

Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren zur Synthese von chiralen Alkoholen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Andrea Weckbecker
aus Mayen

Jülich, 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Referent: Prof. Dr. Werner Hummel
Korreferent: Prof. Dr. Manfred Braun

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Januar 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2000 bis November 2004 am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Prof. Dr. W. Hummel durchgeführt.

Die Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU) unterstützte Teile dieser Arbeit im Rahmen des Verbundprojekts Biokatalyse.

Der Inhalt der vorliegenden Arbeit wurde bereits teilweise in Form von Publikationen zusammengefasst:

Weckbecker, A., Hummel, W.

Glucose Dehydrogenase for the Regeneration of NADH and NADPH

in: Methods in Biotechnology (Barredo Fuente, J. L., ed.)

Humana Press (in press)

Weckbecker, A., Schneider, F., Hummel, W.

Cloning, sequence analysis and heterologous expression of the gene encoding an (*R*)-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir* DSM 20587

Appl. Microbiol. Biotechnol. (eingereicht)

Weckbecker, A., Hummel, W.

Enzyme-catalyzed regeneration of nicotinamide coenzymes

Enzyme Microb. Technol. (eingereicht)

Weckbecker, A., Hummel, W.

Improved synthesis of chiral alcohols with *Escherichia coli* cells co-expressing pyridine nucleotide transhydrogenase, NADP⁺-dependent alcohol dehydrogenase and NAD⁺-dependent formate dehydrogenase

Biotechnol. Lett. 26: 1739-1744, 2004.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1. Chirale Alkohole	1
1.1 Darstellung chiraler Alkohole auf chemischem Wege.....	2
1.2 Darstellung chiraler Alkohole auf biokatalytischem Wege	6
2. Alkohol-Dehydrogenasen.....	10
3. Regenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren	13
4. Motivation und Zielsetzung	16
Material und Methoden.....	18
1. Material	18
1.1 Geräte.....	18
1.2 Chemikalien.....	19
1.3 Mikroorganismen	19
1.4 Vektoren	20
2. Mikrobiologische Methoden.....	20
2.1 Anzucht und Medien	20
2.2 Expression der Gene	21
2.3 Konservierung der Bakterienstämme	22
3. Biochemische Methoden.....	22
3.1 Gewinnung von Rohextrakten.....	22
3.1.1 Zellaufschluss im analytischen Maßstab.....	22
3.1.1.1 Zellaufschluss mittels Schwingmühle	22
3.1.1.2 Zellaufschluss mittels Ultraschall.....	23
3.1.2 Zellaufschluss für größere Volumina.....	23
3.2 Chromatographische Methoden.....	23
3.2.1 Anionenaustausch-Chromatographie.....	23
3.2.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie	24
3.2.3 Hydroxylapatitchromatographie	24
3.2.4 Gelfiltration	24
3.2.5 Affinitätschromatographie	24
3.2.6 Entsalzen und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen	25
3.3 Analytische Methoden.....	25
3.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford	25
3.3.2 Bestimmung der ADH-Aktivität	25
3.3.3 Bestimmung der Mut2G38D-ADH-Aktivität	25
3.3.4 Bestimmung der GDH-Aktivität	26
3.3.5 Bestimmung der IDH-Aktivität.....	26
3.3.6 Bestimmung der MAE-Aktivität	26
3.3.7 Bestimmung der FDH-Aktivität.....	26
3.3.8 Bestimmung der PNT-Aktivität.....	27
3.3.9 Bestimmung der Acn-Aktivität.....	27
3.3.10 Nachweis von chiralen Alkoholen mittels Gaschromatographie	27
3.3.11 Nachweis von (3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure- <i>tert</i> -butylester mittels GC/MS	27
3.3.12 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
3.3.13 Native PAGE	29
3.3.14 Präparative native PAGE.....	29
3.3.15 Blotting von Proteinen	29
3.3.15.1 Elektroblothing nach Kyhse-Andersen	29
3.3.15.2 NuPAGE® Western Transfer	30

3.3.16	Färbungen von Gelen und Membranen.....	30
3.3.16.1	Coomassie-Färbung von Proteinen	30
3.3.16.2	Silberfärbung von Proteinen	30
3.3.16.3	Amidoschwarzfärbung von Proteinen	30
3.3.16.4	Aktivitätsfärbung von Proteinen nach nativer PAGE	31
3.3.17	Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz	32
4.	Molekularbiologische Methoden	32
4.1	Präparation von genomischer DNA	32
4.1.1	Präparation von genomischer DNA aus <i>Lactobacillus kefir</i>	32
4.1.2	Präparation von genomischer DNA aus <i>Bacillus subtilis</i>	33
4.1.3	Präparation genomischer DNA mit Hilfe des DNeasy Tissue Kit	34
4.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	34
4.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit QIAquick Gel Extraction Kit.....	34
4.4	Herstellung von Primern	35
4.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
4.6	Aufreinigung von PCR-Produkten mittels QIAquick PCR Purification Kit.....	36
4.7	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	36
4.8	Isolierung von Genen mittels Universal GenomeWalker™ Kit.....	36
4.9	DNA-Restriktion.....	37
4.10	Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA	38
4.11	DNA-Ligation.....	38
4.12	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	38
4.13	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	38
4.14	Präparation von Plasmid-DNA.....	39
4.15	DNA-Sequenzierung	39
5.	Enzymatische Synthesen von Alkoholen mit Cofaktorregenerierung	39
5.1	Synthese von chiralen Alkoholen in zellfreien Systemen	39
5.2	Durchführung von Ganzzellbiotransformationen	40
5.2.1	Durchführung von Ganzzellbiotransformationen mit substratgekoppelter Cofaktorregenerierung.....	40
5.2.2	Durchführung von Ganzzellbiotransformationen mit enzymatischer Cofaktorregenerierung.....	41
5.2.3	Durchführung von Ganzzellbiotransformationen mit Permeabilisierung der Zellmembran.....	42
5.2.4	Durchführung von Ganzzellbiotransformationen in organisch-wässrigen Zweiphasensystemen.....	42
Ergebnisse.....	44	
1.	„Zweite“ ADH aus <i>Lactobacillus kefir</i>	44
1.1	Reinigung der „zweiten“ ADH	44
1.2	N-terminale Sequenzdaten der „zweiten“ ADH	47
1.3	Isolierung des „zweiten“ <i>adh</i> -Gens mittels Universal GenomeWalker™ Kit (Clontech).....	47
1.4	Klonierung und Expression der „zweiten“ ADH.....	48
2.	ADH aus <i>Lactobacillus kefir</i>	50
2.1	Isolierung des <i>adh</i> -Gens mittels Universal GenomeWalker™-Kit (Clontech).....	51
2.2	Klonierung und Expression des Gens.....	53
2.2.1	Klonierung und Expression	53
2.2.2	Optimierung der Expressionsbedingungen.....	54
2.3	Biochemische Charakterisierung der ADH.....	55
2.3.1	Reinigung der rekombinanten ADH.....	55
2.3.2	Bestimmung des Temperaturoptimums der ADH	56

2.3.3	Bestimmung des pH-Optimums	57
2.3.4	Bestimmung der kinetischen Konstanten.....	58
2.3.5	Einfluss von Metallionen auf die ADH-Aktivität	59
3.	Entwicklung enzymatischer Regenerierungssysteme	60
3.1	Cofaktorregenerierung durch Glucose-Dehydrogenase (GDH):	
	Systeme ADH-GDH (pAW-3, pAW-4)	63
3.1.1	Isolierung des <i>gdh</i> -Gens.....	64
3.1.2	Klonierung und Expression der <i>gdh</i>	64
3.1.3	Reinigung der rekombinanten GDH.....	64
3.1.4	Biochemische Charakterisierung der rekombinanten GDH.....	65
3.1.4.1	Ermittlung des Temperaturoptimums der GDH.....	65
3.1.4.2	Bestimmung des pH-Optimums der GDH.....	66
3.1.4.3	Bestimmung der kinetischen Konstanten	67
3.1.4.4	Einfluss von Metallionen auf die GDH-Aktivität.....	68
3.1.4.5	Vergleich der ermittelten biochemischen Daten mit Literaturangaben.....	69
3.1.5	Untersuchung von Kreuzreaktionen.....	70
3.1.6	Coexpression von ADH und GDH (pAW-3).....	72
3.1.7	Optimierung der Expressionsbedingungen	73
3.1.8	Bestimmung der Stabilität des Rohextraktes	75
3.1.9	Trennung von ADH und GDH mittels Chromatographie.....	77
3.1.10	Umsetzungen im zellfreien System.....	78
3.1.10.1	Ermittlung des optimalen Enzymverhältnisses	78
3.1.10.2	Umsetzungen verschiedener Ketone	79
3.1.11	Ganzzellumsetzungen mit <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pAW-3.....	80
3.1.11.1	Ganzzellumsetzungen von verschiedenen Ketonen im wässrigen System.....	80
3.1.11.2	Ganzzellumsetzungen von Acetophenon in organisch- wässrigen Zweiphasensystemen.....	82
3.1.12	Coexpression von GDH und ADH (pAW-4).....	83
3.1.13	Ganzzellumsetzungen von verschiedenen Ketonen mit <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pAW-4.....	85
3.1.14	Vergleich der Systeme <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pAW-3 und pAW-4	86
3.1.15	Zusammenfassung der Systeme pAW-3 und pAW-4.....	87
3.2	Cofaktorregenerierung durch Malic Enzyme (MAE): System ADH- MAE (pAW-5).....	88
3.2.1	Isolierung des <i>mae</i> -Gens.....	89
3.2.2	Coklonierung von ADH und MAE.....	89
3.2.3	Expression von pAW-5	90
3.2.4	Trennung von ADH und MAE mittels Chromatographie	92
3.2.5	Biochemische Charakterisierung des rekombinanten MAE.....	94
3.2.5.1	Bestimmung des Temperaturoptimums von MAE	94
3.2.5.2	Bestimmung des pH-Optimums von MAE	95
3.2.5.3	Bestimmung der kinetischen Konstanten	96
3.2.5.4	Vergleich der ermittelten biochemischen Daten mit Literaturangaben.....	97
3.2.6	Untersuchung von Kreuzreaktionen.....	98
3.2.6.1	Untersuchung des Einflusses von L-Malat und Pyruvat auf die ADH	98
3.2.6.2	Untersuchung des Einflusses von Acetophenon und Phenylethanol auf MAE.....	99
3.2.7	Umsetzungen im zellfreien System.....	100
3.2.7.1	Ermittlung des optimalen Enzymverhältnisses	100
3.2.7.2	Umsetzungen verschiedener Ketone	101
3.2.8	Ganzzellumsetzungen mit <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pAW-5.....	102
3.2.9	Zusammenfassung des Systems pAW-5	104

3.3	Cofaktorregenerierung durch Isocitrat-Dehydrogenase (IDH): System ADH-IDH (pAW-6)	104
3.3.1	Isolierung des <i>idh</i> -Gens	105
3.3.2	Coklonierung und Coexpression von ADH und IDH	105
3.3.3	Expressionsoptimierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pAW-6	106
3.3.4	Klonierung und Expression der IDH	107
3.3.5	Biochemische Charakterisierung der IDH.....	108
3.3.5.1	Aufreinigung der rekombinanten IDH.....	108
3.3.5.2	Ermittlung des Temperaturoptimums der rekombinanten IDH.....	109
3.3.5.3	Bestimmung des pH-Optimums der IDH.....	110
3.3.5.4	Ermittlung der kinetischen Konstanten der rekombinanten IDH.....	111
3.3.5.5	Vergleich der ermittelten biochemischen Eigenschaften mit Literaturangaben	112
3.3.6	Untersuchungen auf Kreuzreaktionen	113
3.3.7	Umsetzungen im zellfreien System	114
3.3.7.1	Ermittlung des optimalen Enzymverhältnisses.....	114
3.3.7.2	Umsetzungen verschiedener Ketone	115
3.3.8	Ganzzellumsetzungen mit <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pAW-6	116
3.3.9	Zusammenfassung des Systems pAW-6.....	118
3.4	Cofaktorregenerierung durch Isocitrat-Dehydrogenase (IDH): System ADH-IDH-AcnB (AW-11).....	118
3.4.1	Isolierung und Klonierung des <i>acnB</i> -Gens	119
3.4.2	Coexpression von ADH, IDH und AcnB	120
3.4.3	Ganzzellumsetzungen mit <i>E. coli</i> BL21(DE3)/AW-11	121
3.4.4	Zusammenfassung des Systems AW-11.....	122
3.5	Cofaktorregenerierung durch Formiat-Dehydrogenase: System LB- ADH-FDH (pAW-7).....	122
3.5.1	Coklonierung und Coexpression von LB-ADH und FDH.....	123
3.5.2	Expressionsoptimierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pAW-7	125
3.5.3	Trennung von LB-ADH und FDH.....	126
3.5.4	Untersuchung von Kreuzreaktionen	127
3.5.5	Umsetzungen im zellfreien System	128
3.5.5.1	Ermittlung des optimalen Enzymverhältnisses.....	128
3.5.5.2	Umsetzungen verschiedener Ketone	129
3.5.6	Ganzzellumsetzungen mit <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pAW-7	130
3.5.7	Zusammenfassung des Systems pAW-7.....	132
3.6	Cofaktorregenerierung durch Formiat-Dehydrogenase (FDH): System LK-ADH-FDH (pAW-8).....	132
3.6.1	Coklonierung von ADH und FDH	133
3.6.2	Coexpression von ADH und FDH.....	134
3.6.3	Trennung von ADH und FDH	134
3.6.4	Untersuchung von Kreuzreaktionen	136
3.6.5	Umsetzungen im zellfreien System	137
3.6.5.1	Ermittlung des optimalen Enzymverhältnisses.....	137
3.6.5.2	Umsetzungen verschiedener Ketone	138
3.6.6	Ganzzellumsetzungen mit <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pAW-8	138
3.6.7	Vergleich der beiden ADHs aus <i>L. kefir</i> und <i>L. brevis</i>	140
3.6.8	Zusammenfassung des Systems pAW-8.....	141
3.7	Cofaktorregenerierung durch Transhydrogenase (PNT): System LK- ADH-FDH-PNT (AW-9).....	141
3.7.1	Isolierung der <i>pnt</i> -Gene	142
3.7.2	Klonierung der <i>pnt</i> -Gene.....	143
3.7.3	Coexpression von ADH, FDH und PNT.....	143
3.7.4	Ganzzellumsetzungen mit <i>E. coli</i> BL21(DE3)/AW-9	144

3.7.5	Vergleich der Stämme <i>E. coli</i> BL21(DE3)/AW-9 und <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pAW-8.....	145
3.7.6	Zusammenfassung des Systems AW-9	146
3.8	Cofaktorregenerierung durch Formiat-Dehydrogenase (FDH): System Mut2G38D-ADH-FDH (pAW-10)	147
3.8.1	Coklonierung und Coexpression von Mut2G38D-ADH und FDH	148
3.8.2	Expressionsoptimierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pAW-10	148
3.8.3	Trennung von Mut2G38D-ADH und FDH	149
3.8.4	Biochemische Charakterisierung von Mut2G38D-ADH	150
3.8.4.1	Ermittlung des Temperaturoptimums der Mut2G38D-ADH.....	150
3.8.4.2	Bestimmung des pH-Optimums der Mut2G38D-ADH.....	151
3.8.4.3	Ermittlung der kinetischen Konstanten von Mut2G38D-ADH.....	152
3.8.5	Untersuchung von Kreuzreaktionen.....	153
3.8.6	Umsetzungen im zellfreien System.....	153
3.8.7	Ganzzellumsetzungen mit <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pAW-10.....	153
3.8.8	Zusammenfassung des Systems pAW-10	154
Diskussion und Ausblick		155
1.	„Zweite“ ADH aus <i>Lactobacillus kefir</i>	155
2.	Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren	155
2.1	Einfluss der Zellpermeabilisierung auf die Ganzzellbiotransformationen	158
2.2	Einfluss von zugesetzten Cofaktoren auf die Ganzzellbiotransformationen	159
2.3	Vergleich der verschiedenen Systeme.....	161
2.3.1	Vergleich der Systeme anhand der Umsetzung verschiedener Substrate	161
2.3.2	Vergleich der Reduktionsaktivitäten der verschiedenen Ganzzellsysteme	162
2.3.3	Vergleich der Systeme anhand der Aktivitäten der einzelnen Enzyme	165
2.4	Beurteilung der Qualität der Ganzzellumsetzungen	167
2.5	Vergleich der Ganzzellumsetzungen mit den Umsetzungen im zellfreien System	167
3.	Vergleich verschiedener Verfahren zur Synthese von (<i>R</i>)-Phenylethanol, (<i>2R,5R</i>)-Hexandiol und (<i>S</i>)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure- <i>tert</i> - butylester	169
Zusammenfassung		179
Anhang		182
1.	Verwendete Primer.....	182
1.1	Klonierungsprimer.....	182
1.2	Primer zur Isolierung der <i>adh</i> -Gene	184
2.	Sequenz der ADH aus <i>L. kefir</i>	185
3.	Sequenz der „zweiten“ ADH aus <i>L. kefir</i>	186
Literaturverzeichnis.....		187

Abkürzungsverzeichnis

AcnB	Aconitase B
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
Akt.	Aktivität
amp	Ampicillin
bp, bps	Basenpaare
cm	Chloramphenicol
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
<i>de</i>	diastereomeric excess, Diastereomerenüberschuss
DTT	1,4-Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ee</i>	enantiomeric excess, Enantiomerenüberschuss
EtOH	Ethanol
FDH	Formiat-Dehydrogenase
GC	Gaschromatographie
GDH	Glucose-Dehydrogenase
h	Stunden
HAc	Essigsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IEC	ion exchange chromatography, Anionenaustausch-Chromatographie
INT	<i>p</i> -Iodonitrotetrazoliumviolett
kDa	Kilodalton
KPi	Kaliumphosphat
IPTG	Isopropyl-D-1-thiogalactopyranosid
LB-ADH	Alkohol-Dehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i>
LB	Luria-Bertani
LK-ADH	Alkohol-Dehydrogenase aus <i>Lactobacillus kefir</i>
M	molar
MAE	Malic Enzyme
MeOH	Methanol
min	Minuten
mM	millimolar
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure

Abkürzungsverzeichnis

MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MTBE	<i>tert</i> -Butylmethylether
NAD/NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidiert/reduziert)
NADP/NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (oxidiert/reduziert)
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ori	Origin, Replikations-Startpunkt
PES	Phenazinethosulfat
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PNT	Pyridin-Nucleotid-Transhydrogenase
Pro	Promotor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
spez.	spezifisch
TE	Tris-EDTA
TEA	Triethanolamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

Einleitung

1. Chirale Alkohole

In den frühen 90er Jahren lagen noch etwa 90 % der synthetischen chiralen Pharmazeutika als racemische Gemische vor. Allerdings zeigen Enantiomere oft sehr unterschiedliche oder auch gegensätzliche pharmakologische Effekte. Um gezielt eine gewünschte Wirkung zu erzielen, sollten chirale Wirkstoffe enantiomerenrein vorliegen. 1992 gab die US Food and Drug Administration einen Leitfaden bezüglich der Einführung von enantiomerenreinen Wirkstoffen heraus. Bei der Zulassung neuer Medikamente werden von den Behörden zunehmend enantiomerenreine Wirkstoffe gefordert. Heutzutage liegen mehr als 50 % der 500 weltweit meistverkauften Medikamente in enantiomerenreiner Form vor^[1], neun der zehn sog. „Blockbuster“ sind chirale Verbindungen^[2].

Optisch aktive Substanzen wie Alkohole, Amine und Aminosäuren sind wichtige Zwischenprodukte für die Synthese vieler Pharma- und Agrowirkstoffe. Unter vielen Techniken, die zur Synthese optisch aktiver Substanzen zur Verfügung stehen, hat die asymmetrische Reduktion beträchtlich an Bedeutung gewonnen. Vor allem die asymmetrische Reduktion von Ketonen zu chiralen Alkoholen ist eine der nützlichsten Reaktionen in der organischen Chemie.

Enantiomerenreine Alkohole sind bedeutende chirale Bausteine, sog. „Chiral Building Blocks“ der industriellen Spezial- und Feinchemie. Unter anderem fungieren diese Substanzen als essentielle Schlüsselintermediate bei der Herstellung von Pharmazeutika, Feinchemikalien sowie vielen interessanten Molekülen und Naturstoffen. Nahezu alle Naturstoffsynthesen enthalten einen Ketonreduktionsschritt, welcher oft sogar der Schlüsselschritt der Synthese ist^[3].

Arzneimittel, bei deren Synthesen chirale Alkohole wichtige Intermediate sind, sind beispielsweise blutdrucksenkende Mittel, Calcium- und Kaliumkanalblocker, Antiarrhythmika, β 3-Rezeptor-Agonisten, Anti-Cholesterin-Mittel und HIV-Protease-Inhibitoren.

Die Synthese optisch aktiver Alkohole kann mit chemischen oder biokatalytischen Methoden erfolgen.

