und Kettenlängen von nur 181 (BSL-A) bzw. 182 Aminosäuren (BSL-B), sind sie die derzeit kleinsten bekannten Lipasen. Die *Bacillus subtilis* Lipasen besitzen zudem im Gegensatz zu den meisten anderen Lipasen, keine Deckelstruktur und sind daher nicht Grenzflächen-aktivierbar (1.2.3). Das katalytische Serin ist daher oberflächenlokalisiert und

lösungsmittelzugänglich. In dem hochkonservierten Lipase-Konsensusmotiv G-X-S-X-G des aktiven Zentrums ist in beiden Enzymen das erste Glycin durch ein Alanin substituiert. Darüberhinaus besitzen beide Enzyme keine Cysteine und sind daher ohne Disulfidbrücken stabil. Die jedoch aus struktureller Sicht bemerkenswerteste Besonderheit ist, dass ihnen, verglichen mit der kanonischen α/β -Hydrolasefaltung, die Stränge $\beta 1$ und $\beta 2$ fehlen, die Helix αD durch eine einzelne helikale Windung substituiert und weiterhin αE stark verkürzt ist. BSL-A und -B enthalten somit weniger Strukturelemente als die kanonische Faltung und werden daher auch als *minimale α/β -Hydrolasen* bezeichnet^{45,48}. Aus biochemischer Sicht ist besonders die hohe Aktivität und Stabilität beider Enzyme im alkalischen pH-Bereich ($\text{pH}_{\text{opt.}} = 10$) hervorzuheben. Aufgrund der strukturellen Eigenschaften, können somit sowohl BSL-A als auch BSL-B als Lipase-Basisstrukturen betrachtet werden, die sich hervorragend zur Aufklärung grundlegender Fragestellung eignen.

1.2.3 LIPASEN VERSUS ESTERASEN: DAS KONZEPT DER GRENZFLÄCHENAKTIVIERUNG

Da sich die Substratspektren der vielen unterschiedlichen Vertreter der Carboxylesterhydrolasen überschneiden, ist eine exakte Unterteilung der lipolytischen Enzyme schwierig. Lipasen (EC 3.1.1.3) weisen besondere Ähnlichkeit sowohl mit Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1) als auch mit den Arylesterasen (3.1.1.2) auf. Darüberhinaus finden sich aber auch Überschneidungen mit der komplexen Gruppe der Phospholipasen (EC 3.1.x.x – verschiedene Einträge) und einigen weiteren Unterklassen der Hydrolasen (NC-IUBMB, Enzymnomenklatur-Datenbank: www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/). Daher gab es im Laufe der Zeit verschiedene Ansätze, um die lipolytischen Enzyme zu klassifizieren. Einer der ersten Versuche der Klassifizierung beruhte auf der Beobachtung unterschiedlicher reaktionskinetischer Eigenschaften. Diese sog. Grenzflächenaktivierung wurde erstmals 1936 von Holwerda *et al.* beschrieben und von Schönheyder und Volqvartz 1945 bestätigt^{70,71}: Bei geringen Konzentrationen eines wasserunlöslichen Substrats war bei der Lipase aus der Schweineleber keine lipolytische Aktivität zu beobachten. Bei höheren Konzentrationen und Emulsionsbildung hingegen, stieg die Aktivität sprunghaft an (Abbildung 1.4). Einige Jahre später wurde in detaillierten Untersuchungen gezeigt, dass dieser sprunghafte Aktivitätsanstieg stets mit dem Erreichen der kritischen Micellarkonzentration (CMC) des Substrats zusammenfällt⁷². Seitdem wurde die Grenzflächenaktivierung als eindeutiges

Kriterium zur Abgrenzung der Lipasen von den Esterasen, die dieses Phänomen nicht zeigten, verwendet⁷³.

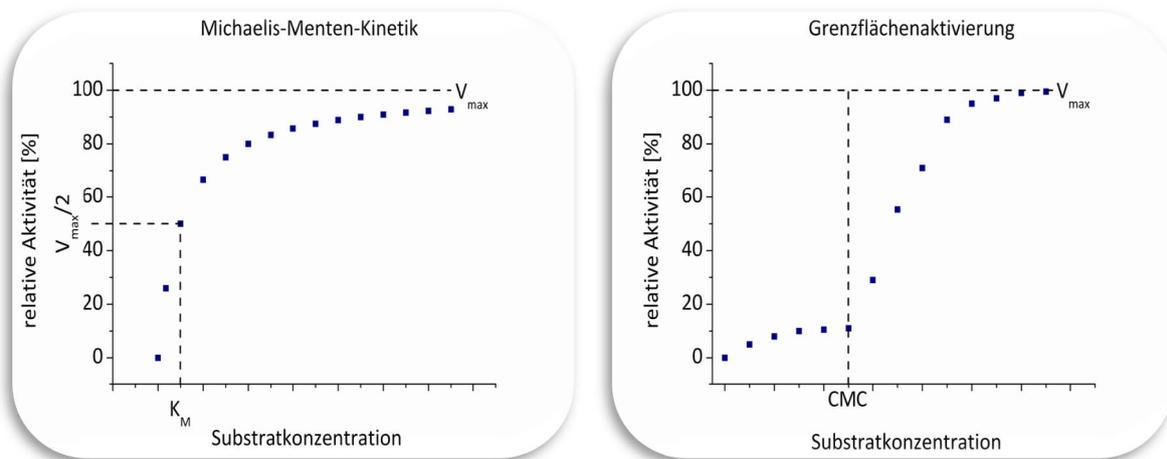


Abbildung 1.4 Gegenüberstellung der klassischen Michaelis-Menten-Kinetik und der Kinetik einer grenzflächenaktivierbaren Lipase. Nach der klassischen Michaelis-Menten-Kinetik (links) steigt die Enzymaktivität bis zum Erreichen eines Sättigungsbereiches linear mit der Substratkonzentration an. Demgegenüber ist bei grenzflächenaktivierbaren Lipase (rechts) erst oberhalb der kritischen Micellarkonzentration (CMC) ein sprunghafter Aktivitätsanstieg zu beobachten. Unterhalb der CMC kommt es, aufgrund des Fehlens einer Substrat/Wasser-Grenzfläche, nur zu einem geringen Aktivitätsanstieg, wohingegen die mit der Micellenbildung einhergehende Grenzflächenbildung zur Öffnung der Deckeldomäne und damit zu einem sprunghaften Aktivitätsanstieg führt.

Die strukturelle Ursache für die Grenzflächenaktivierung wurde einige Jahre später, mit der Aufklärung der ersten dreidimensionalen Strukturen von Lipasen, identifiziert^{50,74}. Die Kristallstrukturen zeigten, dass der Zugang zum aktiven Zentrum des Enzyms durch eine mobile α -helikale Domäne, dem sog. *Deckel*, blockiert wird. Durch den Kontakt mit einer Substrat/Wasser-Grenzfläche kommt es zu einer strukturellen Änderung der Deckeldomäne, die daraufhin zurück klappt und den Zugang zum aktiven Zentrum freigibt (Abbildung 1.5). Die Strukturen von Lipasen, die mit bzw. ohne substratanalogen Inhibitoren kristallisiert wurden, ermöglichten einen genauen Einblick in die strukturellen Änderungen während des Übergangs vom geschlossenen (inaktiven) zum offenen (aktiven) Zustand^{75,76}.

Die Mechanismen des Deckelöffnens können aber zwischen den verschiedenen lipolytischen Enzymen variieren. Allen gemeinsam ist jedoch, dass das Öffnen des Deckels zur Bildung eines frei zugänglichen aktiven Zentrums sowie einer hydrophoben Substratbindetasche führt⁷⁷. In manchen Lipasen ist das Öffnen des Deckels darüberhinaus für die Ausbildung der Oxyanionentasche (1.2.2), die die tetrahedralen Reaktionsintermediate stabilisiert, verantwortlich. Trotzdem ist eine eindeutige Klassifizierung eines lipolytischen Enzyms als

echte Lipase (EC 3.1.1.3), auf Basis der Grenzflächenaktivierung und Anwesenheit einer Deckeldomäne nicht immer möglich. Dieses Klassifizierungsproblem beruht darauf, dass einige lipolytische Enzyme aufgrund ihres Substratspektrums eindeutig als *echte* Lipasen identifiziert wurden, diese jedoch keine Deckeldomäne (z.B. *Bacillus subtilis* Lipase A) besitzen bzw. trotz Anwesenheit eines Deckels keine Grenzflächenaktivierung (z.B. *Candida antarctica* Lipase B und *Burkholderia glumae* Lipase) zeigen^{48,60,67,78-81}. Daher wurde zur Definition einer Lipase vorgeschlagen, das Substratspektrum als Kriterium zu nutzen und so Lipasen als solche Enzyme zu definieren, die langkettige Acylglycerole mit 12 oder mehr Kohlenstoffatomen in der Acylkette hydrolysieren können⁸². Die Definition von Verger ist bis heute die am weitesten verbreitete, eine eindeutige und endgültige offizielle Definition erfolgte bislang jedoch nicht.

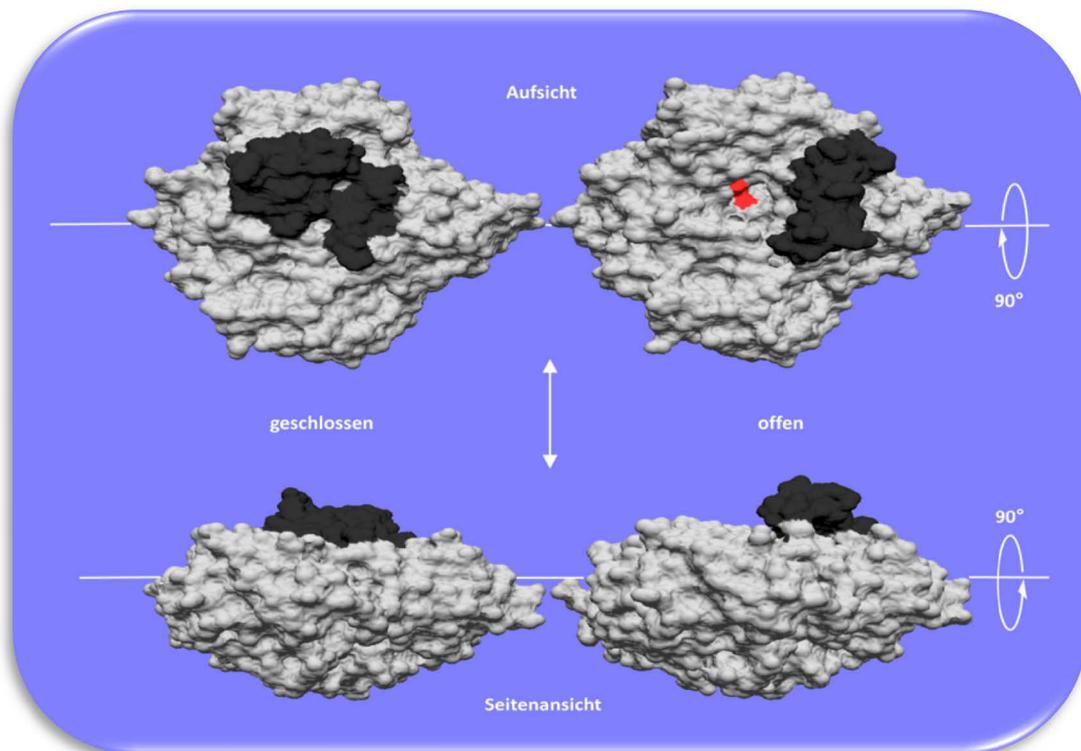


Abbildung 1.5 Die *Candida rugosa* Lipase im geschlossenen und offenen Zustand. Nach der Interaktion der Lipase mit einer Substrat/Wasser-Grenzfläche geht die Lipase, durch strukturelle Änderung der Deckeldomäne (schwarz), vom inaktiven/geschlossenen (links, PDB-ID: 1trh) in den aktiven/offenen Zustand (rechts, PDB-ID: 1crl) über. Durch die Öffnung der Deckeldomäne wird der Zugang zum aktiven Zentrum (rot) freigegeben.

1.2.3 DER KATALYSEMECHANISMUS VON LIPASEN

Der Mechanismus der Lipase-katalysierten Hydrolyse bzw. Umesterung (Abbildung 1.6) ist mit dem der Serin-Proteasen vergleichbar^{77,83}. Nach Bindung des Substrats an das katalytische Zentrum des freien Enzyms erfolgt der Transfer eines Protons von der Hydroxygruppe des katalytischen Serins auf die Imidazolseitenkette des katalytischen Histidinrests. Dieser Protonentransfer wird maßgeblich durch die saure Aminosäure der katalytischen Triade beeinflusst, da diese durch Interaktion mit der Imidazolgruppe für die korrekte Orientierung des Histidins verantwortlich ist. Die durch den Protonentransfer stark erhöhte Nucleophilie der Serinseitenkette ermöglicht den nucleophilen Angriff des Serins auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Substrats. Das hierdurch gebildete tetraedrische Intermediat 1 wird durch die Bildung von Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen dem negativ geladenen Carbonyl-Sauerstoffatom und den Amidfunktionen der Oxyanionentasche stabilisiert. Ester bei der Umesterung ($R_3 = \text{Alkyl}$) Fettsäure bei der Hydrolyse ($R_3 = \text{H}$)

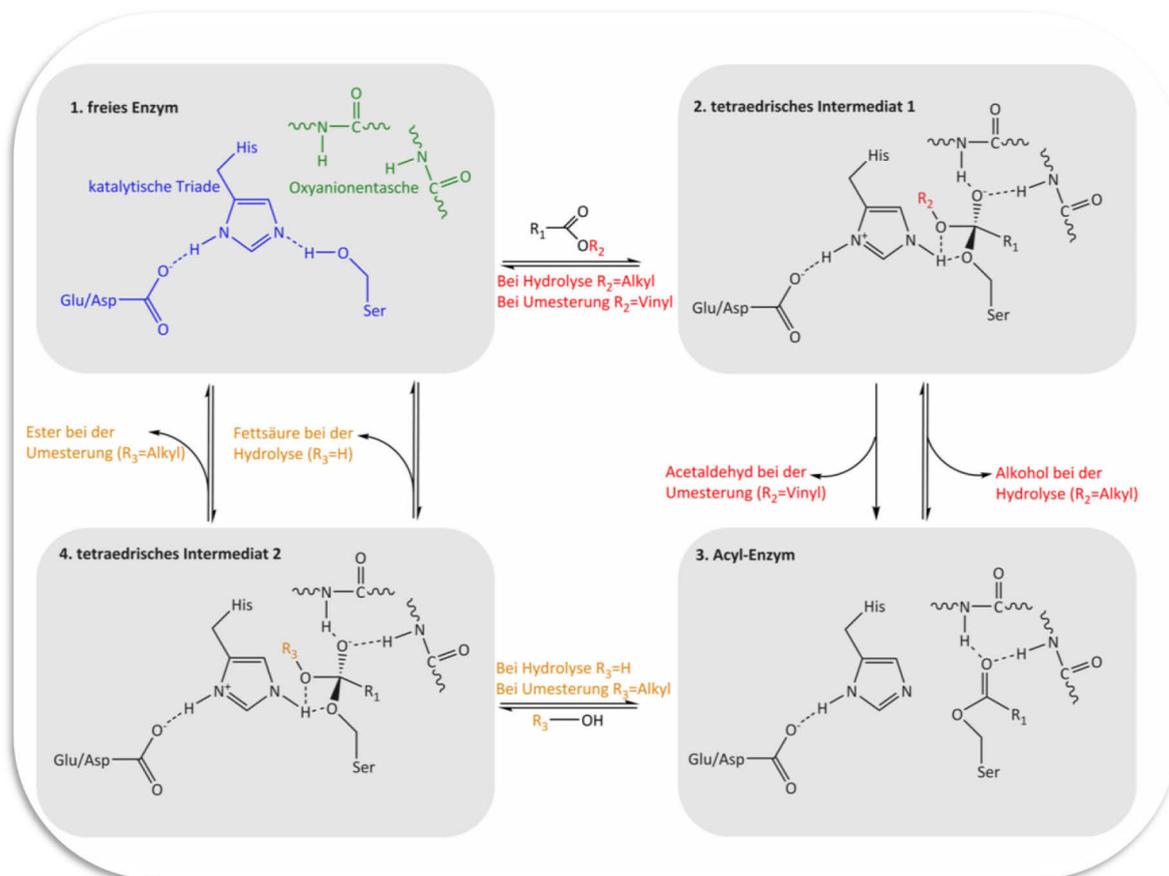


Abbildung 1.6 Der katalytische Mechanismus der lipasekatalysierten reversiblen Hydrolyse eines Fettsäureesters und irreversiblen Umesterung eines Vinylsters.

Das Proton des Histidinrests wird anschließend auf das Sauerstoffatom der Esterbindung übertragen, die Bindung gespalten und ein Acyl-Enzym-Intermediat gebildet, das am katalytischen Serinrest mit dem Fettsäureteil des Substrats verestert ist. Als erstes Reaktionsprodukt wird in diesem Reaktionsschritt im Falle der Hydrolyse ein Alkohol und im Falle der Umesterungsreaktion, nach Keto-Enol-Tautomerisierung des Vinylalkohols, ein Molekül Acetaldehyd freigesetzt. Im nächsten Reaktionsschritt wird das kovalente Acyl-Enzym-Intermediat durch Anlagerung eines Moleküls Wasser (Hydrolyse) bzw. Alkohol (Alkoholyse bei der Umesterung) an das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Substrat-Fettsäureteils und gleichzeitiger Protonierung des Histidinrests in das tetraedrische Intermediat 2 überführt. Dieser Übergangszustand wird in gleicher Weise wie das tetraedrische Intermediat 1 stabilisiert. Wird nun das Proton am Histidin auf das katalytische Serin übertragen, löst sich die Acylgruppe vom aktiven Serin und ein Molekül Fettsäure (Hydrolyse) oder Fettsäureester (Alkoholyse) wird als zweites Reaktionsprodukt freigesetzt. Hierdurch kehrt die katalytische Triade wieder in ihren ursprünglichen Zustand (freies Enzym) zurück und kann in einen neuen Reaktionszyklus eintreten^{58,84-88}.

Diese biotechnologisch hochinteressanten Lipase-katalysierten Reaktionstypen zeichnen sich darüberhinaus durch ausgesprochen hohe Spezifität und Selektivität aus. Dies bezieht sich sowohl auf die *Regioselektivität* (Position der Esterbindung im Substratmolekül die hydrolysiert oder gebildet wird), die *Chemoselektivität* (Art des Substrats, das durch das Enzym erkannt wird) als auch auf die *Stereoselektivität* (Art des Stereoisomers, das bevorzugt umgesetzt bzw. gebildet wird). Ein Beispiel für die erfolgreiche Ausnutzung dieser besonderen Eigenschaften, ist die Modifikation von Triacylglycerolen. In diesem Bereich kommen drei Eigenschaften von Lipasen besonders zum tragen: (1) Regioselektivität, d.h. die Position der Fettsäure am Glyceridrückgrat; (2) Fettsäurespezifität, d.h. Länge und Sättigungsgrad der Fettsäurekette; und (3) Art des Acylglycerins, d.h. Mono-, Di- oder Triacylglyceride.

Die meisten bekannten Lipasen sind 1,3-regioselektiv (Spaltung der Esterbindungen am C₁- und C₃-Atoms des Triacylglycerids), wohingegen nur einige wenige auch die sn-2-Position (Spaltung der Esterbindung am C₂-Atom des Triacylglycerids) erkennen und somit eine Kompletthydrolyse eines Triacylglycerids ermöglichen. Bezogen auf ihre Fettsäurespezifität, sind Lipasen in der Lage, Ester mit mittel- bis langkettigen

Fettsäureresten (C_4 - C_{18} ; in seltenen Fällen bis C_{22}) umzusetzen, jedoch mit unterschiedlichen Effizienzen. Selbst die Isoformen einer Lipase können schon stark in diesen Eigenschaften variieren. Im Falle der Isoformen der *C. rugosa* Lipase setzt z.B. die Isoform 1 bevorzugt mittelkettige (C_8 - C_{10}), die Isoform 3 bevorzugt kurzkettige und die Isoformen 2 und 4 bevorzugt langkettige (C_{16} - C_{18}) Substrate um ^{89,90}. Andere Lipasen zeichnen sich hingegen durch die Umsetzung eher ungewöhnlicher Substrate, wie z.B. ungesättigter Fettsäuren, aus. In diesem Zusammenhang sind eine Isoform der *Geotrichum candidum* Lipase, die Selektivität gegenüber *cis* (Δ -9) ungesättigten Substraten zeigt, die Pankreas- und einige mikrobielle Lipasen, die langkettige, mehrfach-ungesättigte Substrate umsetzen, und die Lipasen aus dem Meerschweinchen, *S. hyicus* und *Rhizopus*, die Phospholipase A1-Aktivität besitzen, zu nennen. Demzufolge können lipolytische Enzyme mit unterschiedlichen Selektivitäten, alleine oder in Kombination eingesetzt werden, um Produkte mit hoher Wertschöpfung, wie strukturierte Triglyceride mit verbesserten Nährwerten, Kakaobuttersubstitute und Öle, die mit mehrfach ungesättigte Fettsäuren angereichert sind, sowie eine beeindruckende Vielzahl an Mono-, Di- und Triglyceriden, Fettsäuren und Estern zu synthetisieren ^{22,25,77}. Im Folgenden wird auf die biotechnologische Bedeutung von Lipasen im Allgemeinen und lipasekatalysierte Reaktionen in nicht-wässrigen Lösungsmitteln im Speziellen näher eingegangen.

1.3 Hydrolasen in der Biotechnologie

Die zentrale Bedeutung der Hydrolyse im Zellstoffwechsel nahezu aller Organismen, spiegelt sich in der ubiquitären Verbreitung von Lipasen in der Natur wider. Sowohl die lipasekatalysierte Hydrolyse von Fettsäureestern als auch die Umkehrreaktionen finden in nahezu allen Auf- und Abbauprozessen organischer Materie statt. Lipasen erfüllen darüberhinaus Kriterien, die an moderne industrielle Katalysatoren gestellt werden. Dies sind z.B. hohe Effizienz, hohe Umsatzraten und geringe Produktion an Abfallstoffen oder entsorgungspflichtigen Nebenprodukten ^{26,91}. Daher ist es nicht verwunderlich, dass Lipasen in der organischen Synthese eine Schlüsselposition einnehmen ⁷⁷. Ihre biochemischen Eigenschaften haben dafür gesorgt, dass sich die Lipasen zu einer der industriell am meisten genutzten Enzymfamilien entwickelt hat: Lipasen sind (1) nicht Cofaktor-abhängig, (2) aufgrund der zumeist relativ einfachen Faltung sehr stabil, (3) unter nicht-physiologischen Bedingungen, wie z.B. in organischen Lösungsmitteln oder ionischen Flüssigkeiten,

einsetzbar, (4) gegenüber einem breiten Spektrum an Substraten aktiv, (5) äußerst reaktionsspezifisch und (6) vielfach sehr regio- und stereoselektiv^{77,92-97}.

Lipasen mit breiten Substratspektren werden überall dort verwendet, wo inhomogene Rohstoffe oder Substratgemische umgesetzt werden müssen. Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz von Lipasen in Waschmitteln, da Verschmutzungen aus unterschiedlich aufgebauten Fetten und Ölen bestehen können. Die zudem häufig ausgeprägte Temperatur- und pH-Stabilität erweist sich in diesem Zusammenhang als weiterer Vorteil, da Temperaturen und pH-Werten während des Waschens häufig außerhalb des physiologischen Bereichs liegen²⁷. Lipasen mit engeren Substratspektren und hoher Regioselektivität hingegen, werden z.B. bei der Verarbeitung und Veredelung von Fetten und Ölen und bei der Käseherstellung eingesetzt. Im letzteren Fall tragen sie durch Spaltung der in der Milch enthaltenen Triglyceride entscheidend zur Aromabildung im Käse bei^{12,25,98,99}. In der chemischen Industrie werden Lipasen als leistungsfähige Werkzeuge zur Herstellung einer Vielzahl von unterschiedlichsten Produkten eingesetzt^{36,100,101}. Durch ihre hohe Substratspezifität und Enantioselektivität dienen sie als chirale Katalysatoren in kinetischen Racematspaltungen und Desymmetrisierungen¹⁰²⁻¹⁰⁵. Von besonderer Bedeutung ist hierbei der Einsatz in organischen Lösungsmitteln, in denen Lipasen vornehmlich solche Reaktionen katalysieren, die in wässrigen Lösungen nicht möglich sind^{106,107}.

1.3.1 LIPASEN IN ORGANISCHEN LÖSUNGSMITTELN: WICHTIGE KONZEPTE UND ANWENDUNGEN

Trotz der offensichtlichen Vorteile enzymkatalysierter Reaktionen hat erst ihre Anwendbarkeit in nicht-wässrigen Systemen ihren breiten Einsatz in der organische Synthese ermöglicht, denn viele organische Verbindungen sind in Wasser unlöslich oder nicht stabil. Darüberhinaus ist die Entfernung von Wasser vom Produkt aufgrund des hohen Siedepunkts und der hohen Verdampfungswärme sehr aufwendig und kostenintensiv^{108,109}. Ein weiterer Nachteil der Biokatalyse in wässrigen Lösungsmitteln ist, aus Sicht der organischen Chemie, dass störende Nebenreaktionen, wie Hydrolysen, Racemisierungen, Polymerisierungen und Zerfallsprozesse, durch Wasser erleichtert werden. Die darüberhinaus lange Zeit bestehende Annahme, dass Enzyme in nicht-wässrigen Lösungsmitteln inaktiv sind, wurde durch die, seit den Pionierarbeiten von Klivanov¹¹⁰⁻¹¹² andauernde, intensive Forschungsarbeit, widerlegt^{93,106,113-118}.

In wässrigen Lösungsmitteln, werden Enzyme in der Regel in gelöster Form eingesetzt. Im Gegensatz dazu, werden sie in organischen und anderen nicht-wässrigen Lösungsmitteln in Form von, häufig unlöslichen, Proteinpartikeln verwendet. Dabei ist die Präparation der Enzymproben ausschlaggebend für deren Stabilität und katalytische Eigenschaften. Somit haben nicht nur die Bedingungen, unter denen die enzymkatalysierte Reaktion durchgeführt wird, sondern auch die „Präparationsgeschichte“ einen entscheidenden Einfluss auf die Enzymaktivität und –stabilität. Mit anderen Worten gesagt, können bei der Präparation von Enzymen für die nicht-wässrige Biokatalyse ausgeprägte Hystereseeffekte auftreten¹¹⁶. Da Enzyme normalerweise als wässrige Lösungen aus ihrer biologischen Quelle isoliert werden, ist für die Verwendung unter nicht-wässrigen Bedingungen die Entfernung des Wassers erforderlich. Hierzu stehen eine Reihe von Techniken zur Verfügung, von denen die wichtigsten nachfolgend angesprochen werden¹¹⁶:

Lyophilisierung: Die Lyophilisierung (Sublimations- oder Gefriertrocknung) ist die einfachste und zugleich am häufigsten eingesetzte Methode, um wasserfreie Enzymproben herzustellen. Zwei entscheidende Nachteile dieser Methode sind jedoch die, dass (1) lyophilisierte Enzyme oft niedrigere spezifische Aktivitäten aufweisen als Präparate, die auf anderem Wege hergestellt wurden und (2) die Morphologie der einzelnen Enzympartikel bzw. die Protein-Protein-Stapelung sehr heterogen ist. Durch diese Heterogenität wird häufig die Diffusion eingeschränkt, oder Enzym-Substrat-Wechselwirkungen verhindert. Die Verwendung kleiner Enzympartikel, die z.B. durch vorhergehende Behandlung mit Ultraschall erhalten wurden, sind erforderlich, um diese Nachteile auszugleichen¹¹⁵. Die spezifische Aktivität lyophilisierter Proben kann aber auch durch den Zusatz von Salzen (z.B. KCl, CsCl), Polymeren (z.B. Polyethylenglycol, Polyvinylpyrrolidon), Substraten und Lyoprotektiva (z.B. Sorbitol, Trehalose) beträchtlich gesteigert werden¹¹⁹. Ein entscheidender Vorteil der Lyophilisierung ist jedoch, dass die Enzymproben, im Gegensatz zu allen anderen Methoden, weder modifiziert noch komplexiert werden.

Immobilisierung: Die Immobilisierung ist ein alternativer Weg, um feste, enzymhaltige Partikel herzustellen. Für die Verwendung in nicht-wässrigen

Lösungsmitteln, werden die Enzyme normalerweise durch Adsorption an eine Trägermatrix gebunden. Die Stärke der Bindung spielt in diesem Zusammenhang eine eher untergeordnete Rolle, da eine Ablösung des Enzyms in nicht-wässrigen Lösungsmitteln in der Regel nicht stattfindet. Überschüssiges Wasser wird im Anschluss durch Evaporation oder Extraktion mit einem wassermischbaren Lösungsmittel entfernt¹²⁰.

Cross-linked enzyme crystals (CLECs)¹²¹: CLECs sind Proteinmikrokristalle eines Enzyms, die nach der Kristallisierung durch ein multifunktionales Reagenz – in der Regel Glutardialdehyd – quervernetzt werden. Somit sind CLECs eine andere Form immobilisierter Enzyme, die nach Entfernung des Wassers (siehe Immobilisierung) in nicht-wässrigen Lösungsmitteln eingesetzt werden können.

Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)¹²²: Ein entscheidender Nachteil der CLECs, ist die zum Teil sehr aufwendige Kristallisierung, für die man zugleich hochreine Enzympräparationen benötigt. Um diese zeitaufwendigen Methoden zu umgehen, wurden die sog. CLEAs entwickelt. Der Zusatz von Salzen, wassermischbaren organischen Lösungsmitteln oder nicht-ionischen Polymeren zu wässrigen Proteinlösungen, führt zur Bildung von physikalischen aktiven Aggregaten, die durch nicht-kovalente Bindungen zusammengehalten werden, ohne gleichzeitige Veränderung der Tertiärstruktur¹²³. Anschließend werden diese Proteinaggregate für die Verwendung in nicht-wässrigen Lösungsmitteln quervernetzt und getrocknet (siehe CLECs).

Solubilisierter Enzyme: Sämtliche, zuvor beschriebenen Methoden haben zur Folge, die Enzyme in Form sichtbarer Partikel, die in dem jeweiligen nicht-wässrigen Lösungsmitteln suspendiert sind, verwenden zu müssen. Es ist jedoch auch möglich, die Enzyme so vorzubehandeln, dass sie in nicht-wässrigen Lösungsmitteln mehr oder weniger löslich sind. Die hierzu verfügbaren Methoden können in drei Kategorien unterteilt werden¹¹⁶:

- (1) Kovalente Modifizierung funktioneller Gruppen am Enzym.
- (2) Zusatz grenzflächenaktiver Substanzen oder Polymere.

- (3) Einschluss der Enzyme in hydratisierten reversen Micellen oder Mikroemulsionen.

Die, durch diese Präparationsmethoden ermöglichte, Biokatalyse in organischen Lösungsmitteln bietet eine Reihe von Vorteilen^{124,125}. Besonders hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang die folgenden Aspekte:

Ausbeute: Die Gesamtausbeute von Biokatalyseprozessen in organischen Lösungsmitteln wird aufgrund der vereinfachten Isolierung des Produkts häufig verbessert. Dies kann z.B. durch eine vereinfachte Entfernung niedrigsiedender Lösungsmittel erreicht werden.

Löslichkeit: Nicht-polare Substrate können durch die verbesserte Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln besser umgesetzt werden¹²⁶. Darüberhinaus können durch die verbesserte Löslichkeit hydrophober Produkte höhere Produktkonzentrationen erreicht werden.

Kontaminationen: Da viele organische Lösungsmittel auf lebende Zellen letal wirken, ist die mikrobielle Kontamination solcher Systeme vernachlässigbar gering. Dieser Aspekt ist vor allem in industriellen Prozessen, in denen die Aufrechterhaltung steriler Bedingungen ein großes Problem ist, von entscheidender Bedeutung.

Nebenreaktionen: Durch den Einsatz organischer Lösungsmittel werden unerwünschte wasserabhängige Nebenreaktionen unterdrückt (z.B. Hydrolyse von Säureanhydriden und Halogeniden¹²⁷, Polymerisierung von Chinonen¹²⁸, Racemisierungen von Cyanhydrinen¹²⁹, Acylmigrationen¹³⁰ oder Esterhydrolysen¹³¹).

Enzymrückgewinnung: Da die Enzyme in der Regel als unlösliche Proteinpartikel eingesetzt werden, können sie durch einfache Filtration zurückgewonnen, aus dem Lösungsmittel entfernt und anschließend häufig wiederverwendet werden.

Stabilität: Enzyme sind in organischen Lösungsmitteln normalerweise wesentlich stabiler, da die meisten Denaturierungsprozesse wasserabhängig

sind ^{132,133}. Die Schweinepankreaslipase ist z.B. in verschiedenen organischen Lösungsmitteln über mehrere Stunden bei 100 °C aktiv, während sie bei der gleichen Temperatur in wässriger Lösung sofort denaturiert ¹³⁴.

Spezifität: Konformationsänderungen, die während der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes erfolgen (*induced fit*), gehen häufig mit der Bildung bzw. dem Brechen von Wasserstoffbrücken einher. Diese Prozesse werden durch wässrige Lösungen in hohem Maße erleichtert, da gebrochene Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Aminosäuren sehr schnell mit umliegenden Wassermolekülen wieder gebildet werden können. Auf diese Weise kommt dem Wasser die Rolle eines „molekularen Schmiermittels“ zu. Organische Lösungsmittel hingegen erschweren solche strukturellen Änderungen und halten das Enzym somit in einer eher starren Konformation ¹³⁵. Enzymeigenschaften, die durch solche Konformationsänderungen bestimmt werden, wie z.B. Substratspezifität, Chemo-, Regio- und Enantioselektivität, können jedoch durch Variation des organischen Lösungsmittels, gezielt gesteuert werden ¹³⁶⁻¹⁴⁰.

Thermodynamisches Gleichgewicht: Der wohl bedeutendste Vorteil der Biokatalyse in nicht-wässrigen Lösungsmitteln ist die Möglichkeit, das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion zu verschieben. Somit können z.B. Lipasen und Proteasen, statt der Hydrolyse, die Synthese von Estern, Polyestern, Lactonen, Amiden und Peptiden, chemo-, regio- und enantioselektiv, katalysieren ¹²⁴.

Trotz der Vielzahl an Vorteilen, die die nicht-wässrige Biokatalyse mit sich bringt, ist die Abwesenheit des Wassers gleichzeitig ihr größter Nachteil. Das Fehlen des Wassers, das viele enzymatische Eigenschaften direkt und indirekt beeinflusst, bewirkt, dass die Enzymaktivität oftmals $10^4 - 10^5$ mal geringer ist, als die in wässrigen Lösungen. Die Gründe für diesen Aktivitätsverlust sind sehr vielfältig (Abbildung 1.7) und können u.a. durch die Abnahme der Polarität des Enzym-Mikromilieus, den Verlust wichtiger Wassermoleküle an der Enzymoberfläche, die Verminderung der strukturellen Mobilität oder die Deaktivierung während der Enzympräparation hervorgerufen werden.

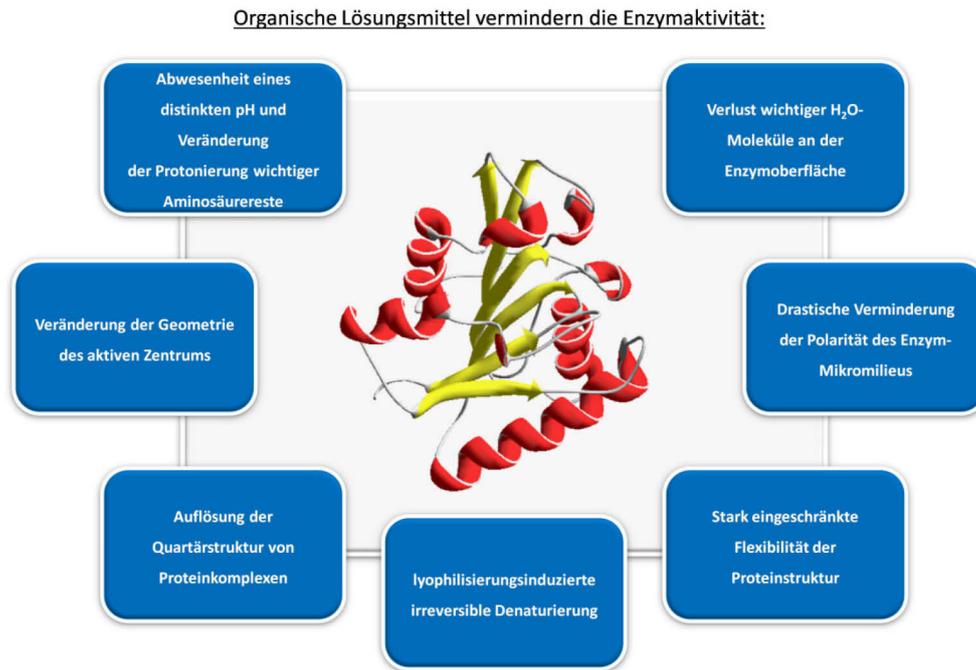


Abbildung 1.7 Faktoren, die zur Verminderung der Enzymaktivität in organischen Lösungsmitteln führen (nach ¹⁴⁸).

Neben den schon zuvor genannten Präparationsmethoden, sind jedoch in der nicht-wässrigen Biokatalyse noch mindestens drei weitere (wichtige) Konzepte bekannt, mit deren Hilfe sich die Aktivität der Enzympräparate stark beeinflussen lässt. Das erste Konzept bezieht sich auf die Auswahl des organischen Lösungsmittels anhand seines Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P$). Der $\log P$ -Wert beschreibt, wie gut ein organisches Lösungsmittel mit Wasser mischbar ist. Hierbei können organische Lösungsmittel grob in vier Gruppen unterteilt werden (Tabelle 1.1). Es hat sich herausgestellt, dass man mit diesem physikochemischen Parameter sowohl die Aktivität als auch die Stabilität eines Enzyms entscheidend beeinflussen kann ¹⁰⁹.

Häufig wird ein Anstieg des K_M -Werts für eine bestimmte Reaktion in einem organischen Lösungsmittel relativ zum wässrigen Milieu beobachtet. Dieser Effekt beruht auf der effektiven Solvatisierung des Substrats durch das jeweilige organische Lösungsmittel ¹⁴¹. Je besser ein organisches Lösungsmittel ein Substrat solvatisieren kann, desto stärker wird die freie Energie des Substrats vermindert und gleichzeitig die freie Aktivierungsenergie der enzymatischen Reaktion erhöht. Dies hat zur Folge, dass die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt. Somit kann z.B. durch die Verwendung eines apolaren Lösungsmittels (positiver $\log P$ -Wert)

für die Umsetzung eines polaren Substrats, die Solvatisierung des Substrats vermindert und dadurch die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht werden.