1.1 Darstellung chiraler Alkohole auf chemischem Wege

Heutzutage ist eine Vielzahl von Methoden zur Darstellung optisch aktiver Alkohole auf chemischem Wege bekannt. Neben der Racematspaltung wird vor allem die Reduktion von prochiralen Ketonen angewandt. Die asymmetrische Reduktion von Ketonen kann chemisch über verschiedene Methoden erfolgen. So können die klassischen Hydrid-Reagenzien wie LiAlH_4 mit optisch aktiven Liganden modifiziert werden. Alternativ wird die Reduktion des Ketons mit einem klassischen Reduktionsmittel in Gegenwart eines chiralen Katalysators durchgeführt.

Werden die eingesetzten Hydride bei Hydroborierungen durch chirale Diole oder Aminoalkohole modifiziert, können prochirale Carbonylverbindungen asymmetrisch reduziert werden. Mittels Corey-Bakshi-Shibata-Reduktion (CBS-Reduktion) werden Reduktionen von prochiralen Ketonen mit Boran und einer katalytischen Menge eines chiralen Oxazaborolidins mit sehr guten chemischen und optischen Ausbeuten enantioselektiv durchgeführt^[4]. Die CBS-Reduktion eines geschützten Chlordihydroxyacetophenon-Derivats mit *B-n*-Butyloxazaborolidin als Katalysator in Gegenwart von Boran ist der Schlüsselschritt in der Synthese des β -Adrenorezeptor-Agonisten (*R*)-Isoproterenol, welches in einem mehrstufigen Prozess mit einer Ausbeute von 81 % erhalten wurde^[5] (Abb. 1).

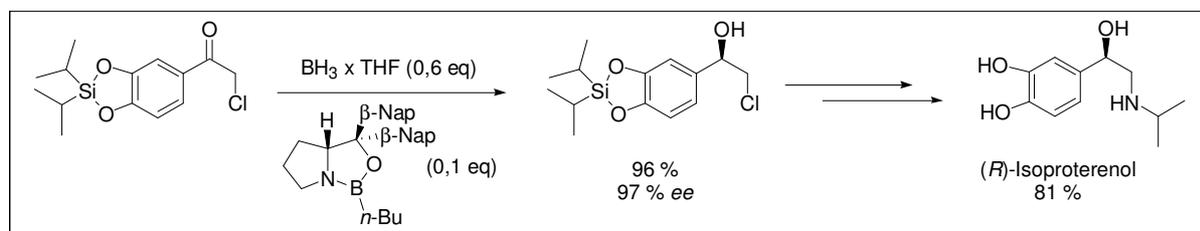


Abb. 1: CBS-Reduktion eines geschützten Chlordihydroxyacetophenon-Derivats in der Synthese des β -Adrenorezeptor-Agonisten (*R*)-Isoproterenol. Als Katalysator wurde neben Boran ein (*R*)-*B-n*-Butyloxazaborolidin-Derivat verwendet.

Als stöchiometrische Reagenzien können chirale Aluminiumhydrid-Verbindungen bei der Reduktion von Ketonen fungieren. Mit Hilfe einer äquimolaren Mischung aus LiAlH_4 und (1*S*,2*R*)-*N*-Methylephedrin gelang die Synthese des Analogons eines menschlichen Glucagon-Rezeptor-Antagonisten bei der Bayer AG mit 99 % *ee*^[6].

Für die stereoselektive Synthese wurden chirale Binaphthyl-Liganden entwickelt, die aufgrund ihrer C_2 -Axialsymmetrie als Chiralitätsüberträger fungieren können. Ein Beispiel für einen solchen Liganden ist BINAP ((2,2'-Bis-(diphenyl-phosphino)-1,1'-binaphthyl),

welches für die Komplexierung von Übergangsmetallen der 8. bis 10. Gruppe verwendet wird (Abb. 2).

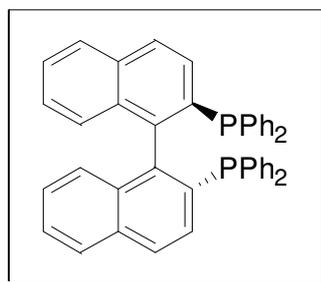


Abb. 2: Struktur des chiralen Liganden BINAP (2,2'-Bis-(diphenyl-phosphino)-1,1'-binaphthyl).

Chirale Alkohole können außerdem durch homogene Hydrierung von Ketonen mit Hilfe von organometallischen Komplexen synthetisiert werden^[7]. Mit Phosphin-Rh-Komplexen als Katalysatoren konnten auf diese Weise Adrenalin, Pantolacton und β -Adrenolytika hergestellt werden. Die besten Ergebnisse wurden in Anwesenheit des SKEWPHOS-Rh(I)-Katalysators (SKEWPHOS = (S,S)-2,4-bis(diphenylphosphino)-pentan) erzielt; Acetophenon wurde mit 82 % optischer Ausbeute zu (S)-Phenylethanol hydriert^[8] (Abb. 3).

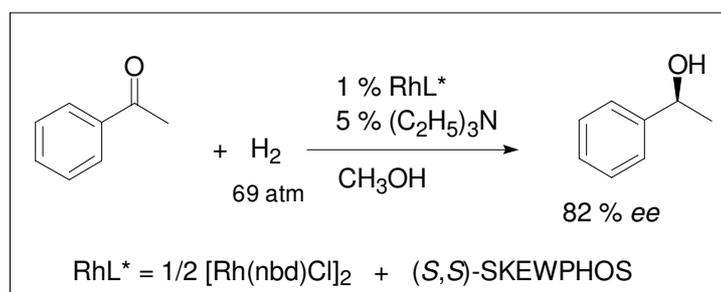


Abb. 3: Hydrierung von Acetophenon mit SKEWPHOS-Rh(I) als Katalysator.

Für enantioselektive Hydrierungen von Ketonen können außerdem BINAP-Ru(II)-Katalysatoren wie $\text{Ru}(\text{OCOCH}_3)_2$ BINAP + 2 HCl eingesetzt werden. Das Antiepileptikum GABOB (γ -Amino- β -hydroxybuttersäure) konnte durch (R)-BINAP-Ru-katalysierte Hydrierung des 4-Benzyloxy-3-butansäureethylesters zum (S)-Hydroxyester mit 98 % ee reduziert werden^[9] (Abb. 4).

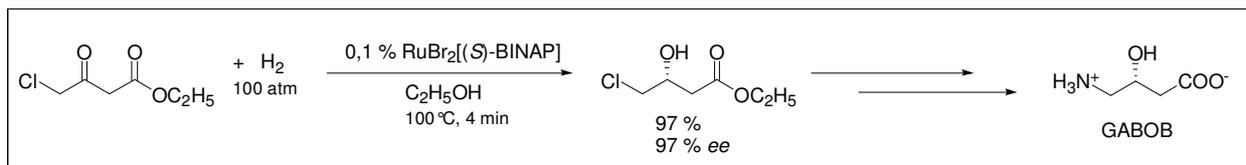


Abb. 4: Synthese des Antiepileptikums GABOB mit Hilfe eines BINAP-Ru-Katalysators.

Asymmetrische Transferhydrierungen von Ketonen werden häufig in Isopropanol als Wasserstoffquelle durchgeführt. Isopropanol ist stabil, leicht handhabbar, umweltfreundlich, preiswert und löst viele organische Verbindungen^[10]. Als Katalysatoren werden meist chirale Ru(II)-Komplexe mit Diphosphin- oder Diamin-Liganden verwendet. Ein sehr erfolgversprechender Katalysator ist *trans*-RuCl₂[(S)-BINAP][(S,S)-dpen] (dpen = Diphenylethylendiamin). Dieser Katalysator zeichnet sich durch bemerkenswerte chemische und optische Ausbeuten sowie hohe Chemoselektivität aus^[11]. Eine alternative Wasserstoffquelle für Transferhydrierungen ist Ameisensäure.

Eine weitere Methode zur Darstellung chiraler Alkohole ist die asymmetrische Hydrosilylierung von Ketonen, welche oft mit DIOP-Rh-Katalysatoren (DIOP = 2,3-O-Isopropyliden-2,3-dihydroxy-1,4-bis(diphenylphosphanyl)butan) durchgeführt wird.

Auch die klassische Aldol-Addition von Aldehyden und Trimethylsilylenolether-Derivaten kann asymmetrisch durchgeführt werden, wenn chirale Lewis-Säuren wie Acyloxoboran-Komplexe zugegen sind.

Optisch aktive sekundäre Alkohole können durch enantioselektive Alkylierung von prochiralen Ketonen dargestellt werden. Für diesen Zweck können organometallische Reagenzien wie beispielsweise Organolithium-, Organomagnesium- oder Organotitanverbindungen durch optisch aktive organische Substanzen chiral modifiziert werden. Durch geeignete Kombination von Carbonylsubstraten und modifizierten organometallischen Reagenzien ist die stereoselektive Synthese von Alkoholen in akzeptablen optischen Ausbeuten möglich. Die Ethylierung von Benzaldehyd beispielsweise gelang mit > 90 % ee mit Hilfe von Diethylmagnesium gekoppelt mit der äquimolaren Menge an Dilithium-Salz eines optisch reinen Binaphthols (Abb. 5).

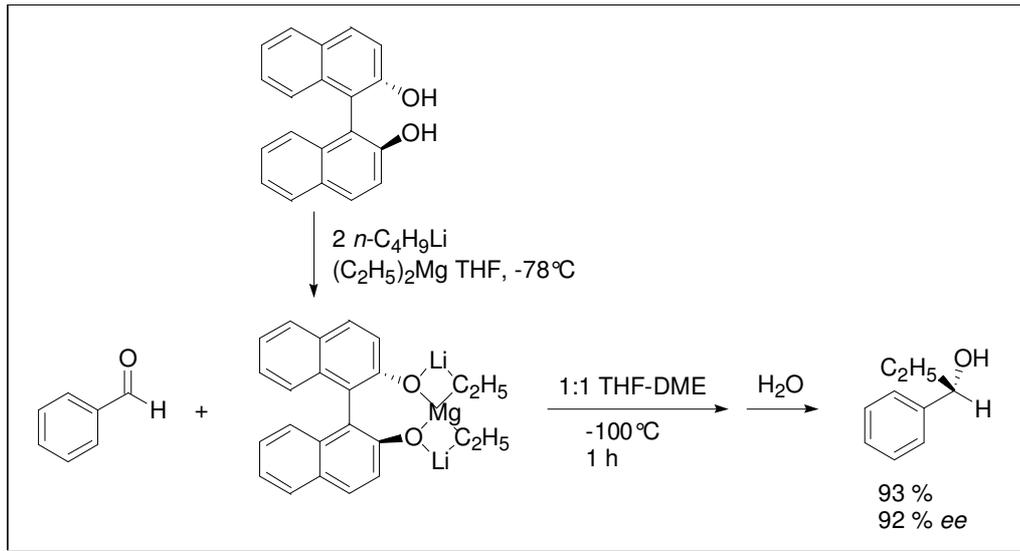


Abb. 5: Enantioselektive Ethylierung von Benzaldehyd. Als Katalysator fungiert Diethylmagnesium gekoppelt mit der äquimolaren Menge an Dilithium-Salz eines enantiomerenreinen Binaphthols.

Auch mittels heterogener asymmetrischer Katalyse ist es möglich, chirale Alkohole zu synthetisieren. In Gegenwart von kristallinen β -Cyclodextrinen können prochirale Ketone mit NaBH_4 stereoselektiv reduziert werden, allerdings mit schlechten Ausbeuten^[12]. Des Weiteren können Dendrimere als Katalysatoren eingesetzt werden. Dendrimere sind gut löslich und können aufgrund ihrer Größe leicht vom Reaktionsansatz abgetrennt werden. In Anwesenheit von amphiphilen Dendrimern, die aus PAMAM (Polyamidoamin) und D-Gluconolacton hergestellt werden, können asymmetrische Reduktionen von Ketonen mit NaBH_4 mit guten optischen Ausbeuten durchgeführt werden^[13].

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung enantiomerenreiner Alkohole ist die Racematspaltung. So bildeten sich durch hydrolytische Racematspaltung von Epoxiden in Gegenwart von Cobalt-Salen-Komplexen nach Öffnung der Epoxidringe je nach verwendetem Katalysator (*R*)- bzw. (*S*)-Diole mit sehr guten Enantioselektivitäten^[14].

Nachteile von chemisch katalysierten Reaktionen sind die häufig extremen Reaktionsbedingungen, welche Probleme wie Isomerisierungen, Racemisierungen, Epimerisierungen oder Umlagerungen verursachen können. Des Weiteren liefern chemische Synthesen von optisch aktiven Verbindungen oft nur unzureichende optische Ausbeuten, während bei Biotransformationen meist optische Ausbeuten von $> 99\%$ erzielt werden.

1.2 Darstellung chiraler Alkohole auf biokatalytischem Wege

Die Verwendung von Biokatalysatoren zur Einführung von chiralen Zentren in pharmazeutisch bedeutende Verbindungen ist eine wertvolle Technik.

In den letzten Jahren wurden viele Enzyme mit unterschiedlichen Spezifitäten entdeckt. Fortschritte in der Fermentation, der Proteinreinigung und den Immobilisierungstechniken haben zur Folge, dass stabilere Biokatalysatoren günstiger produziert werden können^[15]. Mit Hilfe von neuen rekombinanten Techniken und automatisiertem Screening konnten neuartige maßgeschneiderte Enzyme hergestellt werden.

Der Einsatz von Enzymen in der organischen Synthese hat sich im industriellen Maßstab bewährt. Enzymkatalysierte Reaktionen weisen entscheidende Vorteile auf. Die Reaktionen erfolgen unter milden Bedingungen wie Raumtemperatur, Atmosphärendruck und neutralem pH-Wert sowie in wässrigen Systemen. Aufgrund der hohen Substratspezifität von Enzymen können in enzymkatalysierten Reaktionen sehr hohe Enantio-, Regio- und Chemoselektivitäten erreicht werden. Die Einführung von Schutzgruppen ist hier nicht notwendig, was verglichen mit chemisch katalysierten Reaktionen zu einer deutlichen Reduktion der Syntheseschritte führt. Bei der Durchführung von enzymatischen Reaktionen können isolierte Enzyme, Zellorganellen oder ganze Zellen eingesetzt werden.

Die Produktion chiraler Alkohole durch Biokatalysatoren erfolgt in den meisten Fällen durch enantioselektive Reduktion von prochiralen Ketonen. Diese Reaktionen werden häufig mit Hilfe von ganzen Zellen durchgeführt. Biotransformationen mit intakten Mikroorganismen sind leicht durchführbar, es wird kein externes Cofaktor-Regenerierungssystem benötigt und es können Alkohole mit hervorragender Enantiomerenreinheit produziert werden^[15].

Der bekannteste Mikroorganismus, der für die Reduktion von prochiralen Ketonen eingesetzt wird, ist Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Bäckerhefe ist preisgünstig und leicht erhältlich, allerdings sind Substratspezifität sowie Stereospezifität der von Bäckerhefe katalysierten Reduktionen von Carbonylverbindungen oft nur ungenügend^[16]. Ein Beispiel für eine von Bäckerhefe katalysierte Reduktion ist die Produktion von (*S*)-3-Hydroxy-2,2-dimethylcyclohexanon, einem Synthesebaustein in der Synthese von Terpenen. Bäckerhefe katalysierte die Reduktion von 2,2-Dimethylcyclohexan-1,3-dion zum oben genannten Alkohol mit einer Ausbeute von ca. 50 % und einer optischen Reinheit von ca. 97 %^[17].

Der Schlüsselschritt in der Synthese des pharmazeutisch wichtigen 5*H*-2,3-Benzodiazepin LY330164 ist die enantioselektive Ketonreduktion mit ganzen *Zygosaccharomyces rouxii*-Zellen, welche mit einem *ee*-Wert von > 99,9 % ablief^[18].

Nocardia salmonicolor katalysiert die enantioselektive Reduktion eines Ketons zum korrespondierenden Alkohol, welcher das Schlüsselintermediat in der Synthese des Calciumkanalblockers SQ31765 darstellt^[19] (Abb. 6).

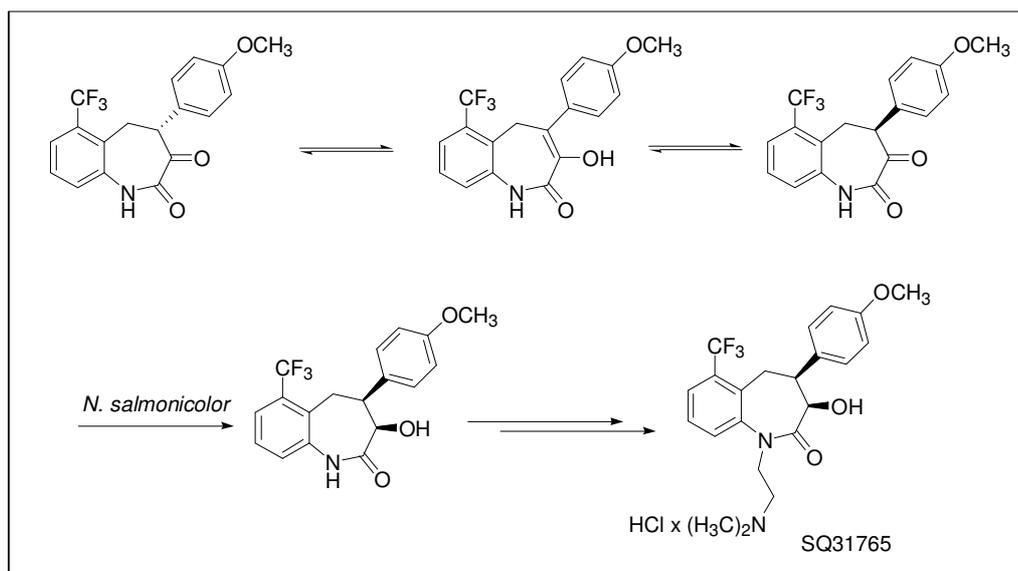


Abb. 6: Enantioselektive Ketonreduktion mit *N. salmonicolor* bei der Synthese des Calciumkanalblockers SQ31765.

Obwohl ein Gleichgewicht zwischen einem achiralen Enol und zwei Ketonen vorliegt, entstand durch die Reduktion mit *N. salmonicolor* lediglich eins von vier Stereoisomeren mit 96 % Ausbeute und > 99,9 % *ee*.

Vorstufen der β -Adrenorezeptoragonisten Denopamin und Salmeterol können durch Reduktion von Bromacetophenonen durch *Rhodotorula rubra*-Zellen produziert werden^[20]. Nach Zusatz des Tensids Natriumlaurylsulfat konnte eine wichtige Vorstufe von (*R*)-Denopamin mit 79 % Ausbeute und 94 % *ee* erhalten werden (Abb. 7).

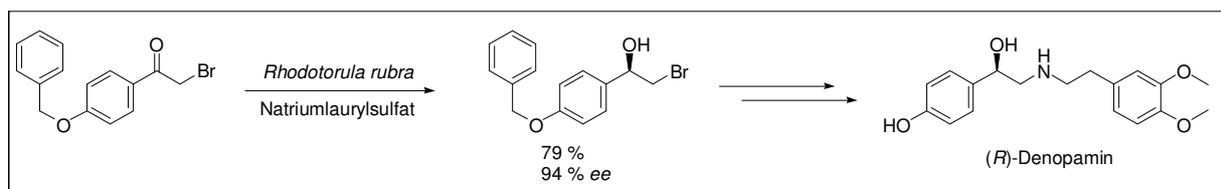


Abb. 7: Synthese von (*R*)-Denopamin durch Reduktion eines Bromacetophenon-Derivats durch *R. rubra*-Zellen.

Hansenula polymorpha ATCC 26012 katalysierte die Reduktion von *N*-[4-(2-Chloracetyl)phenyl]methansulfonamid zum korrespondierenden (*R*)-Alkohol mit 95 % Ausbeute und > 99 % *ee*^[21]. Der gebildete (*R*)-Alkohol ist das Schlüsselintermediat in der Synthese des β -Blockers (*R*)-(-)-Sotalol (Abb. 8).

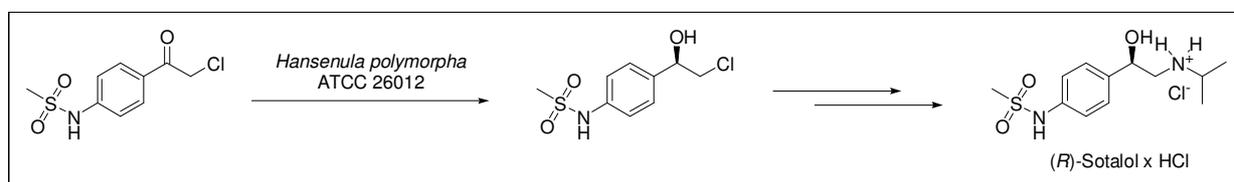


Abb. 8: Stereoselektive Reduktion von *N*-[4-(2-Chloracetyl)phenyl]methansulfonamid zum korrespondierenden (*R*)-Alkohol in der Synthese des β -Blockers (*R*)-(-)-Sotalol.

Eine Vielzahl von Mikroorganismen und Enzymen ist bekannt, die die Reduktion einer einzigen Ketogruppe von α -Keto- oder β -Ketoverbindungen katalysieren. Mit Hilfe einiger dieser Systeme ist es möglich, Vorläufer der wichtigen Anticholesterin-Wirkstoffe, welche die Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA)-Reduktase inhibieren, herzustellen. Mit Hilfe von getrockneten *Geotrichum candidum*-Zellen beispielsweise verlief die Reduktion von 4-Chlor-3-oxobutansäuremethylester zu der wichtigen Vorstufe (*S*)-(-)-4-Chlor-3-hydroxybutansäuremethylester eines HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors mit 95 % Ausbeute und 98 % *ee*^[22] (Abb. 9).

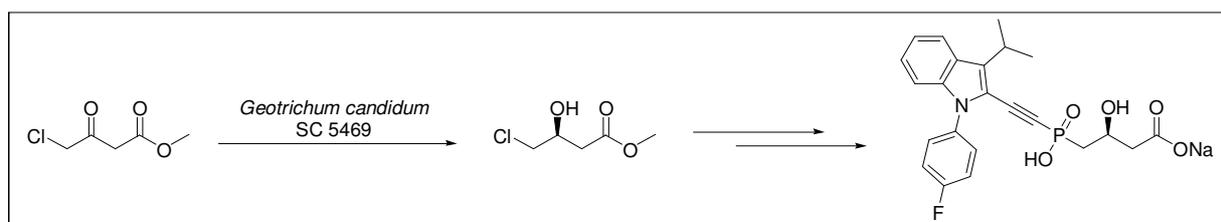


Abb. 9: Reduktion von 4-Chlor-3-oxobutansäuremethylester zum korrespondierenden (*S*)-Alkohol durch *G. candidum* in der Synthese eines HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors.

Bei der Umsetzung von 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit *Lactobacillus kefir*-Zellen entstand 6-Chlor-(3*R*,5*S*)-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester mit hoher Enantio- und Diastereoselektivität^[23] (Abb. 10). Diese Verbindung ist ebenfalls eine wichtige Vorstufe bei der Synthese von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren.

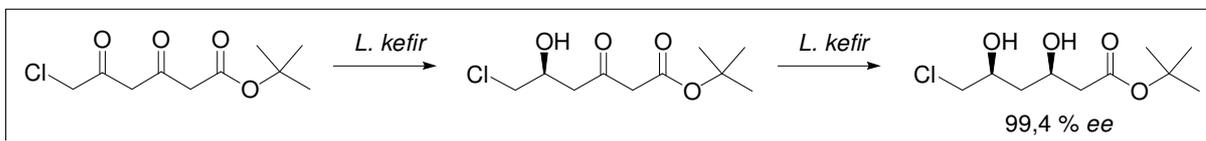


Abb. 10: Reduktion von 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit ganzen Zellen *L. kefir* zu 6-Chlor-(3*R*,5*S*)-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester.

Ein weiteres Beispiel für die erfolgreiche Produktion der Vorstufe eines HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors ist die Reduktion von 3,5-Dioxo-6-phenoxyhexansäureethylester zum korrespondierenden (3*R*,5*S*)-Alkohol durch getrocknete *Acinetobacter calcoaceticus* SC 13876-Zellen^[24].

Die Reduktion von prochiralen Ketonen kann außerdem durch den Einsatz ganzer Pflanzenzellen geschehen. Mit Hilfe von *Daucus carota*-Zellkulturen konnte 2-Oxo-4-phenylbuttersäure mit 100 % Ausbeute und > 99 % *ee* zu (*R*)-(-)-2-Hydroxy-4-phenylbuttersäure reduziert werden^[25].

Ein entscheidender Nachteil beim Einsatz ganzer Wildtyp-Zellen ist, dass ein Stamm oft mehrere konkurrierende Enzyme enthält, die gegensätzliche Selektivitäten aufweisen, so dass kein enantiomerenreines Produkt entsteht. Werden dagegen isolierte Enzyme eingesetzt, kann von definierten Systemen ausgegangen werden. Um effiziente Umsetzungen mit einem bestimmten Enzym zu erzielen, ist es notwendig, rekombinante Biokatalysatoren zu produzieren. Durch rekombinante DNA-Techniken können Enzyme im Vergleich zu nativer Expression mehr als hundertmal so stark exprimiert werden^[26].

Enzyme, mit deren Hilfe chirale Alkohole produziert werden können, sind die Lyasen. Mit Hilfe der Pyruvat-Decarboxylase aus *Zymomonas mobilis*, einer Lyase, wird (*R*)-Phenylacetylcarbinol, eine wichtige Zwischenstufe bei der Synthese von L-Ephedrin, enantioselektiv synthetisiert^[27].

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung chiraler Alkohole ist die enzymatische Racematspaltung. Mit Hilfe von Lipasen können aus racemischen Alkoholen und acylierenden Reagenzien neben Estern die gewünschten enantiomerenreinen Alkohole synthetisiert

werden. Immobilisierte Lipase B aus *Candida antarctica* katalysierte die Umsetzung von racemischem Seudenol (3-Methyl-2-cyclohexenol) mit Vinylbutyrat, wobei neben (*R*)-Seudenolacetat (*R*)-Seudenol entstand^[28].

Die am häufigsten eingesetzte Methode zur enzymkatalysierten Darstellung chiraler Alkohole ist allerdings die enantioselektive Reduktion von Carbonylverbindungen durch Dehydrogenasen.

Das bekannteste Enzym, welches die enantioselektive Reduktion von Ketonen katalysiert, ist die thermostabile Alkohol-Dehydrogenase (ADH) aus *Thermoanaerobium brockii* (TB-ADH). Während kurzkettige Ketone zu den (*R*)-Enantiomeren reduziert werden, katalysiert das Enzym die Umsetzung von höheren Ketonen zu den (*S*)-Alkoholen^[29]. Das Enzym wird bei zahlreichen Synthesen von biologisch aktiven Verbindungen eingesetzt. Ein Beispiel hierfür ist die Darstellung des β_2 -Agonisten Broxaterol. Der Schlüsselschritt der Synthese ist die Reduktion des Isoxazols zum korrespondierenden (*R*)-Alkohol durch TB-ADH mit *ee* > 98 %^[30] (Abb. 11).

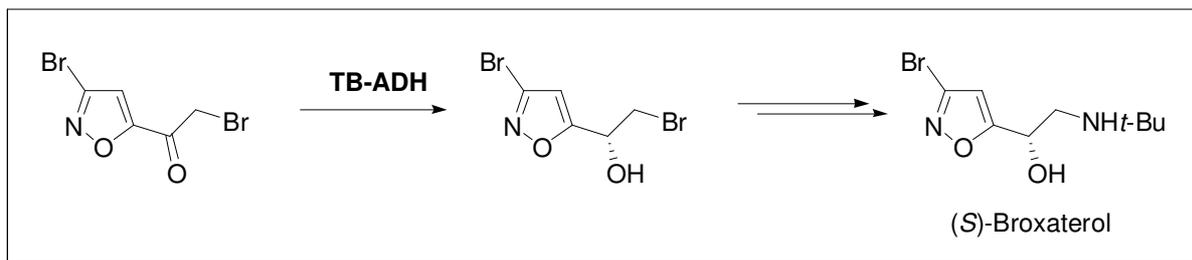


Abb. 11: Synthese des β_2 -Agonisten Broxaterol. Schlüsselschritt der Synthese ist die stereoselektive Reduktion des Isoxazols durch die TB-ADH zum korrespondierenden (*R*)-Alkohol.

Mit Hilfe der ADH aus *Lactobacillus brevis* gelingt die regio- und enantioselektive Reduktion von 3,5-Dioxoheptansäure-*tert*-butylester, welcher der Schlüsselschritt in der Synthese von (*R*)-*semi*-Vioxanthin ist^[31].

2. Alkohol-Dehydrogenasen

Bei der Synthese von chiralen Alkoholen auf biokatalytischem Weg werden hauptsächlich Dehydrogenasen eingesetzt. Dehydrogenasen sind Enzyme, die zur Gruppe der Oxido-

reduktasen gehören und stereospezifisch sowie stereo- und regioselektiv Wasserstoff übertragen. Der Transfer von Wasserstoff findet zwischen dem Substrat und einem Cofaktor statt. Die von Dehydrogenasen benötigten Cofaktoren sind in den meisten Fällen Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid(-Phosphat) (NAD(P)), Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) oder Flavin-Mononucleotid (FMN).

Vor allem ADHs werden bei der Darstellung chiraler Alkohole eingesetzt. Sie treten in einer Vielzahl von lebenden Organismen auf, wo sie für die Entgiftung und den Metabolismus von Ethanol und anderen Alkoholen wichtig sind^[32]. Diese Enzyme sind NAD(P)-abhängig und katalysieren den reversiblen Transfer eines Hydridions von NAD(P)H auf eine Carbonylverbindung gemäß folgender Gleichung (Abb. 12).

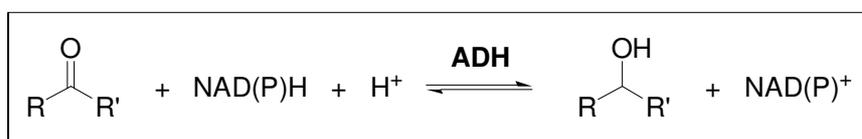


Abb. 12: Reduktion von Carbonylverbindungen durch NAD(P)-abhängige ADHs.

Viele ADHs gehören zur Superfamilie der medium-chain Dehydrogenasen/Reduktasen (MDR) oder der short-chain Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR)^[33]. Während medium-chain ADHs vorzugsweise primäre Alkohole umsetzen, Zn^{2+} -Ionen benötigen und aus ca. 350 Aminosäuren pro Untereinheit bestehen, bevorzugen short-chain ADHs sekundäre Alkohole und benötigen keine metallischen Cofaktoren. Sie enthalten ca. 250 Aminosäuren pro Untereinheit und katalysieren NAD(P)-abhängige Oxidations- bzw. Reduktionsreaktionen. Bekannte Beispiele sind die *Drosophila*-ADH sowie 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen. Die Sequenzen der Enzyme weisen einige homologe Bereiche auf^[34]. So ist die Cofaktor-Bindungsstelle mit dem Muster GXXXGXXG am N-Terminus lokalisiert^[35], während die Substrat-Bindungsstelle am C-Terminus sitzt^[36]. Die Enzyme dieser Familie weisen ein breites Substratspektrum auf, das Steroide, Alkohole, Zucker, Xenobiotika und aromatische Verbindungen umfasst.

Die biochemischen Eigenschaften der ADHs, die für präparative Anwendungen eingesetzt wurden, sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Zusammenfassung der biochemischen Eigenschaften von ADHs, die für präparative Anwendungen eingesetzt wurden (SDR = short-chain Dehydrogenasen, MDR = medium-chain Dehydrogenasen). ¹: Messung mit Standardsubstrat.

ADH aus	ADH-Klasse	Cofaktor	Stereo-selektivität	Substrat-spezifität	Spez. Akt. [U/mg] ¹	Lit.
Pferdeleber	MDR	NAD	S	Aromatische und aliphatische Aldehyde, cyclische Ketone	3 - 4	[37-39]
<i>Lactobacillus brevis</i>	SDR	NADP	R	Aromatische und aliphatische Ketone und Ketoester	450	[40, 41]
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	MDR	NAD	S	Aromatische Ketone und Ketoester	1400	[42-45]
<i>Thermo-anaerobium brockii</i>	MDR	NADP	Kurzkettige Ketone: R, langkettige Ketone: S	Cyclische und acyclische Ketone	63	[46-51]
Hefe	MDR	NAD	S	Kurzkettige Aldehyde, Ketone	460	[38, 52-56]
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	MDR	NAD	S	Acyclische, cyclische und aromatische Aldehyde und Ketone	5	[57-59]

Bei der Synthese chiraler Alkohole können Dehydrogenasen als isolierte Enzyme oder in Form ganzer Zellen eingesetzt werden. Der Einsatz ganzer Zellen hat den Vorteil, dass die bei der Reaktion benötigten Cofaktoren von den Zellen nachgeliefert werden können. Weiterhin entfällt die aufwendige Isolierung und Reinigung der Enzyme. Der Gebrauch von gereinigten Dehydrogenasen bzw. rekombinanten Mikroorganismen hat den Vorteil, dass die Existenz konkurrierender Enzyme mit unterschiedlichen Stereoselektivitäten ausgeschlossen werden kann. Müssen allerdings Cofaktoren zugesetzt werden, steigen die Prozesskosten beträchtlich an. Die Regenerierung der verbrauchten Cofaktoren ist demnach unumgänglich.

3. Regenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren

Bei der Reduktion von Carbonylverbindungen durch NAD(P)-abhängige Dehydrogenasen werden die Nicotinamid-Cofaktoren oxidiert, indem sie stereoselektiv Hydridionen auf die Carbonylkohlenstoffatome der Substrate übertragen. Um solche Prozesse ökonomisch durchzuführen, müssen die oxidierten Cofaktoren regeneriert werden. Für die Regenerierung stehen verschiedene Methoden zur Auswahl.

Ein umweltfreundliches System ist die photochemische Regenerierung, bei der NAD(P)H mittels Lichtenergie regeneriert wird. Dies kann beispielsweise durch den Einsatz eines Cyanobakteriums geschehen. Dieses Bakterium wandelt Lichtenergie mittels eines Elektronentransfersystems in chemische Energie in Form von NAD(P)H um. Das erzeugte NAD(P)H kann genutzt werden, um ein Ketonsubstrat zum chiralen Alkohol zu reduzieren^[60].

Alternativ können Nicotinamid-Cofaktoren elektrochemisch regeneriert werden. Hier erfolgt der Elektronentransfer entweder direkt von einer Elektrode, über einen Mediator wie beispielsweise einen Redoxkatalysator oder über ein gekoppeltes System bestehend aus Mediator und Enzym^[61]. Bei der elektrochemischen Regenerierung werden die geringen Kosten sowie der Einsatz von masselosen Elektronen ausgenutzt. Ein Beispiel für die elektrochemische Regenerierung von NAD(P) ist der Einsatz des Tris(3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthrolin)-Eisen(II/III)-Komplexes als Elektronenüberträger^[62] (Abb. 13).

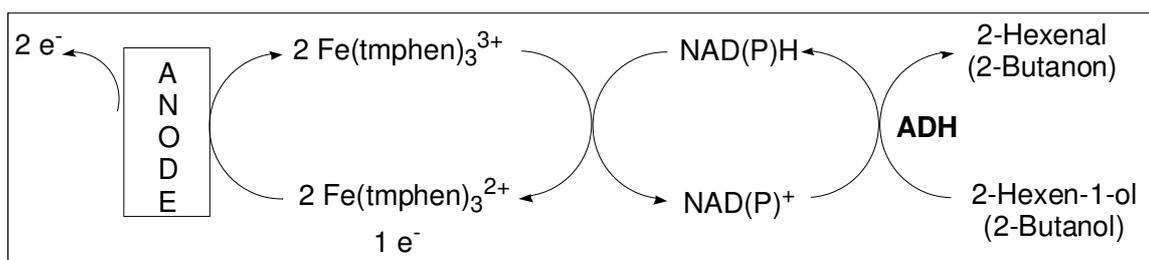


Abb. 13: Elektrochemisch getriebene Oxidation von 2-Hexen-1-ol bzw. 2-Butanol katalysiert durch eine ADH mit Fe(tmphen)_3^{3+} als Mediator (tmphen = 3,4,7,8-Tetramethyl-1,10-phenanthrolin).

Die am häufigsten angewandte Methode zur Regenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren ist die enzymatische. Die enzymatische Regenerierung erfolgt durch den Zusatz eines zweiten Enzyms bzw. eines zweiten Substrats. Bei der Regenerierung von NADH werden hauptsächlich die Enzyme Formiat-DH (FDH), Glucose-DH (GDH), Glucose-6-Phosphat-DH (G-6-P-DH), ADH und Hydrogenase eingesetzt. Die NADPH-Regenerierung erfolgt enzymatisch zumeist mit Hilfe von GDH, G-6-P-DH und ADH. Glutamat-DH (GluDH),

L-Lactat-DH (L-LDH), ADH und NADH-Oxidase (NOX) werden bei der Regenerierung von NAD eingesetzt, während GluDH NADP regeneriert. Tab. 2 gibt einen Überblick über die am häufigsten eingesetzten Enzyme bei der Regenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren.

Tab. 2: Übersicht über die am häufigsten verwendeten Enzyme für die Regenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren.

Zu regenerierender Cofaktor	Cofaktor-regenerierende Enzyme
NADH	FDH, GDH, G-6-P-DH, ADH, Hydrogenase
NADPH	GDH, G-6-P-DH, ADH
NAD	GluDH, L-LDH, ADH, NOX
NADP	GluDH

Das Standardenzym für die NADH-Regenerierung ist FDH. Vorteile der FDH sind der geringe Preis von Formiat, die aufgrund der Decarboxylierung von Formiat irreversible Reaktion sowie die Bildung des Gases CO_2 als einzigem Produkt. Nachteile beim Einsatz der FDH sind die geringe spezifische Aktivität des Enzyms sowie die strikte NAD-Abhängigkeit. Ein Beispiel für die Regenerierung von NADH mittels FDH ist die von der ADH aus *Rhodococcus erythropolis* katalysierte Produktion chiraler Alkohole wie (S)-1-Phenylpropan-2-ol^[42] (Abb. 14).

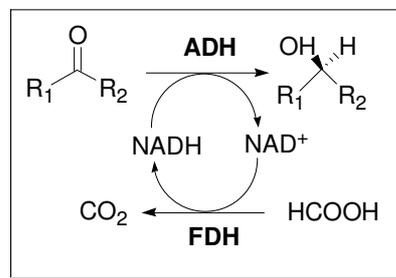


Abb. 14: Synthese von chiralen (S)-Alkoholen katalysiert durch eine ADH gekoppelt mit FDH-katalysierter NADH-Regenerierung.

G-6-P-DH wird eingesetzt für die NADPH-Regenerierung bei der Synthese von (R)-Phenylethanol, die durch die ADH aus *Lactobacillus kefir* katalysiert wird^[63] (Abb. 15).

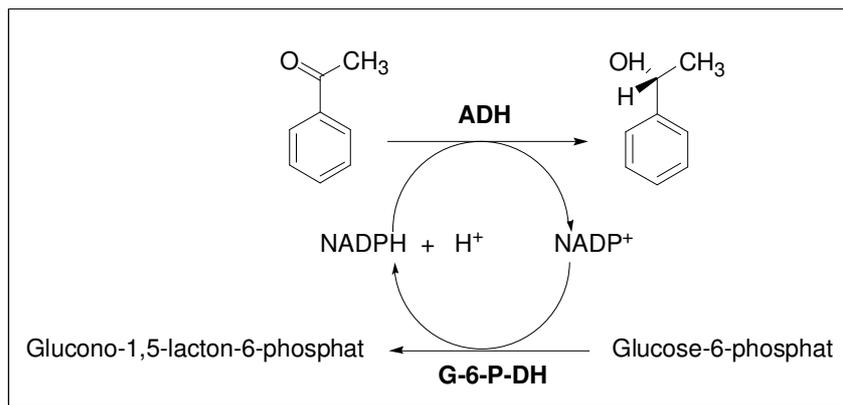


Abb. 15: Synthese von (*R*)-Phenylethanol aus Acetophenon katalysiert durch die ADH aus *L. kefir* mit Hilfe von G-6-P-DH zur NADPH-Regenerierung.

Wie oben erwähnt ist es ebenfalls möglich, durch den Zusatz eines zweiten Substrats die Regenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren zu erreichen. So katalysiert die ADH aus *Thermoanaerobium Brockii* (TB-ADH) gleichzeitig die Reduktion von prochiralen Carbonylverbindungen und die Oxidation von Isopropanol zu Aceton, während NADP(H) regeneriert wird^[29] (Abb. 16).

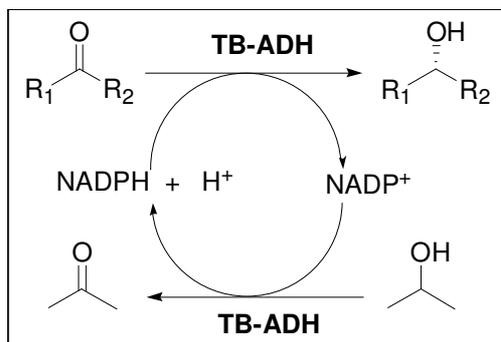


Abb. 16: Reduktion von prochiralen Carbonylverbindungen katalysiert durch TB-ADH mit Cofaktor-Regenerierung durch die Zugabe von Isopropanol als zweitem Substrat, welches zu Aceton oxidiert wird.

Eine neue innovative Methode ist die Konstruktion von Ganzzellbiokatalysatoren, die neben dem rekombinanten produzierenden Enzym ein Cofaktor-regenerierendes Enzym coexprimiert enthalten. Mit Hilfe dieser sog. Designer-Zellen ist es möglich, die Vorteile von Ganzzellkatalysatoren wie die leichte Handhabbarkeit von Biotransformationen durch Verzicht auf Isolierung und Reinigung von Enzymen sowie die zellinterne Cofaktor-Regenerierung zu nutzen und gleichzeitig das Vorhandensein konkurrierender Enzyme, wie es beim Einsatz von Wildtypzellen häufig der Fall ist, auszuschließen. Ein solcher Ganzzellbiokatalysator wurde von Kataoka et al. durch Coexpression der NADP-abhängigen Aldehyd-Reduktase (AR) aus *Sporobolomyces salmonicolor* AKU4429 und der GDH aus

Bacillus megaterium konstruiert. Mit Hilfe dieses Katalysators ist es möglich, den HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor-Vorläufer (*R*)-4-Chlor-3-hydroxybutansäureethylester zu produzieren^[64] (Abb. 17).