Tabelle 1.1 Einteilung organischer Lösungsmittel nach ihrem log *P*-Wert¹²⁴

log <i>P</i>	Wassermischbarkeit	Beispiele
- 2,5 – 0	vollständig mischbar	DMSO, Formamid, Ethylenglykol
0 – 2	teilweise mischbar	Dioxan
2 – 4	kaum mischbar	Chloroform, Hexan, Toluol
> 4	nicht mischbar	Heptan, Oktan

Die Stabilität eines Enzyms in einem organischen Lösungsmittel hängt direkt von den Interaktionen zwischen dem Lösungsmittel und dem Enzymmolekül ab. Neben Wasser können auch andere Lösungsmittel, wie z.B. Formamid, DMSO und Ethylenglykol, Proteine lösen^{142,143}. In diesem Zusammenhang ergab eine umfangreiche Studie, dass einige polare organische Lösungsmittel (z.B. Glycerol, 2,2,2-Trifluoroethanol, Methanol und Phenol) bis zu 10 g L⁻¹ Lysozym lösen können¹⁴³. In den meisten Fällen führt jedoch das Lösen des Enzyms, aufgrund des Verlusts der Tertiär- und in manchen Fällen auch der Sekundärstruktur, zu dessen Inaktivierung. Diese Enzyminaktivierung wird der unterschiedlichen Fähigkeit organischer Lösungsmittel, die für die Aktivität und Strukturintegrität essentielle strukturierte Wasserschicht um die Biokatalysatoren zu verdrängen, zugeschrieben^{144,145}. Diese Fähigkeit ist bei polaren, wassermischbaren Lösungsmitteln mit einem log *P*-Wert < 2 sehr stark ausgeprägt, wohingegen Lösungsmittel mit einem log *P*-Wert > 4 kaum inaktivierende Wirkung zeigen^{144,146,147}. Bis heute ist das log *P*-Konzept der mit am häufigsten berücksichtigte Lösungsmittelparameter, wobei es jedoch immer wieder Ausnahmen von dieser Regel gibt^{148,149}.

Kurz nach der Entdeckung des log *P*-Konzepts zeigten Zaks und Klivanov mit den drei nicht verwandten Enzymen Alkoholoxidase aus Hefe, Polyphenoloxidase aus Pilzen und Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber, dass die Enzymaktivität in verschiedenen Lösungsmitteln mehr oder weniger konstant war, solange die Menge des an das Enzym gebundenen Wassers gleich blieb¹¹¹. Hierzu musste, zum Erreichen einer hohen Enzymaktivität, der

Wassergehalt des Lösungsmittels umso höher sein, je hydrophiler (polarer, wassermischbarer) das Lösungsmittel ist. Dies liegt daran, dass nicht der Wassergehalt des Lösungsmittels für die Enzymaktivität zählt, sondern der Wassergehalt des Enzyms selbst. Abhängig von der Hydrophobie des Lösungsmittels resultieren nun aber bei gleichem Wassergehalt vollkommen verschiedene Mengen Wasser am Enzym¹⁴⁵.

Für eine genauere Korrelation der Enzymaktivität mit der im Reaktionsmedium vorhandenen Wassermenge nutzen Halling und Goderis *et al.* die thermodynamische Wasseraktivität^{113,150}. Die Wasseraktivität a_w ist mit dem Molenbruch von Wasser (χ_w) über den Wasseraktivitätskoeffizienten γ_w gemäß $a_w = \gamma_w \chi_w$ korreliert. Da der Wasseraktivitätskoeffizient γ_w in erster Näherung mit der Lösungsmittelhydrophobizität größer wird, ist offensichtlich, dass ein bestimmter Wert von a_w in einem hydrophoben Lösungsmittel bei einer niedrigeren Wasserkonzentration erreicht wird als in einem hydrophilen Medium. Mit anderen Worten gesagt, spiegelt die Wasseraktivität wider, wie viele Wassermoleküle in einem System nicht gebunden bzw. frei verfügbar sind. In einem hydrophilen Lösungsmittel kann das Wasser sowohl mit dem Enzym als auch mit dem Lösungsmittel selbst interagieren, wohingegen in einem hydrophoben Lösungsmittel nur das Enzym als Interaktionspartner zur Verfügung steht. Daher ist, um das gleiche Maß an Hydratisierung, d.h. die gleiche Wasseraktivität a_w , am Enzym zu erreichen, in einem hydrophoben Lösungsmittel weniger Wasser erforderlich als in einem hydrophilen.

Die direkte Korrelation zwischen der Enzym- und der Wasseraktivität wurde im Fall der *Mucor miehei* Lipase eindeutig nachgewiesen¹⁵¹. Das Aktivitätsoptimum dieser Lipase lag unabhängig vom Lösungsmittel (Hexan bis Pentanon) immer etwa bei $a_w = 0,55$. In einer anderen Untersuchung, die mit fünf Lipasen unterschiedlicher Herkunft durchgeführt wurde, fand man außerdem, dass die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von a_w von Enzym zu Enzym sehr verschieden war, möglicherweise als Folge von unterschiedlichen Molekülstrukturen¹⁵². Eine neuere Studie hat gezeigt, dass der a_w -Wert – anders als bei den bisher genannten, eher unpolaren Solventien – bei polaren Lösungsmitteln wie Dioxan, Acetonitril, Tetrahydrofuran und Aceton keine genauen Vorhersagen zur kritischen Hydratisierung für die optimale Enzymaktivität ermöglicht; dies spiegelt wahrscheinlich direkte Einflüsse des Lösungsmittels auf das Enzym wider¹⁵³.

Das dritte Konzept, die Aktivität eines Enzyms in organischen Lösungsmitteln zu beeinflussen, befasst sich mit dem Protonierungszustand des Enzyms selbst. Mehrfach

haben verschiedene Untersuchungen gezeigt, dass sich Enzyme anscheinend an die physikochemischen Eigenschaften der wässrigen Lösungen, aus denen sie präpariert wurden, „erinnern“ können¹⁵⁴. Ein Weg, den anfänglichen Protonierungszustand des Enzyms und damit seine Aktivität zu beeinflussen, wurde von Zaks und Klivanov entwickelt, die zeigten, dass die Enzymaktivität in organischen Lösungsmitteln deutlich vom pH-Wert der Lösung abhängt, aus der das Enzym - z.B durch Lyophilisierung – isoliert wurde¹⁵⁵. Sie zeigten, dass Enzyme in organischen Lösungsmitteln die höchsten Aktivitäten besitzen, wenn sie aus einer wässrigen Lösung mit dem optimalen pH-Wert lyophilisiert werden. Dieser Effekt – der sog. *pH-memory-effect* – wird mittlerweile auf dem Gebiet der nicht-wässrigen Biokatalyse intensiv angewendet und ist perfekt geeignet, wenn im Verlauf der Reaktion keine Änderungen der Säuren- oder Basenkonzentrationen eintreten. Unter diesen Umständen sind die Protonierungszustände des Enzyms sowohl im organischen Lösungsmittel als auch in der wässrigen Lösung, aus der es isoliert wurde, identisch. Darüberhinaus wurde mittels FTIR-Spektroskopie nachgewiesen, dass die pK_s-Werte der Amino-, Carboxyl- und Hydroxylfunktionen des Enzyms, im lyophilisierten und wässrigen Zustand, um nicht mehr als 0,3 pH-Einheiten voneinander abweichen¹⁵⁶.

Nicht zuletzt das vertiefte Verständnis von Enzymen in wasserfreien Medien hat dazu geführt, dass Enzyme mittlerweile einen festen Platz als industrielle Katalysatoren in effizienten Prozessen in der Feinchemikalien- und Pharmaindustrie gefunden haben¹⁵⁷. Annähernd 150 biokatalytische Prozesse wurden bisher in industriellem Maßstab durchgeführt¹⁵⁸. Die drei herausragendsten Prozesse sind hierbei die Synthesen von Acrylamid (30 000 t p.a., Nitrilhydratase), Nicotinamid (> 3 500 t p.a., Nitrilhydratase) und Lactamantibiotika (> 10 000 t p.a., Penicillinamidase)¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Die Produktionsmasstäbe von mindestens 40 weiteren biokatalytischen Prozessen liegt zwischen 100 und 10 000 t p.a.¹⁵⁸. In den meisten Fällen werden die ausgesprochen hohen Enantio- und Regioselektivitäten der Enzyme genutzt, um Agrochemikalien (Pestizide, synthetische Düngemittel) und pharmazeutische Produkte zu synthetisieren. Dies ist insbesondere für die Pharmaindustrie von Bedeutung, da ca. 80 % aller pharmakologischen Moleküle chiral sind und strikte Richtlinien hoch-enantiomerenreine Endprodukte (> 99,5 % ee) fordern^{17,162}. Darüberhinaus besteht, durch die steigende Komplexität der pharmazeutischen Wirkstoffe, die zum Teil mehrere chirale Zentren besitzen, ein wachsender Bedarf an spezifisch funktionalisierten chiralen Intermediaten^{17,163}. Diese Anforderungen und die zugleich einzigartigen

biochemischen Eigenschaften der Hydrolasen – besonders der Lipasen – haben dazu geführt, dass diese Enzymklasse, sowohl in hydrolytischen als auch synthetischen Reaktionen in organischen Lösungsmitteln, mit Abstand am häufigsten industriell eingesetzt wird (Abbildung 1.8)^{157,158}.

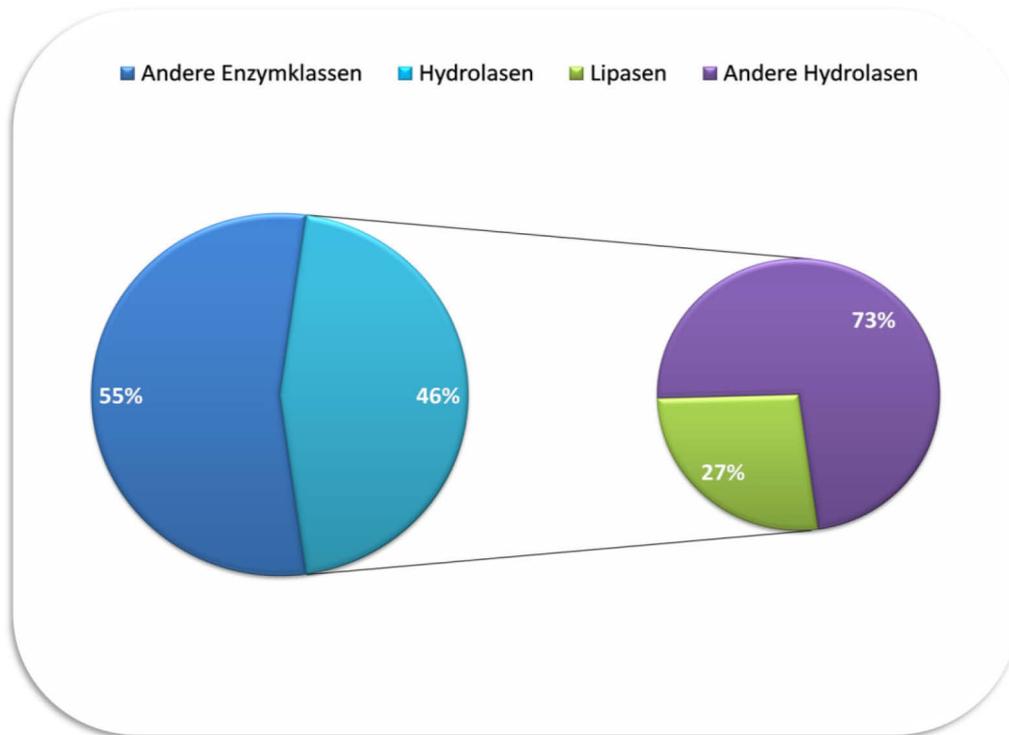


Abbildung 1.8 Anteil der Hydrolasen bzw. Lipasen an biokatalysierten Prozessen im industriellen Maßstab (nach¹⁵⁸).

In Tabelle 1.2 werden beispielhaft einige wichtige industrielle Prozesse aufgeführt, die die Vorteile der Kombination von Lipasen in organischen Lösungsmitteln nutzen (z.B. hohe Substratkonzentrationen, gute Raum-Zeit-Ausbeuten, Verschiebung des thermodynamischen Gleichgewichts in Richtung der Estersynthese, vereinfachte Rückgewinnung des Enzyms).

Tabelle 1.2 Industrielle lipasekatalysierte Prozesse in organischen Lösungsmitteln.

Reaktionstyp	Produkt	Lipase	Firma	Referenz
Racematspaltung von Aminen (Aminolyse)	(<i>R</i>)-Phenylethylmethoxyamid	<i>Burkholderia plantarii</i>	BASF	164
Racematspaltung von Alkoholen (Alkoholyse)	HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor	<i>Burkholderia cepacia</i>	Bristol-Myers-Squibb	165
Desymmetrisierung (Alkoholyse)	(<i>S</i>)-Essigsäure-4-(2,4-difluorophenyl)-2-hydroxymethylpent-4-enylester	<i>Candida antarctica</i>	Schering Plough	166
Asymmetrische Ringöffnung racemischer Azlactone (Alkoholyse)	N-benzoyl-L- <i>tert</i> -Leucinbutylester	<i>Mucor miehei</i>	Celltech	167
Racematspaltung von Alkoholen (Alkoholyse)	(+)-(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-2-methoxycyclohexanol	<i>Candida antarctica</i>	Glaxo-Smith-Kline	168
Estersynthese (Veresterung)	Isopropylpalmitat	<i>Candida antarctica</i>	UNICHEMA Chemie BV	169
Racematspaltung von Alkoholen (Alkoholyse)	(<i>S</i>)-N-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-hydroxymethylpiperidin	<i>Burkholderia cepacia</i>	Bristol-Myers-Squibb	170

1.3.2 LIPASE-KATALYSIERTE ESTERSYNTHESE

In Lipase-katalysierten Synthesereaktionen (Abbildung 1.9), in denen der Netto Gehalt des Wassers ansteigt (z.B. Veresterung), werden häufig physikochemische Probleme beobachtet^{124,171}. Aufgrund der fehlenden Wassermischbarkeit hydrophober organischer Lösungsmittel ($\log P > 4$), kann das in solchen Reaktionen gebildete Wasser nur mit der hydrophilen Enzymoberfläche interagieren. Hierdurch bildet sich schrittweise eine diskrete Wasserphase, die das Enzym umhüllt, aus. Dies führt dazu, dass in vielen Fällen die Reaktion stoppt - Enzyme und Substrate werden durch eine Wassergrenzfläche voneinander getrennt -, bevor ein ausreichend hoher Reaktionsumsatz erreicht wird¹²⁴. Zur Lösung dieser Probleme, stehen prinzipiell zwei Vorgehensweisen zur Verfügung: (1) Entfernung des Wasser aus dem Reaktionssystem (z.B. Evaporation¹⁷², azeotrope Destillation¹⁷³, chemische Trocknung^{174,175}, Zusatz von Molekularsieben oder wasserbindenden anorganischen Salzen¹⁷⁶). (2)

Vermeidung der Wasserbildung durch Einführung eines Acyltransferschritts (z.B. Trans- bzw. Interesterifizierungs- statt Veresterungsreaktion) ¹²⁴.

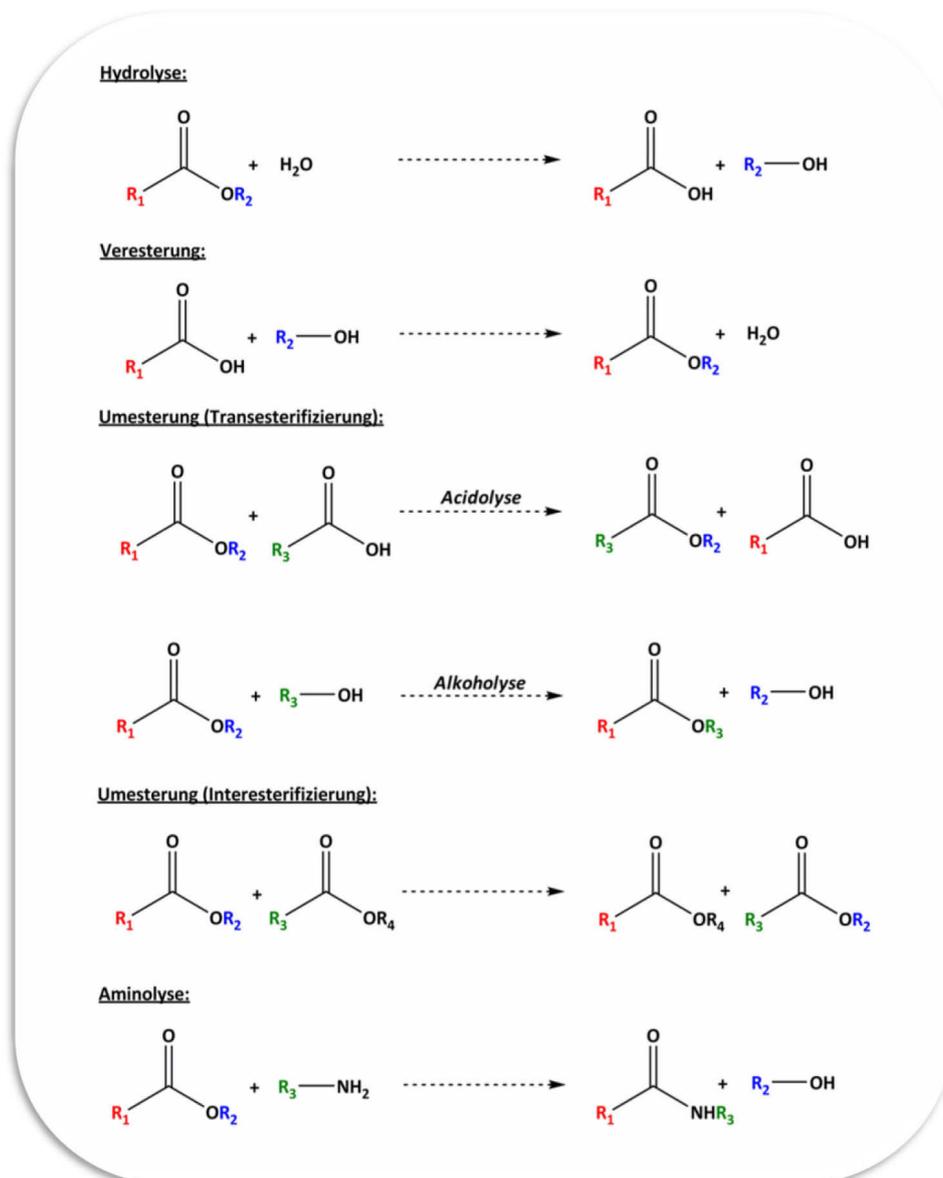


Abbildung 1.9 Lipasekatalysierte Reaktionen unter wässrigen und nicht-wässrigen Bedingungen. Im Gegensatz zur Hydrolyse, die von Lipasen unter wässrigen Bedingungen katalysiert wird, laufen in nicht-wässrigen Lösungsmitteln bevorzugt Estersynthesen (Veresterungen, Umesterungen, Aminolysen) ab.

Aufgrund der direkten Vermeidung der Wasserbildung sind Trans- und Interesterifizierungsreaktionen von der Reaktionsführung her wesentlich einfacher zu handhaben ¹⁰⁹. Darüberhinaus, wird die Wasseraktivität a_w des Reaktionsmediums, die die Enzymaktivität entscheidend beeinflusst, über den gesamten Reaktionsverlauf hinweg konstant gehalten. Im Gegensatz zu hydrolytischen Reaktionen, in denen das Nukleophil

(Wasser) immer im Überschuss (ca. 55 mol L^{-1}) vorliegt, ist die Konzentration des Nucleophils in Umesterungsreaktionen (z.B. Alkohol oder Ester) häufig limitiert. Demzufolge sind Umesterungsreaktionen, in denen „normale“ Alkohole oder Ester als Nucleophile verwendet werden, im Gegensatz zu der quasi-irreversiblen hydrolytischen Reaktion, reversibel. Die Reversibilität solcher Reaktionen wird durch die annähernd gleiche Nucleophilie des angreifenden Nucleophils (Nu^1) und der Abgangsgruppe des Acyldonators (Nu^2), die um das Acyl-Enzym-Intermediat (Abbildung 1.10a) in der Vor- und Rückreaktion konkurrieren, verursacht. Dies führt dazu, dass solche Umesterungsreaktionen nur mit geringen Reaktionsgeschwindigkeiten ablaufen und lediglich unvollständige Umsetzungen des Substrats erreicht werden. Diesen Nachteilen kann man jedoch durch den Einsatz eines hohen Überschusses des Acyldonors oder die Verwendung spezieller Acyldonoren, die eine mehr oder weniger irreversible Reaktionsführung ermöglichen, begegnen¹⁰⁸.

Die Verwendung eines hohen Überschusses des Acyldonors ist jedoch in vielen Fällen teuer und führt häufig zu stark verminderten Enzymaktivitäten¹²⁴. Daher werden in der Regel spezielle Acyldonoren verwendet, deren Abgangsgruppen, durch die elektronenziehende Substituenten, stark verminderte Nucleophilien aufweisen (Abbildung 1.10b). Hierdurch wird das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion so stark auf die rechte Seite verschoben, dass sie als *quasi-irreversibel* betrachtet werden kann¹⁷⁷. Diese Reaktionsart wurde erstmals durch die Verwendung von sog. *aktivierten Estern* (z.B. 2-Haloethyl-, Cyanomethyl- und Oximester) ermöglicht¹⁷⁸. In der industriellen Anwendung haben sich diese Ester jedoch nicht durchsetzen können, da (1) Cyanomethylester giftiges Formaldehydcyanhydrin freisetzen, (2) bei der Verwendung von 2-Haloethylestern entweder nur limitierte Aktivierungen erreicht werden (z.B. 2-Chloroethylester) oder nur schwer abtrennbare Nebenprodukte (z.B. Trifluoroethanol, $\text{Sdp} = 151 \text{ }^\circ\text{C}$) entstehen, und (3) Oximester zur Enzyminhibierung führen können und das nicht-flüchtige Oxim nur schwer aus dem Reaktionsmedium entfernt werden kann^{124,179}.

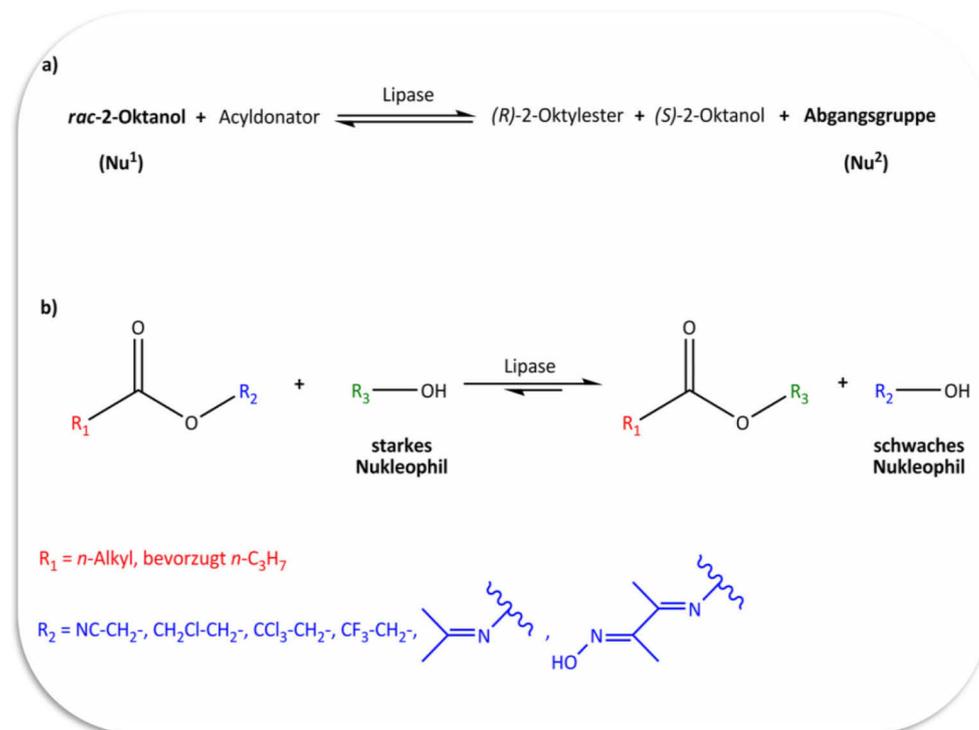


Abbildung 1.10 Lipasekatalysierte Estersynthese (nach ¹²⁴). a) Lipasekatalysierte Umesterungsreaktion am Beispiel der Racematspaltung von *rac*-2-Octanol. b) Strukturen typischer aktivierter Ester, die in lipasekatalysierten Transesterifizierungen eingesetzt werden, um eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts in Richtung der Produktbildung zu ermöglichen.

Im Vergleich zu den zuvor genannten Acyldonoren, die das thermodynamische Gleichgewicht durch die Freisetzung eines schwach nukleophilen Alkohols stark nach rechts verschieben, wird durch die Verwendung von Enolestern die Reaktion vollständig irreversibel und die Reaktionsgeschwindigkeiten noch einmal um ein bis zwei Zehnerpotenzen erhöht (Tabelle 1.3).

Tabelle 1.3 Einfluss verschiedener Ester auf die relative Reaktionsgeschwindigkeit lipasekatalysierter Estersynthesen (nach ¹²⁴)

Reaktion	Acyldonor	relative Reaktionsgeschwindigkeit
Esterhydrolyse	-	1
Acyltransfer	Enolester	10 ⁻¹
Acyltransfer	aktivierte Ester	10 ⁻² – 10 ⁻³
Acyltransfer	nicht-aktivierte Ester	10 ⁻⁴ – 10 ⁻⁵

Bei der Umsetzung von Enolestern (Abbildung 1.11), wie z.B. Vinyl- oder Isopropenylestern, werden Enole als Nebenprodukte gebildet, die ihrerseits sofort zu stabilen Aldehyden oder Ketonen tautomerisieren^{180,181}.

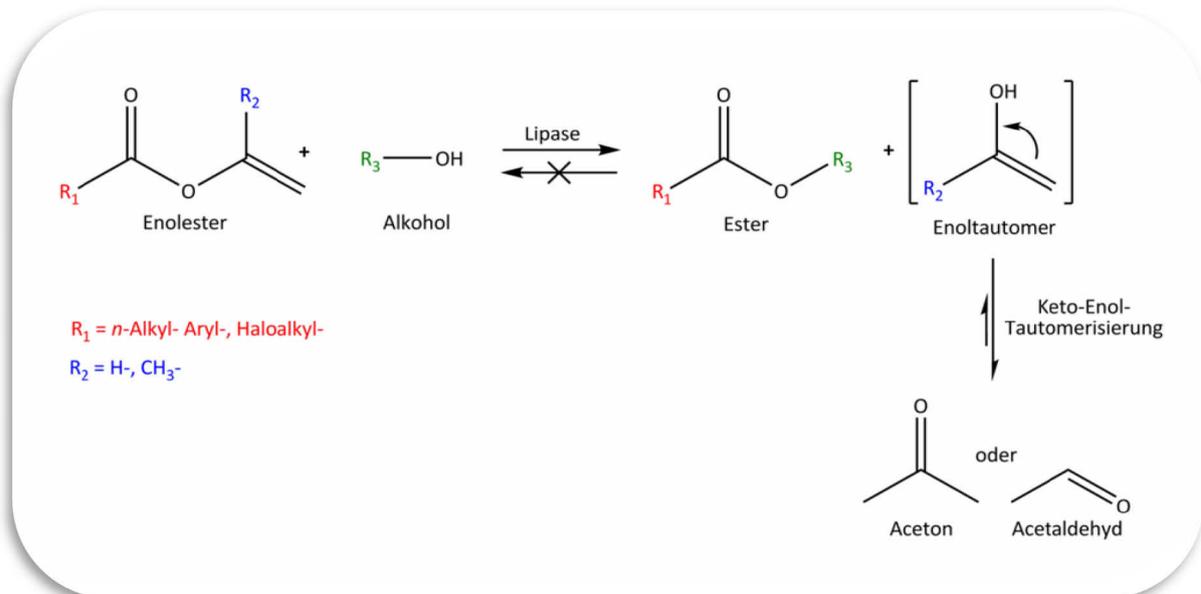


Abbildung 1.11 Irreversible Lipase-katalysierte Estersynthesen (nach¹²⁴). Die Verwendung von Isopropenyl- bzw. Vinylestern in Lipase-katalysierten Transesterifizierungen führt, neben der Synthese eines Esters, zur Bildung von Aceton bzw. Acetaldehyd. Da weder Aceton noch Acetaldehyd als Substrate in der Rückreaktion umgesetzt werden können, sind Lipase-katalysierte Transesterifizierungen von Isopropenyl- bzw. Vinylestern vollständig irreversibel.

Aus sterischen Gründen erzielt man jedoch mit Vinylestern höhere Reaktionsgeschwindigkeiten und bessere Umsatzraten als mit Isopropenylestern¹²⁴. Daher werden Vinylester mit Abstand am häufigsten in Lipase-katalysierten Estersynthesen verwendet. Trotz dieser Vorteile ist der Einsatz von Vinylestern nicht ganz unkritisch. Acetaldehyd, das während der Umsetzung gebildet wird, wurde bereits kurz nach den ersten beschriebenen enzymkatalysierten Estersynthesen mit Vinylestern als eine inaktivierende Verbindung einiger Lipasen identifiziert¹⁸². Die Acetaldehyd-induzierte Inaktivierung von Lipasen ist dabei eines der vielen bekannten Beispiele für die Carbonyl-induzierte Enzyminhibitionen¹⁸³.

1.3.3 INAKTIVIERUNG MIKROBIELLER LIPASEN DURCH ACETALDEHYD

Die inaktivierende Wirkung von Acetaldehyd auf mikrobielle Lipasen, wurde erstmals von Degueil-Castaing *et al.*¹⁸⁰ vermutet und im Rahmen der Optimierung einer *Candida rugosa*

Lipase katalysierten Racematspaltung bicyklischer sekundärer Alkohole durch Berger & Faber¹⁸² nachgewiesen.

Die Untersuchungen von Berger & Faber (Racematspaltung von *rac-endo*-Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-ol mit Vinylacetat) zeigten, dass, im Gegensatz zu vorherigen Ergebnissen¹⁸⁴⁻¹⁸⁷, die Lipase aus *Candida rugosa*, sowohl nach der Wiederverwendung des Enzyms als auch nach direkter Inkubation mit Acetaldehyd, erheblich verminderte Enantioselektivität und Aktivität aufwies. Da bereits vorher gezeigt worden war, dass Acetaldehyd über eine Maillard-Typ Reaktion Schiffbasen¹⁸⁸ u.a. mit der ϵ -Aminogruppe von Lysin¹⁸⁹ bilden kann, vermuteten Berger & Faber, dass die Schiffbasenbildung an lösungsmittelzugänglichen Lysinresten zu Polaritätsveränderungen an der Enzymoberfläche und demzufolge zu strukturellen Änderungen und Inaktivierung der Lipase führt (Abbildung 1.12 a).

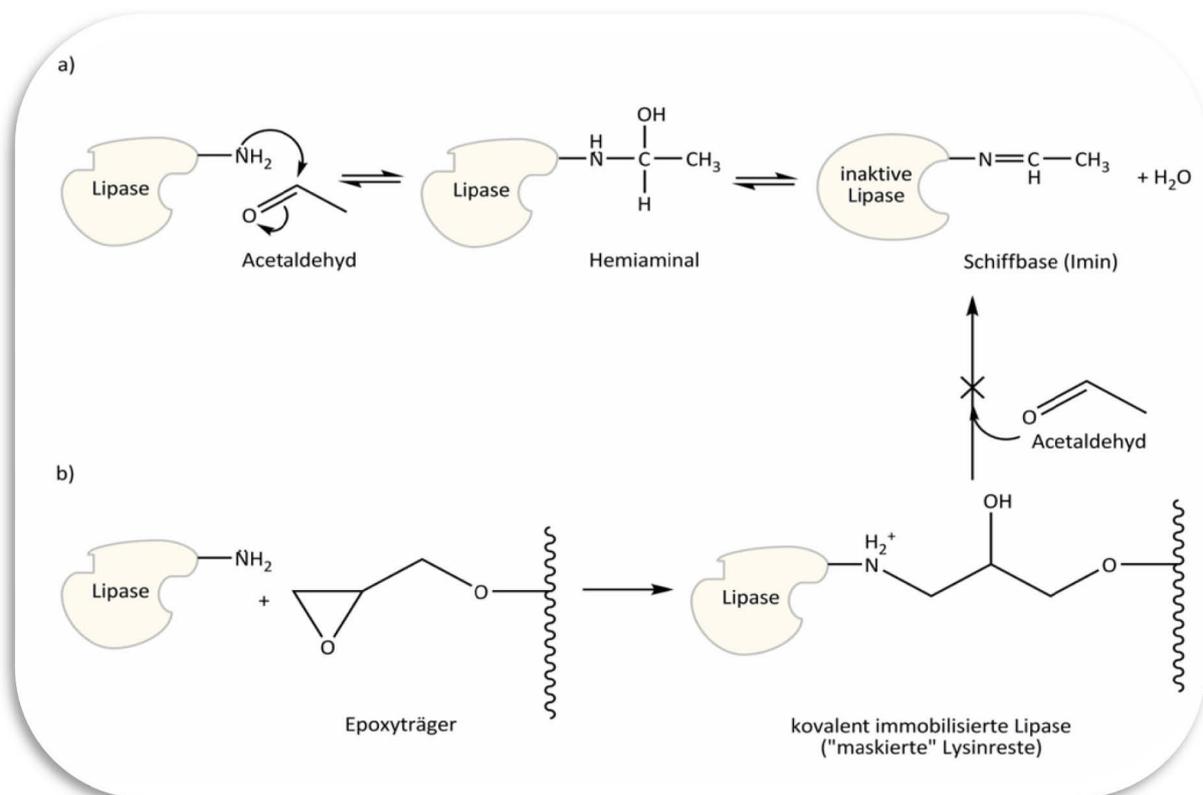


Abbildung 1.12 Acetaldehyd-induzierte Schiffbasenbildung an Protein-gebundenen primären Aminogruppen (nach¹⁹¹). a) Postulierte Inaktivierung einer Lipase durch Acetaldehyd-induzierte Schiffbasenbildungen, die ihrerseits strukturelle Veränderungen der Lipase verursachen; b) Maskierung lösungsmittelzugänglicher Lysinresten durch kovalente Immobilisierung an Epoxyträgern.

In einer darauf folgenden, umfangreichen Arbeit, wurde die Sensitivität von 26 kommerziell erhältlichen Lipaselyophilisaten auf Acetaldehyd getestet¹⁹⁰. Hierzu wurden die Lyophilisate ohne weitere Vorbehandlung in Toluol suspendiert, über Nacht in Gegenwart von 100 mM Acetaldehyd inkubiert und anschließend die relative Aktivität im Vergleich zu einer Probe die

nicht mit Acetaldehyd behandelt wurde, bestimmt. Aus diesen Messungen ergab sich, dass die verschiedenen Lipasen unterschiedlich stark auf die Inkubation mit Acetaldehyd reagieren. So wurden z.B. im Falle der Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) annähernd keine (- 2 %), der Lipase aus *Rhizopus oryzae* (Amano F-AP15) moderate (- 17 %) und der Lipase aus *Candida rugosa* (Sigma Typ VII) starke (- 76 %) Aktivitätseinbußen gemessen. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde postuliert, dass (1) die Acetaldehydsensitivität der Lipase von der mikrobiellen Quelle abhängt aus der sie stammt; (2) große Lipasen (ca. 60 kDa) sensitiver als kleine Lipasen (25 – 35 kDa) sind; und (3) Lipasen mit einem vergleichsweise niedrigen Lysingehalt (2,2 – 2,6 %) stabiler als Lipasen mit einem hohen Lysingehalt (3,7 – 4,2 %) sind. Jedoch trafen diese Postulate nicht auf sämtliche Enzyme zu, da z.B. die Lipasen aus *Rhizopus niveus* und *Pseudomonas fluorescens* mit einem Lysingehalt von 5 - 6 % keine Acetaldehydsensitivität zeigten¹⁹⁰. Aufgrund der unzureichenden Gültigkeit dieser Postulate, wurden die experimentellen Ergebnisse von Weber *et al.* (1995) und die zu dieser Zeit verfügbaren Kristallstrukturen der *Candida rugosa*, *Galactomyces geotrichum* (vormals *Geotrichum candidum*), *Pseudomonas glumae*, *Candida antarctica* und *Mucor miehei* (vormals *Rhizomucor miehei*) Lipasen *in silico* analysiert¹⁹¹. Durch die Berechnung der Lösungsmittelzugänglichkeit und der pK_s-Werte – die berechenbaren pK_s-Werte sind direkt proportional zu der nicht-berechenbaren Nukleophilie – der ε-Aminogruppe, wurde das folgende Postulat zur Erklärung der unterschiedlichen Acetaldehydsensitivitäten entwickelt: Je höher die Lösungsmittelzugänglichkeit und die pK_s-Werte, und damit die Nukleophilie als Maß für die Neigung zur Schiffbasenbildung, der ε-Aminogruppen ist, desto sensitiver reagiert die entsprechende Lipase auf die Gegenwart von Acetaldehyd¹⁹¹. Mit Hilfe dieser Parameter, wurde im Falle der *Candida rugosa* Lipase versucht, einen möglichen *hot-spot* Lysinrest für die Acetaldehydinaktivierung zu finden. Durch die Suche nach Lysinresten mit sowohl hohen Lösungsmittelzugänglichkeiten als auch hohen pK_s-Werten, wurde in der *Candida rugosa* Lipase die Aminosäure Lys₇₅ als möglicher *hot spot* indentifiziert. Lys₇₅ arretiert die Deckeldomäne, durch Wasserstoffbrückenbildung zwischen seiner ε-Aminogruppe und den Aminosäuren Glu₇₀, Glu₇₁ und Asn₂₉₂, während der Katalyse im geöffneten Zustand (Abbildung 1.13). Demzufolge postulierten Weber *et al.* (1997), dass durch Schiffbasenmodifikation dieses Lysinrestes der Deckel nicht mehr im geöffneten Zustand gehalten werden kann und somit die Enzymaktivität sinkt¹⁹¹.

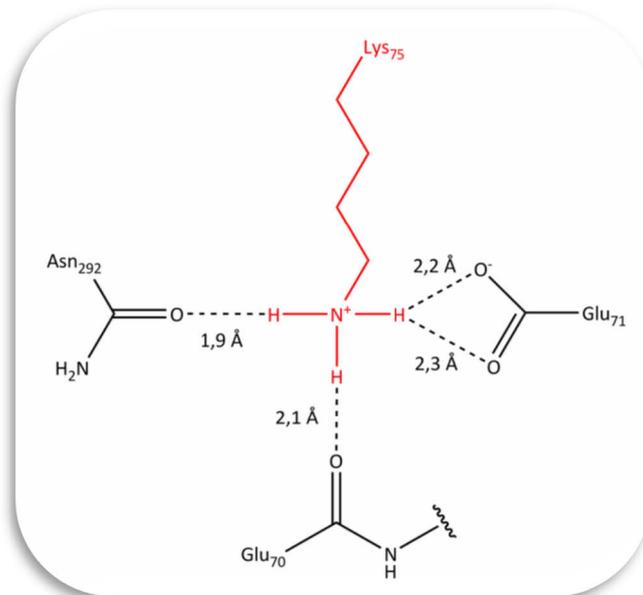


Abbildung 1.13 Arretierung der Deckeldomäne der *C. rugosa* Lipase durch Lys₇₅ (nach¹⁹¹). Während der Katalyse wird die *C. rugosa* Lipase durch Interaktion von Lys₇₅ der Deckeldomäne mit Glu₇₀, Glu₇₁ und Asn₂₉₂ im offenen/aktiven Zustand arretiert.

Die in der Arbeit von Weber *et al.*¹⁹¹ postulierte Stabilisierung der *Candida rugosa* Lipase durch den konservativen Aminosäureaustausch Lys₇₅ → Arg₇₅ wurde jedoch, und damit auch die zentrale Rolle des Lys₇₅ in der Acetaldehydinaktivierung, nicht experimentell gezeigt. Die einzigen erfolgreichen Stabilisierungen gegen Acetaldehyd, wurden durch Adsorption der *Candida rugosa* Lipase an Celite® 545 [Fluka] bzw. die kovalente Immobilisierung der *Candida rugosa* Lipase an VA-Epoxy-Biosynth-Träger [Riedel de Haën] erreicht^{182,192}. Der Stabilisierungseffekt durch kovalente Immobilisierung war hierbei wesentlich ausgeprägter, als der durch Adsorption¹⁹³. Somit kann die erfolgreiche Stabilitätssteigerung durch kovalente Immobilisierung an einen Epoxyträger, die zu einer „Maskierung“ der gebundenen Lysinreste führt (Abbildung 1.12 b), als einziger deutlicher Hinweis auf die Beteiligung der Lysine an der Lipaseinaktivierung durch Acetaldehyd betrachtet werden. Ob die Inaktivierung mikrobieller Lipasen auf der Bildung von Schiffbasen zwischen den Lysinresten und Acetaldehyd beruht, ist jedoch bis heute fraglich, da zum einen keine direkte Korrelation zwischen der Bildung von Schiffbasen und der Aktivitätsabnahme gemessen werden konnte und zum anderen Schiffbasen äußerst instabile Verbindungen sind, die leicht hydrolysieren.

2 MOTIVATION UND ZIELSETZUNG

2.1 Motivation

Das von Weber *et al.*¹⁹¹ entwickelte Postulat zur Erklärung der unterschiedlichen Acetaldehydsensitivitäten verschiedener Lipasen, basiert auf zwei physikochemischen Parametern: Lösungsmittelzugänglichkeit und pK_s -Werte der Lysin ϵ -Aminogruppen. Während die Lösungsmittelzugänglichkeit einer ϵ -Aminogruppe eine logische Voraussetzung für die Reaktion mit Acetaldehyd darstellt, so ergibt sich für den pK_s -Wert, als Parameter für die Acetaldehydsensitivität, folgendes Problem: Der pK_s -Wert ist direkt proportional zur Nukleophilie, die ihrerseits die Neigung der ϵ -Aminogruppe beschreibt, eine Schiffbase mit Acetaldehyd zu bilden. Dementsprechend gilt, dass je höher der pK_s -Wert (Nukleophilie) ist, desto höher ist die Neigung der entsprechenden ϵ -Aminogruppe zur Schiffbasenbildung. Dies gilt jedoch nur, wenn man zwei deprotonierte ϵ -Aminogruppe ($-NH_2$) miteinander vergleicht. Protonierte ϵ -Aminogruppen ($-NH_3^+$) sind hingegen – unabhängig von ihrem pK_s -Wert – nicht reaktiv¹⁹⁴. Darüberhinaus liegen ϵ -Aminogruppen, die einen erhöhten pK_s -Wert und damit nach Weber *et al.*¹⁹¹ eine höhere Reaktivität aufweisen, eher in protonierter Form vor bzw. sind schwerer zu deprotonieren, als solche mit einem niedrigeren pK_s -Wert. Das als *hot spot* postulierte Lys₇₅¹⁹¹ würde demzufolge, mit einem berechneten pK_s -Wert von 11,3, bei pH 7,0 (pH-Optimum der *Candida rugosa* Lipase) $10^{4,3}$ x häufiger in protonierter/nicht-reaktiver als in deprotonierter/reaktiver Form vorliegen.

Weber *et al.*¹⁹⁰ haben, in ihrer umfangreichen Analyse kommerzielle Enzymlyophilisate verwendet. Solche Enzympräparate sind, im Gegensatz zu käuflich erhältlichen Chemikalien, sehr heterogene Gemische, die neben dem gewünschten Enzym noch Additive (z.B. Kohlenhydrate), Fette, Puffersalze und weitere Proteinverunreinigungen, darunter auch andere Enzyme, enthalten¹⁹⁵. Die Untersuchung der Zusammensetzung von 34 kommerziellen Lipasepräparaten ergab, dass der Proteingehalt verschiedener Lyophilisate zwischen 0,1 und 51,8 % liegt und neben der Lipase auch Proteasen, Carboxylesterasen und Thioesterasen nachgewiesen werden können¹⁹⁶⁻¹⁹⁹. Diese Heterogenität stellt bei der Verwendung kommerzieller Enzympräparate eine der Hauptursachen für Reproduzierbarkeits-, *screening*- und *scale up*-Probleme dar^{195,200}. In diesem Zusammenhang kann selbst die unterschiedliche Zusammenstzung verschiedener Chargen

einer Lipasepräparation desselben Anbieters die Reproduzierbarkeit drastisch beeinflussen²⁰¹. Bei der Verwendung solcher Lyophilisate in organischen Lösungsmitteln sind darüberhinaus die Bedingungen während der Expression und Reinigung (Pufferzusammensetzung, Pufferkonzentration, pH) von Bedeutung. Eine besondere Rolle muss im Zusammenhang mit der Acetaldehydinaktivierung dem pH-Wert während der Lyophilisierung beigemessen werden. Da Weber *et al.*¹⁹⁰ sämtliche Lipasen ohne weitere Vorbehandlung in einem apolaren Lösungsmittel (Toluol, $\log P = 2,52$) suspendiert haben, ist davon auszugehen, dass der Protonierungszustand der Lipasen dem pH-Wert des Lyophilisierungspuffers entsprach (*pH-memory effect*). Da der Protonierungsgrad der ϵ -Aminogruppen die Reaktivität gegenüber Acetaldehyd entscheidend beeinflusst, könnte dies eine der Hauptursachen für die zum Teil stark variierenden Sensitivitäten gegenüber Acetaldehyd darstellen. Ein deutlicher Hinweis auf den Einfluss der verschiedenen Präparationsbedingungen der Enzymhersteller sind z.B. die verschiedenen Stabilitäten der *Aspergillus niger* und *Rhizomucor miehei* Lipasen gegenüber Acetaldehyd: Die *Aspergillus niger* Lipase Amano AP6 [Amano Enzyme Inc.] wies nach der Inkubation mit Acetaldehyd eine Aktivitätssteigerung um 22 % auf, wohingegen das Lyophilisat der Firma Röhm eine um 27 % verminderte Aktivität zeigte. Die *Rhizomucor miehei* Lipase Novo SP524 [Novozymes] zeigte nach der Inkubation eine um 20 % erhöhte und das Lyophilisat der Firma Biocatalysts eine um 23 % verringerte Aktivität¹⁹⁰.

2.2 Zielsetzung

Aus diesen Überlegungen und dem derzeitigen Literaturstand ergeben sich demnach folgende Fragestellungen:

- 1. Beeinflusst der Protonierungszustand die Stabilität von Lipasen gegenüber Acetaldehyd?** Anhand ausgewählter Lipaselyophilisate, die zum Teil bereits von Weber *et al.*¹⁹⁰ analysiert wurden, soll der Einfluss des Protonierungszustands auf die Stabilität gegenüber Acetaldehyd untersucht werden. Darüberhinaus soll anhand der deckellosten minimalen α/β -Hydrolasen BSL-A und -B überprüft werden, ob die Deckel-domäne, wie von Weber *et al.*¹⁹¹ postuliert, eine entscheidende Rolle im Verlauf der Acetaldehyd-induzierten Inaktivierung spielt.

-
- 2. Gibt es Lysinreste die für die Aufrechterhaltung der katalytischen Aktivität essentiell sind (*hot spots*)?** Durch gezielte Mutagenese sämtlicher Lysinreste sollte, am Beispiel der BSL-B untersucht werden ob einzelne Lysinreste essentiell für Aufrechterhaltung der katalytischen Aktivität sind. Für diese Untersuchung wurde BSL-B ausgewählt, da sie (1) genetisch zugänglich ist, (2) im Gegensatz zu käuflichen Lipaselyophilisaten in einem hohen Reinheitsgrad und mit definierter Pufferzusammensetzung isoliert werden kann und (3) als minimale α/β -Hydrolase, mit einer molekularen Masse von weniger als 20 kDa, eine vereinfachte Analytik ermöglicht.
- 3. Welcher Mechanismus liegt der Acetaldehyd-induzierten Inaktivierung mikrobieller Lipasen zugrunde?** Aufgrund der minimalen α/β -Hydrolasefaltung, d.h. dem Fehlen zusätzlicher Sekundärstrukturelemente, die eine Übertragung der Ergebnisse auf andere Lipasen zulässt, und der zuvor genannten vereinfachten Analytik, sollte am Beispiel der BSL-B der molekulare Inaktivierungsmechanismus durch Acetaldehyd näher analysiert werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 GERÄTE UND CHEMIKALIEN

Analytik	Hersteller
UV-Transilluminator	Stratagene
Thermocycler	Eppendorf
Dynamische Lichtstreuung: DynaPro mit temperierbarer Probenkammer	Protein Solutions
Software: Dynamics V6	Protein Solutions
Massenspektrometer: Quadrupol MS 1200L	Varian

Bildverarbeitung	Hersteller
Eagle Eye II	Stratagene
Stella imaging system	Raytest
Software: Stella Version 1	Raytest
Software: Aida (Advanced Image Data Analyzer)	Raytest

Chromatographie	Hersteller
ÄKTA explorer Proteinreinigungssystem	GE
Software: UNICORN Multi Purpose Control	GE
IMAC-Matrix: Ni-NTA-superflow	QIAGEN
Gelfiltrationsmatrix: Sephadex G-25	Pharmacia
Gaschromatograph: SiChromat 3	Siemens
GC-Säule: 25m Ultra I	Agilent

Elektrophorese**Hersteller**

<i>i</i> -Mupid Gel system	Cosmo Bio Co.
Mini-Protean II	Bio-Rad
Spannungsgeber: PowerPAC 300	Bio-Rad
Xcell SureLock™	Invitrogen
Spannungsgeber: PowerEase 500	Invitrogen

Spektroskopie**Hersteller**

UV / Vis-Spektralphotometer DU-650	Beckman
Mikrotiterplattenreader SpectraMax	Molecular Devices
Software Mikrotiterplattenreader: SoftMax Pro 3.1.2	Molecular Devices

Konzentratoren**Hersteller**

Vivaspin-2 (MWCO 3.000)	Sartorius
Vivaspin-20 (MWCO 3.000)	Sartorius

Zellaufschluss**Hersteller**

Sonoplus HD60	Bandelin
Kegelspitze KE66	Bandelin

Zentrifugation**Hersteller**

Sorvall RC 5B	DuPont
Rotina 35R	Hettich
Mikro 22R	Hettich

Alle verwendeten Chemikalien für Lösungen und Puffer waren mindestens von p.A.-Qualität und wurden in der Regel von Fluka, Roth, Sigma-Aldrich, Serva oder Merck bezogen.

Nährmedienbestandteile waren von Merck, Difco, Roth oder Invitrogen.

Die Enzyme für die Molekularbiologie wurden von Fermentas oder Stratagene bezogen.

Es wurden folgende Kits der entsprechenden Firmen benutzt:

Kit	Hersteller
HiSpeed Plasmid Mini Kit	Qiagen
HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen

3.1.2 BAKTERIENSTÄMME UND VEKTOREN

Stämme	Hersteller
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> DH5 α	Novagen

Vektoren	Referenz
pET19b- <i>lipA</i>	202
pET19b- <i>lipB</i>	202
pET19b- <i>lipB</i> K25A	diese Arbeit
pET19b- <i>lipB</i> K37A	diese Arbeit
pET19b- <i>lipB</i> K46A	diese Arbeit
pET19b- <i>lipB</i> K66A	diese Arbeit
pET19b- <i>lipB</i> K71A	diese Arbeit

pET19b- <i>lipB</i> K72A	diese Arbeit
pET19b- <i>lipB</i> K90A	diese Arbeit
pET19b- <i>lipB</i> K97A	diese Arbeit
pET19b- <i>lipB</i> K124A	diese Arbeit
pET19b- <i>lipB</i> K172A	diese Arbeit
pET19b- <i>lipB</i> K25R	diese Arbeit
pET19b- <i>lipB</i> K37R	diese Arbeit
pET19b- <i>lipB</i> K46R	diese Arbeit
pET19b- <i>lipB</i> K66R	diese Arbeit
pET19b- <i>lipB</i> K71R	diese Arbeit
pET19b- <i>lipB</i> K72R	diese Arbeit
pET19b- <i>lipB</i> K90R	diese Arbeit
pET19b- <i>lipB</i> K97R	diese Arbeit
pET19b- <i>lipB</i> K124R	diese Arbeit
pET19b- <i>lipB</i> K172R	diese Arbeit

3.2 Kultivierung und Stammhaltung von *E. coli*

Alle im Folgenden aufgeführten Medien wurden in entsalztem Wasser (A. bidest.) angesetzt und 20 min bei 121°C autoklaviert. Thermolabile Komponenten wurden sterilfiltriert.

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte bei 37°C in LB-Medium²⁰³.

LB (Luria-Bertani)-Medium:	1% (w/v) Trypton	
	1% (w/v) Hefeextrakt	
	0,5% (w/v) NaCl	pH 7,5

Zur Selektion antibiotikaresistenter Transformanten wurde nach dem Autoklavieren sterilfiltriertes Ampicillin (100 mg L^{-1}) zugegeben. Zur Herstellung von Nährböden wurde den Flüssigmedien 2% (w/v) Agar [Roth] zugefügt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 PRÄPARATION VON PLASMID-DNA AUS *E. COLI*

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das QIAGEN Plasmid Mini oder Midi Kit verwendet. Diese Kits beruhen in modifizierter Form auf der alkalischen Lyse²⁰⁴ und einer anschließenden Anionenaustauschchromatographie. Anzucht volumina und Zellaufschluss der Bakterienkulturen sowie die Reinigungsschritte mittels Säulenmaterial erfolgten analog zu den Herstellerangaben des QIAGEN *Plasmid Purification Handbook* (2005).

3.3.2 QUIKCHANGE®-PCR

Für den gezielten Austausch der Lysinreste in BSL-B gegen Alanin bzw. Arginin wurde das sogenannte QuikChange®-Verfahren²⁰⁵ [Stratagene] eingesetzt. Bei diesem Verfahren wird ein aus *dam*⁺ *E. coli*-Stämmen doppelsträngiges methyliertes Ausgangsplasmid mit einem Primerpaar, das die gewünschte Mutagenesequenz enthält, als Ganzes mittels PCR amplifiziert (Abbildung 3.1). Die Mutageneseprimer hybridisieren an korrespondierenden Stellen auf dem *sense*- und *antisense*-Strang des Ausgangsplasmids. Das PCR-Produkt ist eine Kopie des Ausgangsplasmids mit der gewünschten Mutation auf beiden Stängen, sowie jeweils einem Einzelstrangbruch (*nick*) auf jedem Plasmidstrang. Um weitere, bis auf die gewünschten Mutationen zu vermeiden, wurde als amplifizierendes Enzym die durch Korrekturaktivität (3'-5'-Exonukleaseaktivität) ausgezeichnete *Turbo-Pfu*-Polymerase [Stratagene] verwendet. Das Ausgangsplasmid wird anschließend durch die für methylierte und hemimethylierte DNA spezifische Restriktionsendonuklease *DpnI* abgebaut und die Einzelstrangbrüche nach der Transformation durch zelleigene DNA-Ligaseaktivität repariert.

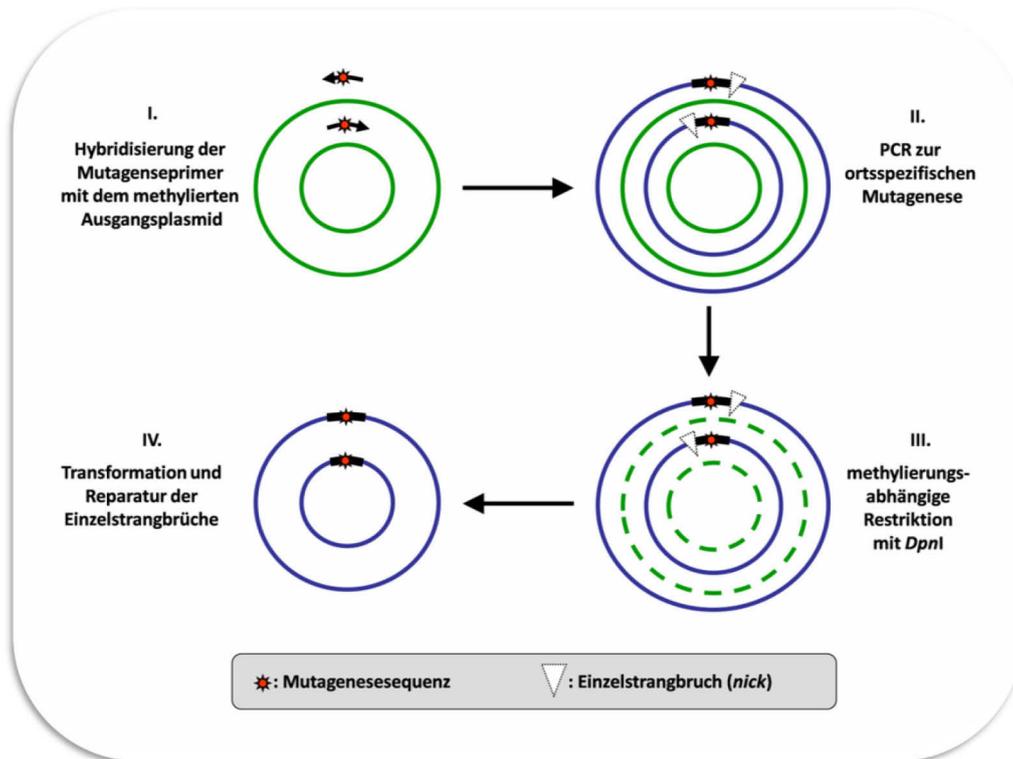


Abbildung 3.1 Prinzip der ortsspezifischen Mutagenese nach dem QuikChange[®]-Verfahren²⁰⁵ [Stratagene]

Der Standard-QuikChange[®]-PCR-Ansatz besteht aus folgenden Komponenten:

20-500	ng	DNA als PCR-Matrize
1/10	Vol.	10x Polymerase-Puffer
200	μM	je dNTP
0,5	μM	je Primer
2-5	U	DNA-Polymerase

Gesamtvolumen je Ansatz: 50 μL

Die PCR wurde in einem Eppendorf ep gradient S Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung	5	min	95	°C	
Zyklen (16x)	1	min	95	°C	Denaturierung
	1	min	55	°C	Primer-Annealing
	7,5	min	72	°C	Elongation
Terminale Elongation	15	min	72	°C	

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte elektrophoretisch auf einem Agarosegel.

3.3.3 HYDROLYTISCHE SPALTUNG VON DNA DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Zu analytischen Zwecken wurden 0,5-1 µg DNA mit 1-5 U Restriktionsendonuklease in einem den Herstellerangaben entsprechenden Ansatz von 10-20 µL bei optimaler Reaktionstemperatur inkubiert. Für die Restriktion des Ausgangsplasmids im Anschluss an eine QuikChange[®]-Mutagenese (3.3.2) wurde der komplette PCR-Ansatz mit 20 U *DpnI* für 1 h bei 37 °C inkubiert und die Endonuklease anschließend hitzeinaktiviert (20 min bei 80 °C).

3.3.4 ALKALISCHE AGAROSEGELELEKTROPHORESE VON DNA

Die mit Restriktionsendonukleasen behandelte DNA wurde zur Identifizierung und Quantifizierung elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Herstellung der Gele sowie die Durchführung der Elektrophorese erfolgte gemäß Sambrook *et al.* (2001). Die Agarosekonzentration betrug 0,8 % (w/v) in 0,5 x TBE-Puffer. Ethidiumbromid, das zwischen benachbarten Basenpaaren interkaliert und dadurch eine Visualisierung unter UV-Licht ($\lambda = 254-366$ nm) ermöglicht, wurde den Gelen 0,01 %ig (v/v) zugegeben. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/5 Vol. 5 x DNA-Probenpuffer versetzt. Als DNA-Molekulargewichtsstandard diente die *GeneRuler 1 kb DNA ladder* [Fermentas]. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelkammern bei einer Spannung von bis zu 11 V pro cm Elektrodenabstand in 0,5 x TBE-Puffer durchgeführt.

Die Agarosegele wurden mit dem Videosystem EagleEye II[®] [Stratagene] dokumentiert.

3.3.5 HITZESCHOCK-TRANSFORMATION VON *E. COLI*

Die Herstellung von zur Aufnahme von DNA kompetenter Bakterienzellen (*E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* DH5 α) für eine Hitzeschock-Transformation erfolgte nach der RbCl-Methode²⁰⁶.

LB-Medium wurde mit 1/25 Vol. Magnesium-Mix und 1/100 Vol. einer ÜN-Kultur gemischt und bis zu einer OD₅₈₀ von 0,4 bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (20 min, 5.000 rpm, Rotina 35R, 4 °C) geerntet. Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das Sediment in 1/2 Vol. eiskaltem TMF-Puffer resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (10 min, 6.000 rpm, Rotina 35R, 4 °C) wurde das Pellet in 1/10 Vol. eiskaltem TMF-Puffer aufgenommen und in Aliquots von 200 μ L aufgeteilt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Ansätze auf Eis oder nach Zugabe von Glycerol in einer Endkonzentration von 20 % (v/v) bei -80 °C gelagert.

Magnesium-Mix:	500	mM	MgCl ₂
	500	mM	MgSO ₄
TMF-Puffer:	100	mM	CaCl ₂
	50	mM	RbCl ₂
	40	mM	MnCl ₂

Zur Transformation wurden 200 μ L kompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 100 ng Plasmid-DNA vorsichtig gemischt und 1 h auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA erfolgte durch Erhitzen der DNA-Zellsuspension für 90 s auf 42 °C („Hitzeschock“). Der Transformationsansatz wurde anschließend mit 800 μ L LB-Medium versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert („phänische Expression“). 100 μ L des Ansatzes wurden auf Ampicillin-Selektivagar ausplattiert. Der restliche Ansatz wurde zentrifugiert (3 min, 10.000 rpm, Mikro 22R, RT), das Pellet in 100 μ L LB-Medium resuspendiert und auf einer weiteren Selektivagarplatte ausplattiert. Als Negativkontrolle wurden transformationskompetente Zellen ohne zugegebene Plasmid-DNA ausplattiert.

3.4 Heterologe Genexpression in *E. coli*

3.4.1 HOCHZELLDICHTE-KULTIVIERUNG

Für die heterologe Expression von BSL-B in *E. coli* wurde eine Hochzelldichte (HZD)-Kultivierung durchgeführt. Hierbei handelte es sich um eine *fed-batch*-Kultivierung unter substratlimitierenden Bedingungen. Auf diese Weise wird die Wachstumsrate μ unter dem kritischen Wert $\mu_{\text{krit}} = 0,14 \text{ h}^{-1}$ ²⁰⁷ gehalten und somit eine unvollständige Oxidation des Substrats (Glucose), die ihrerseits zu einer wachstumshemmenden Säurebildung führen würde, vermieden.

Für die Kultivierung wurde der Fermenter [Typ Techfors, Infors AG, Schweiz] zunächst mit dem HZD-*batch*, dem Antischaummittel *Anti foam* 289 [Sigma] und VE-Wasser (Tabellen 3.1 & 3.2) befüllt und autoklaviert. Anschließend wurden die restlichen Komponenten des *batch*-Mediums (Tabellen 3.1 & 3.2) über einen Sterilfilter zugegeben. Als Vorkultur wurden 100 mL LB-Medium mit 1,6 mL einer ÜN-Kultur inokuliert und für 5 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Kalibrierung der pH- und pO_2 -Elektroden wurde der auf 30 °C temperierte Fermenter mit der Vorkultur inokuliert, nach 27,5 h die Expression durch Zugabe von Isopropyl- β -thiogalactosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 2,5 mM induziert und die Fermentation nach 40 h beendet.

Während der gesamten Fermentation wurden pH-Wert, Temperatur, Rührerdrehzahl, Belüftungsrate und Zugabe des *feed*-Mediums (Tabellen 3.1 & 3.2) durch die Steuereinheit des Fermenters [DDC Version 2.0, Infors AG, Schweiz] geregelt.

Nach Beendigung der Fermentation wurden die Zellen durch Zentrifugation (45 min, 6.000 rpm, Sorvall RC-5B, 4 °C) pelletiert und bei – 80 °C gelagert.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Stammlösungen zur Durchführung einer HZD-Kultivierung.

HZD-batch	2	g/L	NH ₄ Cl	MgSO₄-Lösung	200	g/L	MgSO ₄ x7H ₂ O
	20	g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄	Thiamin-Lösung	200	g/L	Thiamin-HCl
	130	g/L	KH ₂ PO ₄	Glucose-batch	400	g/L	Glucose
	100	g/L	K ₂ HPO ₄	Glucose-feed	717,7	g/L	Glucose
	60	g/L	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Ampicillin	200	g/L	Ampicillin
	30	g/L	Hefeextrakt	IPTG	300	g/L	IPTG
HZD-feed	1	L	HZD-Batch	Vitamin-Lösung	0,1	g/L	Riboflavin
	180	g/L	Hefeextrakt		10	g/L	Thiamin-HCl
Na₂-EDTA	46,5	g/L	Na ₂ EDTA x 2H ₂ O (Titrplex III)		0,5	g/L	Nicotinsäure
					0,5	g/L	Pyridoxin-HCl
Spuren- elemente (in 5M HCl)	10	g/L	CaCl ₂ x 2H ₂ O		0,5	g/L	Ca-Panhotenat
	0,5	g/L	ZnSO ₄ x 7H ₂ O		0,001	g/L	Biotin
	0,25	g/L	CuCl ₂ x 2H ₂ O		0,01	g/L	Cyanocobalamin
	2,5	g/L	MnSO ₄ x H ₂ O		0,02	g/L	Folsäure
	1,75	g/L	CoCl ₂ x 6H ₂ O	sonstige Zusätze	5	mL	<i>Anti foam</i> 289
	0,125	g/L	H ₃ BO ₃		100	mL	ÜN-Kultur
	2,5	g/L	AlCl ₃ x 6H ₂ O				VE-Wasser
	0,5	g/L	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O				
	10	g/L	FeSO ₄ x 7H ₂ O				

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der HZD-Kultivierungsmedien

	<i>batch</i> -Medium	<i>feed</i> -Medium
HZD-<i>batch</i>	1.000 mL	
HZD-<i>feed</i>		500 mL
Glucose-<i>batch</i>	50 mL	
Glucose-<i>feed</i>		4.180 mL
MgSO₄-Lösung	50 mL	250 mL
Vitamin-lösung	50 mL	25 mL
Spurenelemente	40 mL	20 mL
Thiamin-Lösung	5 mL	25 mL
Na₂-EDTA	2 mL	
Anti foam 289	3 mL	2 mL
ÜN-Kultur	100 mL	
A. bidest.	8.700 mL	
Σ	10.000 mL	5002 mL

3.4.2 ZELLAUFSCHLUSS DURCH ULTRASCHALL

Da bei der heterologen Expression von BSL-B in *E. coli* keine Sekretion in den Kulturüberstand stattfindet, musste zur Reinigung der Lipase ein Zellaufschluss durchgeführt werden. Dazu wurde das Zellpellet in 15 mL Lyse-Puffer resuspendiert, 200 µL Lysozymlösung und zur Senkung der Viskosität 20 µL DNaseI zugegeben.

Lyse-Puffer:	30	mM	Imidazol	
	300	mM	NaCl	
	50	mM	NaH ₂ PO ₄	pH 8,0
Lysozymlösung:	100	mg/mL	Lysozym (in A. bidest.)	
DNaseI-Lösung:	0,5	mg/mL	DNaseI (in PBS)	

Der Zellaufschluss durch Ultraschall erfolgte für 20 min diskontinuierlich (50 % cycle) bei 40 W (70 % power) in einem 50 mL Falcon-*tube* auf Eis. Anschließend wurde die Probe zur Abtrennung der Zelltrümmer zentrifugiert (30 min, 18.000 rpm, Sorvall RC-5B, 4 °C) und der dabei erhaltene Überstand filtriert. Der so hergestellte Zellrohextrakt wurde direkt zur Proteinreinigung eingesetzt.

3.5 Quantitative Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes einer Proteinlösung wurde photometrisch nach Bradford²⁰⁸ bestimmt. Sie beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 vorwiegend an basische Aminosäuren. Dazu wurden 100 µL Probenlösung mit 900 µL Bradford-Reagenz gemischt, 10 min bei RT inkubiert und die Extinktion im Spektralphotometer bei $\lambda = 595$ nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer mit BSA erstellten Eichgerade im Bereich von 10 – 100 µg/mL ermittelt.

Bradford-Reagenz:	100	mg	Coomassie Brilliant Blue G-250
	50	mL	Ethanol (abs.)
	100	mL	85 %ige Phosphorsäure
	ad 1	L	VE-Wasser

3.6 Chromatographische Reinigung von BSLB

3.6.1 IMAC AN NI-NTA-AGAROSE

Unter Anwendung der immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) ²⁰⁹ kann man Proteine nach ihrer unterschiedlichen Bindungsaffinität zu Metallionen, die ihrerseits durch Chelatbildung an Liganden immobilisiert werden, trennen. Die Stärke und Spezifität der Bindung ist daneben noch abhängig vom pH-Wert und der Ionenstärke.

Lysepuffer:	30	mM	Imidazol
	50	mM	NaH ₂ PO ₄
	300	mM	NaCl
Waschpuffer:	50	mM	Imidazol
	50	mM	NaH ₂ PO ₄
	300	mM	NaCl
Elutionspuffer:	250	mM	Imidazol
	50	mM	NaH ₂ PO ₄
	300	mM	NaCl

Eine schnelle und effiziente Methode zur Reinigung von rekombinanten Proteinen mit einem N- oder C-terminalen Histidin-Oligopeptid (*His-tag*) ist die IMAC an Ni-NTA-Agarose. Für die präparative Reinigung von BSL-B mit einem N-terminalen Histidin-Decapeptid wurde die Ni-NTA-Agarose der Fa. QIAGEN [Hilden] verwendet. Ni²⁺-Ionen werden mittels des vierzähligen Liganden Nitrilotriessigsäure (NTA) chelatisiert und an einer Agarosematrix immobilisiert. 30 mL Ni-NTA-Superflow™ wurden mit 5 Säulenvolumen Lysepuffer äquilibriert und der Zellrohextrakt (3.4.2) mit einer Flussrate von 0,5 mL min⁻¹ aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit Lyse-Puffer bei einer Flussrate von 1 mL min⁻¹ solange gespült, bis die Extinktion des Eluats bei $\lambda = 280$ nm nicht weiter absank. Durch eine erhöhte Imidazolkonzentration im Waschpuffer wurden schwach gebundene Fremdproteine bei

einer Flussrate von 2 mL min^{-1} von der Ni-NTA-Matrix eluiert. Die isokratische Elution von reiner BSLB erfolgte mit Elutionspuffer bei einer Flussrate von 1 mL min^{-1} .

3.6.2 GELFILTRATIONSCHROMATOGRAPHIE AN SEPHADEX™ G-25-MEDIUM

Die Gelfiltration, als Methode zur Trennung von Molekülen nach ihrer Größe, wurde im unmittelbaren Anschluss an die IMAC (3.6.1) zum Entsalzen BSL-A- und -B-haltiger Proben angewandt. 1 L Sephadex™ G-25-Medium [GE Healthcare] wurde mit mindestens 5 Säulenvolumen Glycin/NaOH-Puffer äquilibriert und die BSL-A- bzw. -B-Lösung im gleichen Puffer bei einer Flussrate von 20 mL min^{-1} eluiert.

Glycin/NaOH-Puffer:	10 mM	Glycin	pH 11,0 (NaOH)
----------------------------	-------	--------	----------------

Die Proben wurden aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.7 Lyophilisierung

Um den Einfluss unterschiedlicher Protonierungszustände der verwendeten Lipasen auf die Sensitivität gegenüber Acetaldehyd unter nicht-wässrigen Bedingungen testen zu können, wurden die Enzyme unter Ausnutzung des *pH-memory-effects* wie folgt behandelt:

Die Lipasepräparationen aus *C. rugosa*, *R. oryzae* und *P. fluorescens* wurden sowohl in Citrat/NaOH- (pH 6) als auch in Carbonat-Puffer (pH 10) mit einer Endkonzentration von 10 mg mL^{-1} gelöst. BSL-A und BSL-B wurden sowohl mit Glycin/NaOH-Puffer (3.6.2) als auch mit Citrat-NaOH-Puffer 1:2 verdünnt. Die Endkonzentration der Enzyme betrug $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Sämtliche Enzymproben wurden sofort in Schraubverschlussgefäße aus Glas aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Die Lyophilisierung erfolgte über Nacht bei $0,011 \text{ mbar}$.

Citrat/NaOH-Puffer:	100 mM	Zitronensäure-Monohydrat	pH 6,0
Carbonat-Puffer:	100 mM	Na_2CO_3	
	100 mM	NaHCO_3	pH 10,0

3.8 Proteinmodifikationen

3.8.1 MODIFIKATION MIT ACETALDEHYD UNTER NICHT-WÄSSRIGEN BEDINGUNGEN

Um die Sensitivität der verwendeten Lipasen gegenüber Acetaldehyd in Abhängigkeit ihres Protonierungszustandes unter nicht-wässrigen Bedingungen zu testen, wurden die Enzymlyophilisate (3.7) mit je 1 mL Toluol versetzt. Um den Wassereintrag möglichst gering zu halten, wurde das Toluol vor Gebrauch für mindestens 48 h über Molekularsieben mit einem Porendurchmesser von 0,4 nm [Merck] getrocknet. Anschließend wurden die Lyophilisat-Toluol Gemische für 3 min in einem Ultraschallbad [Bandelin] homogenisiert und für 24 h mit Acetaldehyd in einem Überkopfmischer [Heidolph] bei RT inkubiert. Die Inkubation erfolgte dabei im Falle der Lipasepräparationen aus *C. rugosa*, *R. oryzae* und *P. fluorescens* mit Konzentrationen von 0–2,5 M und im Falle von BSL-A und BSL-B mit 0–1 M Acetaldehyd. Nach der Inkubation wurden die Lipasen mit je 1 mL Sörensen-Puffer extrahiert, aggregiertes Protein durch Zentrifugation (10 min, 14.000 rpm, Rotina 35R, 4 °C) entfernt, der Gesamtproteingehalt bestimmt (3.5) und die hydrolytische Restaktivität ermittelt (3.9.2).

Sörensen-Puffer:	50 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	
	50 mM	KH ₂ PO ₄	pH 8,0

3.8.2 MODIFIKATION VON BSL-B MIT METHYLACETIMIDAT

Die Modifikation von Proteinen mit Imidoestern wie z. B. Methyl- oder Ethylacetimidat führt unter basischen Bedingungen zur Bildung von amidinierten primären Aminogruppen (Abbildung 3.2)

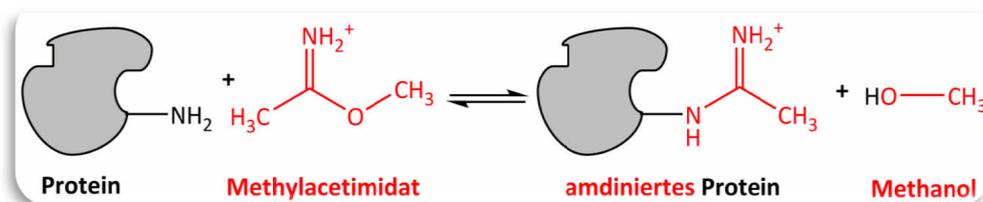


Abbildung 3.2 Modifikation eines Proteins mit Methylacetimidat

Die Modifikation von BSL-B mit Methylacetimidat erfolgte in leicht abgewandelter Form nach dem Protokoll von Tawfik²¹⁰. Hierzu wurden 2 x 1 mL BSL-B-Lösung (3.6) mit jeweils 1

mL Methylacetimidat-Lösung versetzt und für 1 h bei RT inkubiert. Als Nullprobe diente 1 mL BSL-B-Lösung der mit 1 mL NaOH/HCl-Lösung gemischt und ebenfalls für 1 h bei RT inkubiert wurde. Die Endkonzentration von BSL-B betrug $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$.

Methylacetimidat-Lösung	0,9	M	Methylacetimidat	
	1	M	NaOH	pH 9,5 (1 M HCl)
NaOH/HCl-Lösung	1	M	NaOH	pH 9,5 (1 M HCl)

Aggregiertes Protein wurde im Anschluss durch Zentrifugation (10 min, 14.000 rpm, Rotina 35R, 4 °C) entfernt und jeweils 200 μL der unmodifizierten und modifizierten BSL-B-Proben zur späteren gelelektrophoretischen Analyse (3.12) zurückbehalten. Eine der Methylacetimidat-BSL-B-Proben wurde mit einem Vivaspin-20 Konzentrator [Sartorius] in frischen Glycin/NaOH-Puffer (3.6.2) überführt, auf die ursprüngliche BSL-B-Konzentration von $0,5 \text{ mg/mL}$ konzentriert (5.000 rpm, Rotina 35R, 4 °C) und von aggregiertem Protein durch Zentrifugation (10 min, 14.000 rpm, Rotina 35R, 4 °C) befreit. Anschließend wurde der Gesamtproteingehalt sämtlicher BSL-B-Proben bestimmt (3.5) und diese mit Acetaldehyd behandelt (3.8.3).

3.8.3 MODIFIKATION VON BSL-B MIT ACETALDEHYD UNTER WÄSSRIGEN BEDINGUNGEN

Zur Modifikation von unbehandelten (3.6) oder mit Methylacetimidat behandelten (3.8.2) BSL-B Proben wurden die Enzymlösungen mit 0-1,8 M Acetaldehyd für 2 h oder ÜN bei 37 °C und 300 rpm in einem Thermomixer [Eppendorf] inkubiert. Die Endkonzentrationen von BSL-B betragen $0,1-0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Im Anschluss wurde aggregiertes Protein durch Zentrifugation (10 min, 14.000 rpm, Rotina 35R, 4 °C) entfernt, der Gesamtproteingehalt photometrisch bestimmt (3.5), die hydrolytische Restaktivität ermittelt (3.9.2) und ggf. elektrophoretische (3.12) und massenspektrometrische (3.14) Analysen durchgeführt.