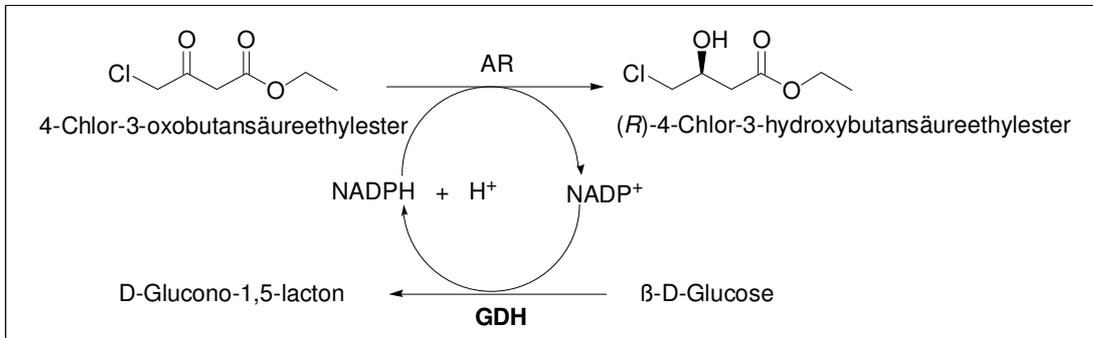


Abb. 17: Asymmetrische Reduktion von 4-Chlor-3-oxobutansäureethylester mit Hilfe eines Ganzzellbiokatalysators, der neben der Aldehyd-Reduktase (AR) aus *Sporobolomyces salmonicolor* AKU4429 die GDH aus *B. megaterium* coexprimiert enthält.

4. Motivation und Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren zur Synthese von chiralen Alkoholen. Diese Ganzzellbiokatalysatoren sollten durch Coexpression einer NADP-abhängigen (*R*)-spezifischen ADH aus *Lactobacillus kefir* bzw. *brevis* und eines Enzyms zur Regenerierung des Cofaktors konstruiert werden. Für die Auswahl an regenerierenden Enzymen sollten einige Kriterien beachtet werden. So sollten die spezifischen Aktivitäten der beteiligten Enzyme in der gleichen Größenordnung liegen, die Gensequenz des regenerierenden Enzyms sollte bekannt sein und bei der Reaktion entstehende störende Nebenprodukte sollten vermieden werden. Von großem Vorteil ist es außerdem, wenn die Reaktion des regenerierenden Enzyms irreversibel abläuft. Da die beiden ADHs aus *L. kefir* und *L. brevis* eine geringe NAD-Nebenaktivität besitzen, sollten diese Enzyme mit der NAD-abhängigen FDH aus *Candida boidinii* gekoppelt werden. Nach der Entwicklung der Ganzzellbiokatalysatoren sollten diese umfassend biochemisch charakterisiert werden. Zur Ermittlung des optimalen Enzymverhältnisses an ADH und entsprechendem Cofaktor-regenerierendem Enzym und zum Vergleich mit Ganzzellbiotransformationen sollten Umsetzungen im zellfreien System durchgeführt werden. Die Durchführung von Ganzzellbiotransformationen sollte unter unterschiedlichen Bedingungen erfolgen. So sollte der Einfluss von zugesetzten Cofaktoren untersucht werden, um zu überprüfen, ob die zellinterne Cofaktormenge für effiziente Umsetzungen ausreichend ist.

Außerdem sollte untersucht werden, ob die Umsetzungen durch Permeabilisierung der Zellmembran beeinflusst werden. Als Substrate sollten das Standardsubstrat der beiden ADHs, Acetophenon, sowie andere prochirale Ketone in den Umsetzungen eingesetzt werden. Schließlich sollten die einzelnen Ganzzellsysteme anhand der Ergebnisse der Umsetzungen vergleichend bewertet werden.

Des Weiteren sollte eine weitere NADP-abhängige ADH aus *Lactobacillus kefir* zur Homogenität gereinigt werden. Nach Isolierung des Gens, Klonierung und Expression sollte das Enzym umfassend biochemisch charakterisiert werden.

Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte

Analytik

GC/MS: Gaschromatograph HP 6890, Quadrupol-	
Massendetektor HP 5973	Hewlett-Packard
Gaschromatograph GC-17A	Shimadzu
Protein Sequenzer 477 A	Applied Biosystems

Bildverarbeitung

Eagle Eye II	Stratagene
--------------	------------

Chromatographie

BioCAD Sprint	PerSeptive Biosystems
---------------	-----------------------

Desintegration

Schwingkugelmühle MM2000	Retsch
Ultraschallgerät Sonopuls HD 60	Bandelin
Desintegrator S	IMA

Elektrophorese

DNA Elektrophoresekammer GT System	Bio-Rad
NuPAGE [®] XCell <i>SureLock</i> [™] Mini Cell	
mit NuPAGE [®] Bis-Tris Gelen	Invitrogen
NuPAGE [®] XCell II [™] Blot Module	Invitrogen
Model 491 Prep Cell	Bio-Rad

PCR

Personal Cyclers	Biometra
------------------	----------

Spektroskopie

UV/VIS-Spektralphotometer UV-1602	Shimadzu
-----------------------------------	----------

Ultrafiltration

Microcon 10 kDa	Millipore
Centriprep-10 Concentrator	Millipore
YM-Membran 10 kDa	Millipore
Ultrafiltrationszelle Modell 8050 und 8010	Millipore

Zentrifugation

Sorvall RC5B und RC5B Plus	DuPont
Tischzentrifuge Mikro 22 R	Hettich
Tischzentrifuge Rotina 35 R	Hettich
Speed-Vac-Konzentrator Univapo 150 H mit Kühlfalle Unicryo MC2L	Uniequip

1.2 Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien waren mindestens von p.a.-Qualität und wurden von Fluka, Sigma, Roth, Acros oder Merck bezogen. Nährmedienbestandteile waren von Merck oder Difco, die Coenzyme von Biomol. Restriktionsenzyme kamen von Roche und New England BioLabs, alle weiteren Enzyme für die molekularbiologischen Arbeiten von Roche und Qiagen. Chemikalien für die molekularbiologischen Untersuchungen waren von höchster Qualität.

1.3 Mikroorganismen

<i>Lactobacillus kefir</i>	DSM 20587
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 20054
<i>Bacillus subtilis</i> Strain 168	DSM 4424
<i>Escherichia coli</i> K12	Stratagene
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> Tuner(DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> Origami(DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RP	Stratagene

1.4 Vektoren

pET-21a(+)	Novagen
pETDuet-1	Novagen
pACYCDuet-1	Novagen
pKK223-3	Amersham Pharmacia

2. Mikrobiologische Methoden

2.1 Anzucht und Medien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Nährmedien vor Gebrauch durch Autoklavieren bei 2 bar und 121 °C für 20 min sterilisiert. Festen Medien wurde 1,5 % Agar zugesetzt.

Für die Anzucht von *L. kefir* und *L. brevis* wurde MRS-Medium mit folgender Zusammensetzung verwendet:

Caseinpepton (trypt. verdaut)	10,0 g
Fleischextrakt	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Glucose	20,0 g
CH ₃ COONa	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
Tween 80	1,0 g
Diammoniumhydrogencitrat	2,0 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ x H ₂ O	0,05 g
H ₂ O	1,0 l
pH 6,5	

MRS-Medium wurde für 15 min bei 118 °C sterilisiert.

Die Kulturen wurden ohne Schütteln bei 30 °C angezogen. Nach 40 h wurden die Zellen abzentrifugiert (4 °C, 11000 rpm, 20 min) und bei -20 °C gelagert.

B. subtilis wurde in low-salt LB-Medium angezogen:

Low-salt LB (Luria-Bertani)-Medium:

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
H ₂ O	1,0 l
pH 7,0	

Die Kultivierung erfolgte in einer Schüttelkultur bei 28°C und 200 rpm für 15 h.

Die Anzucht der verschiedenen *E. coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium mit folgender Zusammensetzung.

LB (Luria-Bertani)-Medium:

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
H ₂ O	1,0 l
pH 7,5	

Die Flüssigkulturen wurden bei 120 rpm und 37°C für 16 h angezogen.

2.2 Expression der Gene

Zur Expression der verschiedenen Gene wurden unterschiedliche *E. coli*-Expressionsstämme, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* Tuner(DE3) und *E. coli* Origami(DE3), eingesetzt. Des Weiteren wurden die Expressionsvektoren pET-21a(+) und pETDuet-1, welche Ampicillin-Resistenzgene tragen, sowie pACYCDuet-1, welcher das Chloramphenicol-Resistenzgen enthält, verwendet. Zur Selektion wurde den LB-Medien 50 µg/ml Ampicillin bzw. 34 µg/ml Chloramphenicol zugesetzt. Zunächst wurden Vorkulturen mit Volumina von 5 bzw. 100 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 120 rpm und 37°C geschüttelt. Die Hauptkulturen wurden 1 %ig inokuliert und ebenfalls bei 120 rpm und 37°C geschüttelt. Die Expression der rekombinanten Gene wurde nach Erreichen einer OD₆₆₀ von 0,5 mit unterschiedlichen Mengen an IPTG (1 bis 2000 µM) induziert. Anschließend wurden die Kulturen bei verschiedenen Temperaturen (25-37°C)

für 1,5 bis 19 h geschüttelt. Die Zellen wurden nach Ernte durch Zentrifugation bei -20°C bzw. -80°C gelagert.

2.3 Konservierung der Bakterienstämme

Für eine Konservierung über längere Zeiträume wurden die Bakterienstämme bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase in 5 ml des empfohlenen Mediums angezogen. Aliquots von 700 µl wurden entnommen, mit 300 µl sterilem Glycerin versetzt, durchmischt und bei -80°C gelagert.

3. Biochemische Methoden

3.1 Gewinnung von Rohextrakten

Die durch Zentrifugation geernteten Zellen wurden mit 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,2 auf 20 bis 40 %ige Zellsuspensionen verdünnt und anschließend verschiedenen Aufschlussverfahren unterzogen.

Der Aufschluss von *E. coli* BL21 (DE3)/AW-11 erfolgte zur Reaktivierung von AcnB durch Zusatz von 0,25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ und 2,5 mM DTT.

Der Zellaufschluss von *E. coli* BL21(DE3)/AW-9 wurde nach dem Protokoll von Clarke und Bragg durchgeführt^[65].

3.1.1 Zellaufschluss im analytischen Maßstab

3.1.1.1 Zellaufschluss mittels Schwingmühle

Zum Aufschluss geringer Mengen an Bakterienzellen wurde die Nassvermahlung mittels einer Schwingmühle der Firma Retsch verwendet.

In 1,5 ml-Eppendorfgefäße wurden 1,2 g Glasperlen (Ø 0,3 mm) und 0,6 ml Zellsuspension gefüllt und mittels einer Schwingmühle 10 min bei maximaler Schwingfrequenz aufgeschlossen. Durch Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4°C wurden aus dem

Zellhomogenat Zelltrümmer und Glasperlen abgetrennt. Der Überstand wurde als Rohextrakt in Enzymtests eingesetzt.

3.1.1.2 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Bei rekombinanten *E. coli*-Stämmen erfolgte der Aufschluss mit gepulstem Ultraschall mittels eines Pulsed Sonifier der Firma Branson. 1-2 ml Zellsuspension wurde für 2 min bei 70 % Puls, 80 % Intensität auf Eis mit Ultraschall behandelt und für eine Minute zwischengekühlt. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde der Rohextrakt abgenommen und das Pellet für weitere Untersuchungen aufbewahrt.

3.1.2 Zellaufschluss für größere Volumina

Der Aufschluss größerer Volumina an Zellen wurde in einem Desintegrator S (IMA) durchgeführt. Dazu wurden Zellsuspension und Glasperlen (\varnothing 0,3 mm) in einem Volumenverhältnis von 1 : 2 gemischt. Die Zellen wurden durch Rühren unter Eiskühlung für 20 min bei 3500 rpm aufgeschlossen. Aus dem Zellhomogenat wurden Glasperlen und Zelltrümmer durch Zentrifugation für 10 min bei 11000 rpm und 4°C abgetrennt und der Rohextrakt abgetrennt.

3.2 Chromatographische Methoden

Die Aufreinigung bzw. Trennung der verschiedenen Enzyme erfolgte über säulenchromatographische Trennmethode.

3.2.1 Anionenaustausch-Chromatographie

Als Material für die Anionenaustausch-Chromatographie wurde Q-Sepharose FF (Pharmacia) verwendet. Das jeweilige Enzympräparat wurde auf eine mit Puffer A (meist 50 mM TEA-Puffer pH 7,0) äquilibrierte Q-Sepharose FF-Säule aufgetragen. Nach dem Auftragen des Rohextraktes wurde die Säule mit dem gleichen Puffer gespült. Die Elution der gebundenen Proteine gelang durch Verwendung eines linearen Gradienten mit 1 M NaCl (Puffer B: Puffer A + 1 M NaCl). Die Detektion erfolgte UV-spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die einzelnen Fraktionen wurden auf Aktivität geprüft. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden vereinigt, über eine Ultrafiltrationskammer (Amicon, Millipore) eingeeengt und evtl. umgepuffert.

3.2.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Für die Aufreinigung mittels Hydrophober Interaktionschromatographie wurde das Material Phenyl-650C (Tosoh) verwendet. Die Proteinlösung wurde auf eine mit Puffer A (meist 50 mM TEA-Puffer pH 7,0 + 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) äquilibrierte Phenyl-650C-Säule (Tosoh) aufgetragen. Die Konzentration an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wurde mit Hilfe eines linearen bzw. 3-Stufen-Gradienten bis auf 0 % verringert (Puffer B entspricht Puffer A ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Die erhaltenen Fraktionen wurden auf Aktivität getestet. Die aktivsten Fraktionen wurden vereinigt und über eine Ultrafiltrationskammer (Amicon) entsalzt und eingeeengt.

3.2.3 Hydroxylapatitchromatographie

Für die Hydroxylapatitchromatographie wurde Hydroxylapatit 20 μm (Bio-Rad) eingesetzt. Die Proteinlösung wurde auf eine mit Puffer A (10 mM KPi-Puffer pH 6,5 + 150 mM NaCl) äquilibrierte Hydroxylapatitsäule aufgetragen. Zur Elution der Proteine wurde ein 3-Stufen-Gradient mit Puffer B (400 mM KPi-Puffer pH 6,5 + 250 mM NaCl) angelegt. In den erhaltenen Fraktionen wurde die Aktivität bestimmt, die aktivsten Fraktionen wurden vereinigt.

3.2.4 Gelfiltration

Für die Gelfiltration, welche die Auftrennung von Proteinen und zugleich die Bestimmung ihres nativen Molekulargewichts erlaubt, wurde als Matrix HiLoad 16/60 Superdex 200 (Pharmacia) verwendet. Die Säule hatte ein Volumen von 125 ml sowie einen Durchmesser von 1,6 cm. Der Trennbereich umfasst Proteine mit einem Gewicht von 10 bis 600 kDa. Die Eichung der Säule erfolgte mit Thyroglobulin, Catalase, Albumin, Chymotrypsinogen A, Ferritin, Aldolase, Ovalbumin und Ribonuclease A. Als Puffer für die Gelfiltration wurde 50 mM TEA-Puffer pH 7,0 + 150 mM NaCl verwendet.

3.2.5 Affinitätschromatographie

Als Material für die Affinitätschromatographie wurde Red Sepharose CL-6B (Pharmacia) eingesetzt. Nach Spülen der Säule mit Puffer A (10 mM KPi-Puffer pH 7,5) erfolgte die Elution der Proteine durch einen linear ansteigenden Gradienten von 0 bis 10 mM NADP.

3.2.6 Entsalzen und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Das Aufkonzentrieren, Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen erfolgte in Amicon-Ultrafiltrationszellen mit YM10-Membranen (Millipore). Das Einengen auf ein Fünftel des ursprünglichen Volumens erfolgte bei 4 bar Stickstoff-Überdruck. Alternativ wurden zum Aufkonzentrieren Zentrifugations-Einheiten wie Centriprep-10TM (Millipore) und für kleinere Volumina MicroconTM (Millipore) verwendet. Die Membranen aller verwendeten Vorrichtungen besaßen Ausschlussgrenzen von 10 kDa.

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt von Enzymlösungen wurde nach der Methode von Bradford^[66] bestimmt. Die Eichgerade wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt. Der Proteingehalt wurde durch Messung der Absorption bei 595 nm bestimmt.

3.3.2 Bestimmung der ADH-Aktivität

Bei der Reduktion von Ketonen durch die NADP-abhängigen ADHs wird NADPH oxidiert. Die Aktivitätsbestimmung der ADHs beruhte auf der photometrisch gemessenen Abnahme der NADPH-Menge bei 340 nm. Die Messungen erfolgten in Küvetten bei 30 °C über einen Zeitraum von einer Minute. Der molare Extinktionskoeffizient für NADPH beträgt $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Der Testansatz enthielt 50 mM TEA-Puffer pH 7,0, 11 mM Acetophenon, 1 mM MgCl₂ und 0,25 mM NADPH bzw. NADH. Das Gesamtvolumen pro Ansatz betrug 1 ml.

3.3.3 Bestimmung der Mut2G38D-ADH-Aktivität

Der Aktivitätstest für Mut2G38D-ADH erfolgte analog zum ADH-Aktivitätstest, allerdings in 100 mM KPi-Puffer pH 8,0 und mit 0,25 mM NADH.

3.3.4 Bestimmung der GDH-Aktivität

Die Ermittlung der GDH-Aktivität beruhte auf der photometrischen Messung des bei der Reaktion entstandenen NADPH bei 340 nm. Der Testansatz setzte sich zusammen aus 75 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0, 100 mM D-Glucose und 2 mM NADP auf 1 ml. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl Enzymlösung gestartet. Die Tests wurden bei 30°C in Küvetten durchgeführt, gemessen wurde über einen Zeitraum von einer Minute.

3.3.5 Bestimmung der IDH-Aktivität

Die Aktivität der IDH wurde ebenfalls durch die Messung des entstandenen NADPH am Photometer bei 340 nm bestimmt. Die Testlösung enthielt 25 mM MOPS-Puffer pH 7,5, 2,5 mM NADP, 0,5 mM DL-Isocitrat und 5 mM MgCl₂ auf 1 ml. Die Messung erfolgte bei 37°C über einen Zeitraum von einer Minute.

3.3.6 Bestimmung der MAE-Aktivität

Auch die Aktivitätsbestimmung des MAE beruhte auf der photometrisch gemessenen Zunahme der NADPH-Menge bei 340 nm. Der Testansatz setzte sich zusammen aus 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,45, 50 mM KCl, 24 mM L-Malat pH 7,4, 1 mM MnCl₂ und 0,5 mM NADP in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde bei 30°C über einen Zeitraum von einer Minute gemessen.

3.3.7 Bestimmung der FDH-Aktivität

Die Aktivität der FDH wurde ebenfalls photometrisch bei 340 nm durch die Messung des entstandenen NADH bestimmt. Der Testansatz enthielt 150 mM Natriumformiat und 1,5 mM NAD in 50 mM KPi-Puffer pH 7,5. Die Messung erfolgte bei 30°C und wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet. Der Anstieg der Absorption bei 340 nm wurde über einen Zeitraum von einer Minute verfolgt.

3.3.8 Bestimmung der PNT-Aktivität

Der Test zur Bestimmung der Transhydrogenase-Aktivität erfolgte photometrisch bei 375 nm und 30°C. Der Ansatz setzte sich zusammen aus 50 mM Tris-Acetat-Puffer pH 7,5, 250 mM Sucrose, 2,5 M Rotenon, 0,5 mM NADPH und 0,5 mM 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet und wurde über einen Zeitraum von 1 min verfolgt.

3.3.9 Bestimmung der Acn-Aktivität

Die Acn-Aktivität wurde durch Kopplung der Acn mit der IDH bestimmt. Hierdurch konnte die Bildung von NADPH photometrisch bei 340 nm gemessen werden. Der Testansatz enthielt 100 mM TEA-Puffer pH 7,5, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM NADP, 1 U IDH und 1 mM Trisnatriumcitrat. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet und die Reaktionsgeschwindigkeit bei 30°C über einen Zeitraum von einer Minute gemessen.

3.3.10 Nachweis von chiralen Alkoholen mittels Gaschromatographie

Die Analyse präparativer Umsetzungen von Acetophenon zu (*R*)-Phenylethanol, von 2,5-Hexandion zu (*2R,5R*)-Hexandiol und von 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester zu (*S*)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester erfolgte am Gaschromatographen GC-17A (Shimadzu). Hierfür wurde die chirale Säule CP-Chirasil-DEX CB (Chrompack, 25 m x 0,25 mm ID) verwendet. Als Trägergas wurde Helium (1,3 ml/min) eingesetzt. Das Temperaturprogramm war folgendes: 60°C (5 min), 60 – 195°C (5°C/min). Die Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze ist in 5.1 und 5.2 beschrieben. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 37°C. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben entnommen und mit dem gleichen Volumen an Ethylacetat bzw. Chloroform gründlich gemischt. Zur Phasentrennung wurde 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert, die organische Phase abgenommen und mittels Gaschromatographie untersucht.