3.8.4 MODIFIKATION MIT 2,4-HEXADIENAL UNTER WÄSSRIGEN BEDINGUNGEN

Zur Modifikation von unbehandelten BSL-B-Proben (3.6) wurden die Enzymlösungen mit 0-0,05 M 2,4-Hexadienal ÜN bei 37 °C und 300 rpm in einem Thermomixer [Eppendorf] inkubiert. Im Anschluss wurde aggregiertes Protein durch Zentrifugation (10 min, 14.000

rpm, Rotina 35R, 4 °C) entfernt, der Gesamtproteingehalt photometrisch bestimmt (3.5), die hydrolytische Restaktivität ermittelt (3.9.2) und ggf. elektrophoretische (3.12) und massenspektrometrische (3.14) Analysen durchgeführt.

3.8.5 MODIFIKATION VON RINDERSEBUMALBUMIN (BSA) MIT ACETALDEHYD UNTER WÄSSRIGEN BEDINGUNGEN

Für die Reaktion zwischen verschiedenen Pufferkomponenten mit Acetaldehyd bzw. der Modifikation von BSA mit Acetaldehyd, wurden folgende Ansätze hergestellt und ÜN bei 37 °C bei 300 rpm in einem Thermomischer inkubiert:

Probe	Protein (1 mg/mL)	VE- Wasser	NaOH (10 mM)	Glycin (10mM)	Acetaldehyd (500 mM)
1	-	✓			
2	-	✓			✓
3	-	✓	✓		✓
4	-	✓		✓	✓
5	-	✓	✓	✓	✓
6	BSA	✓			
7	BSA	✓			✓
8	BSA	✓	✓		✓
9	BSA	✓		✓	✓
10	BSA		✓	✓	✓

Sämtliche BSA-haltigen Proben wurden im Anschluss mit Trichloressigsäure gefällt (3.11).

3.9 Enzymaktivitätstests

3.9.1 TRIBUTYRINPLATTENTEST

Der Tributyrinplattentest dient dem einfachen Nachweis intra- oder extrazellulärer lipolytischer Aktivität. Hierfür wurde eine Tributyrin-Emulsion mit 500 mL LB-Ampicillin-Agar (3.2) vermischt und in Petrischalen gegossen. Die Emulsion trübt den Agar stark ein. Auf den Tributyrinplatten wurden in ausreichend hoher Verdünnung (vorherige Optimierung) die zu untersuchenden *E. coli*-Transformanden ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Tributyrinplatten einige Zeit bei 4 °C inkubiert, um Zellyse hervorzurufen und die intrazellulär exprimierten BSL-B-Varianten (3.3.2) freizusetzen. Um Kolonien, deren Zellen aktive BSL-B-Varianten exprimieren, wird das wasserunlösliche Tributyrin in wasserlösliches Glycerol und Buttersäure hydrolysiert (Abbildung 1.1) und ein deutlich sichtbarer Klärhof gebildet.

Tributyrin-Emulsion:	7,5	mL	Tributyrin
	0,75	g	Gummi arabicum
	ad 15	mL	VE-Wasser

Herstellung der Emulsion mittels Hochgeschwindigkeits-Rührwerk (Ultraturrax)

3.9.2 PARA-NITROPHENYLPALMITAT-TEST (PNPP-TEST)

Der pNPP-Test²¹¹ ist eine photometrische Methode zur Bestimmung hydrolytischer Aktivität in Ganzzellextrakten oder gereinigten Enzympräparationen, der auf der photometrischen Detektion freigesetzten *para*-Nitrophenolates beruht.

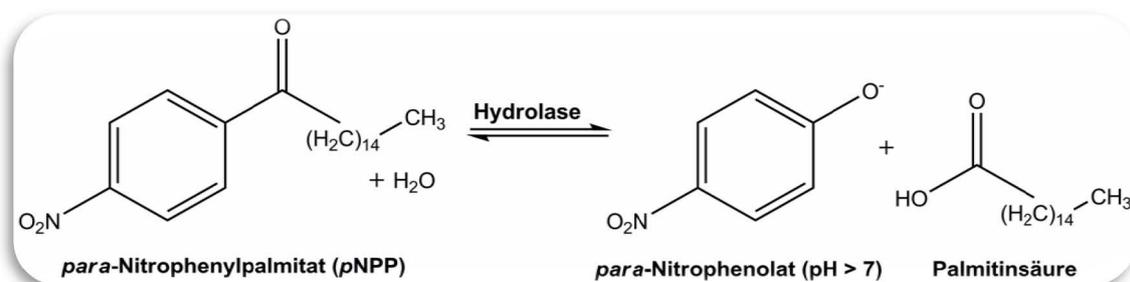


Abbildung 3.3 Hydrolyse von *para*-Nitrophenylpalmitat zu *para*-Nitrophenolat und Palmitinsäure

Nach Vermischen der *p*NPP-Emulsion mit einer ausreichend verdünnten Enzymprobe (vorherige Optimierung) wird bei Anwesenheit einer aktiven Lipase das farblose *p*NPP in Palmitinsäure und gelbes *para*-Nitrophenolat ($A_{\max} = 410 \text{ nm}$) gespalten. Aus der Absorptionzunahme bei 410 nm, die kontinuierlich mit einem SpektraMax Photometer [Molecular Devices] verfolgt wurde, ließen sich die hydrolytischen Aktivitäten der unmodifizierten und modifizierten (3.8) Lipaseproben bestimmen (Formel: siehe Anhang). Der molare Absorptionskoeffizient ϵ von *p*NPP wird mit $15.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ angegeben.

<i>p</i>NPP-Emulsion (50 mL):	Lösung I:	5	mM	Natriumdesoxycholat
		50	mg	Gummi arabicum
		45	mL	Sörensen-Puffer (3.8.1)
	Lösung II:	8	mM	<i>para</i> -Nitrophenylpalmitat
	5	mL	Isopropanol	

Herstellung der *p*NPP-Emulsion durch Mischen von Lösung I und II

Pro Versuchsansatz wurden jeweils 180 μL *p*NPP-Emulsion mit 20 μL Enzymlösung gemischt.

3.10 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Test (DNPH-Test)

Der DNPH-Test²¹² ist eine photometrische Methode zum Nachweis carbonylierter Proteine. Die spezifische Reaktion des farblosen DNPH mit proteingebundenen Carbonylen führt zur Bildung einer farbigen Protein-Hydrazone-Verbindung ($A_{\max} = 375 \text{ nm}$), die photometrisch detektiert und sich zur Identifizierung bzw. relativen Quantifizierung von Carbonylgruppen eignet (Abbildung 3.4).

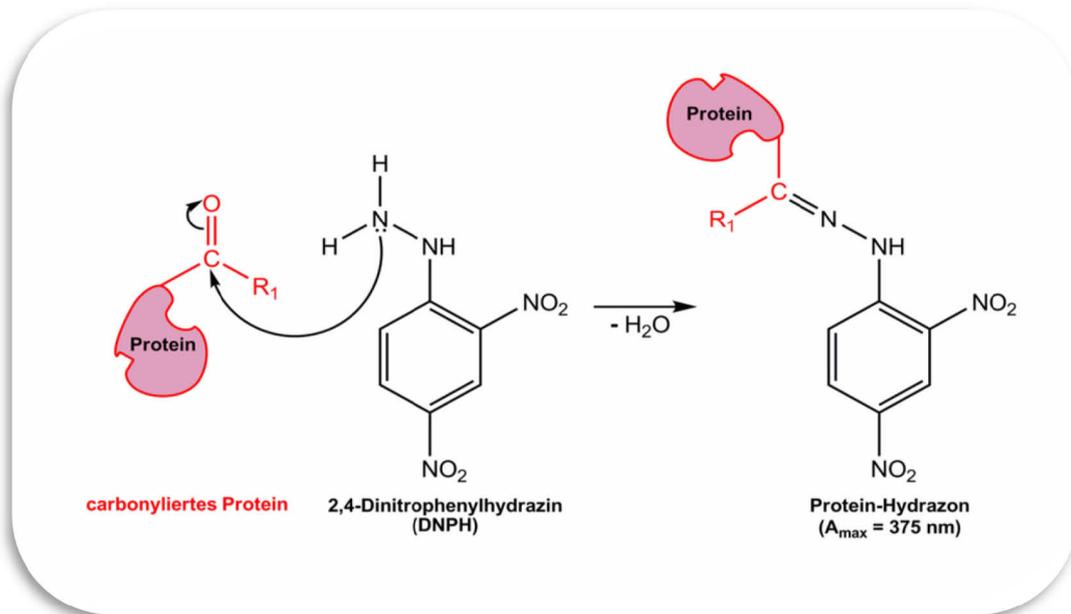


Abbildung 3.4: DNPH-Test zum Nachweis carbonylierter Proteine. Durch die Reaktion von DNPH mit proteingebundenen Carbonylen entsteht ein bei 375 nm absorbierende Protein-Hydrazone.

Hierzu wurden folgende Ansätze (Endvolumen: 1 mL) hergestellt und ÜN bei 37 °C bei 300 rpm in einem Thermomischer inkubiert:

Probe	Protein (1mg/mL)	VE-Wasser	Glycin/NaOH-Puffer	Glycin (10 mM)	NaOH (10 mM)	Acetaldehyd (500 mM)
1	-	✓				
2	BSA	✓				
3	BSA	✓				✓
4	BSA	✓			✓	✓
5	-	✓		✓		
6	-	✓		✓		✓
7	BSA	✓		✓		
8	BSA	✓		✓		✓
9	-		✓			
10	-		✓			✓
12	BSL-B		✓			
13	BSL-B		✓			✓

Sämtliche Proben wurden mit 500 µL DNPH-Lösung versetzt und während der einstündigen Inkubation bei RT alle 10 – 15 min durch Vortexen gemischt. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 500 µL 20 %iger (v/v) Trichloressigsäure und 15 minütiger Inkubation auf Eis gefällt und durch Zentrifugation (30 min, 14.000 rpm, Rotina 35R, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Nicht-proteingebundenes DNPH wurde durch dreimaliges Waschen mit 1:1 (v/v) Ethylacetat/Ethanol entfernt. Hierzu wurden die Proteinpellets jedes Mal mit je 1 mL Ethylacetat/Ethanol versetzt, durch Vortexen gemischt, 10 min bei RT inkubiert und das gefällte Protein vom Überstand durch Zentrifugation (15 min, 14.000 rpm, Rotina 35R, 4 °C) getrennt. Durch Inkubation der gewaschenen Proteinpellets in je 1 mL Resuspendierungspuffer in einem Thermomixer (30 min, 700 rpm, 37 °C) wurde das Protein wieder gelöst, unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (15 min, 14.000 rpm, Rotina 35R, 20 °C) entfernt und die Absorption des Überstands bei 375 nm gemessen.

DNPH-Lösung:	0,1	% (w/v)	DNPH	
	in 2	M	HCl	
Resuspendierungspuffer:	6	M	Guanidin-HCl	
	133	mM	Tris-HCl	
	13	mM	EDTA	pH 7,4

3.11 Proteinfällung mittels Trichloressigsäure (TCA-Fällung)

Für die Fällung von Proteinen mit TCA²¹³ wurden die proteinhaltigen Lösungen mit 1/10 Vol. 70 % TCA versetzt, durch Vortexen gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das gefällte Protein durch Zentrifugation (30 min, 14.000 rpm, Rotina 35R, 4 °C) pelletiert, der Überstand verworfen und die Pellets im direkten Anschluss gelelektrophoretisch analysiert (3.12.1).

3.12 Elektrophoretische Verfahren

3.12.1 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Trennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von SDS in einem diskontinuierlichen Gelsystem²¹⁴, das sich aus einem 5 %igen Sammelgel und einem 12 %igen Trenngel zusammensetzte.

4 x Trenngelpuffer:	1,5	M	Tris-HCl	pH 8,8
4 x Sammelgelpuffer:	0,5	M	Tris-HCl	pH 6,8
Trenngel-Lösung:	2,5	mL	Trenngelpuffer	
	3,35	mL	VE-Wasser	
	4	mL	40 % Acrylamid /Bisacrylamid (37,5:1)	
	100	µL	10 % (w/v) SDS	
	100	µL	10 % (w/v) APS	
Sammelgel-Lösung:	10	µL	TEMED	
	1,25	mL	Sammelgelpuffer	
	2,77	mL	VE-Wasser	
	0,83	mL	40 % Acrylamid /Bisacrylamid (37,5:1)	
	50	µL	10 % (w/v) SDS	
SDS-Probenpuffer:	50	mM	Tris-HCl	pH 6,8
	10	% (v/v)	Glycerol	
	4	% (w/v)	SDS	
	2	% (v/v)	β-Mercaptoethanol	
	0,03	% (w/v)	Bromphenolblau	
Kolloidale Coomassie-Lösung:	10	% (v/v)	Ethanol	
	5	% (w/v)	Al ₂ (SO ₄) ₃ x 14 – 18 H ₂ O	
	2	% (w/v)	Phosphorsäure	
	0,02	% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue G250	

Zur Dokumentation der Reinigungsschritte (3.6) und der Analyse von modifizierten und unmodifizierten Proben (3.8), wurden die Proteinlösungen bzw. –pellets in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Gelapparatur [Bio-Rad] in 1x Elektrophorese-Laufpuffer bei 150 V durchgeführt. Als Protein-Molekulargewichtsstandard diente die *PageRuler Prestained Protein Ladder* [Fermentas]. Die Proteine wurden im Anschluss durch Inkubation der Gele in einer kolloidalen Coomassie-Lösung gefärbt²¹⁵.

3.12.2 ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG (IEF)

Die gelelektrophoretische Trennung von modifizierten und unmodifizierten Proteinproben nach ihrem isoelektrischen Punkt erfolgte unter nicht-denaturierenden Bedingungen mit dem Novex[®] IEF-Gelsystem [Invitrogen] im Bereich von pH 3-7 bzw. pH 3-10. Die Probenvorbereitung und der Gellauf in einer vertikalen Gelkammer [Invitrogen] erfolgten nach den Herstellerangaben im *Novex Pre-Cast Gel Electrophoresis Guide* Version B (2003). Die Färbung der Proteine erfolgte durch Inkubation der Gele in einer kolloidalen Coomassie-Lösung²¹⁵.

3.13 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Bei der dynamischen Lichtstreuung handelt es sich um eine Methode, bei der das Streulicht eines Lasers an einer gelösten bzw. suspendierten Probe analysiert wird. Am häufigsten wird sie bei Polymeren oder Biopolymeren wie z.B. Proteinen angewandt, um den hydrodynamischen Radius der Moleküle zu ermitteln. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Technik dazu verwendet, das konzentrationsabhängige Aggregationsverhalten von BSL-B zu analysieren. Hierzu wurden 3 BSL-B Proben mit Proteinkonzentrationen von 100 µg/mL, 250 µg/mL und 500 µg/mL bei 37 °C inkubiert und in regelmäßigen Abständen über 24 h in einer DynaPro DLS-Apparatur [Protein Solutions] vermessen.

3.14 MALDI-TOF

Für die Identifikation der durch Acetaldehyd induzierten Modifikationen bzw. der modifizierten Aminosäurereste, wurden BSL-B-Proben (0,5 mg mL⁻¹) mit 0 mM, 50 mM und 500 mM Acetaldehyd für 24 h bei 37 °C inkubiert (3.8.3) und mittels SDS-PAGE (3.12.1) getrennt. Zur Analyse der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden die Proteinbanden aus

Coomassie-gefärbten SDS-Gelen ausgeschnitten. Die Gelstückchen wurden nach 2 x 10 min Schütteln mit 650 μL 0,1 M Ammoniumbicarbonat in 30 % (v/v) Acetonitril versetzt, 20 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 6 μL 3 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,8) mit 10 ng/ μL Trypsin [Promega] rehydratisiert. Nach 30 min wurden weitere 6 μL 3 mM Tris-HCl (pH 8,8) ohne Trypsin zugegeben und die Proben über Nacht bei RT verdaut. Die Peptide wurden durch Zugabe von 5 μL A. bidest., 15minütiger Inkubation bei RT, Zugabe von 5 μL 0,2 % (v/v) Trifluoressigsäure in 30 % (v/v) Acetonitril und nochmals 10minütiger Inkubation bei RT eluiert. Anschließend wurden die Peptide auf die Probenplatte aufgetragen oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur MALDI-TOF-MS Analyse wurden 0,5 μL der erhaltenen Peptidlösung und 0,5 μL Matrix (α -Cyano-4-hydroxy-trans-Zimtsäure in 50% (v/v) Acetonitril und 0,25% (w/v) Trifluoressigsäure) auf einer Stahlplatte [Bruker Daltonics] kokristallisiert. Eine externe Kalibrierung erfolgte mittels *Peptide Calibration Standard* für Massenspektrometrie [Bruker Daltonics], der ein Massenspektrum von 1046 - 3147 Da abdeckt und sich aus Angiotensin 1, Angiotensin 2, Substance P, Bombesin, ACTH (1-17), ACTH (8-39) und Somatostatin zusammensetzt. Die Proben wurden in einem Ultraflex MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer III [Bruker Daltonics] im positiven Reflektormodus und einem Beschleunigungspotential von 26,3 kV analysiert. Bei der MALDI-TOF-MS werden die mit einer organischen Matrix kristallisierten Peptide durch kurze Pulse des SmartbeamTM-Lasers, der auf dem konventionellen Nd:YAG-Festkörperlaser basiert, verdampft, in der Gasphase ionisiert und anschließend durch einen Flugzeitmassenspektrometer identifiziert. Zur Steuerung des Geräts wurde die Software flexControl 3.0 und zur Datenanalyse das Programm flexAnalysis 3.0 verwendet.

3.15 Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

Die Identifikation der Reaktionsprodukte, die nach Inkubation von Acetaldehyd in Glycin/NaOH-Puffer bzw. wässriger NaOH-Lösung entstehen, erfolgte mittels GC/MS. Hierfür wurde Acetaldehyd in einer Endkonzentration von 500 mM mit 20 mM Glycin/NaOH-Puffer (3.6.2) bzw. 10 mM NaOH-Lösung vermischt und ÜN bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Thermomischer bei 300 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsprodukte in Dichlormethan extrahiert und in einer GC/MS-Anlage [Siemens und Varian] analysiert.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Die Sensitivität mikrobieller Lipasen gegenüber Acetaldehyd kann über den *pH-memory* Effekt gesteuert werden

Die Fähigkeit einer primären Aminofunktion zur Schiffbasenbildung, ist direkt abhängig von ihrem Protonierungszustand, da nur eine deprotonierte Aminogruppe ($-NH_2$) das Carbonylkohlenstoffatom eines Aldehyds oder Ketons nukleophil angreifen kann¹⁹⁴. Demzufolge sollte die Inaktivierbarkeit einer gelösten Lipase durch Acetaldehyd, falls sie auf der Bildung von Schiffbasen basiert, durch den pH-Wert des verwendeten Puffers reguliert werden können. Im Gegensatz dazu entspricht der Protonierungszustand lyophilisierter Proteine in apolaren organischen Lösungsmitteln dem pH-Wert des Puffers bei der Lyophilisierung (*pH-memory* Effekt, 1.3.1). Im Falle kommerzieller Enzympräparationen muss aufgrund unterschiedlicher Reinigungsprotokolle demnach von unterschiedlichen Protonierungszuständen der verschiedenen Lyophilisate ausgegangen werden. Daher kann, bei fehlender Vereinheitlichung dieses Schlüsselparameters, nur schwer eine vergleichende Aussage über die Acetaldehydsensitivität verschiedener Lipasen getroffen werden. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte daher zunächst die Acetaldehydsensitivität ausgewählter Lipaselyophilisate, nach vorheriger Vereinheitlichung des Protonierungszustandes der ϵ -Aminogruppen, untersucht werden. Hierzu sollten die Lipasen vor der erneuten Lyophilisierung in Puffern gelöst werden, deren pH-Werte zur Bildung größtenteils protonierter/nicht-reaktiver bzw. deprotonierter/reaktiver ϵ -Aminogruppen führen. Um eine, diesen Ansprüchen genügende, Auswahl zweier pH-Werte treffen zu können, wurde im Vorfeld der Stabilitätsuntersuchung das arithmetische Mittel der pK_s -Werte der lösungsmittelzugänglichen ϵ -Aminogruppen, anhand sämtlicher verfügbarer Lipasestrukturen, berechnet (Tabelle 1, Anhang). Die Berechnungen wurden hierzu mit Hilfe des *PROPKA Web Interface 2.0* (<http://propka.ki.ku.dk/~drogers/>) durchgeführt²¹⁶. Hieraus ergab sich ein durchschnittlicher pK_s -Wert der lösungsmittelzugänglichen ϵ -Aminogruppen von 10,17. Folglich wäre ein pH-Wert > 11 erforderlich gewesen, um eine möglichst vollständige Protonierung der ϵ -Aminogruppen zu gewährleisten; allerdings liegt ein solch hoher pH-Wert weit oberhalb der pH-Stabilitätsoptima der meisten Lipasen. Daher wurden die Enzyme in 100 mM Carbonatpuffer bei pH 10 lyophilisiert. Für die Präparation eines überwiegend protonierten Lyophilisats wurde Citrat/NaOH-Puffer mit einem pH-Wert von 6

gewählt. Demzufolge sollten nach dieser Vorbehandlung die protonierten und deprotonierten ϵ -Aminogruppen bei pH 6 in einem Verhältnis von ca. $10^4 : 1$ und bei pH 10 von ca. $1 : 1$ vorliegen (siehe Anhang: Henderson-Hasselbalch-Gleichung).

Die protonierungsabhängige Stabilität in Gegenwart steigender Acetaldehydkonzentrationen in Toluol wurde zunächst am Beispiel der drei kommerziellen Lyophilisate Amano AK (*Pseudomonas fluorescens* Lipase), Amano F-AP15 (*Rhizopus oryzae* Lipase) und Sigma Typ VII (*Candida rugosa* Lipase) untersucht (Abbildung 4.1). Diese Lipasepräparationen wurden bereits von Weber *et al.*¹⁹⁰ analysiert und als nicht inaktivierbar (*Pseudomonas fluorescens* Lipase), moderat inaktivierbar (*Rhizopus oryzae* Lipase) bzw. stark inaktivierbar (*Candida rugosa* Lipase) klassifiziert.

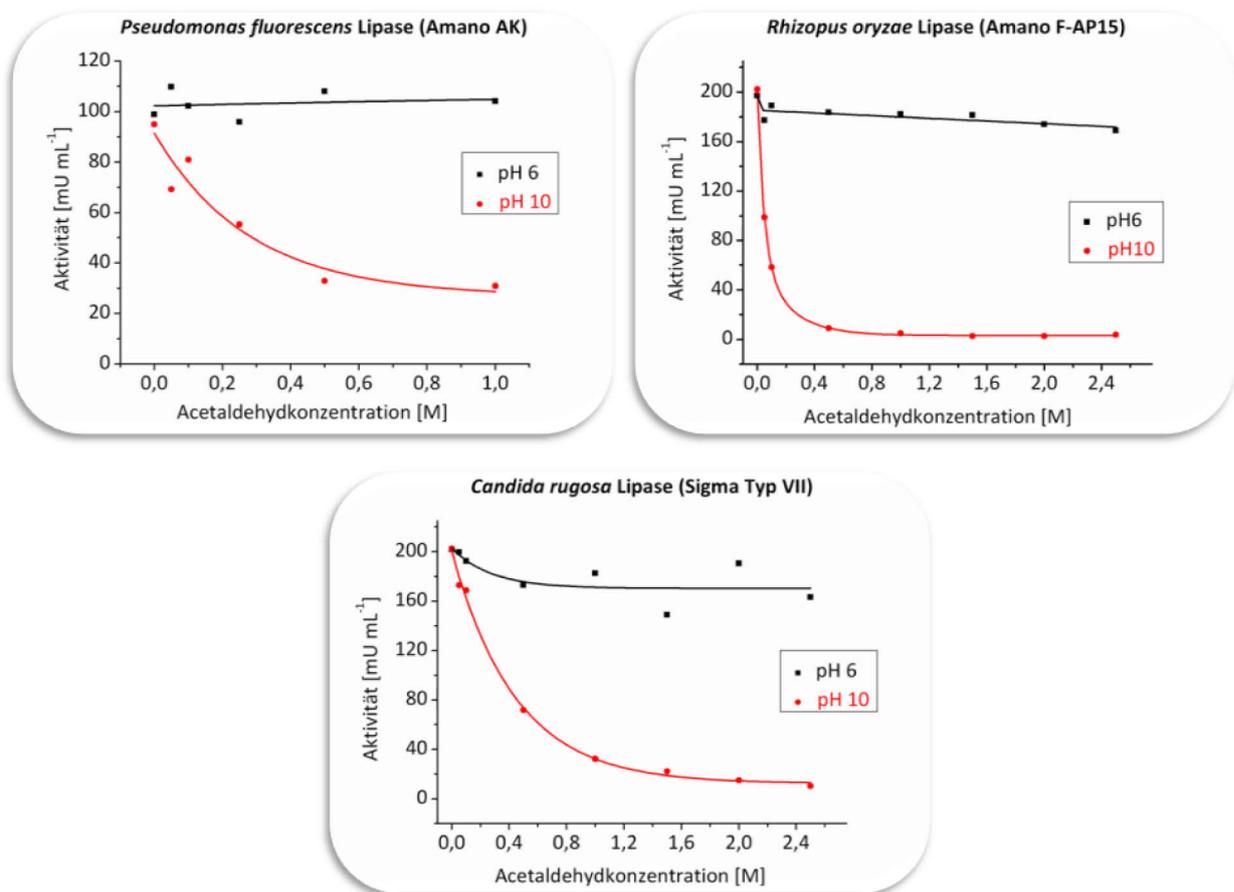


Abbildung 4.1 Inaktivierung der Lipasen aus *P. fluorescens* (Amano AK), *R. oryzae* (Amano F-AP15) und *C. rugosa* (Sigma Typ VII) in Abhängigkeit von der Acetaldehydkonzentration in Toluol nach der Lyophilisierung bei pH 6 und pH 10.

Die untersuchten Enzymlyophilisate verhielten sich nach der Einstellung eines einheitlichen Protonierungszustandes uniform. Die hydrolytischen Aktivitäten der deprotonierten Lipasepräparate (pH 10) sanken mit steigender Acetaldehydkonzentration, wohingegen die

protonierten Lyophilisate (pH 6) keine (*Pseudomonas fluorescens* Lipase) bzw. moderate (*Rhizopus oryzae* und *Candida rugosa* Lipase) Aktivitätsänderungen zeigten (Abbildung 4.1). Aus diesem Ergebnis können folgende qualitative Schlussfolgerungen gezogen werden, dass (1) die Acetaldehydsensitivität keine spezifische Eigenschaft bestimmter Lipasen ist und (2) der Protonierungszustand der lösungsmittelzugänglichen Aminogruppen bzw. das Verhältnis von $-NH_2$ zu $-NH_3^+$ -Gruppen einen Schlüsselparameter für die Acetaldehydsensitivität darstellt. Quantitative Aussagen, z.B. über die Inaktivierungsverläufe oder -kinetiken, können jedoch aufgrund der weiterhin vorhandenen Heterogenität der Versuchsansätze nicht gemacht werden. In diesem Zusammenhang können z.B. unterschiedliche Mengen an Fremdprotein in den Lipaselyophilisaten¹⁹⁷, durch Reaktion mit dem Acetaldehyd, die effektive Acetaldehydkonzentration unterschiedlich stark vermindern. Darüberhinaus kann die hochvariable Morphologie der Lyophilisatpartikel²¹⁷ sowohl die Diffusion des Acetaldehyds als auch die Wechselwirkung des Acetaldehyds mit den Aminogruppen, die durch variiierende Protei-Protein-Stapelung maskiert werden können, unterschiedlich stark beeinflussen¹¹⁵.

Aufgrund des einheitlichen Verhaltens der drei getesteten Lipasen stellte sich an diesem Punkt die Frage, ob die Acetaldehyd-induzierte Inaktivierung auf der Modifikation der hochkonservierten α/β -Hydrolasedomäne oder zusätzlicher Strukturelemente, die in vielen Lipasen vorhanden sind (z.B. Deckeldomäne oder zusätzliche zentrale β -Stränge), beruht. Die Modifikation der Deckeldomäne wurde von Weber *et al.*¹⁹³ als Ursache für die Acetaldehydinaktivierung der Lipasen aus *Galactomyces geotrichum* und *Candida rugosa* postuliert. Aus diesem Grund wurde die Stabilität der Lipasen aus *Bacillus subtilis* (BSL-A und BSL-B) in Gegenwart von Acetaldehyd getestet, da sie keine zusätzlichen Sekundärstrukturelemente besitzen (1.2.2)^{45,48}. Die Stabilitätsuntersuchungen erfolgten dabei in gleicher Weise wie die der drei zuvor getesteten Lipasen und ergaben ein vergleichbares Resultat (Abbildung 4.2). Dies stützt die Schlussfolgerung, dass der Protonierungszustand einen Schlüsselfaktor für die Lipasestabilität darstellt, und weist zum anderen darauf hin, dass nicht die Modifikation zusätzlicher Sekundärstrukturelemente, sondern die Modifikation der hochkonservierten α/β -Hydrolasedomäne das Inaktivierungsverhalten dominiert. Es ist jedoch an dieser Stelle unklar, ob eine möglichst umfangreiche Modifikation der α/β -Hydrolasedomäne oder die Schiffbasenbildung an einem

bestimmten Lysinrest (*hot spot*) für die Lipaseinaktivierung durch Acetaldehyd entscheidend ist.

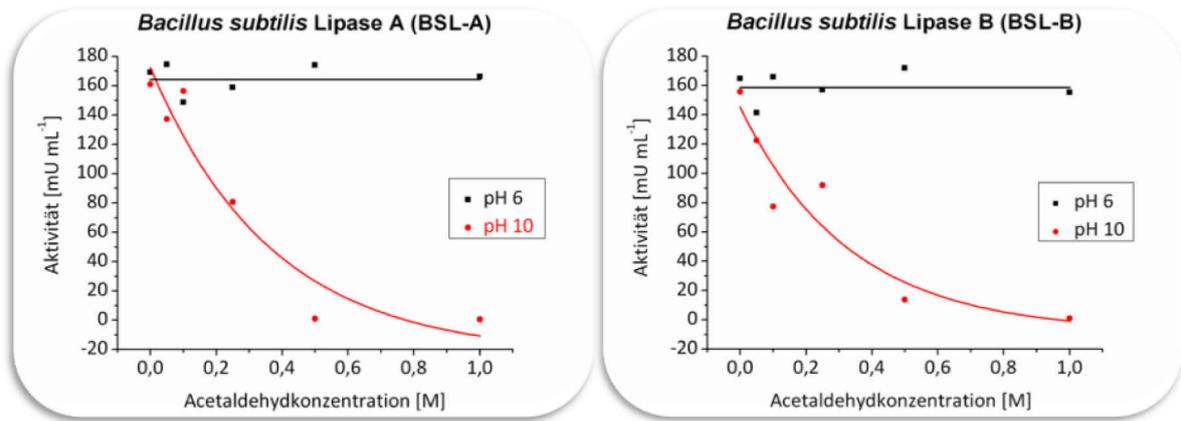


Abbildung 4.2 Inaktivierung der BSL-A und BSL-B durch steigende Acetaldehydkonzentrationen in Toluol nach der Lyophilisierung bei pH 6 und pH 10.

4.2 BSL-B besitzt keinen Lysinrest der für die katalytische Aktivität essentiell ist

Zur genaueren Aufklärung des Inaktivierungsmechanismus mikrobieller Lipasen durch Acetaldehyd, sollte durch gezielte Substitution jedes einzelnen Lysinrestes in BSL-B untersucht werden, ob die Acetaldehyd-induzierte Inaktivierung auf der Modifikation eines *hot-spot* Lysins der α/β -Hydrolasedomäne basiert. Es ist davon auszugehen, dass im Falle der Existenz eines solchen Lysinrestes, die Substitution gegen eine andere Aminosäure einen erheblichen Einfluss auf die katalytische Aktivität hat.

Daher wurde jeder einzelne der 10 Lysinreste in BSL-B sowohl konservativ (Lys \rightarrow Arg, Beibehaltung der basischen Funktion) als auch nicht-konservativ (Lys \rightarrow Ala, Austausch der basischen Funktion gegen eine neutrale) substituiert und die Aktivität über die Bildung von Hydrolysehöfen auf Tributyrin-Agarplatten überprüft.

Da sämtliche Lipasevarianten weiterhin deutliche hydrolytische Aktivität aufwiesen und lediglich graduelle Unterschiede im Verhältnis Hydrolysehofdurchmesser zu Koloniegröße erkennbar waren (Abbildung 4.3), muss aus diesem Ergebnis die Schlussfolgerung gezogen werden, dass BSL-B keinen Lysinrest enthält, der für die Aufrechterhaltung der katalytischen

Aktivität essentiell ist. Dieser Befund wird zudem durch die Ergebnisse der Arbeiten von Jennewein *et al.*²¹⁸ und Di Lorenzo *et al.*²¹⁹ bestätigt, die mit Methoden der gerichteten Evolution versucht haben, eine 2-Desoxy-D-Ribose-5-Phosphat-Aldolase (DERA) aus *E. coli* bzw. eine Lipase aus *Rhizopus oryzae* gegen die Inaktivierung durch Aldehyde zu stabilisieren. Die identifizierten stabilisierten Varianten enthielten jedoch in der Regel mehrere Punktmutationen bzw. Mutationen, die zum Austausch von anderen Aminosäureresten als Lysin führen^{218,219}.

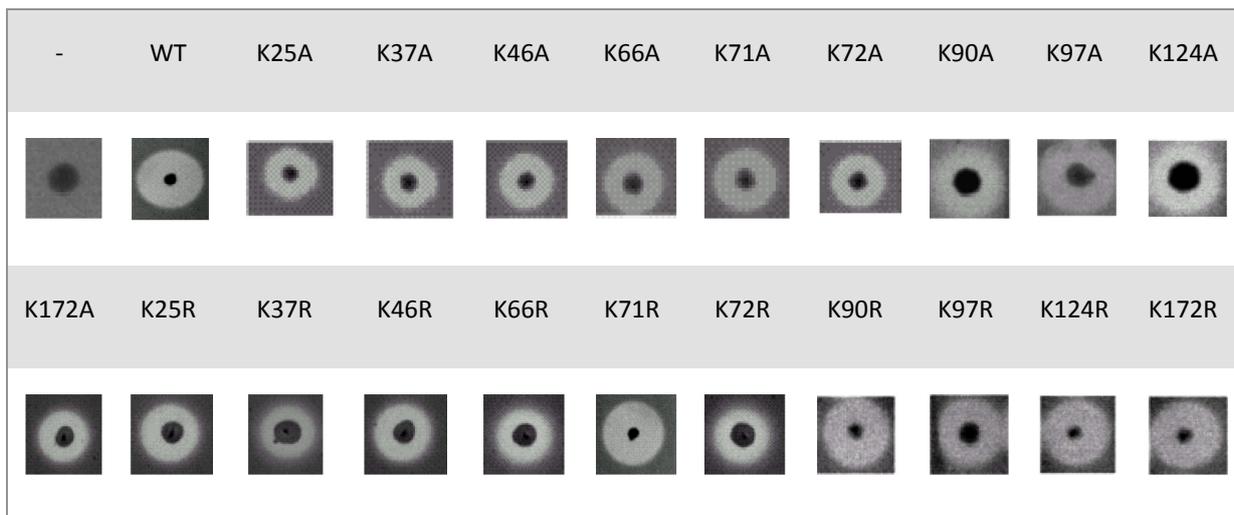


Abbildung 4.3 Tributyrinplattentest der BSL-B Punktmutanten an allen Lysinresten

Die geringen Unterschiede im Verhältnis der Hydrolysehofdurchmesser zur Koloniegröße können aus mutationsbedingten Expressions- und Wachstumsunterschieden resultieren. So kann z.B. eine Mutation, die zwar keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität hat, die Expressionsrate des jeweiligen Gens zum Teil stark vermindern. Eine Verminderung der Überexpression eines heterologen Gens hat jedoch häufig eine Steigerung des Wachstums zur Folge, was im Ergebnis dazu führen kann, dass zwei unterschiedlich große Kolonien gleiche Enzymmengen bzw. -aktivitäten aufweisen und somit gleich große Hydrolysehöfe bilden²²⁰⁻²²³.

Demzufolge muss die Acetaldehyd-induzierte Inaktivierung entweder auf die Modifikation von mehreren Lysinresten oder anderer Aminosäurereste im Protein zurückgeführt werden. Abgesehen von spezifischen kovalenten Wechselwirkungen sind aber auch unspezifische Effekte denkbar. So könnte Acetaldehyd als nichtkompetitiver Inhibitor oder als denaturierendes Reagenz, das durch Aggregation und Präzipitation die Lipase inaktiviert, wirken.

4.3 Die Acetaldehyd-induzierte Inaktivierung von BSL-B beruht nicht auf der Aggregation/Präzipitation des Enzyms

Um die Wirkungsweise des Acetaldehyds im Inaktivierungsverlauf mikrobieller Lipasen (nichtkompetitiver Inhibitor oder denaturierendes Reagenz) aufklären zu können, wurden BSL-B-Proben mit steigenden Acetaldehydkonzentrationen inkubiert und vor bzw. nach der Inkubation sowohl die hydrolytischen Aktivitäten (3.9.2) als auch die Konzentrationen des löslichen Proteins (3.5) bestimmt (Abbildung 4.4). Es muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass diese und sämtliche nachfolgenden Untersuchungen in wässrigen Puffern durchgeführt wurden, da nur unter diesen Bedingungen eine, für die anschließende Analytik unabdingbare, möglichst homogene Modifikation der Lipasemoleküle gewährleistet werden konnte.