3.3.11 Nachweis von (*3R,5S*)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester mittels GC/MS

Der Nachweis von (*3R,5S*)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester erfolgte mit einem Gaschromatographen HP 6890 (Hewlett-Packard), welcher mit einem Quadrupol-

Massendetektor HP 5973 (Hewlett-Packard) gekoppelt war. Die GC-Parameter waren die folgenden: Kapillarsäule HP-5MS (Hewlett-Packard, 30 m x 0,25 mm ID), Trägergas Helium (1,0 ml/min, konstanter Fluss), Temperaturprogramm 60 °C (0–1 min), 60–280 °C (1–14,7 min, 15 °C/min), 280 °C (14,7–20 min). Der Massendetektor wies folgende Parameter auf: EI (70 eV), Ionenquelle 230 °C, Quadrupol 106 °C, Transfer Line 300 °C, detektierbarer Massenbereich 50–550 amu. Der Testansatz setzte sich zusammen aus 100 mM Imidazol-HCl-Puffer pH 6,5, 1 mM NADP, 40 mM Glucose-6-Phosphat, 0,5 U Glucose-6-Phosphat-DH, 2 µl (3*R*,5*S*)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester sowie 50–200 µl Enzymlösung auf 300 µl. Die Ansätze wurden bei 30 °C 2-24 h inkubiert. Aus jedem Ansatz wurden 40 µl Probe entnommen, mit 100 µl Ethylacetat nach gründlichem Mischen ausgeschüttelt, zur Phasentrennung bei 14000 rpm 5 min zentrifugiert und anschließend die organische Phase abgenommen, welche GC/MS-analytisch untersucht wurde.

3.3.12 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Überprüfung von Proteinproben unterschiedlicher Reinheitsgrade auf Zusammensetzung und Homogenität sowie die Kontrolle der Expressionsleistung erfolgte über Gelelektrophorese. Der Zusatz von SDS bewirkt die Denaturierung der Proteine. Die Proteine erhalten proportional zu ihrer Größe eine negative Ladung und können im Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Das Gießen der Gele mit unterschiedlichen Acrylamid-Konzentrationen erfolgte nach den Methoden von Laemmli^[67] und Schagger^[68].

Alternativ wurde das NuPAGE Bis-Tris-System (Invitrogen), welches auf Polyacrylamid-Gelen basiert, die mit Bis-Tris-HCl gepuffert sind (pH 6,4) und verschiedene Acrylamid-Konzentrationen enthalten (10 %, 12 %, 4-12 %), verwendet. Die Elektrophoresen wurden nach Anleitung des Herstellers unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Es wurden MES- oder MOPS-Puffer (Invitrogen) verwendet. Als Marker wurden Mark12™ Wide-Range Protein Standard und SeeBlue® Pre-Stained Protein Standard (beide von Invitrogen) verwendet.

3.3.13 Native PAGE

Die Durchführung der nativen PAGE geschah gemäß der Vorschrift von Laemmli bzw. unter Verwendung von NuPAGE Bis-Tris-Gelen (Invitrogen). Alle Lösungen und Puffer wurden ohne Zusatz von SDS angesetzt.

3.3.14 Präparative native PAGE

Zur Elution von nativem, aktivem Protein aus nach Vorschrift von Laemmli angefertigten Gelen wurde die präparative native PAGE mittels Model 491 Prep Cell (Bio-Rad) durchgeführt. Es wurde ein 10 %iges Trenngel sowie ein 10 %iges Sammelgel hergestellt. Die Höhe des Gels betrug 10 cm. Nach Elution der Bromphenolblau-Bande wurden Fraktionen von je 10 ml gesammelt. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei 12 W und 50 mA unter Kühlung mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Als Elutionspuffer wurde 50 mM TEA-Puffer pH 7,0 verwendet.

3.3.15 Blotting von Proteinen

3.3.15.1 Elektroblotting nach Kyhse-Andersen

Der Transfer von Proteinen aus Gelen auf PVDF-Membranen erfolgte nach der Methode von Kyhse-Andersen^[69]. Bei diesem Verfahren handelt es sich um ein diskontinuierliches System, bei dem ein vollständiger Transfer aller Proteine auf die Membran stattfindet. Es wurden drei Blottingpuffer angesetzt (Anodenpuffer I: 0,3 M Tris, 10 % MeOH pH 10,4; Anodenpuffer II: 25 mM Tris, 10 % MeOH pH 10,4; Kathodenpuffer: 25 mM Tris, 40 mM ϵ -Aminohexansäure, 10 % MeOH pH 9,4). Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel in H₂O gewaschen und im Kathodenpuffer äquilibriert. Die Membran (PVDF-Immobilon-P, Millipore) wurde zunächst kurz in MeOH eingelegt, mit H₂O gewaschen und 5 min in Anodenpuffer II äquilibriert. Zwei der auf Gelgröße zugeschnittenen Filterpapiere wurden mit Anodenpuffer I, eines mit Anodenpuffer II befeuchtet und in dieser Reihenfolge auf die Anode gelegt. Auf die Filter wurden Membran, Gel und zuletzt drei mit Kathodenpuffer befeuchtete Filterpapiere gelegt. Die Proteine wurden mit 1,5 mA/cm² geblottet und mit Amidoschwarz angefärbt.

3.3.15.2 NuPAGE® Western Transfer

Alternativ erfolgte der Transfer von Proteinen aus NuPAGE®-Gelen auf Membranen nach erfolgter Elektrophorese laut Vorschrift für NuPAGE® Western Transfer. Der Transfer-Puffer setzte sich zusammen aus 850 ml Millipore-Wasser, 50 ml NuPAGE® Transfer Puffer 20x sowie 100 ml MeOH. Nach Durchführung der Elektrophorese wurden fünf NuPAGE Pads in Transferpuffer eingelegt. Eine auf Gelgröße zurecht geschnittene PVDF-Membran wurde für 30 s in MeOH und anschließend für einige Minuten in Transferpuffer gelegt. Zwei Filterpapiere wurden auf Gelgröße zurecht geschnitten. Eines davon wurde mit Transferpuffer getränkt und luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Anschließend wurden Gel und Filterpapier so auf ein Stück Parafilm® gelegt, dass sich das Gel oben befand. Auf das Gelstück wurden luftblasenfrei die vorbehandelte PVDF-Membran und darauf das zweite mit Transferpuffer getränkte Filterpapier gelegt. In das Blotmodul wurden zunächst zwei Pads, anschließend das Sandwich aus Filter, Gel, Membran und Filter und nochmals drei Pads gelegt. Es wurde 65 min bei 30 V und 170 mA geblottet und mit Amidoschwarz gefärbt.

3.3.16 Färbungen von Gelen und Membranen

3.3.16.1 Coomassie-Färbung von Proteinen

Die Coomassie-Färbung von Proteinen auf Gelen erfolgte laut Vorschrift mittels der Coomassie G-250-Färbelösung SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen).

3.3.16.2 Silberfärbung von Proteinen

Geringe Proteinkonzentrationen auf Gelen wurden aufgrund der größeren Empfindlichkeit nach der Methode von Blum^[70] mit AgNO₃ sichtbar gemacht.

3.3.16.3 Amidoschwarzfärbung von Proteinen

Die Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen erfolgte mit Amidoschwarzlösung (0,1 % Amidoschwarz, 40 % EtOH, 10 % HAc). Nach der etwa zehnmütigen Färbung wurden die Proteinbanden durch Entfärben des Hintergrundes mit Entfärberlösung (40 % EtOH, 10 % HAc) sichtbar gemacht.

3.3.16.4 Aktivitätsfärbung von Proteinen nach nativer PAGE

Nach nativer PAGE erfolgte die Inkubation der Gele in der Aktivitätsfärbelösung unter Zusatz von 40 µl (3*R*,5*S*)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester unter Lichtabschluss für 2 – 3 h. Die Aktivitätsfärbelösung enthielt 25,00 mg INT (*p*-Iodonitrotetrazoliumviolett; 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid), 2,00 mg PES (Phenazinethosulfat; (*N*-Ethyldibenzopyrazinethylsulfatsalz) und 41,85 mg NADP auf 100 ml. Anstelle von INT wurde alternativ NBT (*p*-Nitro-Blue tetrazoliumchlorid; 3,3'-(3,3'-Dimethoxy-4,4'-biphenylen)bis[2-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazoliumchlorid]) (81,77 mg/100 ml H₂O) eingesetzt. Die Strukturen von INT, PES und NBT sind in Abb. 18 dargestellt.

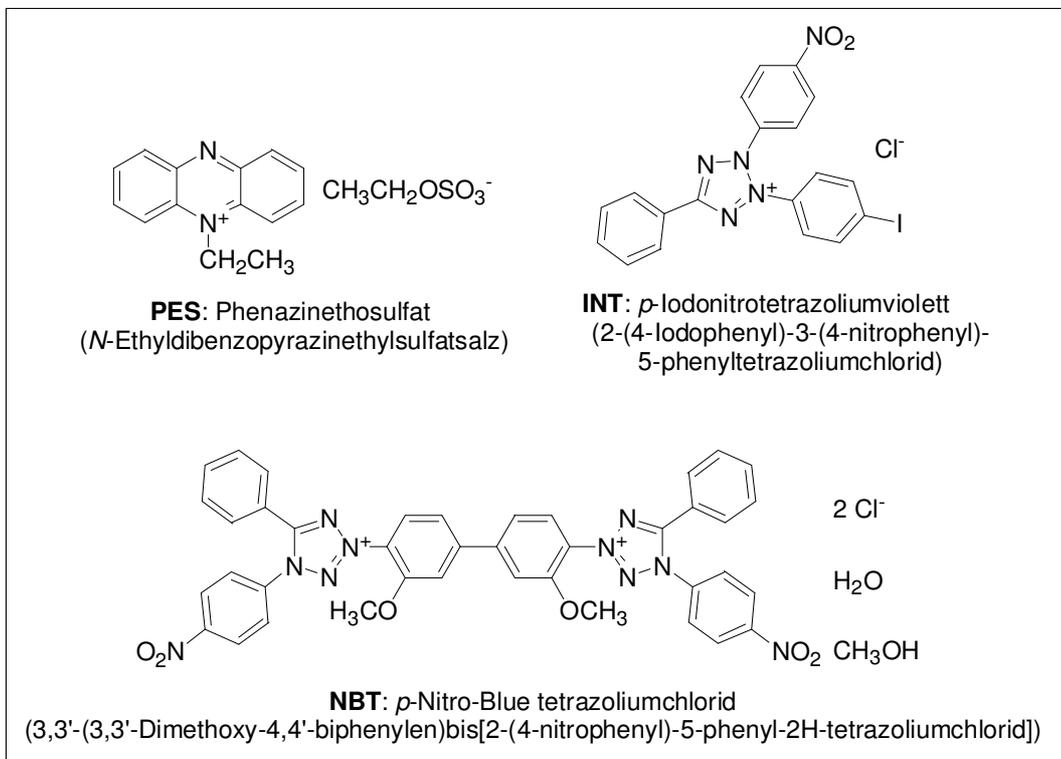


Abb. 18: Strukturen von PES, INT und NBT.

Das Prinzip der Aktivitätsfärbung mit INT und PES ist in folgendem Schema dargestellt und beruht auf der Oxidation des Alkohols zum Keton. Der Farbumschlag erfolgt durch Reduktion des gelben INT zum roten Formazan INT_H (Abb. 19).

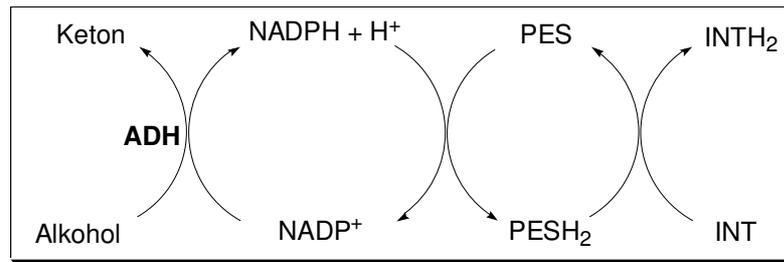


Abb. 19: Schematische Darstellung des Aktivitätstests mit PES und INT.

3.3.17 Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz von Proteinen erfolgte über automatisierten Edman-Abbau^[71] mit einem Automated Sequencer 477A (Applied Biosystems) mit Online-HPLC 120A. Hierbei werden die Aminosäuren schrittweise abgebaut. Die freie Aminogruppe am N-Terminus wird mit Phenylisothiocyanat zum Thioharnstoff-Derivat umgesetzt. Dessen cyclisierende Spaltung führt zu der um die endständige Aminosäure verkürzten Peptidkette und schließlich zu einem 3-Phenyl-2-thiohydantoin-Derivat (PTH-Aminosäure), welches mittels HPLC identifiziert werden kann.

4. Molekularbiologische Methoden

4.1 Präparation von genomischer DNA

4.1.1 Präparation von genomischer DNA aus *Lactobacillus kefir*

Von der konserviert vorliegenden Stammkultur *Lactobacillus kefir* wurde eine Vorkultur bis zum Ende der logarithmischen Phase kultiviert und 10 %ig in den zur Kultivierung vorgesehenen Ansatz überimpft. Dieser wurde bis zu einer OD₆₆₀ von ca. 0,7 bei 30°C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 5000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert (Sorvall, GS3-Rotor). Nach dem Waschen der Zellen mit 10 ml TE (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8,0) wurde mit 6000 rpm (Sorvall, GS3-Rotor, 10 min, 4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml TE resuspendiert und nach Zugabe von 1 mg/ml Lysozym für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde über Nacht bei 50°C unter Zugabe von 1 % Natriumlaurylsarcosin, 0,2 mg/ml Proteinase K und 0,1 mg/ml RNAse A lysiert und die RNA abgebaut. Die genomische DNA wurde durch fraktionierte Phenolfällungen abgetrennt.

- Phenolfällungen:
1. 1 Vol. Phenol (mit TE-Puffer gesättigt)
 2. 1 Vol. Phenol/CHCl₃/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1)
 3. 1 Vol. CHCl₃/Isoamylalkohol (24 : 1)

Bei jedem Fällungsschritt wurden die Phasen durch vorsichtiges Schwenken etwa 5 min vermischt und anschließend durch Zentrifugation bei 20000 rpm (Sorvall, SS34-Rotor, 20°C, 10 min) getrennt. Nach erfolgter Phasentrennung wurde jeweils die wässrige Phase für den nächsten Schritt abgenommen. Nach dem letzten Schritt wurde die Oberphase mit 0,0625 Vol. 8 M LiCl vermischt und mit 2 Vol. eiskaltem reinstem EtOH vorsichtig überschichtet. Die an der Grenzschicht ausfallende DNA wurde auf eine gebogene Pasteurpipette aufgewickelt und zweimal mit 70 %igem EtOH gewaschen. Nach Trocknung in der Vakuumzentrifuge wurde die DNA in 2 ml TE (10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen.

4.1.2 Präparation von genomischer DNA aus *Bacillus subtilis*

Für die Präparation genomischer DNA aus *B. subtilis* wurden *B. subtilis*-Zellen nach 15 h Wachstum bei 28°C und 200 rpm in 100 ml LB-Medium 30 min lang auf 80°C erhitzt. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 4°C und 7000 rpm wurde das Pellet in 20 ml 25 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 + 10 mM EDTA suspendiert. Anschließend wurde 1 ml Lysozym-Lösung (10 mg/ml) zugegeben und 3 h bei 37°C inkubiert. Nach Zusatz von 6 ml 10 %iger SDS-Lösung und 400 µl Protease K (Qiagen) wurde 15 min auf 65°C erhitzt und 4 ml 5 M NaCl sowie 6 ml CTAB/NaCl-Lösung (10 % CTAB, 4,1 % NaCl) zugesetzt und weitere 20 min auf 65°C erhitzt. Durch Zugabe eines Volumenanteils einer Lösung aus CHCl₃ : Isoamylalkohol (24 : 1) entstand ein Zwei-Phasen-System, welches nach vorsichtigem Schwenken 30 min lang bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert wurde. Die wässrige Phase wurde abgenommen, erneut mit einem Volumenteil der CHCl₃ : Isoamylalkohol-Lösung vermischt und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit 0,6 Volumen kaltem Isopropanol gemischt und 30 min lang bei -20°C inkubiert. Die ausgefallene DNA wurde aufgewickelt und mit 70 %igem kaltem EtOH gewaschen. Nach Trocknen in der Vakuumzentrifuge wurde die DNA in H₂O gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

4.1.3 Präparation genomischer DNA mit Hilfe des DNeasy Tissue Kit

Die Präparation genomischer DNA aus *Lactobacillus brevis* und *E. coli* K12 gelang mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits (Qiagen). Die geernteten Zellen wurden zunächst mit Hilfe von Proteinase K lysiert. Anschließend wurde das Lysat auf DNeasy Mini Spin-Säulen aufgetragen. Während der nachfolgenden Zentrifugation wurde die DNA selektiv an die DNeasy Membran gebunden, während diese von anderen Substanzen passiert wurde. In zwei Waschsritten wurden verbleibende Verunreinigungen sowie Enzyminhibitoren entfernt. Die DNA wurde mit H₂O eluiert und bei 4 °C aufbewahrt.

4.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Identifizierung, Qualifizierung und Isolierung doppelsträngiger DNA wurde diese in Agarosegelen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Herstellung der Gele und die Durchführung der Elektrophorese erfolgten nach der Vorschrift von Sambrook et al.^[72]. Es wurden 0,6–1,5 %ige Agarosegele mit 1x TBE-Puffer (50x TBE-Puffer: 89 mM Tris, 89 mM H₃BO₃, 2,5 mM EDTA, pH 8,3) angefertigt. Den Agarosegelen wurde 0,005 % (v/v) Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zugesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen an DNA-Probenpuffer (6x DNA-Probenpuffer: 6 x TBE pH 8,0, 50 % (v/v) Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau) versetzt. Als Molekulargewichtsstandard wurde 1 kb DNA Ladder (Invitrogen) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in TBE-Puffer bei 5 bis 7 V/cm Gellänge. Die Agarosegele wurden mit dem Videosystem EagleEye II (Stratagene) dokumentiert. Hierbei wurde die Ethidiumbromidfluoreszenz im UV-Durchlicht bei 312 nm angeregt.

4.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit QIAquick Gel Extraction Kit

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) gemäß der Anleitung. Hierzu wurden die aus dem Gel ausgeschnittenen DNA-Banden über spezielle Membransäulen isoliert und nach einem Waschschrift die DNA von der QIAquick-Zentrifugationssäule mit 30 µl Elutionspuffer eluiert.

4.4 Herstellung von Primern

Sämtliche Primer wurden von der Firma metabion (Martinsried) hergestellt und in lyophilisierter Form geliefert.

4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion gelang die Amplifizierung der verschiedenen Gene aus genomischer DNA. Es wurden sowohl Taq-Polymerase (Qiagen) als auch ProofStart DNA Polymerase (Qiagen) verwendet. Die Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes ist in Tab. 3 beschrieben.

Tab. 3: Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes.

Komponente	Menge
Template-DNA	5 – 100 ng
Polymerase-Puffer (10x)	10 μ l
dNTPs	je 0,2 mM
Primer 1	100 pmol
Primer 2	100 pmol
Polymerase	5 U
Aqua bidest	ad 100 μ l

Die PCR-Ansätze wurden mit leichtem Mineralöl überschichtet. Die Durchführung der Reaktionen erfolgte in automatischen DNA-Thermal-Cyclern (Biometra 200 bzw. 500). Das verwendete Protokoll bei Einsatz der Taq-Polymerase ist in Tab. 4 beschrieben.

Tab. 4: PCR-Programm bei Verwendung der Taq-Polymerase. Die Annealing-Temperatur hängt von den Schmelzpunkten der Primer ab. Die Schritte 2 bis 4 wurden 30-mal wiederholt.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1. Initialdenaturierung	94 °C	3 min
2. Denaturierung	94 °C	1 min
3. Annealing	$(T_m - 3)^\circ\text{C}$	1 min
4. Elongation	72 °C	1 min
5. Finale Elongation	72 °C	10 min
6. Kühlung	4 °C	∞

Bei Verwendung der ProofStart DNA Polymerase wurde eine abgeänderte Methode verwendet, welche in Tab. 5 dargestellt ist.

Tab. 5: PCR-Programm bei Verwendung der ProofStart DNA-Polymerase. Die Annealing-Temperatur hängt von den Schmelzpunkten der Primer ab. Die Schritte 2 bis 4 wurden 35-mal wiederholt.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1. Initialdenaturierung	95 °C	5 min
2. Denaturierung	94 °C	50 sec
3. Annealing	$(T_m - 3)^\circ\text{C}$	50 sec
4. Elongation	72 °C	50 sec
5. Finale Elongation	72 °C	10 min
6. Kühlung	4 °C	∞

4.6 Aufreinigung von PCR-Produkten mittels QIAquick PCR Purification Kit

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) laut Anweisung. Mit Hilfe dieses Kits wurde die DNA selektiv an eine Silicagel-Membran gebunden. Verunreinigungen wurden abgetrennt, und die DNA wurde mit 50 μl Elutionspuffer eluiert.