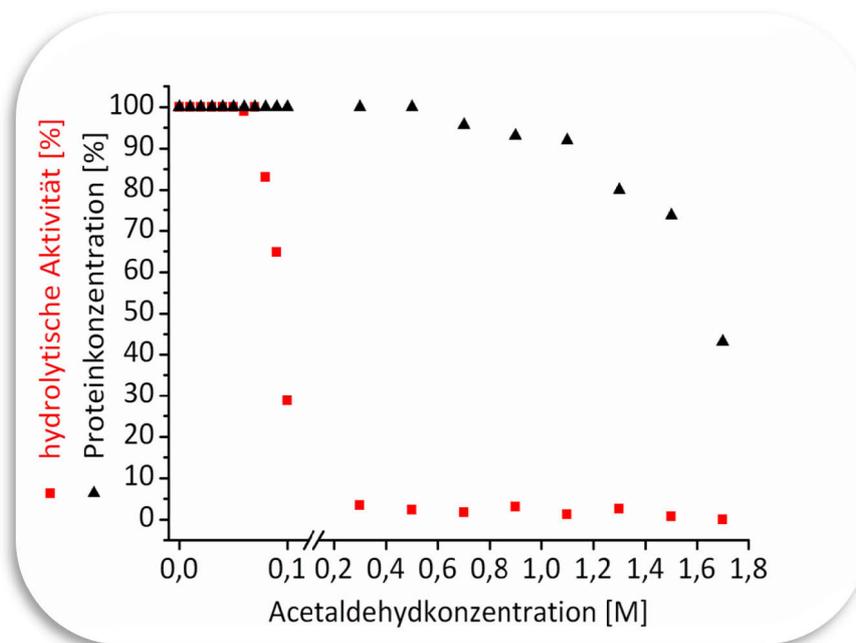


Abbildung 4.4 Acetaldehyd-induzierte Aggregation und Inaktivierung der BSL-B unter wässrigen Bedingungen. Die hydrolytische Aktivität (pNPP-Assay, 3.9.2) und Proteinkonzentrationen (Bradford-Assay, 3.5) wurden sowohl vor als auch nach der 24 h-Inkubation mit Acetaldehyd bestimmt und hieraus die prozentualen Restaktivitäten bzw. -konzentrationen bestimmt.

Die graphische Auftragung der relativen Aktivitäten und Proteinkonzentrationen (Abbildung 4.4) zeigt, dass es zu einer vollständigen Inaktivierung der BSL-B kommt, bevor erste Präzipitationen des Enzyms auftreten. BSL-B ist ab einer Acetaldehydkonzentration von 0,3

M vollständig inaktiviert, wohingegen die Proteinkonzentration erst ab einer Acetaldehydkonzentration von 1,3 M deutlich abfällt. Im Falle der Wirkung des Acetaldehyds als denaturierendes bzw. präzipitierendes Reagenz, wäre eine direkt proportionale Verminderung der Aktivität und löslichen Proteinkonzentration zu erwarten gewesen. Folglich weist dieses Verhalten darauf hin, dass die Acetaldehyd-induzierte Inaktivierung von Lipasen auf einem nicht-kompetitiven Inhibitionsmechanismus basiert. In diesem Kontext wurde im Folgenden der Umfang der Acetaldehyd-induzierten Modifikationen näher analysiert.

4.4 Acetaldehyd induziert eine Verschiebung des isoelektrischen Punkts und die Bildung intermolekularer *cross-links*

Proteine können aufgrund ihres relativen Gehalts an sauren (C-Terminus, Aspartat, Glutamat) und basischen (N-Terminus, Arginin, Histidin, Lysin) Resten elektrophoretisch getrennt werden (isoelektrische Fokussierung, 3.12.2). Der isoelektrische Punkt (pI) eines Proteins ist derjenige pH-Wert, bei dem seine Nettoladung und elektrophoretische Beweglichkeit ebenfalls gleich Null sind. Da die Lysinreste nach der Schiffbasenmodifikation ihren basischen Charakter verlieren, sollte sich der pI der BSL-B nach Acetaldehydinkubation zu einem niedrigeren pH hin verschieben. Je nachdem, wieviele Lysinreste modifiziert werden, sollte eine stärkere oder schwächere Verschiebung zu beobachten sein und demzufolge der Umfang der Acetaldehyd-induzierten Modifikationen abgeschätzt werden können. Die isoelektrische Fokussierung wurde unter nicht-denaturierenden Bedingungen mit einer unmodifizierten und einer mit 0,5 M Acetaldehyd modifizierten BSL-B-Probe durchgeführt.

Für diese Analyse wurde eine Acetaldehydkonzentration von 0,5 M gewählt, da dies die höchste Konzentration ist, bei der die BSL-B nach 24 h vollständig inaktiviert vorlag, jedoch unter den gewählten Bedingungen noch keine Präzipitation zu beobachten war (Abbildung 4.4). Der Vergleich der isoelektrischen Punkte der unmodifizierten und modifizierten BSL-B ergab, dass sich der pI durch die Inkubation mit Acetaldehyd um ca. 3,5 pH-Einheiten von ca. pH 9,5 auf ca. pH 6 verschiebt (Abbildung 4.5). Der berechnete pI-Wert der hier verwendeten Variante (BSL-B_{his}, Tabelle 4.1) stimmt präzise mit dem, in der isoelektrische Fokussierung gemessenen pI, der unmodifizierten BSL-B (Abbildung 4.5) überein. Die Berechnung des pI einer BSL-B_{his}-Variante, in der sämtliche Lysinreste *in silico* durch Glycine

substituiert wurden, ergab, dass dieser Austausch den pI von pH 9,475 auf pH 6,135 verschiebt. Da diese „Neutralisierung“ sämtlicher ϵ -Aminogruppen einen vergleichbaren Effekt auf den pI haben sollte, wie die Modifikation sämtlicher Lysinreste mit Acetaldehyd, wird anhand der Ergebnisse der isoelektrischen Fokussierung der modifizierten BSL-B deutlich, dass nahezu alle 10 ϵ -Aminogruppen modifiziert wurden. Das Vorliegen mehrerer Banden weist jedoch darauf hin, dass nach der Inkubation mit Acetaldehyd nicht eine homogen modifizierte, sondern mehrere unterschiedlich umfangreich modifizierte BSL-B Spezies generiert werden. Da aber die pI-Werte alle im Bereich von pH 6 liegen, ist zum einen davon auszugehen, dass sämtliche Spezies sehr umfangreich modifiziert sind und sich zum anderen untereinander vermutlich nur durch die Modifikation einzelner Lysinreste unterscheiden.

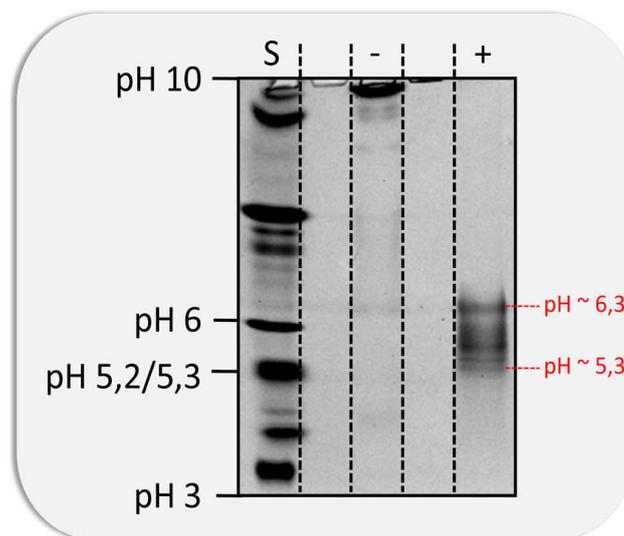


Abbildung 4.5 IEF der BSL-B nach der Inkubation für 24 h bei 37 °C mit (+) bzw. ohne (-) 500 mM Acetaldehyd.

Tabelle 4.1 pI-Werte verschiedener BSL-B-Varianten

Lipasevariante	Eigenschaften	pI	Referenz
BSL-B _{nativ}	Native BSL-B mit Signalsequenz	9,677	Subtilist-Datenbank (http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/)
BSL-B _{his}	Keine Signalsequenz, N-terminaler His ₁₀ -tag	9,475 (berechnet)	EMBL-pI-wrapper (http://www.embl.de/cgi/pi-wrapper.pl)
BSL-B _{his} K→G	BSL-B _{his} in der sämtliche Lysine gegen Glycin substituiert wurden	6,135 (berechnet)	EMBL-pI-wrapper (http://www.embl.de/cgi/pi-wrapper.pl)

Trotz dieses eindeutigen Nachweises der Modifikation basischer Aminosäurereste durch Acetaldehyd war jedoch weiterhin fraglich, ob es sich bei diesen Modifikationen um Schiffbasen oder um solche handelt, die lediglich durch Schiffbasenbildung initiiert werden. Wie bereits zuvor erwähnt, konnte bis heute keine direkte Korrelation zwischen der Schiffbasenbildung und der Aktivitätsabnahme mikrobieller Lipasen nachgewiesen werden. Darüberhinaus sind Schiffbasen sehr instabile Verbindungen, die leicht hydrolysieren. Die Analyse Formaldehyd-induzierter Modifikationen in Modellpeptiden und Insulin ergab in diesem Zusammenhang, dass Schiffbasen-modifizierte Lysinreste stabile intra- und intermolekulare *cross-links* mit Arginin, Asparagin, Glutamin, Histidin, Tryptophan und Tyrosin bilden können^{224,225}. Die Bildung intra- und intermolekularer *cross-links* würde ebenfalls zum einen die Verschiebung des pI induzieren und zum anderen die inaktivierende Wirkung von Acetaldehyd erklären. Die *cross-link*-induzierte „Neutralisierung“ weiterer basischer Aminosäurereste (Arginin und Histidin) würde darüberhinaus erklären, warum einige Acetaldehyd-modifizierte Spezies von BSL-B einen pI < pH 6 aufweisen.

Um die mögliche Bildung intermolekularer *cross-links* nachzuweisen, wurden BSL-B Proben mit Acetaldehydkonzentrationen zwischen 0 und 0,5 M inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE nach ihrer molekularen Masse getrennt (Abbildung 4.6).

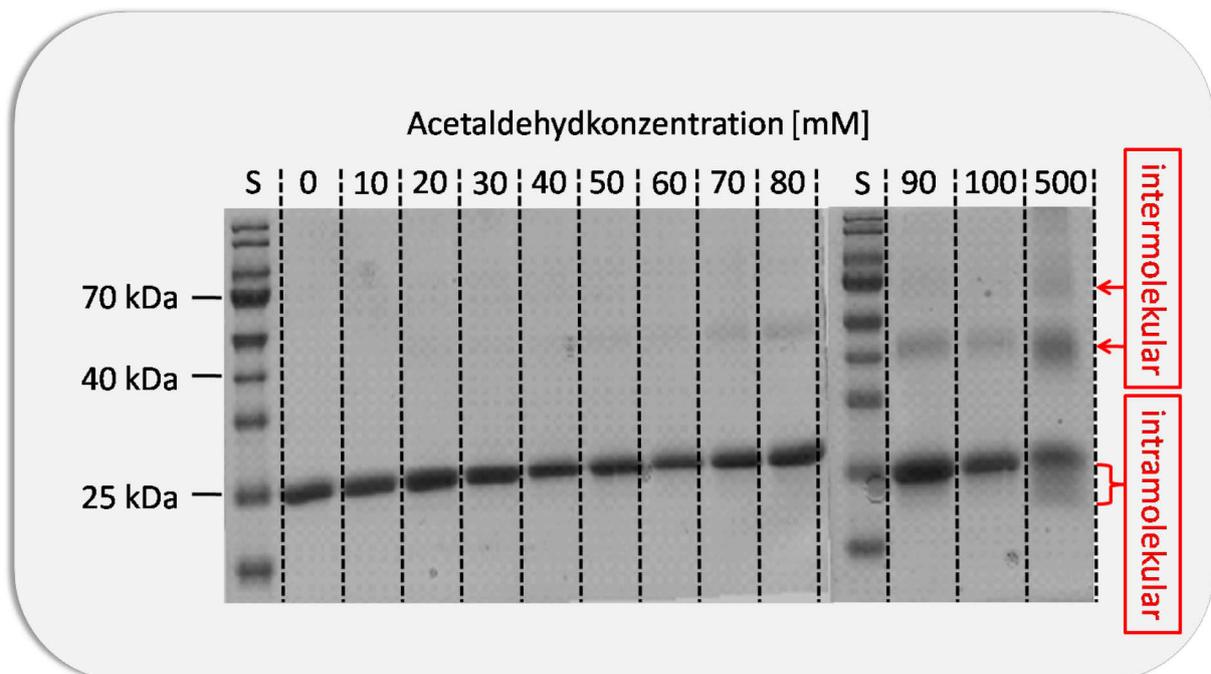


Abbildung 4.6 SDS-PAGE der BSL-B nach der Inkubation mit steigenden Acetaldehydkonzentrationen (0 – 500 mM) für 24 h bei 37 °C.

Die Bildung zusätzlicher Proteinbanden mit der zwei- bzw. dreifachen Molekülmasse der monomeren BSL-B weist eindeutig auf die Fähigkeit des Acetaldehyds hin, intermolekulare *cross-links* zu generieren. In diesem Zusammenhang fällt besonders auf, dass die ersten eindeutig detektierbaren Dimere bei einer Acetaldehydkonzentration von ca. 80 mM auftreten (Abbildung 4.6). Da in diesem Konzentrationsbereich ebenfalls erste Aktivitätseinbußen gemessen wurden (Abbildung 4.4), muss das Acetaldehyd-induzierte *cross-linking* zumindest als ein inaktivierender Faktor in Betracht gezogen werden. Neben der Bildung höhermolekularer Produkte fällt darüberhinaus auf, dass sich (1) die elektrophoretische Mobilität des BSL-B Monomers mit steigender Acetaldehydkonzentration vermindert (Verschiebung der Monomerbande zu höheren Molekularmassen), und (2) bei 500 mM Acetaldehyd Lipasespezies gebildet werden, die elektrophoretisch scheinbar eine kleinere Masse besitzen als das BSL-B Monomer (Einfärbung der Gels unterhalb der BSL-B Monomerbande). Die verminderte elektrophoretische Mobilität der monomeren BSL-B kann auf die Acetaldehyd-induzierte Veränderung des isoelektrischen Punkts (Abbildung 4.5) zurückgeführt werden. Die direkte Korrelation des pI eines Proteins mit dessen elektrophoretischer Mobilität wurde u.a. anhand des stark sauren Proteins Gir2 ($pI \sim 3$) aus der Bier- und Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt. In einer konventionellen SDS-PAGE-Analyse bildete Gir2 (reale Masse 34,4 kDa) eine Proteinbande an einer Position, die einer molekularen Masse von 63 kDa entsprach²²⁶. Durch die anschließende Modifikation von Gir2 mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid, die eine Neutralisierung der sauren Aminosäurereste und damit eine Erhöhung des pI zur Folge hat, konnte die elektrophoretische Mobilität des Protein so weit gesteigert werden, dass es auch gelelektrophoretisch die reale Masse von 34,4 kDa aufwies²²⁶. Die verminderte apparente Masse wird in diesem Zusammenhang darauf zurückgeführt, dass mit steigendem pI die Menge an gebundenem SDS steigt, und hierdurch die elektrophoretische Mobilität erhöht wird²²⁷. Demzufolge kann im Umkehrschluss die Acetaldehyd-induzierte Verminderung des pI von BSL-B (Abbildung 4.5) zu einer sinkenden SDS-Bindung führen, die ihrerseits eine verminderte elektrophoretische Mobilität bzw. eine Erhöhung der apparenten Masse (Abbildung 4.6) nach sich zieht.

Die Bildung modifizierter Lipase mit einer geringeren apparenten Molekülmasse als das BSL-B Monomer kann durch die Knüpfung intramolekularer *cross-links* erklärt werden. Die Bildung intramolekularer *cross-links* kann dazu führen, dass Proteine nach der Denaturierung

durch SDS eine kompaktere dreidimensionale Struktur aufweisen als solche, die keine intramolekularen Verknüpfungen aufweisen. Dies kann bewirken, dass die elektrophoretische Mobilität erhöht wird und die apparente Masse des Proteins im Rahmen einer SDS-PAGE-Analyse sinkt²²⁸.

Zusammenfassend belegen demzufolge die gelelektrophoretischen Analysen unmodifizierter und modifizierter BSL-B-Probe, dass Acetaldehyd (1) basische Aminosäurereste modifizieren und (2) die Bildung inter- und intramolekulare *cross-links* induzieren kann. Fraglich ist jedoch, welcher dieser Effekte dominiert und maßgeblich für die Inaktivierung ist.

4.5 Die Inaktivierungsgeschwindigkeit von BSL-B ist abhängig von der Enzymkonzentration

Zur näheren Untersuchung des Inaktivierungsmechanismus wurden nun Inaktivierungsexperimente mit konstanter Acetaldehydkonzentration und variiierter Enzymkonzentration durchgeführt. Da die Bildung intermolekularer *cross-links*, im Gegensatz zur Modifizierung von basischen Resten an der Proteinoberfläche, eine bimolekulare Reaktion ist, sollte sich eine Abhängigkeit des Inaktivierungsverhaltens von der Proteinkonzentration zeigen.

BSL-B-Proben mit Konzentrationen zwischen 25 und 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ wurden jeweils in Gegenwart eines hohen molaren Überschusses an Acetaldehyd (500 mM) inkubiert und anschließend die spezifische hydrolytische Aktivität bestimmt. Unter diesen Bedingungen lag der Acetaldehyd in einem mindestens 2000-fachen molaren Überschuss im Vergleich zur BSL-B vor. Aufgrund dieses hohen molaren Überschusses muss davon ausgegangen werden, dass jedes einzelne Enzymmolekül, unabhängig von der Lipasekonzentration der Probe, homogen modifiziert wird. Im Falle der Modifikation jedes einzelnen Lipasemoleküls als dominierender Faktor der Acetaldehydinaktivierung, würden sämtliche BSL-B Proben demzufolge eine um den gleichen Betrag verminderte, spezifische Aktivität aufweisen (Abbildung 4.7 a).

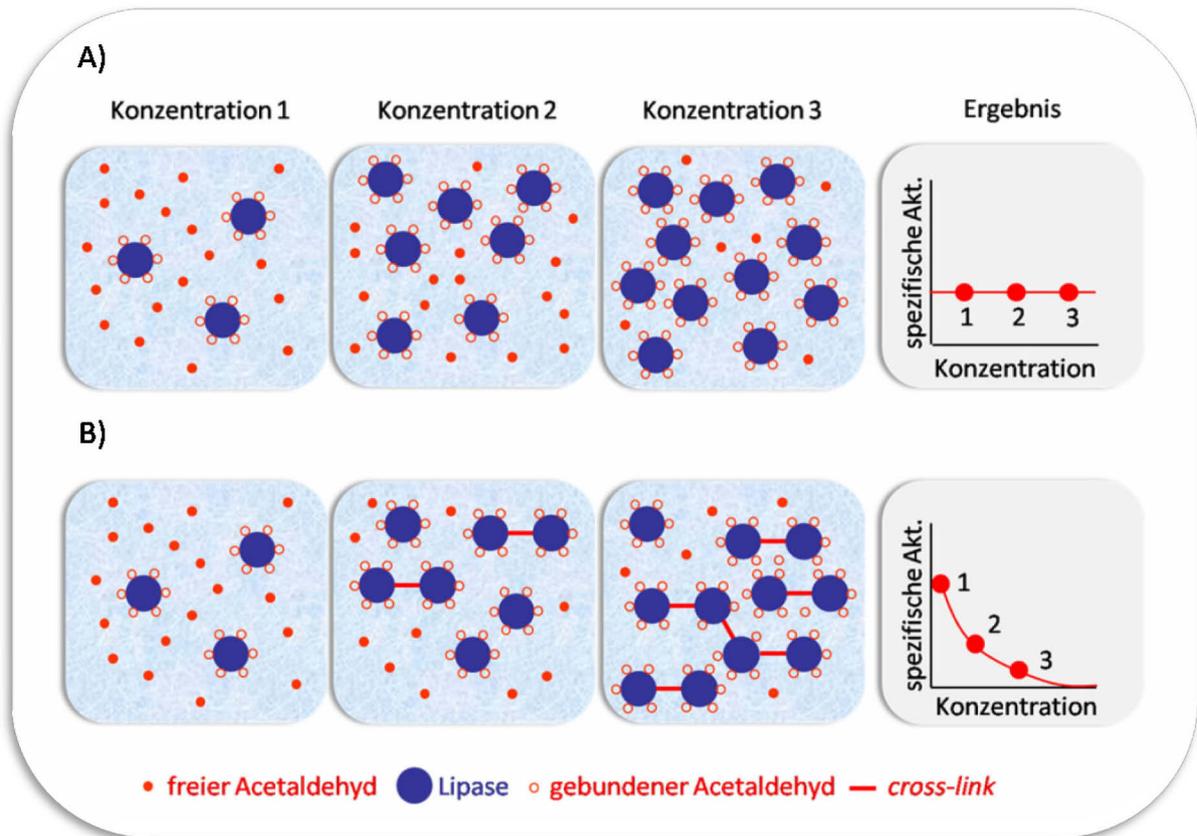


Abbildung 4.7 Acetaldehyd-induzierte Lipaseinaktivierung in Abhängigkeit der Enzymkonzentration und verschiedener dominierender Inaktivierungsmechanismen. A) Bei der Enzyminaktivierung durch Modifikation jedes einzelnen Lipasemoleküls würde, nach der Inkubation verschieden konzentrierter Lipaselösungen in Gegenwart eines hohen molaren Überschusses an Acetaldehyd, in sämtlichen Proben gleiche, um den selben Betrag verminderte, spezifische Aktivitäten gemessen werden. B) Im Falle der Enzyminaktivierung durch intermolekulares *cross-linking* würde, nach der Inkubation verschieden konzentrierter Lipaselösungen in Gegenwart eines hohen molaren Überschusses an Acetaldehyd, mit steigender Lipasekonzentration sinkende spezifische Aktivität gemessen werden.

Im Gegensatz dazu, würde die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens zweier Lipasen mit steigender Lipasekonzentration erhöht werden. Da das Zusammentreffen zweier Lipasemoleküle die Voraussetzung für die Bildung eines intermolekularen *cross-links* darstellt, würde demzufolge, im Falle der intermolekularen *cross-link*-Bildung als dominierender inaktivierender Faktor, die spezifische Aktivität mit steigender Proteinkonzentration sinken (Abbildung 4.7 b). Es ist jedoch davon auszugehen, dass lediglich bis zum Erreichen einer bestimmten Schwellenkonzentration ein linearer Zusammenhang zwischen der Inaktivierungsgeschwindigkeit und der Proteinkonzentration zu beobachten ist. Oberhalb dieser Schwellenkonzentration sollte die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens und somit die Inaktivierung annähernd gleich groß und unabhängig von der Proteinkonzentration sein (Abbildung 4.7 b, asymptotischer Verlauf des Graphen).

Die Messung der proteinkonzentrationsabhängigen Inaktivierung der Lipase zeigte jedoch ein vollkommen unerwartetes Verhalten der BSL-B (Abbildung 4.8). In einem Konzentrationsbereich zwischen 100 und 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ der Lipase konnten, nach zweistündiger Inkubation mit 500 mM Acetaldehyd, keine bzw. nur geringe ($\leq 10\%$) Aktivitätsverminderungen gemessen werden. Demgegenüber, besteht in dem Konzentrationsbereich zwischen 25 und 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ein direkter linearer Zusammenhang zwischen BSL-B-Konzentration und hydrolytischer Restaktivität. In diesem Bereich steigt die hydrolytische Restaktivität mit steigender Lipasekonzentration linear an. Die Schwellenkonzentration für den Übergang zwischen dem konzentrationsabhängigen und konzentrationsunabhängigen Inaktivierungsbereich liegt hierbei bei fast genau 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Abbildung 4.8). Aufgrund dieses Verhaltens konnte daher weder die Modifikation jedes einzelnen Lipasemoleküls noch die Bildung intermolekularer *cross-links* als dominierender Inaktivierungsfaktor identifiziert werden. Jedoch zeigt diese Messung, dass das Ausmaß der Inaktivierung bzw. die Inaktivierungsgeschwindigkeit neben der Acetaldehydkonzentration auch durch die Konzentration der Lipase beeinflusst wird.

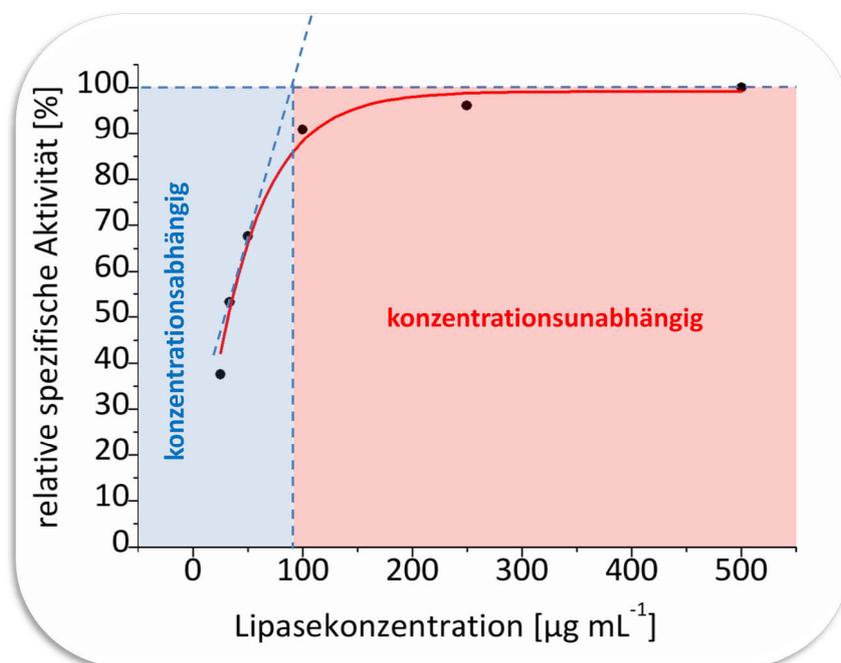


Abbildung 4.8 Hydrolytische Restaktivität von BSL-B-Proben verschiedener Konzentration (25–500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) nach zweistündiger Inkubation mit 500 mM Acetaldehyd.

Dieses ungewöhnliche Verhalten der BSL-B kann jedoch durch das, für verschiedene Lipasen bereits beschriebene Phänomen der Assoziation zu höhermolekularen Strukturen in Lösung

erklärt werden. Die spontane Bildung löslicher und aktiver Aggregate wurde u.a. bei der Lipase aus *Candida rugosa*²²⁹, *Pseudomonas fluorescens*²³⁰, *Pseudomonas aeruginosa*²³¹, *Staphylococcus aureus*²³² auch bei der Lipase A aus *Bacillus subtilis* (BSL-A) beobachtet²³³, die der BSL-B mit 74 % identischen Aminosäuren sehr ähnlich ist. Die Aggregation der BSL-B könnte zu einer „Maskierung“ modifizierbarer Aminosäurereste und dies zu einer Stabilisierung des Enzyms gegen Acetaldehyd führen. Somit könnte, im Falle einer von der Proteinkonzentration abhängigen, unterschiedlichen Aggregationsgeschwindigkeit der BSL-B, das in Abbildung 4.8 dargestellte Inaktivierungsverhalten erklärt werden. Da jedoch weder der Nachweis für die Aggregationsneigung, noch der Nachweis für die Abhängigkeit der Aggregationsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration für BSL-B experimentell erbracht worden ist, wurde im Folgenden das Aggregationsverhalten der BSL-B in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration und der Zeit untersucht. Hierzu wurden BSL-B-Proben mit Konzentrationen von 100, 250 und 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bei 37 °C inkubiert und in regelmäßigen Abständen die hydrodynamische Radien der Proteinpartikel mittel dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt (Tabelle 4.2). Proben mit einer niedrigeren Konzentration als 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, wie sie im zuvor durchgeführten Experiment verwendet wurden, konnten aufgrund der Nachweisgrenze der DLS-Apparatur von 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nicht analysiert werden.

Das Aggregationsverhalten eines Proteins kann anhand zweier Messwerte beurteilt werden: Hydrodynamischer Radius und Polydispersität. Die Zunahme des hydrodynamischen Radius zeigt eindeutig die Aggregation einer Proteinprobe an. In diesem Zusammenhang muss jedoch immer der prozentuale Massenanteil der jeweiligen Partikelpopulation beachtet werden. Der prozentuale Massenanteil gibt an, welchen prozentualen Anteil eine Partikelpopulation mit einem bestimmten hydrodynamischen Radius an der Gesamtmasse der gemessenen Proteinpartikel ausmacht. So liegen z.B. in der 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Probe (Tabelle 4.2), nach 24 stündiger Inkubation bei 37 °C, 74,3 % des gesamten Proteins als Aggregate mit einem hydrodynamischen Radius von 20,2 nm vor. Die Polydispersität hingegen ist ein Maß für die Homogenität einer Partikelpopulation mit einem bestimmten hydrodynamischen Radius. Hierbei wird zwischen einer monodispersen und polydispersen Population unterschieden. Monodisperse Populationen (Polydispersität ≤ 20 %) mit einem hydrodynamischen Radius x zeichnen sich dadurch aus, dass annähernd sämtliche Partikel dieser Population exakt einen hydrodynamischen Radius von x besitzen. Eine polydisperse Population (Polydispersität > 20 %) hingegen, ist ein eher heterogenes Partikelensemble,

deren hydrodynamische Radien lediglich im Bereich des gemessenen Radius x liegen und sich voneinander unterscheiden. Dabei gilt, dass je höher die Polydispersität ist, desto heterogener ist die jeweilige Partikelpopulation bzw. desto mehr unterscheiden sich die hydrodynamischen Radien der Partikel innerhalb dieser Population. Somit zeichnen sich aggregierende Proteinproben in der Regel durch ansteigende hydrodynamische Radien und Polydispersitäten aus, wobei jedoch langsam aggregierende Proben häufig zunächst lediglich ansteigende Polydispersitäten und erst später vergrößerte Radien aufweisen.

Tabelle 4.2 Ergebnisse der DLS-Messungen mit BSL-B-Proben verschiedener Konzentration (100-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

ZEIT T [H]	Hydrodynamischer Radius [nm]			Massenanteil [%]			Polydispersität [%]		
	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$			250 $\mu\text{g mL}^{-1}$			500 $\mu\text{g mL}^{-1}$		
0	3,7	100	16,1	3,4	100	17,5	3,7	100	26,3
1	3,8	100	18,8	4,2	100	25,1	6,2	100	28,0
2	3,9	100	24,8	4,3	100	32,0	6,9	100	36,0
3	3,7	97	28,4	4,5	100	41,1	7,1	100	37,8
	9,9	3	30,3						
4	3,0	98	15,8	3,8	100	33,1	6,6	100	33,7
	16,5	1,9	36,2						
5	3,9	100	35,2	6,1	100	44,1	9,3	100	36,8
6	3,8	96,2	29,6	3,0	83,7	16,5	11,3	100	37,7
	9,2	3,2	17,7	12,3	16,1	39,6			
24	4,4	97,4	13,1	22,8	100	67,7	20,2	74,3	44,4
	28,7	2,5	46,5				374,9	2,1	74,5
							9356	23,6	71,4

Aus dem Vergleich, der in Tabelle 4.2 aufgeführten hydrodynamischen Radien, ist eindeutig ersichtlich, dass (1) BSL-B höhermolekulare Aggregate bildet, (2) die Aggregationsgeschwindigkeit mit steigender Proteinkonzentration wächst und (3) die Aggregatgröße mit der Inkubationszeit zunimmt. Im Falle der 250 und 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ -Proben ist die Aggregatbildung sowohl anhand steigender hydrodynamischer Radien als auch ansteigender Polydispersitäten zu beobachten. Der Anstieg der hydrodynamischen Radien verläuft bei einer Lipasekonzentration von 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ langsamer als bei einer Konzentration von 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Die Aggregatbildung der 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ -Probe hingegen, kann in den ersten Stunden lediglich anhand steigender Polydispersitäten und erst nach 24 h anhand vergrößerter hydrodynamischer Radien beobachtet werden.

Es fällt jedoch auf, dass die zum Teil großen Unterschiede im absoluten Aggregationsverhalten nicht mit den relativ geringen Stabilitätsunterschieden der drei Proben (Abbildung 4.8) gegenüber Acetaldehyd korrespondieren. Vergleicht man aber das Aggregationsverhalten der Proben während der ersten zwei Stunden – entsprechend der Inkubationszeit der zuvor durchgeführten Stabilitätsuntersuchung –, so kann das Lipasekonzentrations-abhängige Stabilitätsverhalten wie folgt erklärt werden. Die Radienzunahme der 250 und 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Proben innerhalb der ersten 2 h deutet auf mindestens eine Verdoppelung der molekularen Masse der Proteinpartikel hin. Diese Bildung von mindestens bimolekularen Aggregaten kann zum einen zu einer partiellen Maskierung modifizierbarer Aminosäurereste führen. Zum anderen kann die Aggregation zu bi- bzw. höhermolekularen Strukturen zur Stabilisierung der Lipase führen^{230,234}. Somit kann homogene Aggregation und die damit einhergehende partielle Maskierung modifizierbarer Aminosäurereste, die vergleichbaren Stabilitäten dieser beiden Proben während der ersten 2 h in Gegenwart von Acetaldehyd erklären. Im Falle der 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ -Probe hingegen, die eine leicht verminderte Stabilität aufweist, ist zwar anhand der hydrodynamischen Radien keine so deutliche Massenzunahme zu erkennen, jedoch übersteigt diese Probe innerhalb der ersten 2 h den Polydispersitätsschwellenwert von 20 % (Tabelle 4.2). Diese ansteigende Polydispersität ist ein eindeutiges Indiz dafür, dass auch in dieser Probe während der ersten 2 h Aggregate entstehen. Diese Aggregatbildung, bei der mindestens bimolekulare Strukturen entstehen müssen, verläuft jedoch wesentlich heterogener als in den beiden höherkonzentrierten Proben. Somit kann aufgrund der Bildung mindestens bimolekularer Lipaseaggregate die Stabilität der 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ -Probe während der ersten 2 h in Gegenwart

von 500 mM Acetaldehyd erklärt werden. Dieses, in Bezug auf die Stabilisierung, eher grenzwertige Aggregationsverhalten, kann daher rühren, dass $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ die Schwellenkonzentration für den Übergang zwischen dem Lipasekonzentrations-abhängigen und Lipasekonzentrations-unabhängigen Bereich (Abbildung 4.8) darstellt.

Durch Extrapolation des konzentrationsabhängigen Aggregationsverhaltens ist davon auszugehen, dass die Proben mit Lipasekonzentrationen zwischen 25 und $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ annähernd oder gar keine Veränderungen der hydrodynamischen Radien und, mit sinkender Lipasekonzentration, immer langsamer steigende Polydispersitäten zeigen würden. Zusammenfassend kann somit die Schlussfolgerung gezogen werden, dass eine schnelle Aggregation der BSL-B zu einer Stabilisierung des Enzyms gegen Acetaldehyd führt.

Dieser stabilisierende Effekt beruht jedoch lediglich auf einer Verlangsamung der Inaktivierung der Lipase. Nach 24 stündiger Inkubation einer BSL-B-Probe mit einer Konzentration von $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ in Gegenwart von 500 mM Acetaldehyd, kommt es ebenfalls zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms (Abbildung 4.4). Dieses, auf den ersten Blick widersprüchliche, Verhalten kann jedoch auf die Natur des Aggregationsprozesses zurückgeführt werden. Die Aggregation nativer Proteine ist kein statischer Prozess, bei dem die Massenzunahme der Aggregate lediglich durch ständige Anlagerung weiterer Moleküle bestimmt wird. Vielmehr handelt es sich hierbei um einen hochdynamischen Prozess, der von fortwährenden Dissoziations- und Assoziationsreaktionen geprägt ist ²³⁵. Die Geschwindigkeit der Massenzunahme ist dabei abhängig von dem Verhältnis der Assoziations- zu Dissoziationsgeschwindigkeiten ²³⁵. Diese Dynamik der Aggregation äußert sich u.a. in fluktuierenden hydrodynamischen Radien und Polydispersitäten (Tabelle 4.2). Verfolgt man diese Messwerte über die gesamte Inkubationszeit hinweg, so kommt es zwischenzeitlich immer wieder zu einer Abnahme der hydrodynamischen Radien bzw. Polydispersitäten (Tabelle 4.2). Demzufolge, kann eine schnelle Aggregation der BSL-B in den ersten Stunden zwar zu einer Stabilisierung der Lipase gegen Acetaldehyd führen, jedoch ermöglicht die ständige Dissoziation einzelne Lipasemoleküle bzw. Aggregatteile mit der Zeit eine vollständige Modifikation und Inaktivierung des Enzyms.

4.6 Acetaldehyd bildet unter wässrigen und nicht-wässrigen Bedingungen farbige, Protein-gebundene Verbindungen

Sämtliche Inaktivierungsversuche, die sowohl unter nicht-wässrigen als auch wässrigen Bedingungen durchgeführt wurden, führten zu einer rötlich bis braunen Verfärbung der Lipaselyophilisate bzw. der Enzymlösungen (Abbildung 4.9). Diese Verfärbung deutet auf die Bildung von Verbindungen mit konjugierten π -Elektronensystemen hin, die mit zunehmender Länge immer tiefer gefärbt erscheinen. Solche Verbindungen könnten ggf. im Gegensatz zu Acetaldehyd die Bildung stabiler Modifikationen an der Proteinoberfläche induzieren.

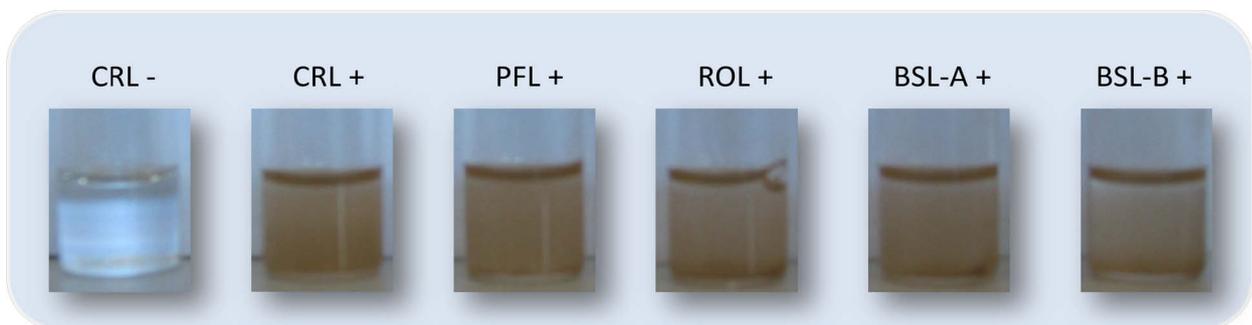


Abbildung 4.9 Verfärbung der Enzymlyophilisate aus *C. rugosa* (Sigma Typ VII, CRL), *P. fluorescens* (Amano AK, PFL), *R. oryzae* (Amano F-AP15, ROL), BSL-A und BSL-B nach Inkubation mit 500 mM Acetaldehyd in Toluol. Mit + sind die Proben gekennzeichnet, die mit Acetaldehyd inkubiert wurden. Zu Vergleichszwecken ist die *C. rugosa* Lipase ohne zugesetztem Acetaldehyd (CRL-) abgebildet.

Aufgrund dieses immer wiederkehrenden Phänomens ergaben sich folgende Fragestellungen: (1) Welche Versuchsparameter führen zur Bildung dieser farbigen Verbindungen? (2) Stellen diese Verbindungen lediglich Nebenprodukte dar, oder können diese mit dem Protein interagieren und somit möglicherweise eine Inaktivierung der Lipasen hervorrufen? (3) Worum handelt es sich bei diesen Verbindungen?