4.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe des SureClone™ Ligation Kits (Pharmacia) erfolgte die Klonierung von PCR-Fragmenten in den Vektor pUC18 *Sma*I/BAP.

4.8 Isolierung von Genen mittels Universal GenomeWalker™ Kit

Mit Hilfe des Universal GenomeWalker™ Kits (Clontech) ist es möglich, ausgehend von genomischer DNA unbekannte DNA Sequenzen, die in der Nähe einer bekannten Sequenz liegen, aufzuklären (Abb. 20). Genomische DNA des gewünschten Organismus wird mit verschiedenen, im Kit enthaltenen Restriktionsenzymen (*Dra*I, *Eco*RV, *Pvu*II, *Scal*I, *Stu*I) verdaut. Jedes dieser Fragmente wird anschließend an mitgelieferte GenomeWalker Adaptoren ligiert, so dass verschiedene Bibliotheken erhalten werden. Diese werden als Templates in jeweils zwei PCR-Reaktionen pro Bibliothek eingesetzt. Der erste (äußere) PCR-Ansatz erfolgt mit dem im Kit enthaltenen äußeren Primer (AP1) und einem gen-spezifischen äußeren Primer (GSP1), während der zweite (innere, „nested“) PCR-Ansatz mit einem mitgelieferten inneren Primer (AP2) und einem gen-spezifischen inneren Primer

(GSP2) erfolgt. Die resultierenden PCR-Produkte können in einem Agarosegel getrennt und das überwiegende Amplifikat aufgereinigt und sequenziert werden.

Alle Arbeitsschritte wurden gemäß Anleitung durchgeführt. Die PCR-Ansätze erfolgten mit dem Advantage™ Genomic Polymerase Mix (Clontech).

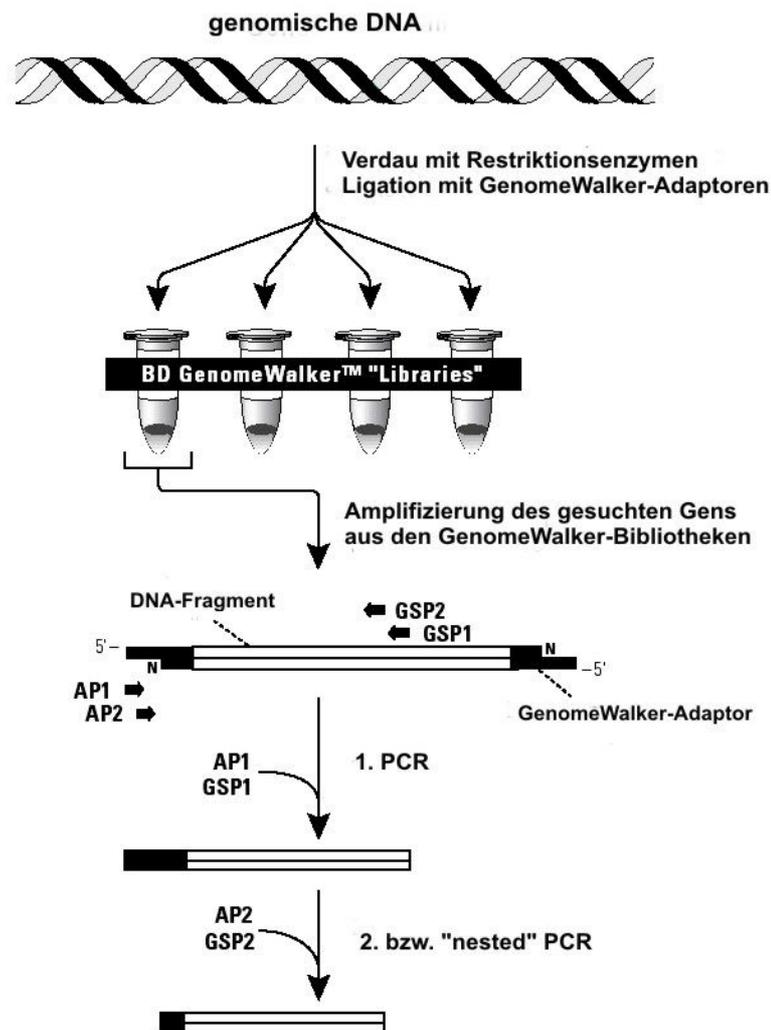


Abb. 20: Schematische Darstellung des Universal GenomeWalker™-Systems.

4.9 DNA-Restriktion

Für analytische und präparative Anwendungen wurden 0,5 bis 1 µg DNA mit 1 bis 5 U Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 30 bis 50 µl für 60 bis 90 min unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen (Temperatur, Pufferauswahl) inkubiert. Anschließend wurde der gesamte oder ein Teil des Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen und evtl. nach der Trennung aus dem Gel isoliert. Die verwendeten Restriktionsenzyme

wurden von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim) und New England Biolabs (Frankfurt) bezogen.

4.10 Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA

Vor der Dephosphorylierung wurde der Restriktionsansatz zur Inaktivierung des Restriktionsenzym für 20 min je nach verwendetem Enzym bei 65 bzw. 80°C inkubiert. Anschließend wurden laut Anleitung Dephosphorylierungspuffer und Alkalische Phosphatase aus Shrimps (Roche Diagnostics) zugesetzt und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

4.11 DNA-Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kits (Roche Diagnostics) gemäß der Anleitung. Die Ligationsansätze wurden für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

4.12 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der Methode von Hanahan^[73] hergestellt. Die Zellen wurden bei -80°C gelagert.

4.13 Transformation von *E. coli*-Zellen

100 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und Plasmid-DNA zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde 60 sec auf 42°C erhitzt, nach weiteren 2 min auf Eis wurden 300 µl LB-Medium zusetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden auf Agarplatten mit Selektionsdruck ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Je nach Plasmid enthielten die Agarplatten Ampicillin (50 µg/ml) und/oder Chloramphenicol (34 µg/ml) als Selektionsmarker.

4.14 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits von Qiagen isoliert. Die Methode beruht in einer modifizierten Form auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen nach Birnboim und Doly^[74] und anschließender Anionenaustausch-Chromatographie. Die Durchführung erfolgte gemäß dem QIAprep Miniprep Handbook. Zur Plasmidisolierung wurde jeweils eine 5 ml-Übernachtskultur eingesetzt.

4.15 DNA-Sequenzierung

Sämtliche DNA-Sequenzierungsarbeiten wurden von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

5. Enzymatische Synthesen von Alkoholen mit Cofaktorregenerierung

5.1 Synthese von chiralen Alkoholen in zellfreien Systemen

Zur Synthese von chiralen Alkoholen in zellfreien Systemen wurden die beteiligten Enzyme partiell aufgereinigt. Als Substrate wurden Acetophenon, 2,5-Hexandion und 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester eingesetzt, welche von den ADHs aus *L. kefir* und *L. brevis* zu (*R*)-Phenylethanol, (*2R,5R*)-Hexandiol bzw. (*S*)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester reduziert wurden. Zur Regenerierung von NADPH wurden GDH und IDH aus *B. subtilis* sowie MAE aus *E. coli*, zur NADH-Regenerierung FDH aus *C. boidinii* eingesetzt. Die Ansätze erfolgten in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Die Untersuchungen wurden mit ADH und cofaktor-regenerierendem Enzym in verschiedenen Verhältnissen sowie 1 mM NADP bzw. NAD bei verschiedenen Inkubationstemperaturen durchgeführt. Die Zusammensetzungen der Ansätze für die einzelnen Systeme sind in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Zusammensetzung der Reaktionsansätze bei der Synthese von chiralen Alkoholen mit verschiedenen Systemen.

System	Zusammensetzung
ADH-GDH	100 mM TEA-Puffer pH 7,5, 1 mM MgCl ₂ , 100 mM D-Glucose, 10 oder 20 mM Acetophenon bzw. 15 mM 2,5-Hexandion bzw. 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester
ADH-IDH	100 mM TEA-Puffer pH 7,5, 10 mM MgCl ₂ , 50 mM DL-Isocitrat, 10 mM Acetophenon bzw. 15 mM 2,5-Hexandion bzw. 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester
ADH-MAE	100 mM TEA-Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM MnCl ₂ , 50 mM KCl, 30 mM L-Malat, 10 mM Acetophenon bzw. 15 mM 2,5-Hexandion bzw. 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester
ADH-FDH	100 mM TEA-Puffer pH 7,5, 1 mM MgCl ₂ , 150 mM Natriumformiat, 10 mM Acetophenon bzw. 15 mM 2,5-Hexandion bzw. 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester

Während der Inkubation der Ansätze wurden in bestimmten Zeitabständen Proben genommen und die Bildung der chiralen Alkohole mittels GC analysiert.

5.2 Durchführung von Ganzzellbiotransformationen

5.2.1 Durchführung von Ganzzellbiotransformationen mit substrat-gekoppelter Cofaktorregenerierung

Für die Durchführung von Ganzzellbiotransformationen mit substrat-gekoppelter Cofaktorregenerierung wurden *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3-Zellen eingesetzt. Die Regenerierung von NADPH erfolgte durch Isopropanol. In einem Gesamtvolumen von 1 ml wurden 50 mg Zellen suspendiert. Die Reaktionsansätze hatten ein Volumen von 1 ml und enthielten 10 mM Acetophenon, 1 mM MgCl₂ sowie 100 µl Zellsuspension in 100 mM TEA-Puffer pH 7,5. Den Ansätzen wurde 0,1 M, 1 M bzw. 5 M Isopropanol zugesetzt. Ein Teil der Ansätze enthielt außerdem 1 mM NADP. Die Durchführung der Umsetzungen erfolgte bei 37°C unter leichtem Schütteln. Nach bestimmten Zeiten wurden Proben genommen und mittels GC auf die Bildung von (*R*)-Phenylethanol untersucht.

5.2.2 Durchführung von Ganzzellbiotransformationen mit enzymatischer Cofaktorregenerierung

E. coli BL21(DE3)/pAW-3, pAW-4, pAW-5, pAW-6, pAW-7, pAW-8, AW-9, pAW-10 und AW-11 wurden in Ganzzellbiotransformationen eingesetzt. 50 mg Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 1 ml suspendiert. Von diesen Zellsuspensionen wurden den Ansätzen unterschiedliche Mengen zugesetzt. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die einzelnen Systeme ist in Tab. 7 dargestellt.

Tab. 7: Zusammensetzung der Reaktionsansätze bei der Durchführung von Ganzzellumsetzungen.

System	Zusammensetzung Reaktionsansatz
pAW-3, pAW-4	100 mM TEA-Puffer pH 7,5, 1 mM MgCl ₂ , 100 mM D-Glucose, 10 mM Acetophenon (100 bzw. 10 µl Zellsuspension) bzw. 15 mM 2,5-Hexandion (100 bzw. 10 µl Zellsuspension) bzw. 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester (100 µl Zellsuspension)
pAW-5	100 mM TEA-Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM MnCl ₂ , 50 mM KCl, 30 mM L-Malat, 100 µl Zellsuspension, 10 mM Acetophenon bzw. 15 mM 2,5-Hexandion bzw. 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester
pAW-6	100 mM TEA-Puffer pH 7,5, 5 mM MgCl ₂ , 50 mM DL-Isocitrat, 10 mM Acetophenon (100 bzw. 10 µl Zellsuspension) bzw. 15 mM 2,5-Hexandion (100 µl Zellsuspension) bzw. 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester (100 µl Zellsuspension)
pAW-7	100 mM TEA-Puffer pH 7,5, 1 mM MgCl ₂ , 150 mM Natriumformiat, 10 mM Acetophenon (100 µl Zellsuspension) bzw. 15 mM 2,5-Hexandion (730 µl Zellsuspension) bzw. 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester (730 µl Zellsuspension)
pAW-8	100 mM TEA-Puffer pH 7,5, 1 mM MgCl ₂ , 150 mM Natriumformiat, 10 mM Acetophenon (400 µl Zellsuspension) bzw. 15 mM 2,5-Hexandion (730 µl Zellsuspension) bzw. 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester (730 µl Zellsuspension)
AW-9	100 mM TEA-Puffer pH 7,5, 1 mM MgCl ₂ , 150 mM Natriumformiat, 10 mM Acetophenon (100 µl Zellsuspension) bzw. 15 mM 2,5-Hexandion (600 µl Zellsuspension) bzw. 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester (600 µl Zellsuspension)
pAW-10	100 mM TEA-Puffer pH 7,5, 1 mM MgCl ₂ , 150 mM Natriumformiat, 730 µl Zellsuspension, 10 mM Acetophenon bzw. 15 mM 2,5-Hexandion bzw. 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester
AW-11	100 mM TEA-Puffer pH 7,5, 5 mM MgCl ₂ , 100 mM Trinatriumcitrat, 100 µl Zellsuspension, 10 mM Acetophenon bzw. 15 mM 2,5-Hexandion bzw. 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester

Bei einem Teil der Ansätze erfolgte der Zusatz von 1 mM NADP bzw. NAD. Die Durchführung der Versuche erfolgte in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 37°C unter leichtem Schütteln. Nach bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen und die Umsetzung mittels GC analysiert.

5.2.3 Durchführung von Ganzzellbiotransformationen mit Permeabilisierung der Zellmembran

Die Permeabilisierung der Zellmembran bei Ganzzellumsetzungen erfolgte durch die Zugabe von 10 µl Toluol pro ml Reaktionsmedium nach der Suspendierung der Zellen in Puffer^[75]. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurden die Ganzzellumsetzungen nach dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die Reduktion der eingesetzten Ketone wurde im Gaschromatographen analysiert.

5.2.4 Durchführung von Ganzzellbiotransformationen in organisch-wässrigen Zweiphasensystemen

Die Einführung organisch-wässriger Zweiphasensysteme diente der erhöhten Löslichkeit von Substraten sowie Produkten als auch der vereinfachten Isolierung der gewünschten Produkte. Es wurden verschiedene organische Lösungsmittel (MTBE, *n*-Butylacetat und Toluol) auf ihre Eignung in Zweiphasensystemen bei der Reduktion von Acetophenon durch das System *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3 untersucht. Die wässrige Phase des Systems bestand aus 50 mM TEA-Puffer pH 7,5 + 1 mM MgCl₂ sowie 500 mM Glucose. In der organischen Phase waren 50 mM Acetophenon im jeweiligen Lösungsmittel gelöst. Die beiden Phasen wurden im Verhältnis mit einem Gesamtvolumen von 100 ml eingesetzt. Ein Ansatz enthielt 100 mg Zellen. Die Durchführung der Experimente erfolgte in 500 ml-Kolben bei 30°C unter Schütteln.

Außerdem wurde die Reduktion von Acetophenon im Zweiphasensystem nach Permeabilisierung der Zellmembran der *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3-Zellen untersucht. Hierbei wurden die in der wässrigen Phase, bestehend aus 50 mM TEA-Puffer pH 7,5 mit 500 mM Glucose, suspendierten Zellen für eine Stunde mit Toluol (10 µl/ml) behandelt, bevor die organische Phase bestehend aus MTBE mit 50 mM Acetophenon zugesetzt wurde. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 30°C unter Schütteln.

Allen Ansätzen wurden nach bestimmten Zeitintervallen Proben entnommen und mittels GC analysiert.

Ergebnisse

1. „Zweite“ ADH aus *Lactobacillus kefir*

Bei Ganzzellumsetzungen von 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit *L. kefir*-Zellen zeigte sich überraschenderweise, dass neben 6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester auch 6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester im Reaktionsgemisch vorlag^[23]. Da die bekannte NADP-abhängige ADH aus *L. kefir* lediglich die δ -Ketogruppe des β,δ -Diketoesters reduziert, muss *L. kefir* eine weitere, bisher unbekannte (*R*)-spezifische ADH enthalten, welche die δ -Ketogruppe des β,δ -Diketoesters reduziert. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass diese ADH ebenfalls NADP-abhängig ist, allerdings im Gegensatz zur bereits bekannten ADH nicht die Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen benötigt. Teilziel der vorliegenden Arbeit war die Aufreinigung dieser „zweiten“ ADH, die Isolierung und Klonierung des Gens sowie die biochemische Charakterisierung dieses Enzyms.

1.1 Reinigung der „zweiten“ ADH

Die Reinigung der „zweiten“ ADH aus *L. kefir* erfolgte über verschiedene säulenchromatographische Trennverfahren. Der durch Glasperlensaufschluss gewonnene Rohextrakt wurde zunächst mittels Anionenaustausch-Chromatographie gereinigt. Nach Äquilibrieren der Säule mit 50 mM TEA-Puffer pH 7,0 erfolgte die Elution der Proteine mit einem linearen Gradienten von 0-1 M NaCl. Das Enzym wurde am Säulenmaterial Q-Sepharose FF (Pharmacia) nicht gebunden, allerdings wurde durch dieses Verfahren ein Großteil der Fremdproteine abgetrennt. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und mittels Hydrophober Interaktionschromatographie (Phenyl-650C, Tosoh) gereinigt. Die Proteine eluierten nach Äquilibrieren der Säule mit 50 mM TEA-Puffer pH 7,0 + 1,5 M $(NH_4)_2SO_4$ über einen dreistufigen Gradienten durch Verringerung der $(NH_4)_2SO_4$ -Konzentration. Die aktiven Fraktionen wurden in 10 mM KPi-Puffer pH 6,5 + 150 mM NaCl überführt und auf eine Hydroxylapatit-Säule (Hydroxylapatit 20 μ m, Bio-Rad) aufgetragen. Mittels eines dreistufigen Gradienten wurden Phosphat- und NaCl-Konzentration auf 400 bzw. 250 mM zur Elution der Proteine erhöht. Die Dokumentation der Reinigung erfolgte mittels SDS-PAGE (Abb. 21).

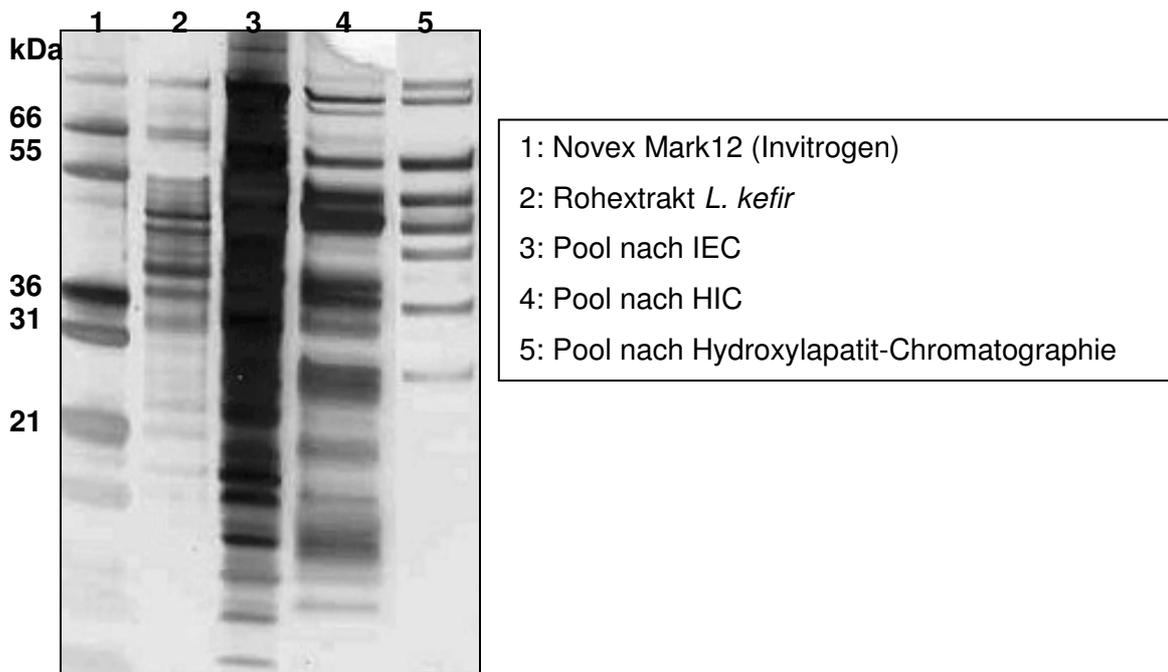


Abb. 21: Silbergefärbte SDS-PAGE der ADH-haltigen Proben nach den jeweiligen Reinigungsschritten.

Da auch nach dem dritten Reinigungsschritt noch sehr viele Banden im SDS-Gel zu sehen sind, wurden weitere Verfahren angewandt. So wurde versucht, die NADP-abhängige ADH mittels Affinitätschromatographie weiter aufzureinigen. Als Gelmaterial wurde Red Sepharose CL-6B (Pharmacia) verwendet. Die Säule wurde mit Puffer A (10 mM KPi-Puffer pH 7,5) gespült. Die Elution der Proteine erfolgte mittels eines linear ansteigenden Gradienten von 0 bis 100 % Puffer B (10 mM KPi-Puffer pH 7,5 + 10 mM NADP). In keiner der Fraktionen konnte ADH-Aktivität gemessen werden.

Des Weiteren wurde versucht, das Enzym durch präparative native PAGE mittels Model 491 Prep Cell (Bio-Rad) zu reinigen. Nach 4,5 h Elektrophoresedauer hatte der Bromphenolmarker das untere Gelende des nativen Rundgels erreicht. Die anschließend eluierenden Proteine wurden aufgefangen. Die Elektrophorese wurde unter Kühlung für 20 h durchgeführt. Die ADH konnte in keiner der Fraktionen wieder gefunden werden.