Die detaillierte Analyse der Bildung und Bindungsfähigkeit dieser Produkte erfolgte durch die Inkubation unterschiedlich zusammengesetzter Versuchsansätze (3.8.5) in Gegenwart von 500 mM Acetaldehyd. Im Rahmen dieser systematischen Analyse wurden zunächst die Versuchsbedingungen, die zur Bildung der farbigen Verbindungen führen, näher untersucht. Hierzu wurden die Komponenten des, in den meisten Inaktivierungsversuchen verwendeten, Glycin/NaOH-Puffers (3.6.2) sowohl einzeln als auch kombiniert in Gegenwart von 500 mM Acetaldehyd inkubiert (Tabelle 4.3, obere Zeile). Die Inkubation von Acetaldehyd mit NaOH und/oder Glycin führte zur Bildung von gelb bis rotbraun gefärbte Produkte. In einem

zweiten Schritt wurde anschließend der Einfluss eines Proteins auf die Bildung farbiger Produkte analysiert. Zu diesem Zweck wurde jedem Ansatz nun Rinderserumalbumin (BSA) in einer Konzentration von 1 mg mL^{-1} zugesetzt. Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde auf ein hochreines BSA-Lyophilisat [Sigma] zurückgegriffen, um den Eintrag an Verunreinigungen (Puffersalze, Additive, zusätzliche Proteine usw.) möglichst gering zu halten und somit den alleinigen Einfluss eines Proteins auf die Produktbildung zu untersuchen. Diese Analyse (Tabelle 4.3, mittlere Zeile) ergab, dass bereits die Inkubation von BSA mit Acetaldehyd zur Bildung einer orangefarbenen Verbindung führt und sich die Farbigkeit der Lösung durch Zusatz einzelner bzw. beider Glycin/NaOH-Pufferkomponenten über rot nach braun-schwarz hin verschiebt. Analog zu der ersten Versuchsreihe scheint auch hier die Farbverschiebung in der Reihenfolge $\text{NaOH} < \text{Glycin} < \text{Glycin/NaOH}$ zuzunehmen. Daher kann, in Bezug auf die Versuchsbedingungen, unter denen diese farbigen Verbindungen entstehen, die Schlussfolgerungen gezogen werden, dass (1) Acetaldehyd nur in Gegenwart von NaOH, Glycin oder eines Proteins zur Bildung des farbigen Produkts befähigt ist, und (2) die Kombination der einzelnen Komponenten (NaOH, Glycin, Protein) zu einer Verschiebung des Farbe über rot nach braun bis schwarz führt.

Tabelle 4.3 Einfluss verschiedener Komponenten auf die Bildung farbiger Verbindungen und Test der Bindungsfähigkeit dieser Verbindungen an BSA

Lösungsmittel/ Protein	-Acetaldehyd	+Acetaldehyd	+Acetaldehyd +NaOH	+Acetaldehyd +Glycin	+Acetaldehyd +NaOH +Glycin
H ₂ O					
BSA in H ₂ O					
BSA in H ₂ O nach TCA- Fällung					

Die Bindungsfähigkeit der farbigen Reaktionsprodukte an Proteine wurde durch TCA-Fällung (3.11) der BSA-haltigen Ansätze und anschließendes Waschen der Proteinpellets untersucht (Tabelle 4.3, untere Zeile). Die starke Verfärbung der Proteinpellets weist hierbei eindeutig auf eine stabile Verbindung der farbigen Reaktionsprodukte mit dem Protein hin. Da jedoch die, zwischen Acetaldehyd und primären Aminogruppen, postulierte Bildung von Schiffbasen zum einen durch die TCA-Fällung hydrolysiert worden wären und zum anderen die gebildeten Schiffbasen, aufgrund des Fehlens konjugierter π -Elektronensysteme, keine sichtbare Farbe aufweisen würden, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die hier beobachtete Verfärbung auf Reaktionsprodukten mit konjugierten Doppelbindungen beruht, die ihrerseits durch stabile kovalente Bindungen mit dem Protein verknüpft sind.

Die beschriebenen Ergebnisse lassen sich wie folgt erklären: Unter den gewählten Reaktionsbedingungen (Acetaldehyd in Gegenwart von Base und/oder primären Aminoverbindungen wie Glycin oder BSA) treten Aldolkondensationen auf, wodurch mehrfach ungesättigte Aldehyde unterschiedlicher Kettenlänge mit konjugierten π -Elektronensystemen und somit auch unterschiedlicher Farbintensität entstehen. Basen-²³⁶ und Aminosäuren-katalysierte²³⁷ Aldolkondensationen können in diesem Zusammenhang durch die kovalente Verknüpfung zweier Moleküle Acetaldehyd zur Bildung eines Moleküls Crotonaldehyd (α,β -ungesättigter Aldehyd mit konjugiertem π -Elektronensystem) führen (Abbildung 4.10). Durch weitere Aldolreaktionen dieser α,β -ungesättigten Aldehyde mit Acetaldehyd, würde pro Acetaldehydmolekül das π -Elektronensystem jeweils um eine konjugierte Doppelbindung erweitert werden (2-Butenal (Crotonaldehyd) \rightarrow 2,4-Hexadienal \rightarrow 2,4,6-Octatrienal \rightarrow 2,4,6,8-Decatetraenal usw.) und dies eine Verschiebung des Farbeindrucks von gelb über rot und braun nach schwarz hervorrufen²³⁸.

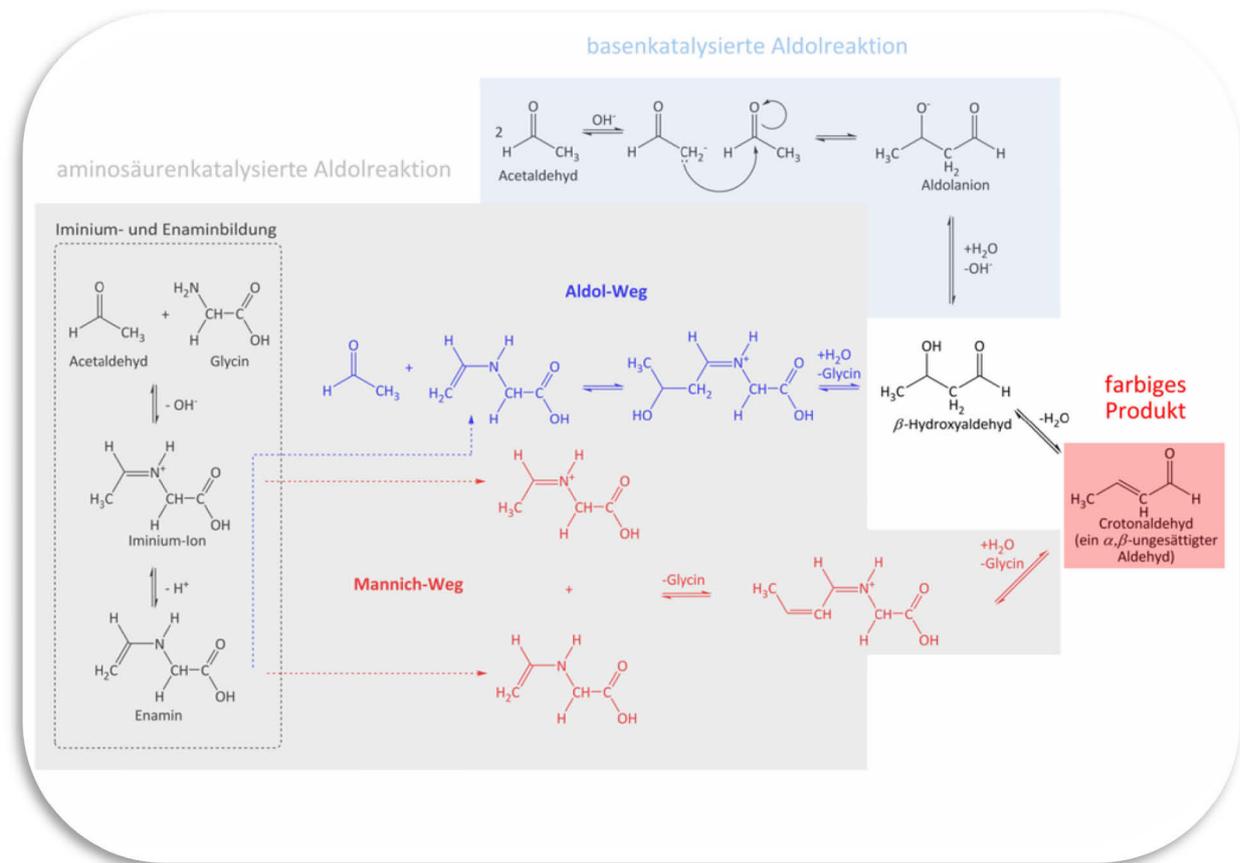


Abbildung 4.10 Basen- und aminosäurekatalysierte Aldolkondensation von Acetaldehyd zu α,β -ungesättigten Aldehyden

Die auf diesem Weg gebildeten α,β -ungesättigten Aldehyde erklären darüberhinaus, warum (1) die Inkubation von Acetaldehyd mit Glycin zu einer stärkeren Verfärbung führt als die Inkubation mit NaOH und (2) die Modifikationen selbst unter stark sauren Bedingungen (TCA-Fällung) noch stabil sind. Die durch eine 10 mM Glycinlösung katalysierte Aldolkondensation von Acetaldehyd ist in ihrer katalytischen Effizienz mit der säurekatalysierten und hocheffizienten Reaktivität einer konzentrierten Schwefelsäurelösung (10 - 15 M) vergleichbar und somit wesentlich effizienter als die Umsetzung in einer 10 mM NaOH-Lösung^{237,239,240}. Hierdurch kommt es bei der Inkubation von Acetaldehyd mit Glycin zur Bildung eines ausgedehnteren π -Elektronensystems und somit zu einer stärkeren Verschiebung des Farbeindrucks (rot statt gelb) als nach der Inkubation mit NaOH (Tabelle 4.3, obere Zeile). Zudem besitzen α,β -ungesättigte Aldehyde neben der Aldehydfunktion noch eine zweite reaktive funktionelle Gruppe: die α,β -ständige Doppelbindung, die durch ihre Nachbarschaft zur Carbonylfunktion reaktiver ist, als die übrigen Doppelbindungen. Durch diese Doppelbindung wird zum einen die Bildung stabiler

Michael-Addukte zwischen α,β -ungesättigten Aldehyden und Proteinen (Abbildung 4.11) ermöglicht, und zum anderen das Spektrum der Aminosäuren, mit denen diese Aldehyde reagieren können, von Lysin auf Arginin, Cystein, Histidin, Lysin und Serin erweitert²⁴¹⁻²⁴³.

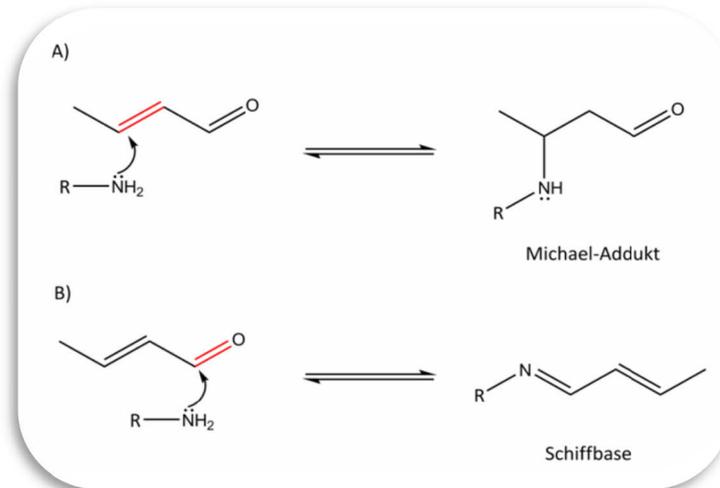


Abbildung 4.11 Michael-Addition (a) und Schiffbasenbildung (b) zwischen einer primären Aminogruppe und dem α,β -ungesättigten Aldehyd Crotonaldehyd

4.7 Aldolkondensation von Acetaldehyd führt zur Bildung α,β -ungesättigter Aldehyde

Zum Nachweis der Bildung α,β -ungesättigter Aldehyde wurden 500 mM Acetaldehydlösungen in Gegenwart von NaOH bzw. Glycin, analog zu den unter 4.6 aufgeführten Versuchen, inkubiert, die Reaktionsprodukte mit Dichlormethan extrahiert und mittels GC/MS analysiert. Bei der GC/MS-Analyse konnten jedoch lediglich die Reaktionsprodukte des Acetaldehyd/NaOH-Ansatzes identifiziert werden, da nur diese durch Dichlormethan aus der wässrigen Phase extrahiert werden konnten. In Gegenwart von Glycin entstanden Produkte, die selbst nach einer mehrstündigen Inkubation mit Dichlormethan nicht in die organische Phase extrahiert werden konnten (Abbildung 4.12).

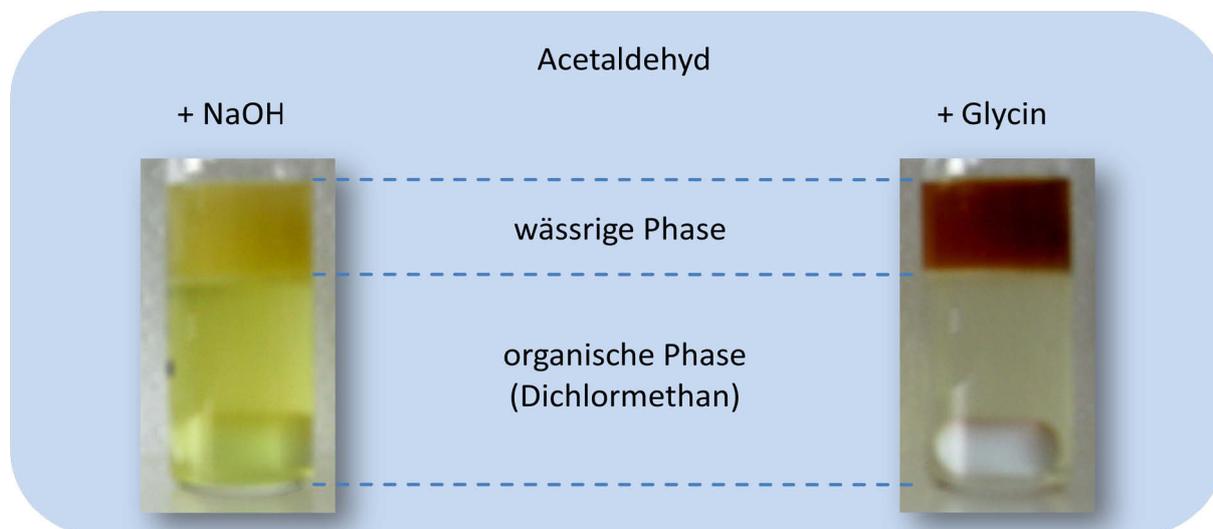


Abbildung 4.12 Extraktion der in Gegenwart von 10 mM NaOH (+ NaOH) bzw. 10 mM Glycin (+ Glycin) gebildeten farbigen Verbindungen aus einem wässrigen Ansatz mit 500 mM Acetaldehyd mittels Dichlormethan.

Durch die Analyse der GC/MS-Spektren konnten die α,β -ungesättigten Aldehyde 2,4-Hexadienal (m/z : 96, 95, 67) und 2,4,6-Octatrienal (m/z : 122) eindeutig als Hauptreaktionsprodukte nachgewiesen werden. Darüberhinaus wurde eine Vielzahl höhermolekularer Verbindungen detektiert, deren eindeutige Identifikation aufgrund der sehr komplexen Fragmentierungsmuster jedoch nicht möglich war. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass es sich bei diesen höhermolekularen Verbindungen um länger-kettige α,β -ungesättigte Aldehyde handelt. Der Nachweis der α,β -ungesättigten Aldehyde steht im Einklang mit den Ergebnissen von Nozière *et al.*²³⁸, die nach der Inkubation einer 10 mM Glycinlösung mit 500 mM Acetaldehyd u.a. 2,4-Hexadienal und 2,4,6-Octatrienal als Hauptprodukte nachweisen konnten. Darüberhinaus wurden auch höhermolekulare Produkte (z.B. 2,4,6,8-Decatetraenal) identifiziert, die für den rötlich-braunen bis schwarzen Farbeindruck der wässrigen Lösung verantwortlich sind²³⁸.

Die fehlende Extraktionsfähigkeit der Acetaldehyd/Glycin-Reaktionsprodukte in Dichlormethan kann in diesem Zusammenhang darauf zurückgeführt werden, dass Glycin als primäre Aminoverbindung nicht nur die Aldolkondensation von Acetaldehyd katalysieren, sondern auch über eine Michael-Addition mit α,β -ungesättigten Aldehyden reagieren kann (Abbildung 4.11a).

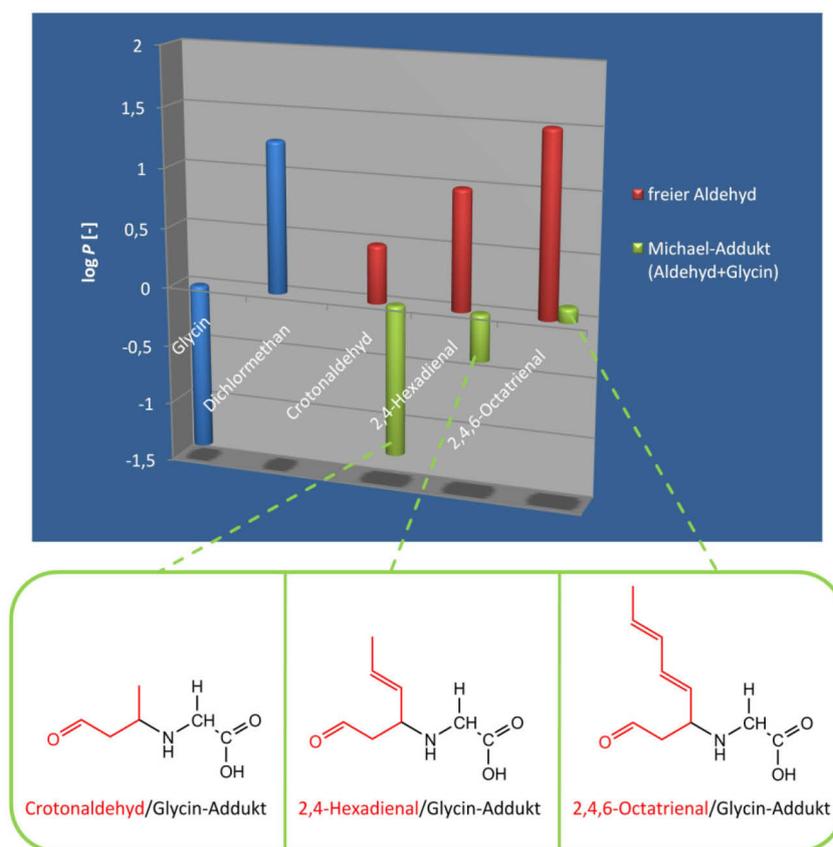


Abbildung 4.13 Veränderung der log *P*-Werte α,β -ungesättigter Aldehyde durch Michael-Addition an Glycin. Zu Vergleichszwecken sind die log *P*-Werte von freiem Glycin und dem Extraktionsmittel Dichlormethan aufgeführt. Die log *P*-Werte der einzelnen Verbindungen wurden mit dem Programmpaket ChemDraw 11.0 Ultra [Cambridge Soft] berechnet.

Die auf diesem Weg gebildeten Michael-Addukte weisen im Vergleich zu den freien Aldehyden stark verminderte log *P*-Werte (verstärkte Hydrophilie) auf (Abbildung 4.13), was wiederum nach dem gültigen Prinzip *similia similibus solventur* („Ähnliches löst sich in Ähnlichem“) zu einer verminderten Löslichkeit in dem hydrophoben Lösungsmittel Dichlormethan (log *P* = 1,26) führt.

4.8 α,β -ungesättigte Aldehyde bilden stabile Michael-Addukte mit BSA und BSL-B

Nach der erfolgreichen Identifikation α,β -ungesättigter Aldehyde, die nach der basen- bzw. aminosäurenkatalysierten Aldolkondensation von Acetaldehyd entstehen, sollte die Bildung stabiler Michael-Addukte (Abbildung 4.11) zwischen den Aldehyden und Proteinen, BSA bzw. BSL-B, untersucht werden. Hierzu wurden Versuchsansätze unterschiedlicher Zusammensetzung mit bzw. ohne Acetaldehyd inkubiert (3.10) und anschließend auf die Bildung von Michael-Addukten hin untersucht. Der Nachweis erfolgte hierbei über die photometrische Identifikation proteingebundener Carbonylgruppen mittels

Dinitrophenylhydrazin (DNPH) (3.10), da nur bei der Michael-Addition eines α,β -ungesättigten Aldehydes mit dem Protein die Carbonylfunktion erhalten bleibt. Im Falle einer Schiffbasenbildung würde die Carbonylfunktion des Aldehyds verloren gehen (Abbildung 4.14).

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde zum Teil ein hochreines BSA-Lyophilisat verwendet, da die Bildung von Michael-Addukten unter verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht werden sollte, jedoch BSL-B lediglich in Glycin/NaOH-Puffer ihre native Struktur bei gleichzeitig ausreichend hoher Stabilität beibehält.

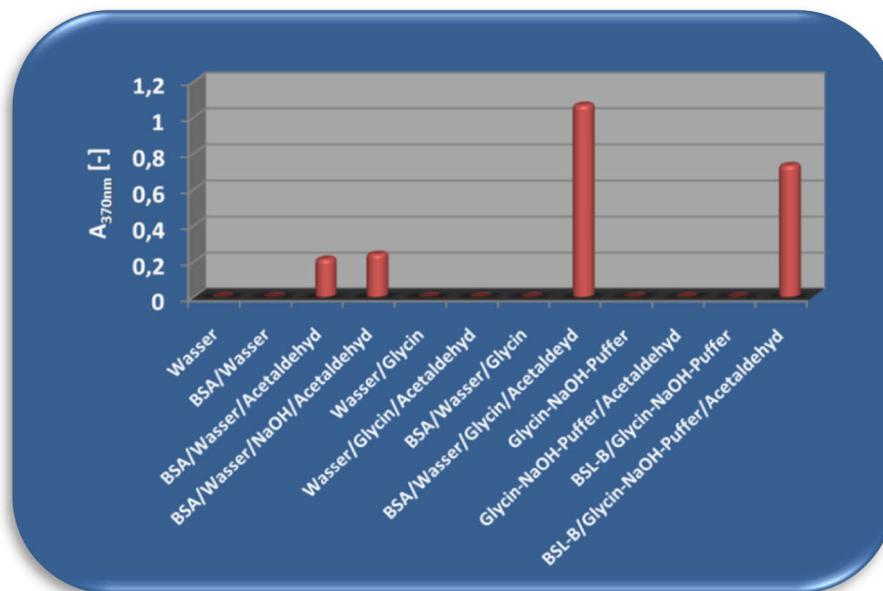


Abbildung 4.14 DNPH-Test zum Nachweis proteingebundener Carbonylgruppen nach der Inkubation unterschiedlich zusammengesetzter Proben mit bzw. ohne 500 mM Acetaldehyd (3.10).

Die DNPH-Analyse der verschiedenen Ansätze ergab, dass die Inkubation von Acetaldehyd in Gegenwart von NaOH und/oder primären Aminverbindungen (Glycin oder Protein) zur Bildung proteingebundener Carbonylgruppen führt (Abbildung 4.14). Da es unter diesen Bedingungen zur Bildung α,β -ungesättigter Aldehyde kommt (4.7) und gleichzeitig nur die Michael-Addition dieser Aldehyde zur Beibehaltung der Carbonylfunktion führt, weist dieses Ergebnis eindeutig darauf hin, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen Michael-Addukte zwischen α,β -ungesättigten Aldehyden und BSA bzw. BSL-B gebildet werden. Die drei- bzw. fünfmal höheren Absorptionen der BSL-B- bzw. BSA-Proben mit Glycin, im Vergleich zu den BSA-Proben ohne Glycin, weisen auf eine wesentlich stärkere Bildung α,β -ungesättigter Aldehyde bzw. Michael-Addukte hin und unterstreichen damit die bereits beschriebene hohe katalytische Effizienz des Glycins für diese Reaktion²³⁷. Die in diesem

Zusammenhang gemessene niedrigere Absorption der BSL-B-Probe im Vergleich zur BSA-Probe kann dabei auf die wesentlich geringere Konzentration modifizierbarer Aminosäurereste zurückgeführt werden. Der BSA-Ansatz enthält z.B. eine ca. 3,6-fach höhere Konzentration an Lysinresten als die BSL-B-Probe (0,86 μmol Lysinreste pro BSA-Ansatz, 0,24 μmol Lysinreste pro BSL-B-Ansatz). Desweiteren weist die nur geringfügig ansteigende Absorption der in Wasser gelösten BSA-Probe nach Zusatz von NaOH darauf hin, dass NaOH die Menge an gebildeten α,β -ungesättigten Aldehyden bzw. Michael-Addukten nur leicht erhöht (Abbildung 4.14). Daher muss die durch NaOH-Zusatz induzierte Farbverschiebung von gelb nach rot (Tabelle 4.3) auf die Bildung längererkettiger α,β -ungesättigter Aldehyde und nicht auf eine erhöhte Konzentration dieser Aldehyde zurückgeführt werden.

4.9 2,4-Hexadienal inaktiviert BSL-B

Aufgrund des Nachweises der Bindungsfähigkeit α,β -ungesättigter Aldehyde an BSL-B, wurde das kommerziell erhältliche Aldehyd 2,4-Hexadienal, das zugleich eines der Hauptprodukte der basen- bzw. aminosäurenkatalysierten Aldolkondensation von Acetaldehyd darstellt (4.7), auf seine inaktivierende Wirkung hin untersucht. Hierzu wurden BSL-B Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen an 2,4-Hexadienal inkubiert (3.8.4) und anschließend die hydrolytischen Restaktivitäten bestimmt (3.9.2). Um der wahrscheinlich unvollständigen Umsetzung des Acetaldehyds zu α,β -ungesättigten Aldehyden und der zugleich möglichen Bildung α,β -ungesättigter Aldehyde mit verschiedenen Kettenlängen ausgehend von Acetaldehyd Rechnung zu tragen, wurden die BSL-B-Proben in Gegenwart von 0, 10, 25 und 50 mM 2,4-Hexadienal inkubiert. Die Konzentrationen von 10, 25 und 50 mM 2,4-Hexadienal würden demzufolge, ausgehend von einer Acetaldehydkonzentration von 500 mM, einer Umsetzung von 6, 15 bzw. 30 % des gesamten Acetaldehyds zu 2,4-Hexadienal entsprechen.

Die mit steigender 2,4-Hexadienalkonzentration sinkende hydrolytische Restaktivität der BSL-B belegt eindeutig die lipaseinaktivierende Wirkung dieses α,β -ungesättigten Aldehyds (Abbildung 4.15). Desweiteren zeigt dieser Versuch, dass 2,4-Hexadienal ein weitaus effektiveres Inaktivierungsreagenz als Acetaldehyd ist, da BSL-B nach der Inkubation mit 50 mM 2,4-Hexadienal über 24 h lediglich eine Restaktivität von 19 % aufweist, wohingegen die Inkubation mit 50 mM Acetaldehyd zu keiner messbaren Aktivitätsverminderung im gleichen Zeitraum führt (Abbildung 4.4). Diese Diskrepanz kann daher, im Rahmen der Acetaldehyd-

induzierten Inaktivierung mikrobieller Lipasen, als ein weiteres Indiz für die zentrale Rolle α,β -ungesättigter Aldehyde angesehen werden, da nur bei Inkubation mit höheren Acetaldehydkonzentration eine für die Lipaseinaktivierung ausreichend hohe Konzentration der α,β -ungesättigten Aldehyde erreicht werden kann. Dennoch kann auf der Basis dieser Ergebnisse nicht eindeutig geschlossen werden, ob die inaktivierende Wirkung α,β -ungesättigter Aldehyde primär auf der Bildung von Schiffbasen oder von Michael-Addukten basiert. Jedoch weisen die starke inaktivierende Wirkung der α,β -ungesättigte Aldehyde, die hohe Stabilität der Acetaldehyd-induzierten Modifikationen (z.B. keine Hydrolyse während isoelektrischer Fokussierungen oder TCA-Fällungen) und das erweiterte Spektrum an Aminosäuren, die durch α,β -ungesättigte Aldehyde modifiziert werden können, eher darauf hin, dass die Acetaldehyd-induzierte Inaktivierung auf der Bildung von Michael-Addukten basiert.

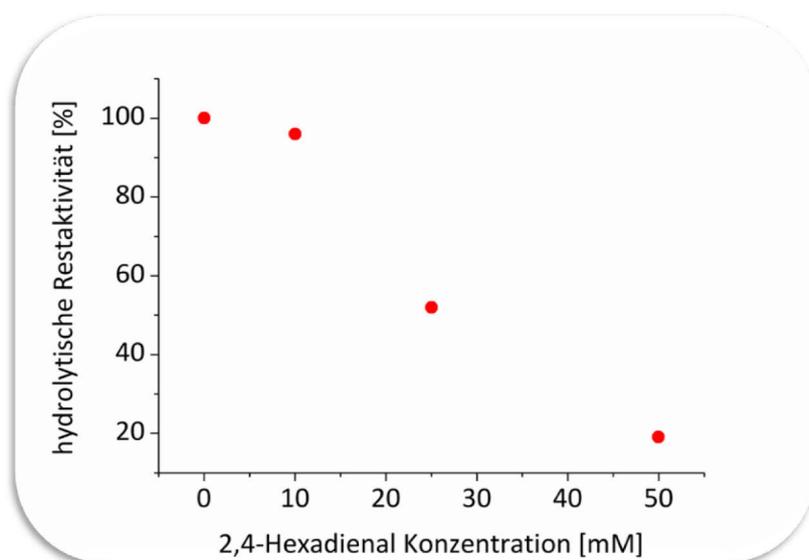


Abbildung 4.15 Hydrolytische Restaktivität der BSL-B nach der Inkubation mit steigenden 2,4-Hexadienalkonzentrationen von 0 – 50 mM in Glycin/NaOH-Puffer für 24 h bei 37 °C.

4.10 Die Maskierung primärer Aminogruppen führt zu einer Stabilisierung der BSL-B

Die bis dato effektivste Stabilisierungsstrategie mikrobieller Lipasen gegen Acetaldehyd bestand in der kovalenten Immobilisierung des Enzyms an einen VA-Epoxy-Biosynth-Träger¹⁸². Da die Immobilisierung durch Bildung kovalenter Bindungen zwischen den ϵ -Aminogruppen von Lysinen und den Epoxygruppen des Trägermaterials, bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der positiven Ladung, erfolgt, wurde von Berger & Faber¹⁸² postuliert,

dass der stabilisierende Effekt durch die Maskierung eines Teils der ϵ -Aminogruppen und der dadurch eingeschränkten Schiffbasenbildung hervorgerufen wird. Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse, kann diese Stabilisierung jedoch auch durch eine Verlangsamung der, durch primäre Aminogruppen katalysierten, Aldolkondensation von Acetaldehyd zu α,β -ungesättigten Aldehyden erklärt werden. Hierfür spricht zudem, dass sowohl die Immobilisierung als auch andere Stabilisierungsversuche (z.B. Adsorption an Celite-Träger oder gerichtete Mutagenese von Lysinresten) nicht zu einer absoluten Stabilisierung der Enzyme, sondern lediglich zu einer Verlangsamung des Inaktivierungsprozesses geführt haben^{182,192,218,219}. Durch die Maskierung eines Teils der primären Aminogruppen würden pro Zeiteinheit weniger α,β -ungesättigte Aldehyde gebildet werden, diese könnten jedoch, aufgrund des erweiterten Spektrums an modifizierbaren funktionellen Gruppen (freie Lysine, Arginine, Cysteine, Histidine und Serine), das Enzym vollständig inaktivieren. Da Acetaldehyd demgegenüber lediglich freie Lysinreste und den N-Terminus durch die Bildung von Schiffbasen modifizieren kann, sollte, unter der Annahme, dass die Acetaldehyd-induzierte Schiffbasenbildung inaktivierend wirkt, eine Maskierung eines Teils der Lysine zu einer Steigerung der Stabilität des Enzyms führen.

Um den Einfluss der primären Aminogruppen der BSL-B (N-Terminus und Lysin ϵ -Aminogruppen) auf die Stabilität gegenüber Acetaldehyd zu testen, wurden BSL-B-Proben (Lipasekonzentration 1 mg mL^{-1}) vor der Inkubation mit 500 mM Acetaldehyd mit bzw. ohne Methylacetimidat modifiziert (3.8.2). Methylacetimidat modifiziert spezifisch primäre Aminogruppen unter Beibehaltung der positiven Ladung und gleichzeitig hoher Stabilität der Modifikation im alkalischen pH-Bereich²⁴⁴. Da Methylacetimidat neben den proteingebundenen primären Aminogruppen auch die Aminogruppen des im Glycin/NaOH-Puffer enthaltenen Glycins modifiziert, konnte auf diesem Weg der Einfluss sämtlicher primärer Aminogruppen des Systems auf die Inaktivierung der BSL-B untersucht werden. Um jedoch auch den Einfluss der Glycinaminofunktionen zu untersuchen, wurde eine methylacetimidatmodifizierte Probe vor der Inkubation mit Acetaldehyd in frischen, unmodifizierten Glycin/NaOH-Puffer umgepuffert (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4 Behandlung der verschiedenen Versuchsansätze

Probe	1	2	3	4	5
Modifikation mit Methylacetimidat	-	+	-	+	+
Umpufferung in frischen Glycin/NaOH-Puffer	-	-	-	-	+
500 mM Acetaldehyd	-	-	+	+	+

+: Der entsprechende Arbeitsschritt (z.B. Modifikation mit Methylacetamid) wurde durchgeführt. -: Der entsprechende Arbeitsschritt wurde nicht durchgeführt.

Die IEF-Analyse der mit bzw. ohne Methylacetimidat-modifizierten BSL-B (Abbildung 4.16, Proben 1 und 2) zeigt, dass die modifizierte BSL-B-Probe einen höheren isoelektrischen Punkt als die unbehandelte Probe aufweist. Im Gegensatz zu der unbehandelten Probe ($pI = 9,677$) wandert die mit Methylacetimidat modifizierte BSL-B so gut wie nicht mehr in das IEF-Gel ein. Dieses Verhalten kann auf eine, durch die Modifikation hervorgerufene, Erhöhung des pI zurückgeführt werden, da durch die Reaktion mit Methylacetimidat die ϵ -Aminogruppen neutralisiert, jedoch eine neue Iminogruppe eingeführt wird (Abbildung 3.2). Der im Vergleich zur ϵ -Aminogruppe höhere pK_s -Wert der Iminogruppe führt insgesamt zu einer Erhöhung des pI der gesamten Lipase. Die Berechnung des pI einer BSL-B-Variante, in der sämtliche Lysinreste durch Arginine ausgetauscht wurden – dies entspricht in etwa der Modifikation sämtlicher Lysinreste durch Methylacetimidat – ergab, dass sich der pI durch diese Substitutionen um ca. 0,4 pH-Einheiten auf über pH 10 erhöht. Demnach weist dieses Ergebnis, neben den anderen Befunden dieser Untersuchung, auf die erfolgreiche Modifikation der BSL-B durch Methylacetimidat hin. Demgegenüber konnte keine Veränderung der molekularen Massen der behandelten bzw. unbehandelten Probe mittels SDS-PAGE festgestellt werden.

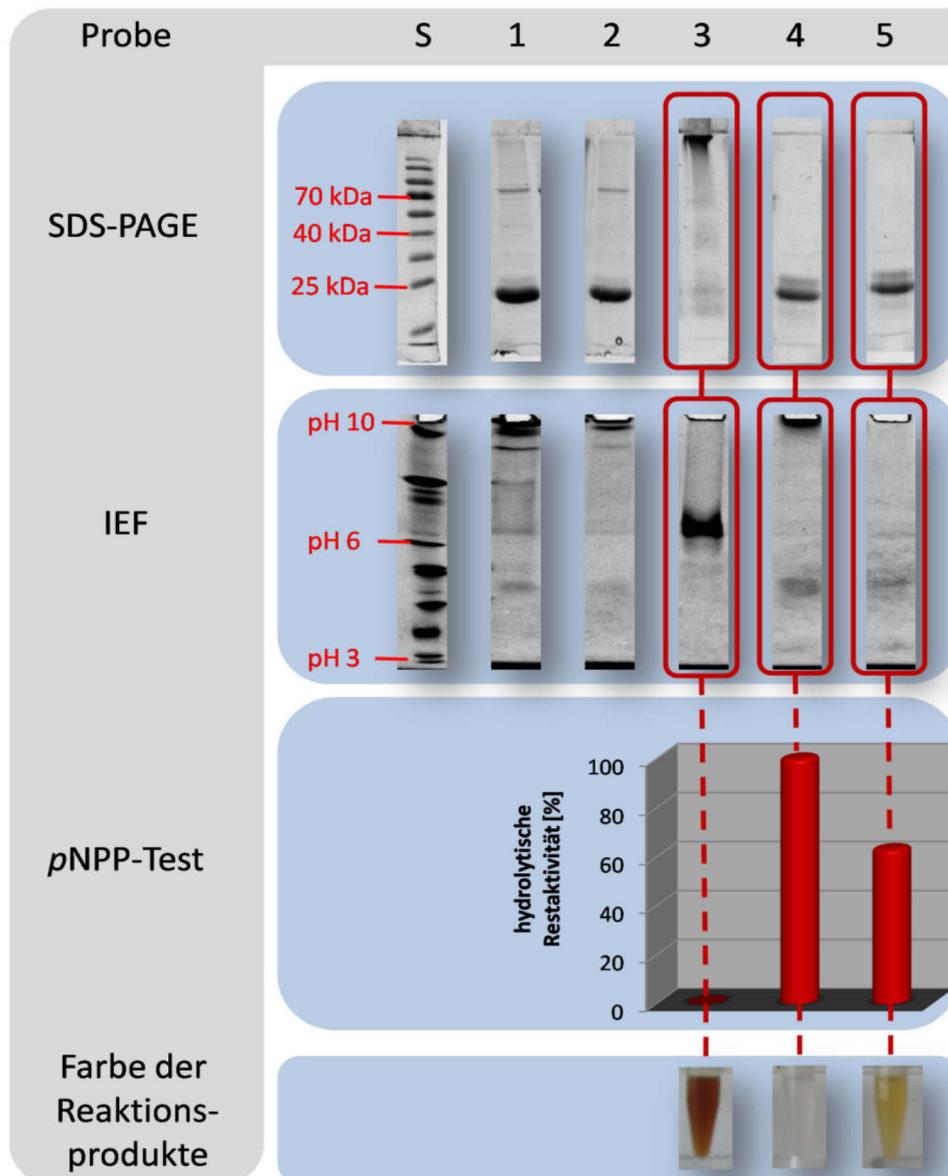


Abbildung 4.16 Acetaldehydinaktivierung verschiedener BSL-B-Proben nach der Reaktion der proteingebundenen primären Aminogruppen (N-Terminus und Lysinseitenketten) mit bzw. ohne Methylacetimidat. S: Molekulargewichts- bzw. IEF-Standard. 1-5: Unterschiedlich vorbehandelte BSL-B-Proben (vgl. Tabelle 4.4).