Um herauszufinden, ob das Enzym an ein anderes Anionenaustauscher-Material bindet, wurde ein Enzympräparat auf eine HQ20-Säule (PerSeptive Biosystems) gegeben. Auch hier erfolgte keine Bindung des Proteins.

Da auch diese Versuche nicht zur Aufreinigung bis zum homogenen Enzym führten, wurde eine alternative Strategie zur Reinigung der „zweiten“ ADH gewählt. Es wurde versucht, das Protein über eine Aktivitätsfärbung zu isolieren. Hierzu wurde eine native PAGE

durchgeführt, wobei dreimal die gleiche Probe an partiell aufgereinigter ADH aufgetragen wurde. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel gedrittelt. Während ein Teil des Gels nach der Vorschrift von Kyhse-Andersen geblottet^[69] und die PVDF-Membran anschließend mit Amidoschwarz gefärbt wurde, wurde der zweite Teil des Gels mit Silber gefärbt und der dritte Teil einer Aktivitätsfärbung mit INT und PES unterzogen. Da bei dieser Färbemethode die Oxidationsreaktion katalysiert wird, wurde als Substrat (3*R*,5*S*)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester verwendet. Das Enzym konnte als rote Bande im Gel nachgewiesen werden. Das Silber-gefärbte Gelstück, das mit INT und PES gefärbte Gelstück sowie die Blotmembran wurden nebeneinander gelegt und verglichen (Abb. 22).

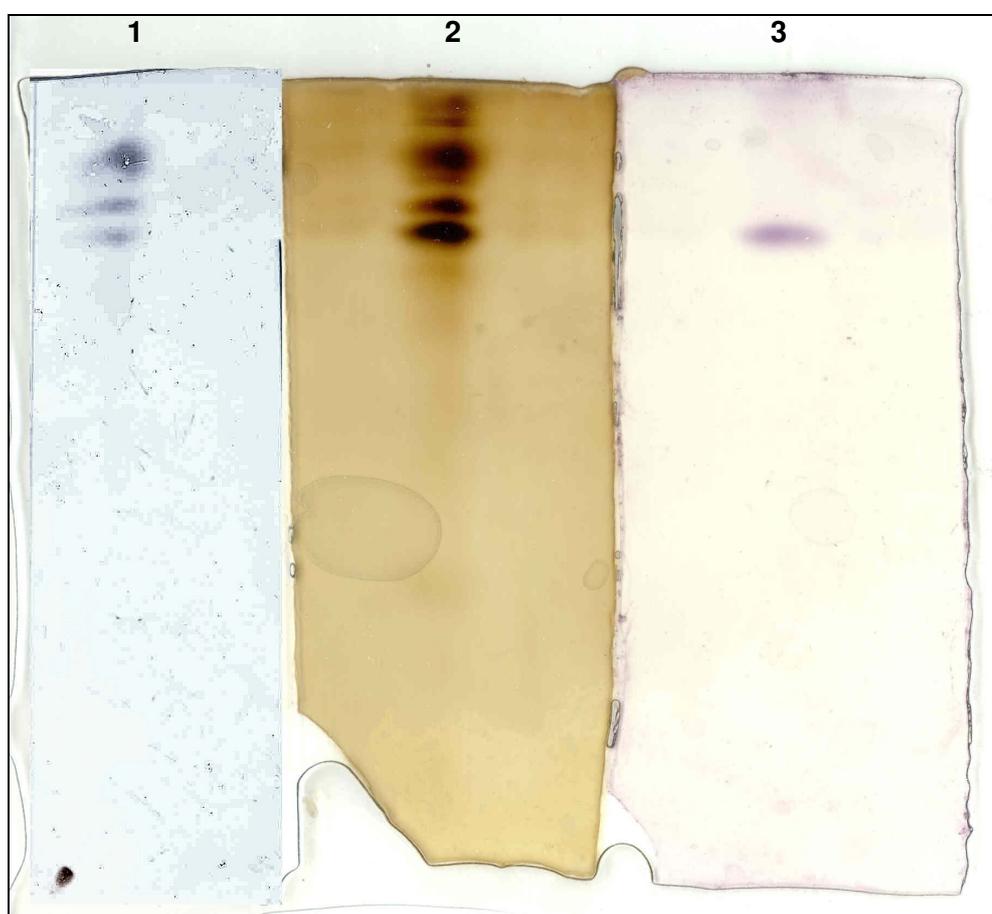


Abb. 22: Native PAGE der partiell aufgereinigten „zweiten“ ADH. Teil 1 wurde geblottet, Teil 2 wurde mit AgNO_3 und Teil 3 mit PES und INT gefärbt.

Die Bande im Blot, die der sich bei der Aktivitätsfärbung im Gel rot gefärbten entsprach, wurde aus der Membran geschnitten. Es folgte die N-terminale Sequenzierung über automatisierten Edman-Abbau^[71].

1.2 N-terminale Sequenzdaten der „zweiten“ ADH

Durch die Sequenzanalyse der Aminosäuren mittels Edman-Abbau konnten 45 Aminosäuren des N-Terminus der „zweiten“ ADH aus *L. kefir* bestimmt werden.

N-Terminus: GRLDKKVAIITGGVKGFGFLAMAKLFVKEGAKVVITDVDDQHADEA

1.3 Isolierung des „zweiten“ *adh*-Gens mittels Universal GenomeWalker™ Kit (Clontech)

Auf der Grundlage der N-terminalen Aminosäuresequenz der „zweiten“ ADH wurden unter Berücksichtigung der Codon Usage für *Lactobacillus brevis*, welcher große Ähnlichkeit zu *L. kefir* zeigt, Primer (N1 bzw. C1) entworfen. Des Weiteren wurden degenerierte Primer (Ndeg1 bzw. Cdeg1) konstruiert. Die genomische DNA aus *L. kefir* wurde mittels Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert. Anschließend wurden die synthetisierten Primer in verschiedenen Kombinationen in PCR-Ansätzen mit der genomischen DNA als Template eingesetzt. Bei allen Ansätzen wurden Amplifikate erhalten. Die nachfolgende Sequenzanalyse bestätigte die Amplifizierung eines 80 bp-großen Fragment des Gens. Anhand dieses Genfragments konnten genspezifische Primer (Cwalk1, Cwalk2, Nwalk1, Nwalk2) konstruiert werden, die für die Durchführung des Universal GenomeWalker™ Kits (Clontech) benötigt wurden. Die genomische DNA aus *L. kefir* wurde mit den im Kit enthaltenen Restriktionsenzymen geschnitten und die erhaltenen Fragmente an ebenfalls im Kit enthaltene Adaptoren ligiert. Die genspezifischen äußeren Primer wurden in Kombination mit den Adaptor-spezifischen äußeren Primern in PCR-Ansätzen eingesetzt. Die erhaltenen Amplifikate wurden als Templates in PCR-Ansätzen verwendet, bei welchen die genspezifischen inneren Primer sowie die Adaptor-spezifischen inneren Primer eingesetzt wurden. Die auf diese Weise erhaltenen Fragmente wurden einer Sequenzanalyse unterworfen und konnten zu einer sicheren Gesamtsequenz kombiniert werden.

Die erhaltene Gensequenz der „zweiten“ *adh* sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind im Anhang aufgeführt. Das Gen setzt sich aus 741 Basen zusammen, was einer Proteinsequenz bestehend aus 246 Aminosäuren entspricht. Hieraus ergeben sich ein Molekulargewicht von 26316 Da sowie ein theoretischer isoelektrischer Punkt von 5,69.

Die Proteinsequenz der „zweiten“ ADH aus *L. kefir* wurde mit Hilfe des BLAST P-Algorithmus^[76] mit Einträgen der NCBI-Datenbank verglichen (Abb. 23).

	GXXXGXXG	
2.LK	----MGRLDKKVAIITGGVKGFGLAMAKLFVKEGAKVVITDVDDQHAEALDEIG-RAN-	54
LB	---MSNRLDGKVAIITGGTLGIGLAIATKFVEEGAKVMITGRHSDVGEKAAKSVG-TPDQ	56
LK	---MTDRLKGKVAIVTGGTLGIGLAIADKFVEEGAKVVITGRHADVGEKAAKSIG-GTDV	56
OO	---MVDRLKGKVSIVTGGTLGIGLSIVDLYLKEGAKVVFTGRRQKIGEEAFKHLN-NPKN	56
NA	MELSAQRLKGRVAFVSGGLRGI GLACAERFLAEGAEVVLSDLDAAEASDTARDVMARLGQA	60
	** . : * : : : * * * : * : * : . : : * * : * : : : . . . : * . : . .	

Abb. 23: Partielles Alignment über den N-Terminus der beiden ADHs aus *L. kefir* (LK), *L. brevis* (LB) sowie Dehydrogenasen aus *Oenococcus oeni* (OO) und *Novosphingobium aromaticivorans* (NA). Das Alignment wurde mit Hilfe des Clustal W-Algorithmus unter Verwendung der Blossum-Matrix erstellt^[77]. Die Cofaktorbindungsstelle der short-chain ADHs GXXXGXXG ist grau markiert.

Es fällt auf, dass die Sequenz der „zweiten“ ADH zu den Sequenzen der bereits bekannten ADHs aus *L. kefir* (s. u.) und *L. brevis* eine hohe Homologie zeigt.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz der „zweiten“ ADH aus *L. kefir* mit der Datenbank ergab die Klassifizierung zur Familie der short-chain ADHs. Die Vertreter dieser Familie bestehen aus ca. 250 Aminosäuren und zeigen am N-Terminus eine charakteristische Consensus-Sequenz. Alle in Abb. 23 aufgeführten Proteine zeigen dieses Sequenzmotiv **GXXXGXXG**. Dieser hochkonservierte Bereich stellt die Cofaktorbindungsstelle der short-chain ADHs dar.

1.4 Klonierung und Expression der „zweiten“ ADH

Für die Klonierung der „zweiten“ *adh* aus *L. kefir* wurden Primer konstruiert, welche sich aus DNA-Fragmenten, die vor dem N- bzw. nach dem C-Terminus des Gens liegen, zusammensetzten (GG-N bzw. GG-C). Diese Primer wurden in einer PCR eingesetzt, welche genomische DNA aus *L. kefir* als Template enthielt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde einer Sequenzanalyse unterworfen, welche die Gesamtsequenz des Gens bestätigte. Mit Hilfe des SureClone™ Ligation Kits (Pharmacia) erfolgte die Klonierung des Gens in den Vektor pUC 18 *Sma*I/BAP. Drei der sechs untersuchten Klone zeigten nach Restriktion Vektor und Gen in der richtigen Größe. Einer dieser Klone wurde sequenziert; die Sequenzanalyse bestätigte die korrekte Gensequenz.

Zur Expression des Gens wurden Primer entworfen, welche an den Genenden die Restriktionsschnittstellen *NdeI* bzw. *BamHI* anfügen sollten (01Primer3' bzw. 01Primer5'). Als Expressionsvektor wurde pET-21a(+) (Novagen) ausgewählt. Dieser Vektor enthält den T7-Promotor sowie das Ampicillin-Resistenzgen. Die Primer wurden in einer PCR eingesetzt. Das aufgereinigte PCR-Produkt sowie der Vektor pET-21a(+) wurden mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* geschnitten. Nach der Ligation der beiden DNA-Fragmente erfolgte die Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen. Sechs der Klone wurden mittels Isolierung und Restriktion der Plasmid-DNA auf korrekte Ligation hin überprüft. Fünf dieser Klone zeigten Vektor und Gen in der korrekten Größe. Die nachfolgende Sequenzanalyse bestätigte die korrekte Sequenz der „zweiten“ *adh* (p2LKADH).

Das Plasmid p2LKADH wurde anschließend in die kompetenten Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3) und Tuner(DE3) (beide von Novagen) transformiert. Nach Wachstum der Vorkulturen über Nacht bei 37°C und 120 rpm wurden die Hauptkulturen 1 %ig angeimpft und bis zu einer OD₆₆₀ von ca. 0,5 ebenfalls bei 37°C und 120 rpm inkubiert. Bei Erreichen dieser OD wurde mit 1 mM IPTG induziert und für 3 h bei 27°C und 120 rpm geschüttelt. Nach Ernte und Ultraschall-Aufschluss wurden Aktivitätsmessungen mit (S)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester durchgeführt. Es erfolgte keine Umsetzung des Substrats. Lösliche und unlösliche Fraktionen von *E. coli* BL21 (DE3)/p2LKADH und *E. coli* Tuner(DE3)/p2LKADH wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Zur Kontrolle wurde Rohextrakt aus *L. kefir* aufgetragen (Abb. 24).

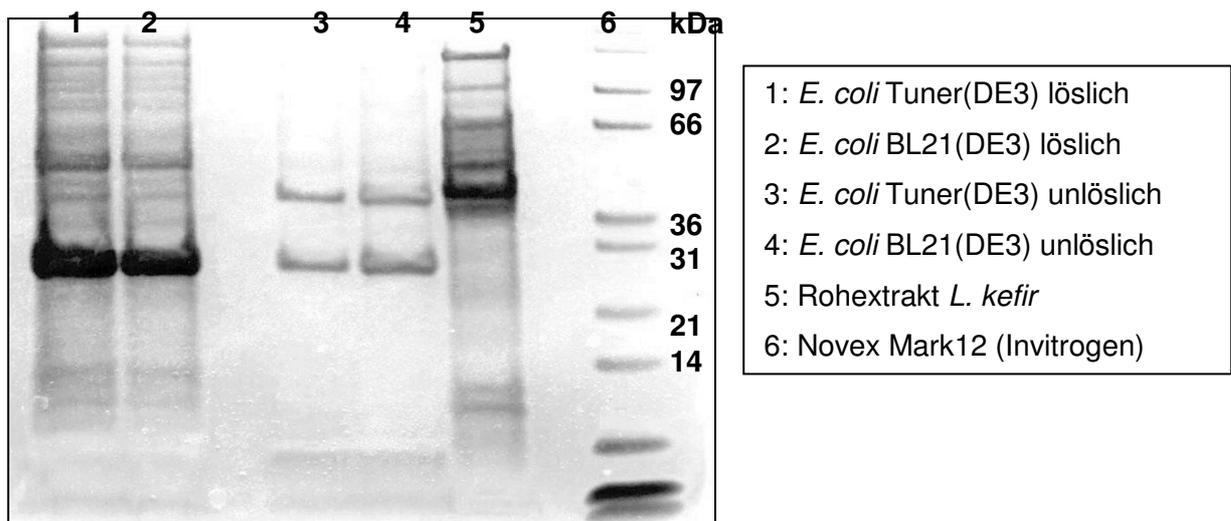


Abb. 24: SDS-PAGE der löslichen und unlöslichen Fraktionen von *E. coli* BL21 (DE3)/p2LKADH und *E. coli* Tuner(DE3)/p2LKADH sowie Rohextrakt aus *L. kefir*.

Die SDS-PAGE zeigt, dass eine Überexpression der „zweiten“ LK-ADH vorliegt. Im Rohextrakt von *L. kefir* ist das Enzym nur in sehr geringen Mengen vorhanden.

Laut SDS-PAGE sollte eine hohe Enzymaktivität zu messen sein. Aus diesem Grund wurde überlegt, ob das Enzym durch das Fehlen elementarer Komponenten inaktiviert wird. So wurden dem Assay Mg^{2+} -Ionen und Spurenelementlösung zugesetzt. Des Weiteren wurden die Zellen in Medium angezogen, welches Spurenelementlösung enthielt und es wurden verschiedene Substrate eingesetzt. Es wurde keine Aktivität festgestellt. Als Kontrolle wurde bei allen Tests Wildtyp-Enzym eingesetzt, welches die Reduktion von (S)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester katalysierte. Rohextrakt von *E. coli* Tuner(DE3)/p2LKADH wurde mittels Anionenaustausch-Chromatographie (Q-Sepharose FF, Pharmacia) aufgereinigt. In einigen der erhaltenen Fraktionen konnte minimale Umsetzung von 0,44 % nach 6 h und von 1,58 % nach 24 h Inkubationsdauer festgestellt werden. Auch nach Variation der Expressionsbedingungen konnte keine Aktivitätssteigerung erzielt werden.

Um ein alternatives Expressionssystem zu überprüfen, wurden Primer synthetisiert (02Primer3' bzw. 02Primer5'), welche den Genenden die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *HindIII* anfügen sollten. Das mittels PCR amplifizierte Gen sowie der Expressionsvektor pKK223-3 wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* geschnitten. Nach erfolgter Gelelektrophorese und Gelelution wurden die beiden DNA-Fragmente ligiert und in kompetente *E. coli* JM105-Zellen transformiert. Nach Anzucht der Zellen und Abschluss erfolgten Aktivitätsmessungen. Auch hier erfolgte keine Umsetzung von (S)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester durch das rekombinante Enzym; lediglich durch das Wildtyp-Enzym.

2. ADH aus *Lactobacillus kefir*

Die NADP-abhängige (*R*)-spezifische ADH aus *Lactobacillus kefir* wurde erstmals 1990 beschrieben^[78, 79]. Neben der Abhängigkeit von NADP besitzt sie eine geringe NAD-Nebenaktivität und benötigt Mg^{2+} -Ionen. Sie katalysiert die stereoselektive Reduktion von prochiralen Ketonen zu (*R*)-Alkoholen und weist ein breites Substratspektrum auf. Mittels dieser ADH können aromatische, cyclische, polycyclische und aliphatische Alkohole synthetisiert werden^[80]. In der vorliegenden Arbeit wurden als Substrate für die ADH das Standardsubstrat Acetophenon sowie 2,5-Hexandion und 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester verwendet. Diese Verbindungen werden von der ADH stereoselektiv zu (*R*)-Phenylethanol, (2*R*,5*R*)-Hexandiol bzw. (S)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester reduziert (Abb. 25).

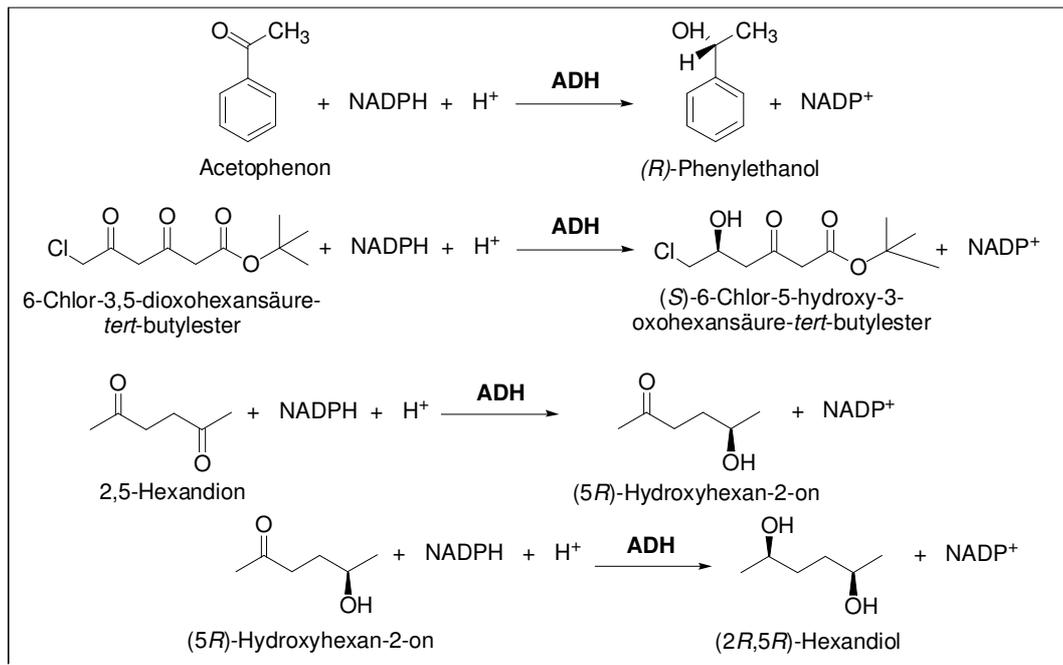


Abb. 25: Substrate der ADH aus *L. kefir*, die in dieser Arbeit eingesetzt und stereoselektiv zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert wurden.

Im Laufe der Dissertation von Bettina Riebel gelang die Aufreinigung der ADH bis zur Homogenität sowie die biochemische Charakterisierung des Wildtyp-Enzyms^[41]. Des Weiteren konnte die Aminosäuresequenz des Enzyms größtenteils aufgeklärt werden.

2.1 Isolierung des *adh*-Gens mittels Universal GenomeWalker™-Kit (Clontech)

Auf der Grundlage der größtenteils bekannten Aminosäuresequenz der ADH aus *L. kefir*^[41] sowie der teilweise aufgeklärten Nucleotidsequenz wurden Primer (1_LKADH-Cwalk1, 1_LKADH-Cwalk2, 1_LKADH-Nwalk1, 1_LKADH-Nwalk2) konstruiert. Mit Hilfe der im GenomeWalker™-Kit enthaltenen Restriktionsenzyme wurde genomische DNA aus *L. kefir* verdaut. Aus den aufgereinigten DNA-Restriktionsansätzen wurde mittels Ligation an GenomeWalker-Adaptoren eine GenomeWalker-Bibliothek angelegt. Diese Bibliothek diente als Template für die ersten PCR-Ansätze. Als Primer wurden der im Kit enthaltene Adaptor-spezifische Primer AP1 sowie die gen-spezifischen Primer 1_LKADH-Cwalk1 bzw. 1_LKADH-Nwalk1 (Up- bzw. Downstream) verwendet. Die so erhaltenen PCR-Produkte dienten als Templates für die zweiten PCR-Ansätze, welche mit dem Adaptor-spezifischen Primer AP2 und den gen-spezifischen Primern 1_LKADH-Cwalk2 bzw.