Nach der Umpufferung einer BSL-B Probe (Tabelle 4.4) und der anschließenden Inkubation der Proben mit 500 mM Acetaldehyd (Proben 3-5), wurde der Einfluss der Lysinreste auf die Modifikation und Inaktivierung der BSL-B mittels SDS-PAGE, IEF und pNPP-Test untersucht (Abbildung 4.16). Die SDS-PAGE der drei Proben zeigt eindeutig, dass lediglich die nicht mit Methylacetimidat behandelte Probe eine drastische Erhöhung der molekularen Masse aufweist. Da diese vergrößerten Massen bereits zuvor auf die Bildung intermolekularer *cross-links* zurückgeführt wurde (Abbildung 4.6), kann hiermit eindeutig belegt werden, dass die Bildung dieser Quervernetzungen von modifizierten Lysinresten initiiert werden. Zudem

zeigt sich in den vollkommen unveränderten molekularen Massen der Proben 4 und 5, dass die Lysinreste dieser Proben umfangreich durch Methylacetimidat modifiziert wurden. Aufgrund der offensichtlich effiziente Quervernetzung der BSL-B-Moleküle, hätte man bei einer unvollständigen Modifikation zumindest teilweise dimere BSL-B-Strukturen detektieren müssen ($M_w \sim 40$ kDa). Die parallel durchgeführte IEF der Proben 3-5 bestätigt das Ergebnis der SDS-PAGE. Im Rahmen dieser Analyse wies lediglich der unbehandelte BSL-B-Ansatz (Probe 3) eine drastische Verschiebung des pI auf. Da die Methylacetimidat-modifizierten Proben keinerlei Veränderung des pI zeigten, kann diese Verschiebung, die bereits zuvor beobachtet wurde (Abbildung 4.5), eindeutig auf die Acetaldehyd-induzierte Modifikation der Lysinreste zurückgeführt werden. Die vollkommen unveränderten pI -Werte der Proben 4 und 5 weisen darüberhinaus ebenfalls auf die effiziente Modifikation der Lysinreste durch Methylacetimidat hin.

Da es aufgrund der sehr unterschiedlichen Behandlung der Proben (Modifikation mit bzw. ohne Methylacetimidat, Umpufferung der Probe 5 usw.) zu unterschiedlich starker Präzipitation der BSL-B kam, wurden die löslichen Proteinkonzentrationen der Proben 3-5 vor dem $pNPP$ -Test vereinheitlicht und anschließend die höchste gemessene hydrolytische Restaktivität gleich 100 % gesetzt. Durch diesen Vergleich ergab sich, dass die Probe 3 eine hydrolytische Restaktivität von 0 %, die der Probe 4 eine von 100 % und die der Probe 5 eine von 61 % aufwies (Abbildung 4.16, $pNPP$ -Test). Dies beweist, dass die vollständige Maskierung der primären Aminogruppen der BSL-B (Probe 4) zu einer drastischen Stabilisierung des Enzyms führt. Jedoch führt die Zugabe unmodifizierter primärer Amine (frischer Glycin/NaOH-Puffer in Probe 5) zu einer partiellen Verminderung der hydrolytischen Aktivität um ca. 40 %. Da allerdings die Untersuchungsergebnisse auf eine annähernd vollständige Modifikation der Lysinreste durch Methylacetimidat hinweisen, muss diese Inaktivierung auf die Modifikation anderer Aminosäurereste zurückgeführt werden. Berücksichtigt man diese Schlussfolgerung und zugleich, dass die Stärke der Verfärbung der drei Proben (Tabelle 4.3), proportional zur Inaktivierung ist, so muss dieses Ergebnis auf die verstärkte Bildung von α,β -ungesättigten Aldehyden, die als Michael-Addukte diverse Aminosäurereste modifizieren, zurückgeführt werden. Im Gegensatz zu Acetaldehyd können α,β -ungesättigte Aldehyde neben den Lysinresten auch Arginine, Cysteine, Histidine und Serine modifizieren²⁴³. Hierdurch können in der hier verwendeten BSL-B-Variante (BSL-B ohne Signalsequenz, mit N-terminalem His₁₀-tag) potentiell 32 weitere

Aminoreste (3 Arginine, 15 Serine und 14 Histidine) modifiziert werden. Zwar ist aufgrund des amphiphilen Charakters der α,β -ungesättigten Aldehyde, der dem der natürlichen Lipasesubstrate ähnelt, und der Gegenwart von zwei modifizierbaren Aminosäuren in der katalytischen Triade (Ser₇₈ und His₁₅₇) auch ein kompetitiver Inaktivierungsmechanismus denkbar, jedoch weisen die Ergebnisse dieser Arbeit eher auf einen nicht-kompetitiven Inaktivierungsmechanismus hin. Die molaren Überschüsse an Acetaldehyd bzw. 2,4-Hexadienal, die zu einer vollständigen Inaktivierung der Lipase führen, sind z.B. viel zu hoch, als dass es sich bei ihnen um kompetitive Inhibitoren handeln könnte. Ein kompetitiver Inhibitor sollte bereits im mM-Bereich, eine deutliche Inaktivierung hervorrufen.

Daher können die Ergebnisse dieser Untersuchung wie folgt erklärt werden. In der nicht mit Methylacetimidat vorbehandelten Probe liegt die maximale Konzentration an primären Aminofunktionen gegeben durch N-Terminus, ϵ -Aminogruppen und Glycin (Puffer) vor. Hierdurch kann der Acetaldehyd mit den proteingebundenen primären Aminen reagieren und die Bildung intermolekularer *cross-links* induzieren (Abbildung 4.16, SDS-PAGE). Jedoch kann die initiale Schiffbasenbildung sowohl mit den proteingebundenen als auch den freien Aminofunktionen des Glycin/NaOH-Puffers auch zur Aldolkondensation von Acetaldehyd zu α,β -ungesättigten Aldehyden führen (4.7). Die hohe Konzentration an verfügbaren Aminogruppen würde in diesem Zusammenhang, im Vergleich zu den Proben 4 und 5, innerhalb der Inkubationszeit die Bildung der meisten und zugleich langkettigsten α,β -ungesättigten Aldehyde ermöglichen (Abbildung 4.16, Farbe der Reaktionsprodukte). Die mittels IEF nachgewiesenen Verschiebung des pI der Probe 3 könnte somit durch die Bildung der Acetaldehyd-induzierten intermolekularen *cross-links* und/oder die stabile Michael-Adduktbildung an den Lysinresten erklärt werden. Die zusätzliche Modifikation weitere Aminosäurereste (Arginine, Histidine, Serine) könnte dann abschließend eine vollständige Inaktivierung der BSL-B hervorrufen. Im Gegensatz dazu, würde die vollständige Maskierung der proteingebundenen Aminofunktionen durch Methylacetimidat dazu führen, dass weder intermolekulare *cross-links* noch Michael-Addukte an BSL-B gebildet werden können. Die Unterbindung der Bildung stabiler Lysinmodifikationen würde sich demnach in unveränderten molekularen Massen und isoelektrischen Punkten äußern (Abbildung 4.16). Durch die Zugabe unmodifizierten Glycins durch die Umpufferung der Probe 5, wäre jedoch eine, im Vergleich zu Probe 3 verminderte, Aldolkondensation des Acetaldehyds ermöglicht (Abbildung 4.16, Farbe der Reaktionsprodukte). Die Anwesenheit von α,β -ungesättigten

Aldehyden in dieser Probe könnte daher zur Modifikation der Arginine, Histidine und Serine führen, und die verminderte, aber deutliche Inaktivierung der Lipase um ca. 40 % erklären. Trotz der potentiellen Modifikation von drei Argininresten durch die α,β -ungesättigten Aldehyde, sollte aufgrund der Einführung zusätzlicher Iminogruppen durch Methylacetimidat und die potentielle Modifikation von 14 Histidinen ($pK_s = 6,5$) der pI dieser Probe größer sein als der der Probe 4. Ein Indiz hierfür ist die, im Vergleich zu Probe 4, geringere Migration des Proteins in das IEF-Gel (Abbildung 4.16).

Zusammenfassend basieren demnach ca. 40 % der gesamten Inaktivierung von BSL-B auf der Michael-Adduktbildung an Arginin-, Histidin- und Serinresten, und ca. 60 % auf der Bildung von Michael-Addukten an Lysinen. Eine Inaktivierung durch das Schiffbasen-induzierte *cross-linking* kann in diesem Zusammenhang durch die Ergebnisse in Abschnitt 4.5 ausgeschlossen werden.

4.11 MALDI-TOF-Analyse Acetaldehyd-modifizierter BSL-B-Proben

Zur Identifikation der Acetaldehyd-induzierten Modifikationen und der modifizierten Aminosäurereste wurden BSL-B-Proben ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) in Gegenwart von 0, 50 und 500 mM Acetaldehyd für 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels MALDI-TOF-MS (3.14) analysiert. Die durch die MALDI-TOF-Analyse erhaltenen Ergebnisse ließen jedoch keine eindeutigen Schlussfolgerungen bezüglich der Modifikationen und modifizierten Aminosäurereste zu. Lediglich zwei Aussagen können anhand der gemessenen Peptidmassen getroffen werden. Zum einen werden mit zunehmender Acetaldehydkonzentration immer weniger Peptidmassen innerhalb des kalibrierten Massenbereiches (ca. 1-3 kDa) gemessen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass mit steigender Acetaldehydkonzentration nach dem hydrolytischen Verdau der BSL-B-Proben immer größere Peptidfragmente mit einer Molekülmasse $> 3 \text{ kDa}$ generiert werden. Diese Peptidmassenzunahme kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. (1) Trypsin hydrolysiert bevorzugt die Peptidbindungen an Lysinen. Die Acetaldehyd-induzierte Modifikation von Lysinresten könnte zu einer Maskierung dieser Schnittstellen und somit mit steigender Acetaldehydkonzentration zu einer immer unvollständigeren Hydrolyse von BSL-B führen. (2) Die Acetaldehyd-induzierte Bildung intra- und intermolekularer *cross-links* könnte selbst bei einer vollständigen Hydrolyse von BSL-B durch Trypsin zu einer deutlichen Massenzunahme der Peptide führen.

Die zweite Aussage, die anhand der gemessenen Massenspektren getroffen werden kann, bezieht sich auf die Identifikation einer Acetaldehyd-induzierten Modifikation an Lys₃₇. In der 50 mM-Probe konnte in einer geringen Konzentration ein Peptidfragment mit einer Masse von 1507,711 Da nachgewiesen werden. Dieses Peptid konnte jedoch nicht in der 0 mM-Probe identifiziert werden. Bei diesem Peptid kann es sich um das Fragment Asn₂₆ – Lys₃₇ ($M_w = 1437,712$) mit einem über Michael-Addition gebundenen Crotonaldehyd handeln. Die Bindung eines Crotonaldehyds ($M_w = 70,09 \text{ g mol}^{-1}$) würde zu einer Massenzunahme von theoretisch 1437,712 Da auf 1507,772 Da führen. Da diese theoretische Masse exakt mit der gemessenen Peptidmasse übereinstimmt, kann dieses Ergebnis als deutlicher Hinweis auf die Modifikation des Lysinrestes 37 durch Crotonaldehyd angesehen werden.

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse aus der MALDI-TOF-Analyse Acetaldehyd-modifizierter BSL-B-Proben die bisherige Interpretation des Inaktivierungsmechanismus insofern, als es zu einer mit zunehmender Acetaldehydkonzentration zu immer umfangreicheren Modifikationen der Lipase kommt, die die enzymatische Fragmentierung verhindern und zum anderen die gebildeten α,β -ungesättigten Aldehyde Michael-Addukte mit dem Enzym bilden können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Lipasen (Triacylglycerolhydrolasen, EC 3.1.1.3) gehören zu der Strukturfamilie der α/β -Hydrolasen und hydrolysieren in wässrigen Lösungen Triglyceride in Glycerin und Fettsäuren. Aufgrund der (1) verhältnismäßig einfachen Produktion, (2) Cofaktorunabhängigkeit, (3) breiten Substratspektren, (4) hohen Enantioselektivität und (5) hohen Stabilität in nicht-wässrigen Lösungsmitteln (z.B. organische Lösungsmittel, überkritisches CO₂, ionische Flüssigkeiten) sind Lipasen die mit Abstand am häufigsten verwendeten Enzymen in der organische Synthesechemie. Unter wasserfreien Bedingungen katalysieren Lipasen Estersynthesen durch Esterifizierungs-, Interesterifizierungs- und Transesterifizierungsreaktionen.

Da Lipase-katalysierte Transesterifizierungen unter Verwendung konventioneller Ester und Alkohole jedoch reversible Reaktionen darstellen und somit keine hohen Produktausbeuten erreicht werden können, werden zu diesem Zweck Enolester (Isopropenylester oder Vinylester) als Substrate eingesetzt. Nach der Spaltung tautomerisiert das Enol zu einer Carbonylverbindung (Aceton oder Acetaldehyd), die ihrerseits nicht mehr als Substrat für die Rückreaktion dienen kann und somit eine irreversible Reaktionsführung mit hohen Produktausbeuten ermöglicht. Trotz dieser Vorteile ist es bekannt, dass Aldehyde als alkylierende Reagenzien Schiffbasen mit Lysin ϵ -Aminogruppen und dem N-Terminus bilden und somit strukturelle Veränderungen induzieren zu können. Diese Fähigkeit zur Schiffbasenbildung wird als Hauptursache für die Inaktivierung mikrobieller Lipasen durch Acetaldehyd angesehen. Da jedoch Schiffbasen zum einen sehr instabile Verbindungen sind und zum anderen keine direkte Korrelation zwischen Schiffbasenbildung und Lipaseinaktivierung nachgewiesen wurde ist bis heute fraglich, ob die Acetaldehyd-induzierte Inaktivierung mikrobieller Lipasen wirklich durch die Bildung von Schiffbasen hervorgerufen wird. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte detaillierte Untersuchung des Acetaldehyd-induzierten Inaktivierungsmechanismus mikrobieller Lipasen ergab, dass (1) die Stabilität gegenüber Acetaldehyd durch den Protonierungszustand der Lipase gesteuert werden kann, (2) Acetaldehyd durch Basen- bzw. Aminosäuren-katalysierte Aldolkondensation α,β -ungesättigte Aldehyde bildet und (3) diese ungesättigten Aldehyde als nicht-kompetitive Inhibitoren durch stabile Michael-Addukt-Bildung am Enzym zur Inaktivierung der Lipasen führt.

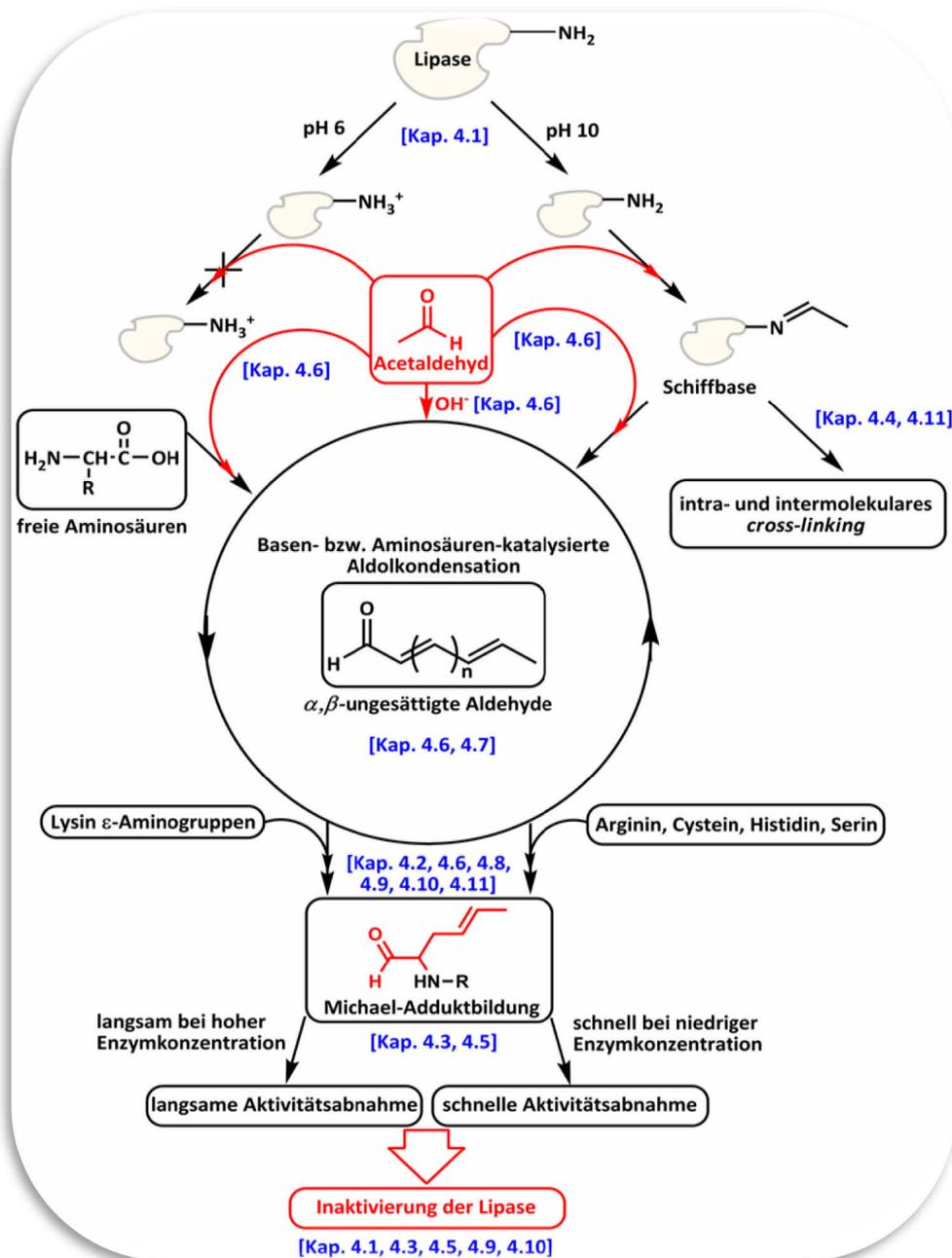
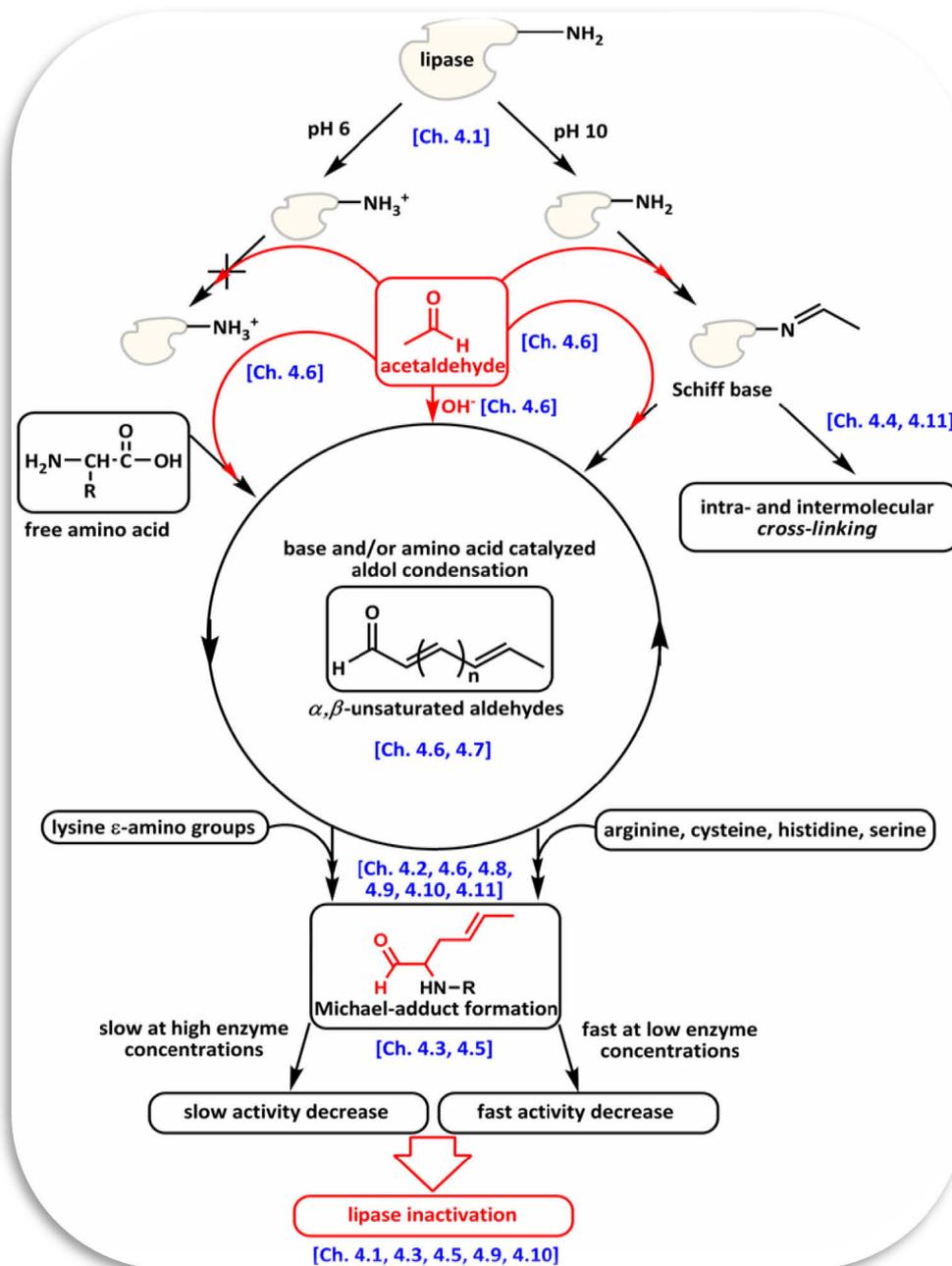


Abbildung 5.1 Postulierter Inaktivierungsmechanismus mikrobieller Lipasen durch Acetaldehyd: In Abhängigkeit des pH-Wertes des verwendeten Puffers können überwiegend deprotonierte Aminogruppen (-NH₂) oder protonierte Aminogruppen (-NH₃⁺) an der Enzymoberfläche generiert werden. Lediglich deprotonierte Aminogruppen können mit Acetaldehyd Schiffbasen bilden, die ihrerseits die Bildung intra- bzw. intermolekularer *cross-links* induzieren können. Darüberhinaus katalysieren Basen (Puffer) und/oder Aminoverbindungen (proteingebundene Aminogruppen, freie Aminoverbindungen im Puffer) die Aldolkondensation von Acetaldehyd zu α,β-ungesättigten Aldehyden, die je nach Kettenlänge zu einer gelblich bis braun-schwarzen Verfärbung der Lösung bzw. des Lyophilisats führen. Die Bildung stabiler Michael-Addukte zwischen dem Enzym und den α,β-ungesättigten Aldehyden führt zur Inaktivierung der Lipase. Die Inaktivierungsgeschwindigkeit ist dabei sowohl von der Konzentration der α,β-ungesättigten Aldehyde als auch von der Konzentration der Lipase abhängig. Bei niedrigen Enzymkonzentrationen verläuft der Inaktivierungsprozess schnell, da die langsame Aggregation der Lipase eine schnelle und umfangreiche Modifikation des Proteins ermöglicht. Demgegenüber erschwert die schnelle Aggregation der Lipase bei höheren Enzymkonzentrationen die schnelle Modifikation, wodurch der Inaktivierungsprozess verlangsamt, jedoch aufgrund der Dynamik der Aggregation (Assoziation und Dissoziation) die Lipase letztendlich auch inaktiviert wird. Die entsprechenden Kapitel zu den einzelnen Schritten des Inaktivierungsmechanismus sind in blau hervorgehoben.

5 ABSTRACT

Lipases (triacylglycerol hydrolases, EC 3.1.1.3) belong to the α/β -hydrolase family and catalyze the hydrolysis of triglycerides to the corresponding glycerol and fatty acids. Furthermore, lipases are the most frequently used biocatalysts in organic chemistry due to the following reasons: (1) ready availability and low cost production; (2) no requirement of cofactors; (3) broad substrate specificity; (4) high enantioselectivity; and (5) high stability in non-aqueous media such as ionic liquids, supercritical fluids, and organic solvents. Under non-aqueous reaction conditions lipases catalyze the synthesis of esters by esterification, interesterification, and transesterification.

Lipase catalyzed ester formations starting from alcohols and esters as substrates (transesterifications) are equilibrium reactions that have to be shifted toward the product side in order to guarantee high conversion. Therefore, several activated esters (e.g. enol esters or ethoxyvinyl esters) have been tested as substrates, with enol esters such as isopropenyl acetate or vinyl acetate being the most useful acyl donors. After cleavage the enol tautomerizes to a carbonyl compound (acetaldehyde or acetone), which cannot serve as a substrate for the back reaction, rendering this system fast and irreversible and also facilitating downstream processing, due to the volatility of the carbonyl compound. Despite of these advantages, aldehydes are generally known to act as alkylating reagents on enzymes by forming Schiff-bases in a Maillard-type reaction, in particular with lysine ϵ -amino groups. Nevertheless, due to the low stability of Schiff-bases and the lacking proof that Schiff-base formation and inactivation of the lipase are directly correlated, it is questionable if Schiff-base formation directly induces the inactivation of the enzyme. The detailed analysis of the acetaldehyde-induced inactivation mechanism showed, that (1) the stability of the lipases toward acetaldehyde can be controlled by the protonation state of the enzyme, (2) acetaldehyde can form α,β -unsaturated aldehydes by base- and/or amino acid-catalyzed aldol condensation, and (3) these aldehyde can act as non-competitive inhibitors by forming stable Michael-adducts with the enzyme (scheme 5.2).



Scheme 5.2 Postulated inactivation mechanism of microbial lipases by acetaldehyde: Depending on the pH-value of the buffer predominantly deprotonated amino groups (-NH₂) or protonated amino groups (-NH₃⁺) can be generated at the surface of the enzyme. Solely deprotonated amino groups are able to form Schiff bases with acetaldehyde, which on their part can induce the formation of intra- and intermolecular *cross-links* respectively. Furthermore, bases (buffer) and/or amino compounds (protein-bound amino groups, free amino compounds in the buffer) catalyze the aldol condensation of acetaldehyde to α,β-unsaturated aldehydes. Depending on the chain length these aldehydes lead to a yellowish to brownish-black coloration of the solution and lyophilisate respectively. The formation of Michael-adducts between the enzyme and the α,β-unsaturated aldehydes leads to the inactivation of the lipase. The velocity of the inactivation process depends on the concentration of the α,β-unsaturated aldehydes as well as the concentration of the enzyme. At low enzyme concentrations the inactivation proceeds fast, due to the slow aggregation of the lipase, which enables a fast and comprehensive modification of the protein. On the other hand the fast aggregation at high enzyme concentrations hampers a comprehensive and fast modification of the protein, whereby the inactivation process is decelerated. However, the dynamic aggregation process (dissociation and association) enables finally the comprehensive modification and inactivation of the lipase. The corresponding chapters that deal with the different inactivation steps are highlighted in blue.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry: Palgrave Macmillan; 2002.
2. Hilvert D. Critical analysis of antibody catalysis. *Annu Rev Biochem* 2000;69:751-793.
3. Ulber R, Soye K. 5000 Jahre Biotechnologie: Vom Wein zum Penicillin. *Chem unserer Zeit* 2004;38(3):172-180.
4. Drauz K, Waldmann H. Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. Weinheim: Wiley-VCH; 2002.
5. Payen A, Persoz JF. Mémoire sur la diastase, les principaux produits de ses reactions et leurs applications aux artes industriels. *Ann Chim Phys* 1833;53:73-92.
6. Ertl G, Gloya T. Katalyse: Vom Stein der Weisen zu Wilhelm Ostwald. *Z Phys Chem* 2003;217:1207-1219.
7. Berzelius JJ. Quelques Idées sur une nouvelle force agissant dans les combinaisons des corps organiques. *Ann Chim Phys* 1835;61:146-151.
8. Breuer M, Stürmer R. Chemie und Biologie Hand in Hand. Enzyme als Katalysatoren. *Chem unserer Zeit* 2006;40(2):104-111.
9. Michael-Sinclair P. Enzymes convert starch to dextrose. *Chem Eng* 1965;72(18):90-96.
10. Alberghina L. Protein Engineering for Industrial Biotechnology: CRC Press; 2000.
11. Tucker GA. Fundamentals of enzyme activity. In: Tucker GA, Woods LFJ, editors. *Enzymes in food processing*. London: Blackie Academic & Professional; 1995. p 1-26.
12. Schmid RD. Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik. Weinheim: Wiley-VCH; 2006.
13. Illanes A. Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications: Springer Netherlands; 2008.
14. Aehle W. Enzymes in industry: production and applications. Weinheim: Wiley-VCH; 2003.
15. Huisman GW, Gray D. Towards novel processes for the fine-chemical and pharmaceutical industries. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13(4):352-358.
16. Lauwers A, Scharpé S. Pharmaceutical enzymes. New York: Marcel Dekker; 1997.
17. Pollard DJ, Woodley JM. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnol* 2007;25(2):66-73.
18. Asano Y. Overview of screening for new microbial catalysts and their uses in organic synthesis--selection and optimization of biocatalysts. *J Biotechnol* 2002;94(1):65-72.
19. Garcia-Junceda E, Garcia-Garcia JF, Bastida A, Fernandez-Mayoralas A. Enzymes in the synthesis of bioactive compounds: the prodigious decades. *Bioorg Med Chem* 2004;12(8):1817-1834.
20. Schoemaker HE, Mink D, Wubbolts MG. Dispelling the myths-biocatalysis in industrial synthesis. *Science* 2003;299(5613):1694-1697.
21. Bornscheuer UT, Kazlauskas RJ. Hydrolases in Organic Synthesis. Weinheim: Wiley-VCH; 2005.
22. Jaeger KE, Reetz MT. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* 1998;16(9):396-403.

23. Liese A, Seelbach K, Wandrey C. Industrial Biotransformations. Weinheim: Wiley-VCH; 2006.
24. Wiktelius D. Lipases - Enzymes for biocatalytic asymmetric synthesis. *Synlett* 2005;2111-2114.
25. Bornscheuer UT. Enzymes in lipid modification. Weinheim: Wiley-VCH; 2000.
26. Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;64(6):763-781.
27. Jaeger KE, Eggert T. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13(4):390-397.
28. Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13(4):345-351.
29. Schmid RD, Verger R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew Chem Int Ed* 1998;37:1608-1633.
30. Borgström B, Brockmann HL. Lipases. New York: Elsevier; 1994.
31. Stehr F, Kretschmar M, Kröger C, Hube B, Schäfer W. Microbial lipases as virulence factors. *J Mol Catal B Enzym* 2003;22(5-6):347-355.
32. Woolley P, Petersen SB. Lipases. Cambridge: Cambridge University Press; 1994.
33. Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol* 2006;39(2):235-251.
34. Müller G, Petry S. Lipases and phospholipases in drug development: from biochemistry to molecular pharmacology. Weinheim: Wiley-VCH; 2004.
35. Villeneuve P, Foglgia TA. Lipase specificities: Potential applications in lipid bioconversions. *Inform* 1997;8:640-650.
36. Houde A, Kademi A, Leblanc D. Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl Biochem Biotechnol* 2004;118(1-3):155-170.
37. Salameh M, Wiegel J. Lipases from extremophiles and potential for industrial applications. *Adv Appl Microbiol* 2007;61:253-283.
38. Demirhian DC. Enzymes from extremophiles. *Curr Opinion Chem Biol* 2001;5:144-151.
39. van den Burg B. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol* 2001;6:213-218.
40. Polaina J, MacCabe AP. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. Dordrecht, NL: Springer; 2008.
41. Andersson RE, Hedlund GB, Jensson V. Thermal inactivation of a heat-resistant lipase produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *J Dairy Sci* 1979;63:361-367.
42. Bradoo S, Saxena RK, Gupta R. Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus* spp. *World J Microbiol Biotechnol* 1999;15:87-91.
43. Kojima Y, Yokoe M, Mase T. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. *Biosci Biotechnol Biochem* 1994;58(9):1564-1568.
44. Dong H, Gao S, Han S, Cao S. Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. lipase and its properties in non-aqueous media. *Biotechnol Appl Biochem* 1999;30 (Pt 3):251-256.
45. Eggert T, van Pouderooyen G, Pencreac'h G, Douchet I, Verger R, Dijkstra BW, Jaeger KE. Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. *Colloids Surfaces B* 2002;26(1-2):37-46.

46. Longhi S, Cambillau C. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1999;1441(2-3):185-196.
47. Lotti M, Grandori R, Fusetti F, Longhi S, Brocca S, Tramontano A, Alberghina L. Cloning and analysis of *Candida cylindracea* lipase sequences. *Gene* 1993;124(1):45-55.
48. van Pouderoyen G, Eggert T, Jaeger KE, Dijkstra BW. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme. *J Mol Biol* 2001;309(1):215-226.
49. Grochulski P, Li Y, Schrag JD, Bouthillier F, Smith P, Harrison D, Rubin B, Cygler M. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J Biol Chem* 1993;268(17):12843-12847.
50. Winkler FK, D'Arcy A, Hunziker W. Structure of human pancreatic lipase. *Nature* 1990;343(6260):771-774.
51. Derewenda ZS, Derewenda U. Relationships among serine hydrolases: evidence for a common structural motif in triacylglyceride lipases and esterases. *Biochem Cell Biol* 1991;69(12):842-851.
52. Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J, et al. The α/β hydrolase fold. *Protein Eng* 1992;5(3):197-211.
53. Nardini M, Dijkstra BW. α/β hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol* 1999;9(6):732-737.
54. Heikinheimo P, Goldman A, Jeffries C, Ollis DL. Of barn owls and bankers: a lush variety of α/β hydrolases. *Structure* 1999;7(6):R141-146.
55. Hulo N, Sigrist CJ, Le Saux V, Langendijk-Genevaux PS, Bordoli L, Gattiker A, De Castro E, Bucher P, Bairoch A. Recent improvements to the PROSITE database. *Nucleic Acids Res* 2004;32(Database issue):D134-137.
56. Schrag JD, Cygler M. Lipases and α/β hydrolase fold. In: Rubin B, Dennis EA, editors. *Lipases, Part A: Biotechnology*. Volume 284, *Methods Enzymol*: Academic Press; 1997. p 85-107.
57. Kazlauskas RJ. Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: prospects for predicting and engineering catalytic properties. *Trends Biotechnol* 1994;12(11):464-472.
58. Lang DA, Manesse ML, de Haas GH, Verheij HM, Dijkstra BW. Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Eur J Biochem* 1998;254(2):333-340.
59. Schrag JD, Li Y, Cygler M, Lang D, Burgdorf T, Hecht HJ, Schmid R, Schomburg D, Rydel TJ, Oliver JD, Strickland LC, Dunaway CM, Larson SB, Day J, McPherson A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure* 1997;5(2):187-202.
60. Noble ME, Cleasby A, Johnson LN, Egmond MR, Frenken LG. The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett* 1993;331(1-2):123-128.
61. Kim KK, Song HK, Shin DH, Hwang KY, Choe S, Yoo OJ, Suh SW. Crystal structure of carboxylesterase from *Pseudomonas fluorescens*, an α/β hydrolase with broad substrate specificity. *Structure* 1997;5(12):1571-1584.
62. Kim KK, Song HK, Shin DH, Hwang KY, Suh SW. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure* 1997;5(2):173-185.
63. Lang D, Hofmann B, Haalck L, Hecht HJ, Spener F, Schmid RD, Schomburg D. Crystal structure of a bacterial lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 refined at 1.6 Å resolution. *J Mol Biol* 1996;259(4):704-717.

-
64. Dartois V, Baulard A, Schanck K, Colson C. Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. *Biochim Biophys Acta* 1992;1131(3):253-260.
 65. Dartois V, Coppee JY, Colson C, Baulard A. Genetic analysis and overexpression of lipolytic activity in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 1994;60(5):1670-1673.
 66. Eggert T, Pencreac'h G, Douchet I, Verger R, Jaeger KE. A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase. *Eur J Biochem* 2000;267(21):6459-6469.
 67. Lesuisse E, Schanck K, Colson C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur J Biochem* 1993;216(1):155-160.
 68. Misset O, Gerritse G, Jaeger KE, Winkler U, Colson C, Schanck K, Lesuisse E, Dartois V, Blaauw M, Ransac S, et al. The structure-function relationship of the lipases from *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. *Protein Eng* 1994;7(4):523-529.
 69. Ransac S, Blaauw M, Lesuisse E, Schanck K, Colson C, Dijkstra BW. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a lipase from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 1994;238(5):857-859.
 70. Holwerda K, Verkade PE, de Willigen AHA. Vergleichende Untersuchungen über die Verseifungsgeschwindigkeit einiger einsäuriger Triglyceride unter Einfluss von Pankreasextrakt. *Rec Trav Chim Pays Bas* 1936;55:43-57.
 71. Schönheyder F, Volqvartz K. On the affinity of pig pancreas lipase for tricaproin in heterogeneous solution. *Acta Physiologica Scandinavica* 1945;9:57-67.
 72. Sarda L, Desnuelle P. Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. *Biochim Biophys Acta* 1958;30(3):513-521.
 73. Verger R, de Haas GH, Sarda L, Desnuelle. Purification from porcine pancreas of two molecular species with lipase activity. *Biochim Biophys Acta* 1969;188(2):272-282.
 74. Brady L, Brzozowski AM, Derewenda ZS, Dodson E, Dodson G, Tolley S, Turkenburg JP, Christiansen L, Hüge-Jensen B, Norskov L, et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 1990;343(6260):767-770.
 75. Grochulski P, Li Y, Schrag JD, Cygler M. Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Sci* 1994;3(1):82-91.
 76. Brzozowski AM, Derewenda U, Derewenda ZS, Dodson GG, Lawson DM, Turkenburg JP, Bjorkling F, Hüge-Jensen B, Patkar SA, Thim L. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* 1991;351(6326):491-494.
 77. Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* 1999;53:315-351.
 78. Hjorth A, Carriere F, Cudrey C, Woldike H, Boel E, Lawson DM, Ferrato F, Cambillau C, Dodson GG, Thim L, et al. A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in the guinea pig (phospho)lipase. *Biochemistry* 1993;32(18):4702-4707.
 79. Jaeger KE, Ransac S, Koch HB, Ferrato F, Dijkstra BW. Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* 1993;332(1-2):143-149.
 80. Thirstrup K, Verger R, Carriere F. Evidence for a pancreatic lipase subfamily with new kinetic properties. *Biochemistry* 1994;33(10):2748-2756.
 81. Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones TA. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 1994;2(4):293-308.
 82. Verger R. "Interfacial activation" of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol* 1997;15:32-38.

83. Dodson G, Wlodawer A. Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem Sci* 1998;23(9):347-352.
84. Longhi S, Manesse M, Verheij HM, De Haas GH, Egmond M, Knoop-Mouthuy E, Cambillau C. Crystal structure of cutinase covalently inhibited by a triglyceride analogue. *Protein Sci* 1997;6(2):275-286.
85. Egloff MP, Marguet F, Buono G, Verger R, Cambillau C, van Tilbeurgh H. The 2.46 Å resolution structure of the pancreatic lipase-colipase complex inhibited by a C11 alkyl phosphonate. *Biochemistry* 1995;34(9):2751-2762.
86. Derewenda U, Swenson L, Green R, Wei Y, Dodson GG, Yamaguchi S, Haas MJ, Derewenda ZS. An unusual buried polar cluster in a family of fungal lipases. *Nat Struct Biol* 1994;1(1):36-47.
87. Grochulski P, Bouthillier F, Kazlauskas RJ, Serreqi AN, Schrag JD, Ziomek E, Cygler M. Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase. *Biochemistry* 1994;33(12):3494-3500.
88. Verschueren KH, Seljee F, Rozeboom HJ, Kalk KH, Dijkstra BW. Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase. *Nature* 1993;363(6431):693-698.
89. Dominguez de Maria P, Sanchez-Montero JM, Sinisterra JV, Alcantara AR. Understanding *Candida rugosa* lipases: an overview. *Biotechnol Adv* 2006;24(2):180-196.
90. Dominguez de Maria P, Alcantara AR, Carballeira JD, de la Casa RM, Garcia-Burgos CA, Hernaiz MJ, Sanchez-Montero JM, Gago JVS. *Candida rugosa* Lipase: A Traditional and Complex Biocatalyst. *Curr Org Chem* 2006;10(10):1053-1066.
91. Herrera S. Industrial biotechnology-a chance at redemption. *Nat Biotechnol* 2004;22(6):671-675.
92. Ghanem A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* 2007;63:1721-1754.
93. Gupta MN, Roy I. Enzymes in organic media. Forms, functions and applications. *Eur J Biochem* 2004;271(13):2575-2583.
94. Reetz MT. Lipases as practical biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* 2002;6(2):145-150.
95. Bornscheuer UT, Bessler C, Srinivas R, Krishna SH. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends Biotechnol* 2002;20(10):433-437.
96. Jaeger KE, Reetz MT. Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. *Curr Opin Chem Biol* 2000;4(1):68-73.
97. Kragl U, Eckstein M, Kaftzik N. Enzyme catalysis in ionic liquids. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13(6):565-571.
98. Fox PF, McSweeney P, Cogan T, Guinee T. *Cheese: Chemistry, Physics & Microbiology*: Academic Press; 2004.
99. Schmid U, Bornscheuer UT, Soumanou MM, McNeill GP, Schmid RD. Highly selective synthesis of 1,3-oleoyl-2-palmitoylglycerol by lipase catalysis. *Biotechnol Bioeng* 1999;64(6):678-684.
100. Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* 1999;29 (Pt 2):119-131.
101. Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv* 2001;19(8):627-662.
102. Gadler P, Glueck SM, Kroutil W, Nestl BM, Larissegger-Schnell B, Ueberbacher BT, Wallner SR, Faber K. Biocatalytic approaches for the quantitative production of single stereoisomers from racemates. *Biochem Soc Trans* 2006;34(Pt 2):296-300.

-
103. Gotor-Fernandez V, Brieva R, Gotor V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *J Mol Catal B Enzym* 2006;40:111-120.
 104. Sakai T, Liu Y, Ohta H, Korenaga T, Ema T. Lipase-catalyzed resolution of (2R*,3S*)- and (2R*,3R*)-3-methyl-3-phenyl-2-aziridinemethanol at low temperatures and determination of the absolute configurations of the four stereoisomers. *J Org Chem* 2005;70(4):1369-1375.
 105. Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 2001;409(6817):258-268.
 106. Klibanov AM. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 2001;409(6817):241-246.
 107. Carrea G, Riva S. *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*. Weinheim: Wiley-VCH; 2008.
 108. Gandhi NN, Patil NS, Sawant SB, Joshi JB. Lipase-catalyzed Esterification. *Catal Rev - Sci Eng* 2000;42(4):439-480.
 109. Krishna SH, Karanth NG. Lipase and Lipase-catalyzed esterification reactions in non-aqueous media. *Catal Rev - Sci Eng* 2002;44(4):499-591.
 110. Klibanov A, Samokhin GP, Martinek K, Berezin IV. A new approach to preparative enzymatic synthesis. *Biotechnol Bioeng* 1977;19(9):1351-1361.
 111. Zaks A, Klibanov AM. The effect of water on enzyme action in organic media. *J Biol Chem* 1988;263(17):8017-8021.
 112. Zaks A, Klibanov AM. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J Biol Chem* 1988;263(7):3194-3201.
 113. Halling PJ. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb Technol* 1994;16(3):178-206.
 114. Khmelnitsky YL, Rich JO. Biocatalysis in nonaqueous solvents. *Curr Opin Chem Biol* 1999;3(1):47-53.
 115. Carrea G, Riva S. Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents. *Angew Chem Int Ed Engl* 2000;39(13):2226-2254.
 116. Halling P. Enzymic Conversions in Organic and Other Low-Water Media. In: Drauz K, Waldmann H, editors. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2002. p 259-285.
 117. Halling PJ. What can we learn by studying enzymes in non-aqueous media? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004;359(1448):1287-1296; discussion 1296-1287, 1323-1288.
 118. Hudson EP, Eppler RK, Clark DS. Biocatalysis in semi-aqueous and nearly anhydrous conditions. *Curr Opin Biotechnol* 2005;16(6):637-643.
 119. Serdakowski AL, Dordick JS. Activating Enzymes for Use in Organic Solvents. In: Carrea G, Riva S, editors. *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2008. p 47-71.
 120. Cao L. *Carrier-bound Immobilized Enzymes*. Weinheim: Wiley-VCH; 2005.
 121. St. Clair NL, Navia MA. Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *J Am Chem Soc* 1992;114:7314-7316.
 122. Cao L, van Rantwijk F, Sheldon RA. Cross-linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Org Lett* 2000;2(10):1361-1364.
 123. Brown DL, Glatz CE. Aggregate breakage in protein precipitation. *Chem Eng Sci* 1987;7:1831-1839.
 124. Faber K. *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook* Berlin: Springer; 2004.

-
125. Dordick JS. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme Microb Technol* 1989;11(4):194-211.
 126. Cotterill IC, Sutherland AG, S.M. R, Grobbauer R, Spreitz J, Faber K. Enzymatic resolution of sterically demanding bicyclo[3.2.0]heptanes: evidence for a novel hydrolase in crude porcine pancreatic lipase and the advantages of using organic media for some of the biotransformations. *J Chem Soc, Perkin Trans* 1991;1:1365-1368.
 127. Yamamoto Y, Yamamoto K, Nishioka T, Oda J. Asymmetric Synthesis of Optically Active Lactones from Cyclic Acid Anhydrides Using Lipase in Organic Solvents. *Agric Biol Chem* 1988;52(12):3087-3092.
 128. Kazandjian RZ, Klivanov AM. Regioselective oxidation of phenols catalyzed by polyphenol oxidase in chloroform. *J Am Chem Soc* 1985;107(19):5448-5450.
 129. Wang YF, Chen ST, Liu KKC, Wong CH. Lipase-catalyzed irreversible transesterification using enol esters: Resolution of cyanohydrins and syntheses of ethyl (R)-2-hydroxy-4-phenylbutyrate and (S)-propranolol. *Tetrahedron Lett* 1989;30(15):1917-1920.
 130. Laumen K, Seemayer R, Schneider MP. Enzymic preparation of enantiomerically pure cyclohexanols: ester synthesis by irreversible acyl transfer. *J Chem Soc, Chem Commun* 1990(1):49.
 131. Okumura S, Iwai M, Tsujisaka Y. Synthesis of various kinds of esters by four microbial lipases. *Biochim Biophys Acta* 1979;575(1):156-165.
 132. Aldercreutz P, Mattiasson B. Aspects Of Biocatalyst Stability In Organic Solvents *Biocat Biotrans* 1987;1(2):99-108.
 133. Noel M, Combes D. Effects of temperature and pressure on *Rhizomucor miehei* lipase stability. *J Biotechnol* 2003;102(1):23-32.
 134. Zaks A, Klivanov AM. Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C. *Science* 1984;224(4654):1249-1251.
 135. Rupley HA, Gratton E, Careri G. Water and globular proteins. *Trends Biochem Sci* 1983;8(1):18-22.
 136. Russell AJ, Klivanov AM. Inhibitor-induced enzyme activation in organic solvents. *J Biol Chem* 1988;263(24):11624-11626.
 137. Gaertner H, Puigserver A. Kinetics and specificity of serine proteases in peptide synthesis catalyzed in organic solvents. *Eur J Biochem* 1989;181(1):207-213.
 138. Ferjancic A, Puigserver A, Gaertner H. Subtilisin-catalysed peptide synthesis and transesterification in organic solvents. *Appl Microbiol Biotechnol* 1990;32(6):651-657.
 139. Högberg HE. Exploiting Enantioselectivity of Hydrolases in Organic Solvents. In: Carrea G, Riva S, editors. *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2008. p 75-112.
 140. Riva S. Exploiting Enzyme Chemoselectivity and Regioselectivity. In: Carrea G, Riva S, editors. *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2008. p 145-168.
 141. Ryu K, Dordick JS. How do organic solvents affect peroxidase structure and function? *Biochemistry* 1992;31(9):2588-2598.
 142. Singer SJ. The Properties of Proteins in Nonaqueous Solvents. *Adv Protein Chem* 1963;17:1-68.
 143. Chin JT, Wheeler SL, Klivanov AM. On protein solubility in organic solvent. *Biotechnol Bioeng* 1994;44(1):140-145.
 144. Laane C, Boeren S, Vos K, Veeger C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol Bioeng* 1987;30(1):81-87.

-
145. Gorman LA, Dordick JS. Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnol Bioeng* 1992;39(4):392-397.
 146. Adachi S, Kobayashi T. Synthesis of esters by immobilized-lipase-catalyzed condensation reaction of sugars and fatty acids in water-miscible organic solvent. *J Biosci Bioeng* 2005;99(2):87-94.
 147. Soo EL, Salleh AB, Basri M, Zaliha Raja Abdul Rahman RN, Kamaruddin K. Optimization of the enzyme-catalyzed synthesis of amino acid-based surfactants from palm oil fractions. *J Biosci Bioeng* 2003;95(4):361-367.
 148. Adlercreutz P. Fundamentals of Biocatalysis in Neat Organic Solvents. In: Carrea G, Riva S, editors. *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2008. p 3-24.
 149. Cantarella M, Cantarella L, Alfani F. Hydrolytic reactions in two-phase systems. Effect of water-immiscible organic solvents on stability and activity of acid phosphatase, beta-glucosidase, and beta-fructofuranosidase. *Enzyme Microb Technol* 1991;13(7):547-553.
 150. Goderis HL, Ampe G, Feyten MP, Fouwe BL, Guffens WM, Van Cauwenbergh SM, Tobback PP. Lipase-catalyzed ester exchange reactions in organic media with controlled humidity. *Biotechnol Bioeng* 1987;30(2):258-266.
 151. Valivety RH, Halling PJ, Macrae AR. Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents. *Biochim Biophys Acta* 1992;1118(3):218-222.
 152. Valivety RH, Halling PJ, Peilow AD, Macrae AR. Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity. *Biochim Biophys Acta* 1992;1122(2):143-146.
 153. Bell G, Janssen AEM, Halling PJ. Water activity fails to predict critical hydration level for enzyme activity in polar organic solvents: Interconversion of water concentrations and activities. *Enzyme Microb Technol* 1997;20:471-477.
 154. Klibanov AM. Enzyme memory. What is remembered and why? *Nature* 1995;374(6523):596.
 155. Zaks A, Klibanov AM. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82(10):3192-3196.
 156. Costantino HR, Griebenow K, Langer R, Klibanov AM. On the pH memory of lyophilized compounds containing protein functional groups. *Biotechnol Bioeng* 1997;53(3):345-348.
 157. Pollard D, Kosjek B. Industrial - Scale Applications of Enzymes in Non - Aqueous Solvents. In: Carrea G, Riva S, editors. *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*. Weinheim: Wiley-VCH; 2008. p 169-188.
 158. Straathof AJJ. Quantitative Analysis of Industrial Biotransformations. In: Liese A, Seelbach K, Wandrey C, editors. *Industrial Biotransformations*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2006. p 515-520.
 159. Yamada H, Kobayashi M. Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996;60(9):1391-1400.
 160. Chassin C. A biotechnological process for the production of nicotinamide. *Chim Oggi* 1996;14:9-12.
 161. Cheetham PSJ. Case studies in the application of biocatalysts for the production of (bio)chemicals. In: Straathof AJ, Adlercreutz P, editors. *Applied Biocatalysis*. 2nd ed: Harwood Academic Publishers; 2000. p 93-153.
 162. Breuer M, Ditrich K, Habicher T, Hauer B, Kessler M, Sturmer R, Zelinski T. Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew Chem Int Ed Engl* 2004;43(7):788-824.
 163. Yazbeck DR, Martinez CA, Hu S, Tao J. Challenges in the development of an efficient enzymatic process in the pharmaceutical industry *Tetrahedron Asymm* 2004;15(18):2757-2763.

-
164. Balkenhohl F, Hauer B, Ladner W, Schnell U, Pressler U, Staudenmaier HR; BASF AG, DE 4329293 A1, assignee. Lipase katalysierte Acylierung von Alkoholen mit Diketenen. 1995.
165. Patel RN. Enantioselective enzymatic acetylation of racemic [4-[4 α ,6 β (E)]]-6-[4,4-bis(4-fluorophenyl)]-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)-1,3-butadienyl]-tetrahydro-4-hydroxy-2H-pyran-2-one. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992;38:56-60.
166. Morgan B, Stockwell BR, Dodds DR, Andrews DR, Sudhakar AR, Nielsen CM, Mergelsberg I, Zumbach A. Chemoenzymatic approaches to SCH 56592, a new azole antifungal. *J Am Oil Chem Soc* 1997;74:1361-1370.
167. Turner NJ, Winterman JR, McCague R, Parratt JS, Taylor SJC. Synthesis of homochiral L-(S)-tert-leucine via a lipase catalysed dynamic resolution process. *Tetrahedron Lett* 1995;36:1113-1116.
168. Stead P, Marley H, Mahmoudian M, Webb G, Noble D, Ip YT, Piga E, Rossi T, Roberts S. Efficient procedures for the large-scale preparation of (1S,2S)-trans-2-methoxycyclohexanol, a key chiral intermediate in the synthesis of tricyclic β -lactam antibiotics. *Tetrahedron Asymm* 1996;7(8):2247-2250.
169. McCrae AR, Roehl E-L, Brand HM. Bio-Ester – Bio-Esters. *Seifen-Öle-Fette-Wachse* 1990;116(6):201-205.
170. Goswami A, Howell JM, Hua EY, K.D. M, Soumeillant MC, Swaminathan S, Qian X, Quiroz FA, Vu TC, Wang X, Zheng B, Kronenthal DR, Patel RN. Chemical and enzymatic resolution of (R,S)-N-(tert-butoxycarbonyl)-3-hydroxymethylpiperidine. *Org Proc Res Dev* 2001;5:415-420.
171. Langrand G, Barattia J, Buono G, Triantaphylides C. Lipase catalyzed reactions and strategy for alcohol resolution. *Tetrahedron Lett* 1986;27(1):29-32.
172. Björkling F, Godtfredsen SE, Kirk O. A highly selective enzyme-catalysed esterification of simple glucosides. *J Chem Soc, Chem Commun* 1989;14:934-935.
173. Bloomer S, Adlercreutz P, Mattiasson B. Facile synthesis of fatty acid esters in high yields. *Enzyme Microb Technol* 1992;14(7):546-552.
174. Bell G, Blain JA, Paterson JDE, Shaw CEL, Todd RJ. Ester and glyceride synthesis by *Rhizopus arrhizus* mycelia. *FEMS Microbiol Lett* 1978;3(4):223-225.
175. Paterson JDE, Blain JA, Shaw CEL, Todd RJ. Synthesis of glycerides and esters by fungal cell-bound enzymes in continuous reactor systems. *Biotechnol Lett* 1979;1(5):211-216.
176. Kvittingen L, Sjursnes B, Halling P, Anthonsen T. Mixing conditions for enzyme catalysis in organic solvents. *Tetrahedron* 1992;48(13):2793-2802.
177. Mischitz M, Pöschl U, Faber K. Limitations of enzymatic acylation using oxime esters: Cosubstrate inhibition and the reversibility of the reaction. *Biotechnol Lett* 1991;13(9):653-656.
178. Kirchner G, Scollar MP, Klivanov AM. Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. *J Am Chem Soc* 1985;107(24):7072-7076.
179. Ghogare A, Kumar KS. Oxime esters as novel irreversible acyl transfer agents for lipase catalysis in organic media. *J Chem Soc, Chem Commun* 1989;20:1533-1535.
180. Degueil-Castaing M, de Jeso B, Drouillard S, Maillard B. Enzymatic reactions in organic synthesis: 2-ester interchange of vinyl esters. *Tetrahedron Lett* 1987;28(9):953-954.
181. Wang YF, Wong CH. Lipase-catalyzed irreversible transesterification for preparative synthesis of chiral glycerol derivatives. *J Org Chem* 1988;53(13):3127-3129.
182. Berger B, Faber K. 'Immunization' of Lipase against Acetaldehyde emerging in Acyl Transfer Reactions from Vinyl Acetate. *J Chem Soc, Chem Commun* 1991(17):1198-1200.

-
183. Seidler NW. Carbonyl-Induced Enzyme Inhibition: Mechanisms and New Perspectives *Curr Enzyme Inhib* 2005;1(1):21-27.
 184. Hsu SH, Wu SS, Wang YF, Wong CH. Lipase-catalyzed irreversible transesterification using enol esters: XAD-8 immobilized lipoprotein lipase-catalyzed resolution of secondary alcohols. *Tetrahedron Lett* 1990;31(44):6403-6406.
 185. Margolin AL, Delinck DL, Whalon MR. Enzyme-catalyzed regioselective acylation of castanospermine. *J Am Chem Soc* 1990;112(8):2849-2854.
 186. Holla EW. Enzymatic Synthesis of Selectively Protected Glycols. *Angew Chem Int Ed* 1989;28(2):220-221.
 187. Ader U, Breitgoff D, Klein P, Laumen KE, Schneider MP. Enzymatic ester hydrolysis and synthesis - two approaches to cycloalkane derivatives of high enantiomeric purity. *Tetrahedron Lett* 1989;30(14):1793-1796.
 188. Ledl F, Schleicher E. New Aspects of the Maillard Reaction in Foods and in the Human Body *Angew Chem Int Ed* 1990;29(6):565-594.
 189. Donohue TM, Tuma DJ, Sorrell MF. Acetaldehyde adducts with proteins: Binding of [¹⁴C]acetaldehyde to serum albumin. *Arch Biochem Biophys* 1983;220(1):239-246.
 190. Weber HK, Stecher H, Faber K. Sensitivity of microbial lipases to acetaldehyde formed by acyl-transfer reactions from vinyl esters. *Biotechnol Lett* 1995;17(8):803-808.
 191. Weber HK, Zuegg J, Faber K, Pleiss J. Molecular reasons for lipase-sensitivity against acetaldehyde. *J Mol Catal B: Enzym* 1997;3(1-4):131-138.
 192. Kaga H, Siegmund B, Neufellner E, Faber K. Stabilization of *Candida rugosa* Lipase against Acetaldehyde by Adsorption onto Celite. *Biotechnol Tech* 1994;8(6):369-374.
 193. Weber HK, Faber K. Stabilization of Lipases against Deactivation by Acetaldehyde Formed in Acyl Transfer Reactions. In: Rubin B, Dennis EA, editors. *Lipases (Part B: Enzyme Characterization and Utilization)*. Volume 286, *Meth Enzymol*: Academic Press; 1997. p 509-518.
 194. Ricci A. *Amino Group Chemistry. From Synthesis to the Life Sciences*. Weinheim: Wiley-VCH; 2008.
 195. Wells A. What Is in a Biocatalyst? *Org Process Res Dev* 2006;10:678-681.
 196. Bjurlin MA, Bloomer S. Proteolytic Activity in Commercial Triacylglycerol Hydrolase Preparations. *Biocatal Biotransfor* 2002;20(3):179-188.
 197. Bjurlin MA, Bloomer S, Haas MJ. Composition and Activity of Commercial Triacylglycerol Acylhydrolase Preparations. *J Am Oil Chem Soc* 2001;78(2):153-160.
 198. Bjurlin MA, Bloomer S, Haas MJ. Identification of carboxylesterase activities of commercial triacylglycerol hydrolase (lipase) preparations. *Eur J Lipid Sci Technol* 2002;104:143-155.
 199. Diczfalusy MA, Alexson SE. Isolation and characterization of novel long-chain acyl-CoA thioesterase/carboxylesterase isoenzymes from *Candida rugosa*. *Arch Biochem Biophys* 1996;334(1):104-112.
 200. Yamane T. Biocatalyses in Microaqueous Organic Media. In: Hou CT, editor. *Handbook Of Industrial Biocatalysis*. 1st ed: CRC Press; 2005.
 201. Dominguez de Maria P, Gago JVS. Causes of Unreproducibility of *C. rugosa* Lipase-catalyzed Reactions in Slightly Hydrated Organic Media. *Tetrahedron* 1999;55(28):8555-8566.

-
202. Detry J, Rosenbaum T, Lütz S, Hahn D, Jäger KE, Müller M, Eggert T. Biocatalytic production of enantiopure cyclohexane-trans-1,2-diol using extracellular lipases from *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;72(6):1107-1116.
 203. Sambrook J, MacCallum P, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
 204. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979;7(6):1513-1523.
 205. Kunkel TA. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82(2):488-492.
 206. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983;166(4):557-580.
 207. Fieschko JC. Fermentation technology using recombinant Microorganisms. In: Rehm HJ, Reed G, editors. *Biotechnology. Volume 7b: VCH Verlagsgesellschaft*; 1989. p 117-140.
 208. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
 209. Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 1975;258(5536):598-599.
 210. Tawfik DS. Amidination of Lysine Side Chains. In: Walker JM, editor. *The Protein Protocols Handbook*. 2nd ed. Totowa, N.J.: Humana Press; 2002. p 479-480.
 211. Winkler UK, Stuckmann M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 1979;138(3):663-670.
 212. Fields R, Dixon HB. Micro method for determination of reactive carbonyl groups in proteins and peptides, using 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Biochem J* 1971;121(4):587-589.
 213. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977;83(2):346-356.
 214. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-685.
 215. Kang D, Gho YS, Shu M, Kang C. Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc* 2002;23(11):1511-1512.
 216. Li H, Robertson AD, Jensen JH. Very Fast Empirical Prediction and Interpretation of Protein pK_a Values. *Proteins* 2005;61(4):704-721.
 217. Oetjen GW, Haseley P. *Freeze-Drying*. Weinheim: Wiley-VCH; 2004.
 218. Jennewein S, Schurmann M, Wolberg M, Hilker I, Luiten R, Wubbolts M, Mink D. Directed evolution of an industrial biocatalyst: 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolase. *Biotechnol J* 2006;1(5):537-548.
 219. Di Lorenzo M, Hidalgo A, Molina R, Hermoso JA, Pirozzi D, Bornscheuer UT. Enhancement of the stability of a prolipase from *Rhizopus oryzae* toward aldehydes by saturation mutagenesis. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(22):7291-7299.
 220. Dumon-Seignovert L, Cariot G, Vuillard L. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expression and Purif* 2004;37:203-206.

-
221. Gellissen G. Production of Recombinant Proteins. Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems. Weinheim: Wiley-VCH; 2005.
222. Balbás P, Lorence A. Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols. Totowa: Humana Press; 2004.
223. Robertson DE, Neal JP. Protein Engineering. Abelson JN, Simon MI, editors: Elsevier Academic Press; 2004.
224. Metz B, Kersten GF, Baart GJ, de Jong A, Meiring H, ten Hove J, van Steenbergen MJ, Hennink WE, Crommelin DJ, Jiskoot W. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with insulin. *Bioconjug Chem* 2006;17(3):815-822.
225. Metz B, Kersten GF, Hoogerhout P, Brugghe HF, Timmermans HA, de Jong A, Meiring H, ten Hove J, Hennink WE, Crommelin DJ, Jiskoot W. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J Biol Chem* 2004;279(8):6235-6243.
226. Alves VS, Pimenta DC, Sattlegger E, Castilho BA. Biophysical characterization of Gir2, a highly acidic protein of *Saccharomyces cerevisiae* with anomalous electrophoretic behavior. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314(1):229-234.
227. Garcia-Ortega L, Rios VD, Martinez-Ruiz A, Onaderra M, Lacadena J, del Pozo AM, Gavilanes JD. Anomalous electrophoretic behavior of a very acidic protein: Ribonuclease U2. *Electrophoresis* 2005;26(18):3407-3413.
228. Griffith IP. The effect of cross-links on the mobility of proteins in dodecyl sulphate-polyacrylamide gels. *Biochem J* 1972;126(3):553-560.
229. Liou YC, Marangoni AG, Yada RY. Aggregation behavior of *Candida rugosa* lipase. *Food Res Int* 1998;31(3):243-248.
230. Fernández-Lorente G, Palomo JS, Fuentes M, Mateo C, Guisán JM, Fernández-Lafuente R. Self-assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. *Biotechnol Bioeng* 2003;82(2):232-237.
231. Stuer W, Jaeger KE, Winkler UK. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1986;168(3):1070-1074.
232. Tyski S, Hryniewicz W, Jeljaszewicz J. Purification and some properties of the *staphylococcal* extracellular lipase. *Biochim Biophys Acta* 1983;749(3):312-317.
233. Acharya P, Rao NM. Stability studies on a lipase from *Bacillus subtilis* in guanidinium chloride. *J Protein Chem* 2003;22(1):51-60.
234. Rajakumara E, Acharya P, Ahmad S, Sankaranaryanan R, Rao NM. Structural basis for the remarkable stability of *Bacillus subtilis* lipase (Lip A) at low pH. *Biochim Biophys Acta* 2008;1784(2):302-311.
235. Frieden C. Protein aggregation processes: In search of the mechanism. *Protein Sci* 2007;16(11):2334-2344.
236. Bruice PY. Organic Chemistry: Prentice Hall; 2007.
237. Noziere B, Cordova A. A kinetic and mechanistic study of the amino acid catalyzed aldol condensation of acetaldehyde in aqueous and salt solutions. *J Phys Chem A* 2008;112(13):2827-2837.
238. Nozière B, Dziedzic P, Córdoba A. Formation of secondary light-absorbing "fulvic-like" oligomers: A common process in aqueous and ionic atmospheric particles? *Geophys Res Lett* 2007;34:L21812.
239. Baigrie LM, Cox RA, Slebocka-Tilk H, Tencer M, Tidwell TT. Acid-catalyzed enolization and aldol condensation of acetaldehyde. *J Am Chem Soc* 1985;107(12):3640-3645.

-
240. Esteve W, Noziere B. Uptake and reaction kinetics of acetone, 2-butanone, 2,4-pentanedione, and acetaldehyde in sulfuric acid solutions. *J Phys Chem A* 2005;109(48):10920-10928.
241. Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-Hydroxnonenal: A Membrane Lipid Oxidation Product of Medicinal Interest. *Med Res Rev* 2008;28(4):569-631.
242. Ichihashi K, Osawa T, Toyokuni S, Uchida K. Endogenous formation of protein adducts with carcinogenic aldehydes: implications for oxidative stress. *J Biol Chem* 2001;276(26):23903-23913.
243. Sayre LM, Lin D, Yuan Q, Zhu X, Tang X. Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one. *Drug Metab Rev* 2006;38(4):651-675.
244. Lundblad RL. *Chemical Reagents for Protein Modification*: CRC Press; 2004.

ANHANG

Mathematische Formeln für den pNPP-Test

Formel zur Berechnung der lipolytischen Aktivität nach spektrophotometrischer Bestimmung mit dem Substrat *para*-Nitrophenylpalmitat (pNPP):

$$A \left[\frac{\text{mol}}{\text{l} * \text{min}} \right] = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta E * V_{ges}}{\epsilon_{pNPP} * d * V_{Probe} * t}$$

Eine Lipaseeinheit U ist definiert als die Enzymmenge, die ein μmol *para*-Nitrophenylpalmitat in 1 min bei 37 °C und pH 8,0 (pNPP-Emulsion, 3.9.2) freisetzt. Daher gilt:

$$A \left[\frac{U}{\text{mL}} \right] = \frac{\Delta E * V_{ges}}{\epsilon_{pNPP} * d * V_{Probe} * t} * 1000$$

Henderson-Hasselbalch-Gleichung

Zur Berechnung des Verhältnisses von deprotonierten ($-\text{NH}_2$) zu protonierten ϵ -Aminogruppen ($\epsilon\text{-NH}_3^+$) nach der Lyophilisierung bei pH 6 bzw. pH 10, wurde die Henderson-Hasselbalch-Gleichung wie folgt angewendet:

$$\text{pH} = \text{pK}_s + \log_{10} \frac{c(\epsilon - \text{NH}_2)}{c(\epsilon - \text{NH}_3^+)}$$

$$\Leftrightarrow 10^{\text{pH} - \text{pK}_s} = \frac{c(\epsilon - \text{NH}_2)}{c(\epsilon - \text{NH}_3^+)}$$

Primersequenzen

Für die Substitution jedes einzelnen Lysinrestes aus BSL-B mittels QuickChange®-PCR (3.3.2) wurden folgende Oligonukleotid-Primer verwendet. Die jeweiligen Primerpaare (z.B. *lipB*-K25R-fw und *lipB*-K25A-fw) unterschieden sich dabei lediglich in der Sequenz des Mutagenesecodons (rot).

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3'-Richtung)
<i>lipB</i> -K25R-fw <i>lipB</i> -K25A-fw	CAA CTT TTT CGC TAT TCG CAA CTA CTT AAT TTC T GC A
<i>lipB</i> -K25R-rev <i>lipB</i> -K25A-rev	AGA AAT TAA GTA GTT GCG AAT AGC GAA AAA GTT G TGC
<i>lipB</i> -K37R-fw <i>lipB</i> -K37A-fw	GGC TGG CAA AGC AAC CGC CTG TAC GCA ATT GAT GCA
<i>lipB</i> -K37R-rev <i>lipB</i> -K37A-rev	ATC AAT TGC GTA CAG GCG GTT GCT TTG CCA GCC TGC
<i>lipB</i> -K46R-fw <i>lipB</i> -K46A-fw	CAA TTG ATT TTT ATG ATC GCA CAG GAA ACA ACC TA G CA
<i>lipB</i> -K46R-rev <i>lipB</i> -K46A-rev	TAG GTT GTT TCC TGT GCG ATC ATA AAA ATC AAT TG TGC
<i>lipB</i> -K66R-fw <i>lipB</i> -K66A-fw	GTT GAC CGT GTT TTA CGC GAG ACT GGG GCA AAA GCA
<i>lipB</i> -K66R-rev <i>lipB</i> -K66A-rev	TTT TGC CCC AGT CTC GCG TAA AAC ACG GTC AAC TGC
<i>lipB</i> -K71R-fw <i>lipB</i> -K71A-fw	GTT TTA AAA GAG ACT GGG GCA CGC AAA GTA GAT ATT GTG GCA
<i>lipB</i> -K71R-rev <i>lipB</i> -K71A-rev	CAC AAT ATC TAC TTT GCG TGC CCC AGT CTC TTT TAA AAC TGC
<i>lipB</i> -K72R-fw <i>lipB</i> -K72A-fw	GAG ACT GGG GCA AAA CGC GTA GAT ATT GTG GCT GCA
<i>lipB</i> -K72R-rev <i>lipB</i> -K72A-rev	AGC CAC AAT ATC TAC GCG TTT TGC CCC AGT CTC TGC
<i>lipB</i> -K90R-fw <i>lipB</i> -K90A-fw	CAA TAC GCT GTA CTA TAT TCG CTA TTT AGG CGG GGG C GC A
<i>lipB</i> -K90R-rev <i>lipB</i> -K90A-rev	GCC CCC GCC TAA ATA GCG AAT ATA GTA CAG CGT ATT G TGC
<i>lipB</i> -K97R-fw <i>lipB</i> -K97A-fw	TTA GGC GGG GGC AAT GCG ATT CAA AAT GTC G TGC
<i>lipB</i> -K97R-rev <i>lipB</i> -K97A-rev	CGA CAT TTT GAA TCG CAT TGC CCC CGC CTA A GC A
<i>lipB</i> -K124R-fw <i>lipB</i> -K124A-fw	ACA GAC CCT AAT CAA GCG ATC CTC TAT ACA TC TGC
<i>lipB</i> -K124R-rev <i>lipB</i> -K124A-rev	GAT GTA TAG AGG ATC GCT TGA TTA GGG TCT GT G CA
<i>lipB</i> -K172R-fw <i>lipB</i> -K172A-fw	TGA ACG GCT ATA TCA GCG AAG GGC TGA ATG G TGC
<i>lipB</i> -K172R-rev <i>lipB</i> -K172A-rev	CCA TTC AGC CCT TCG CTG ATA TAG CCG TTC A GC A

Berechnete pK_s-Werte der ε-Aminogruppen in LipasenTabelle 1: Berechnete pK_s-Werte lösungsmittelzugänglicher ε-Aminogruppen sämtlicher Lipasen, deren Strukturen aufgeklärt wurden.

Organismus [↓]	pdb ID [†]	pK _s -min [‡]	pK _s -max [§]
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	1ji3	9.73	10.5
	1ku0	9.94	10.5
<i>Bacillus subtilis</i>	1i6w	9.87	10.5
	1isp*	9.8	10.5
	1r4z	9.87	10.5
	1r50	9.66	10.5
	1t2n	9.8	10.5
	1t4m	9.73	10.5
<i>Bos taurus</i>	1akn	9.59	10.5
<i>Burkholderia cepacia</i>	1hqd	10.29	10.5
	1oil	10.08	10.43
	1ys1	10.08	10.5
	1ys2	10.08	10.5
	2lip	10.08	10.5
	3lip	10.08	10.5
	4lip	10.01	10.5
	5lip	10.08	10.5
	1cvl	10.15	10.5
	1qge	10.15	10.5
	1tah	9.94	10.5
	2es4	10.01	10.5
<i>Candida antarctica</i>	1lbs	9.8	10.5
	1lbt	9.8	10.36
	1tca	9.87	10.5
	1tcb	9.8	10.43
	1tcc	9.73	10.5
<i>Candida rugosa</i>	1crl	9.45	10.5
	1gz7	9.38	10.5
	1lff	9.87	10.5
	1lpm	9.31	10.5
	1lpn	9.52	10.5
	1lpo	9.45	10.5
	1lpp	9.52	10.5
	1lps	9.52	10.5
1trh	9.59	10.5	
<i>Canis familiaris</i>	1k8q	9.8	10.5
	1rp1	10.08	10.5
<i>Equus caballus</i>	1hpl	9.8	10.5

<i>Fusarium solani pisi</i>	1cua	9.66	10.5
	1cub	9.73	10.5
	1cuc	9.73	10.5
	1cud	9.87	10.5
	1cue	9.66	10.5
	1cuf	9.66	10.5
	1cug	9.66	10.5
	1cuh	9.73	10.36
	1cuj	9.66	10.5
	1cuu	9.66	10.5
	1cuv	9.8	10.43
	1cuw	9.52	10.43
	1cux	9.66	10.5
	1cuy	9.66	10.5
	1cuz	9.66	10.5
	1ffa	9.73	10.5
	1ffb	9.73	10.5
	1ffc	9.73	10.5
1ffd	9.66	10.5	
1ffe	9.59	10.5	
<i>Geobacillus zalihae</i>	2dsn	9.94	10.5
	2z5g	9.8	10.5
<i>Geotrichum candidum</i>	1thg	9.66	10.5
<i>Homo sapiens</i>	1f6w	9.38	10.5
	1gpl	9.87	10.5
	1hlg	9.94	10.5
	1jmy	9.45	10.5
	1lpa	9.73	10.5
	1lpb	9.94	10.5
	1n8s	9.87	10.5
	2oxe	9.87	10.5
	2ppl	9.8	10.5
	<i>Penicillium camembertii</i> [#]	1tia	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1ex9	9.73	10.5
<i>Pseudomonas mendocina</i>	2fx5	10.43	10.43
<i>Pseudomonas sp. MIS38</i>	2z8x	10.15	10.5
	2z8z	10.15	10.5
<i>Rattus norvegicus</i>	1bu8	9.59	10.5
<i>Rhizomucor miehei</i> [#]	1tgl	-	-
	3tgl	10.15	10.5
	4tgl	10.15	10.5
	5tgl	-	-
<i>Rhizopus niveus</i>	1lgy	10.15	10.5
<i>Rhizopus oryzae</i>[#]	1tic	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	2qua	9.94	10.5
	2qub	9.87	10.5
<i>Staphylococcus hyicus</i>	2hih	9.8	10.5
<i>Sus scrofa</i>	1eth	8.96	12.55

<i>Thermomyces lanuginosus</i>	1dt3	10.08	10.43
	1dt5	9.87	10.36
	1dte	10.22	10.5
	1du4	9.94	10.5
	1ein	9.66	10.5
	1gt6	10.22	10.5
	1tib	10.29	10.5
Arithmetisches Mittel (durchschnittlicher pK _s -Wert der Lysin ε-Aminogruppen)		9.82	10.51
		10.17	

↓: Lipasen, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind durch Fettdruck hervorgehoben; †: Die Strukturkoordinaten der Lipasen stammen aus der Brookhaven Proteinstrukturdatenbank (www.pdb.org); ‡: niedrigster pK_s-Wert der Lysin ε-Aminogruppen der jeweiligen Lipase; §: höchster pK_s-Wert der Lysin ε-Aminogruppen der jeweiligen Lipase. Sämtliche pK_s-Werte wurden mit dem *PROPKA web interface 2.0* (<http://propka.ki.ku.dk/~drogers/>) berechnet; *: Die Struktur der BSL-B wurde auf Basis der dreidimensionalen Struktur der BSL-A (1isp) modelliert. Für dieses Homologiemodell berechnet das *PROPKA web interface 2.0* einen pK_s-min von 9,87 und einen pK_s-max von 10,5; #: Da die pdb-Datei lediglich die Koordinaten der C_α-Atome des Peptidrückgrats enthält, konnten für diese Lipasen keine pK_s-Werte berechnet werden. Die pK_s-Werte der ε-Aminogruppen der *R. oryzae* Lipase (1tic) konnten anhand der Strukturdaten der *R. niveus* Lipase (1lgy) berechnet werden, da sich beide Lipasen lediglich durch eine Aminosäuresubstitution (M1A) in der Prosequenz unterscheiden²¹⁹.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Erkrath, 01.10.2008

Benjamin Franken