1_LKADH-Nwalk2 (Up- bzw. Downstream) durchgeführt wurden. Die in den zweiten PCR-Ansätzen erhaltenen PCR-Produkte sind in Tab. 8 aufgelistet.

Tab. 8: PCR-Produkte aus zweiter PCR nach der GenomeWalker-Methode.

Bibliothek	Größe PCR-Produkt Richtung Downstream	Größe PCR-Produkt Richtung Upstream
Stul-Bibliothek	kein Amplifikat	kein Amplifikat
Pvull-Bibliothek	0,9 kb	kein Amplifikat
Drall-Bibliothek	kein Amplifikat	1,5 kb
EcoRV-Bibliothek	kein Amplifikat	kein Amplifikat

Mit den erhaltenen PCR-Fragmenten wurde die gesamte Gensequenz der *adh* sowie weitere Sequenzinformation vor und hinter dem Gen amplifiziert und konnte durch Sequenzierung identifiziert werden. Die Gensequenz der *adh* sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind im Anhang aufgeführt. Das *adh*-Gen besteht aus 759 Basen. Daraus abgeleitet setzt sich das Enzym aus 252 Aminosäuren zusammen. Aus der Aminosäuresequenz ergibt sich ein Molekulargewicht von 26781 Da und ein berechneter isoelektrischer Punkt von 5,09.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz der ADH mit Einträgen in der NCBI-Datenbank mit Hilfe des BLAST P-Algorithmus lieferte über 500 homologe Aminosäuresequenzen. In vielen Fällen handelte es sich um hypothetische Proteine. Die vier Proteine mit den ausgeprägtesten Sequenzhomologien sind in Abb. 26 aufgeführt. Diese Enzyme sind die (*R*)-spezifische ADH aus *L. brevis*, zwei mit short-chain ADHs verwandte Dehydrogenasen mit unterschiedlicher Spezifität aus *Oenococcus oeni* MCW sowie eine mit short-chain ADHs verwandte Dehydrogenase mit unterschiedlicher Spezifität aus *Novosphingobium aromaticivorans*.

	GXXXGXXG	
LK	--MSNRLDGKVAIITGGTLGIGLAIATKFVEEGAKVMITGRHSDVGEKAASVGTTP-DQ	56
LB	---MVDRLKGVKSIVTGGTLGIGLSIVDLYLKEGAKVVFTGRRQKIGEEAFKHLNSP-KN	56
OO 1	---MVDRLKGVKSIVTGGTLGIGLSIVDLYLKEGAKVVFTGRRQKIGEEAFKHLNSP-KN	56
OO 2	---MFDRLKGVKVAIVTGGNSGIGKAIADFIAEGAKVVITGRNQEKGRQTALEIAG---D	54
NA	MELSAQRLKGRVAFVSGGLRGIGLACAERFLAEGAEVVLSDLDAAEASDTARDVMARLGQA	60
	:**.*:*:*** ** * : . : : ***:*: : . . : : . .	

Abb. 26: Partielles Alignment über den N-Terminus der ADHs von *L. kefir* (LK), *L. brevis* (LB) sowie Dehydrogenasen aus *Oenococcus oeni* (OO 1 und 2) und *Novosphingobium aromaticivorans* (NA). Das Alignment wurde mit Hilfe des Clustal W-Algorithmus unter Verwendung der Blossum-Matrix erstellt^[77]. Die Cofaktorbindungsstelle der short-chain ADHs GXXXGXXG ist grau markiert.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz der ADH aus *L. kefir* mit der Datenbank ergab, dass es sich bei dieser ADH ebenso wie bei der „zweiten“ ADH aus *L. kefir* um eine short-chain ADH handelt. Die für diese ADH-Familie typische Cofaktorbindungsstelle **GXXXGXG** ist in Abb. 26 grau unterlegt. Die in der vorliegenden Arbeit ebenfalls verwendete ADH aus *L. brevis* zeigt die höchste Sequenzhomologie zu der ADH aus *L. kefir*. Die Aminosäuresequenzen der beiden Enzyme sind zu 88 % identisch.

2.2 Klonierung und Expression des Gens

2.2.1 Klonierung und Expression

Mittels PCR wurden die Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Bam*HI an das 5'- bzw. 3'-Ende des *adh*-Gens eingefügt. Das PCR-Produkt wurde mittels des Rapid DNA Ligation Kits (Roche) in den bereits linearisierten und 5'-dephosphorylierten Expressionsvektor pET-21a(+) (Novagen) ligiert. Dieser Expressionsvektor enthält den durch IPTG induzierbaren T7-Promotor, ein Ampicillin-Resistenzgen sowie eine multiple Klonierungsstelle mit elf Schnittstellen. Ein Aliquot (10 µl) des Ligationsansatzes wurde zur Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen verwendet. Von den nach Selektion auf LB_{amp}-Platten resultierenden Kolonien wurden 10 Stück ausgewählt und Übernachtskulturen in jeweils 5 ml LB_{amp}-Medium inkubiert. Aus den Kulturen wurde die Plasmid-DNA isoliert und Restriktionsanalysen durchgeführt, welche auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Die Überprüfung von Plasmiden mit inseriertem DNA-Fragment geschah durch Sequenzierung. Die erhaltene Sequenzinformation diente der Kontrolle der bisherigen Gensequenz. Die Gensequenz stimmte mit den Sequenzinformationen mittels des GenomeWalker-Kits überein. Das Plasmid mit der korrekten *adh*-Sequenz wurde für die weiteren Arbeiten verwendet und wird im Folgenden als pADH bezeichnet.

Zur Expression der ADH wurde pADH in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) transformiert. Jeweils eine Einzelkolonie der durch die Transformation von pADH erhaltenen Klone wurde in 5 ml LB_{amp}-Medium überimpft und über Nacht geschüttelt. Anschließend wurde 1 %ig in 100 ml LB_{amp}-Medium überimpft und nach Erreichen einer OD₆₆₀ von 0,5 mit 1 mM IPTG die Genexpression induziert. Nach einer Induktionszeit von 3 h wurden die Zellen geerntet.

2.2.2 Optimierung der Expressionsbedingungen

Um in den rekombinanten *E. coli*-Zellen eine möglichst hohe Expression der ADH zu erzielen, wurden die Expressionsbedingungen bezüglich IPTG-Konzentration, Induktionsdauer und Induktionstemperatur optimiert. Des Weiteren wurde der *E. coli*-Wirtsstamm variiert und die ADH-Aktivitäten im Rohextrakt verglichen. Alle Aktivitätstests erfolgten mit Acetophenon als Standardsubstrat.

Als Wirtsstämme für pADH wurden BL21(DE3), Tuner(DE3) und Origami(DE3) (alle von Novagen) untersucht. Die ADH-Aktivitäten im Rohextrakt nach Ultraschall-Aufschluss der jeweiligen Zellen sind in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9: Spezifische ADH-Aktivitäten nach Ultraschall-Aufschluss der Expressionsstämme Tuner(DE3), BL21(DE3) und Origami(DE3).

Expressionsstamm <i>E. coli</i>	Spez. Akt. [U/mg]
Tuner(DE3)	40,62
BL21(DE3)	41,60
Origami(DE3)	37,68

Da mit dem Expressionsstamm BL21(DE3) die besten Aktivitäten erzielt wurden, wurden die weiteren Arbeiten mit diesem Stamm durchgeführt.

Um die Auswirkungen der Konzentration an Induktor auf die Genexpression zu untersuchen, wurden die *E. coli*-Zellen angezogen und die Expression des *adh*-Gens mit verschiedenen Mengen an IPTG (0,1-2,0 mM) induziert. Die höchsten spezifischen Aktivitäten wurden bei IPTG-Konzentrationen von 1,0 bzw. 1,3 mM erzielt, während die Aktivität bei einer Konzentration von 2,0 mM IPTG sehr niedrig war.

Weiterhin wurde der Einfluss der Induktionstemperatur getestet. Die Inkubation der *E. coli*-Zellen nach der Induktion erfolgte bei verschiedenen Temperaturen (RT, 27°C, 30°C, 33°C, 37°C). Nach Inkubation bei 30°C zeigte die ADH ihre höchste Aktivität.

Des Weiteren wurde die Induktionsdauer variiert. Nach Induktion wurden die *E. coli*-Zellen für 1, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 20 und 24 h bei 30°C inkubiert. Es stellte sich heraus, dass die ADH-Aktivität nach einer Induktionsdauer von ca. 20 h ihr Maximum erreicht, während nach 3 h Induktion noch ca. 73 % der maximalen Aktivität erreicht wurden.

Die Parameter für eine optimale Expression der ADH in *E. coli* BL21(DE3) sind in Tab. 10 zusammengefasst.

Tab. 10: Bedingungen für die optimale Expression der ADH in *E. coli* BL21(DE3).

Parameter	Optima
Induktorkonzentration	1,3 mM
Induktionstemperatur	30 °C
Induktionsdauer	20 h

2.3 Biochemische Charakterisierung der ADH

2.3.1 Reinigung der rekombinanten ADH

Die rekombinante ADH wurde durch Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt. Die *E. coli* BL21(DE3)-Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen. Der erhaltene Rohextrakt wurde auf eine mit 50 mM TEA-Puffer pH 7,0 + 1 mM MgCl₂ äquilibrierte Q-Sepharose FF-Säule (Pharmacia) aufgetragen. Die ADH eluierte mit ansteigendem NaCl-Gradienten bei 160 mM NaCl. Die Fraktionen wurden anschließend auf ADH-Aktivität getestet. Die Ergebnisse der Reinigung sind in Tab. 11 wiedergegeben.

Tab. 11: Aufreinigungstabelle der ADH aus *E. coli* BL21(DE3)/pLKADH.

Reinigungsschritt	Akt. [U/ml]	Protein [mg/ml]	Akt. [U/mg]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	1449,9	13,0	111,5	1,0
Q-Sepharose FF	781,0	1,4	557,9	5,0

Der Aufreinigungserfolg ist mittels eines SDS-Polyacrylamidgels in Abb. 27 dargestellt.

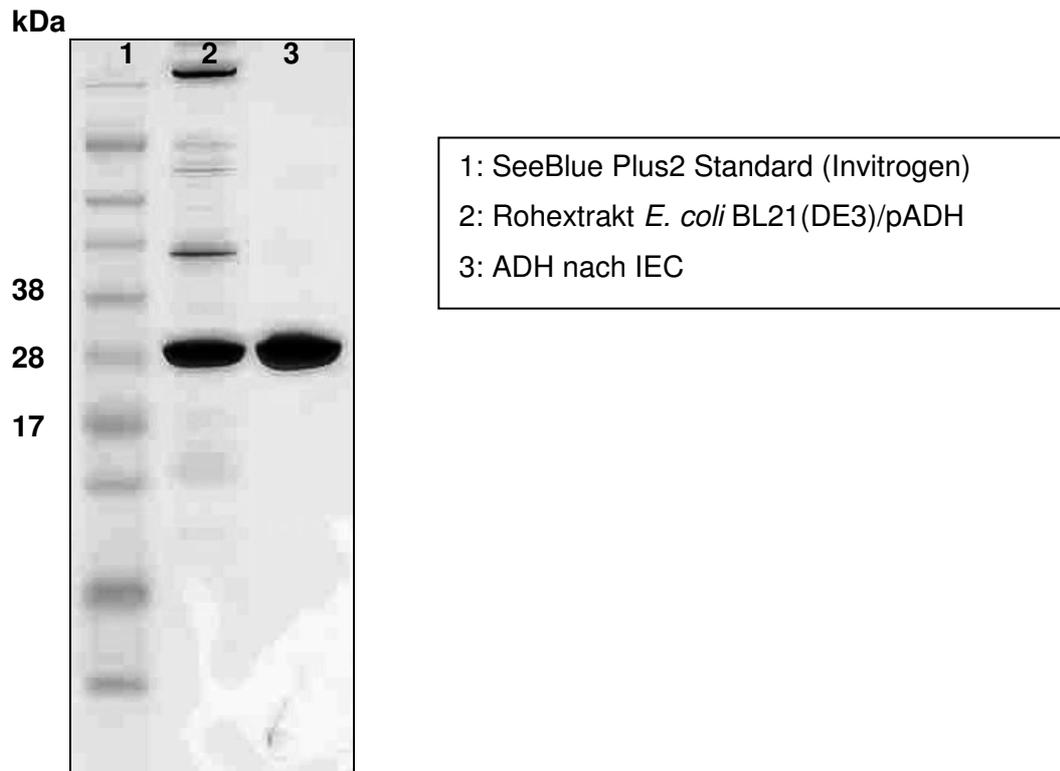


Abb. 27: Silbergefärbte SDS-PAGE (4-12 %). Aufgetragen sind der Rohextrakt *E. coli* BL21(DE3)/pADH sowie der Pool nach der Anionenaustausch-Chromatographie.

Die biochemische Charakterisierung der rekombinanten ADH erfolgte mit dem auf diese Weise aufgereinigten Enzympräparat. Alle Aktivitätstests wurden, soweit nicht anders beschrieben, mit Acetophenon als Substrat durchgeführt.

2.3.2 Bestimmung des Temperaturoptimums der ADH

Das Temperaturoptimum der rekombinanten ADH wurde bei Temperaturen zwischen 5 bis 55°C in 5°C-Schritten aufgenommen. Aus Abb. 28 lässt sich für die ADH ein Temperaturoptimum von 50°C ermitteln.

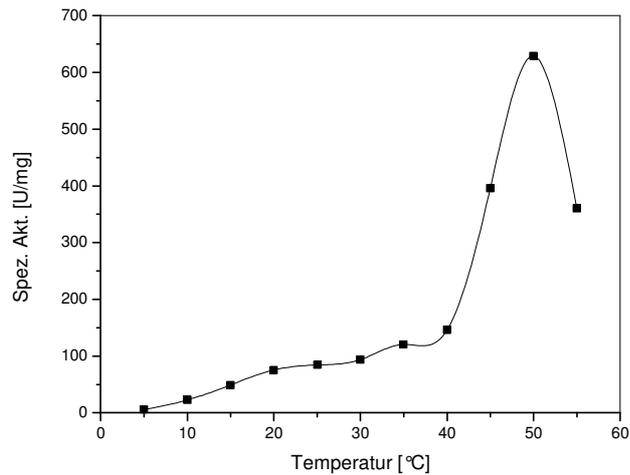


Abb. 28: Temperaturoptimum der rekombinanten ADH. Die ADH-Aktivität wurde im Bereich von 5 bis 55°C gemessen.

2.3.3 Bestimmung des pH-Optimums

Zur Bestimmung des pH-Optimums der rekombinanten ADH wurde die Aktivität bei pH-Werten im Bereich von 4 bis 11 mit den in Tab. 12 aufgeführten Puffern bestimmt.

Tab. 12: Verwendete Puffer zur Bestimmung des pH-Optimums der ADH.

pH-Bereich	Puffersubstanz [250 mM]
4,0-7,0	Citrat- Na_2HPO_4
7,0-8,6	TEA
8,6-11,0	Glycin-NaOH

Aus Abb. 29 ergibt sich ein pH-Optimum von pH 7,0 für die rekombinante ADH.

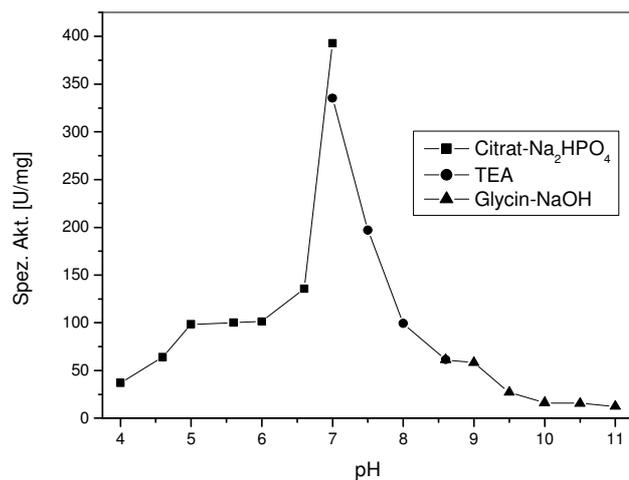


Abb. 29: pH-Optimum der rekombinanten ADH. Die Enzymaktivität wurde in drei verschiedenen 250 mM-Puffern (■ Citrat-Na₂HPO₄, pH 4,0-7,0; ● TEA, pH 7,0-8,6; ▲ Glycin-NaOH, pH 8,6-11,0) bestimmt.

2.3.4 Bestimmung der kinetischen Konstanten

Zur kinetischen Charakterisierung der rekombinanten ADH wurden für verschiedene Substrate Kinetiken gemessen. Die Durchführung der Experimente erfolgte in 50 mM TEA-Puffer pH 7,0. Für das Standardsubstrat Acetophenon wurde zur Bestimmung des K_M -Wertes mit angereinigter ADH die Aktivität im Bereich 0,5 bis 10,3 mM Acetophenon ermittelt (Abb. 30).

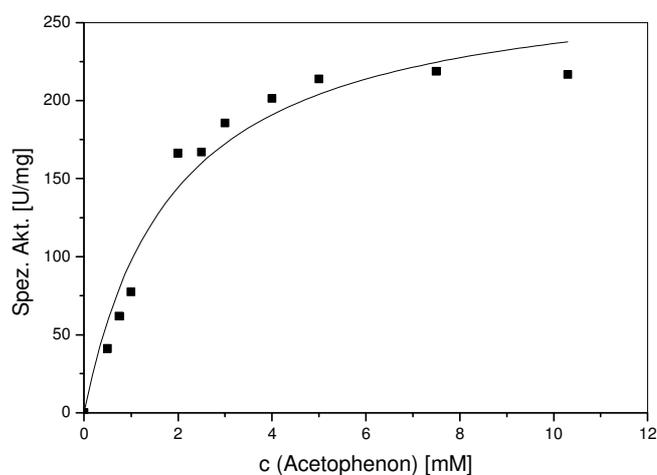


Abb. 30: K_M -Wert-Bestimmung für Acetophenon. Die Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten ADH wurde gegen die Acetophenon-Konzentration aufgetragen.

Aus Abb. 30 wird ersichtlich, dass im Bereich bis 10,3 mM Acetophenon keine Substratinhibierung auftritt. Aus den Messwerten lassen sich mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 1) K_M - und V_{\max} -Wert bestimmen.

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Gl. 1: Michaelis-Menten-Gleichung. V = Anfangsreaktionsgeschwindigkeit, V_{\max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit, $[S]$ = Substratkonzentration, K_M = Michaelis-Menten-Konstante.

Der K_M -Wert für Acetophenon beträgt nach dieser Messung 1,90 mM und der V_{\max} -Wert 281,4 U/mg.

Die gleiche Methode wurde zur Bestimmung der K_M -Werte von NADPH, NADP, NADH und (*R,S*)-Phenylethanol angewandt. In den gemessenen Bereichen wurde keine Substratinhibierung festgestellt. Die kinetischen Daten für Acetophenon, NADPH, NADP, NADH und (*R,S*)-Phenylethanol sind in Tab. 13 zusammengefasst.

Tab. 13: Kinetische Daten der ADH für Acetophenon, NADPH, NADP, NADH und (*R,S*)-Phenylethanol.

Substrat	V_{\max} [U/mg]	K_M [mM]
Acetophenon	281,4	1,90
NADPH	400,0	0,14
NADP	15,3	0,03
NADH	2,9	0,40
NAD	0,49	0,78
(<i>R,S</i>)-Phenylethanol	23,4	3,09

2.3.5 Einfluss von Metallionen auf die ADH-Aktivität

Viele Enzyme benötigen für die Entfaltung ihrer optimalen Aktivität die Anwesenheit von Metallionen. Ist das betreffende Metallion nur relativ locker gebunden, kann es während der Isolierung des Enzyms verloren gehen, was zur Inaktivierung des Enzyms führen kann. Aus diesem Grund ist es wichtig, ein Reaktionsmedium zu verwenden, welches das betreffende Metallion in ausreichender Menge enthält. Die ADH aus *L. kefir* benötigt die Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen. Die Abwesenheit dieser Ionen führt zur irreversiblen Inaktivierung der ADH.

Um den Einfluss verschiedener zweiwertiger Metallionen auf die Aktivität der rekombinanten ADH zu untersuchen, wurden dem Testpuffer Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} und Zn^{2+} in Konzentrationen von jeweils 5, 10 und 15 mM zugesetzt. Zur Kontrolle wurde die ADH-Aktivität in Standardpuffer, 50 mM TEA-Puffer pH 7,0 + 1 mM MgCl_2 , gemessen. Dieser Wert wurde gleich 100 % gesetzt. Die ADH-Aktivität wurde photometrisch bestimmt und ist in Abb. 31 dargestellt.

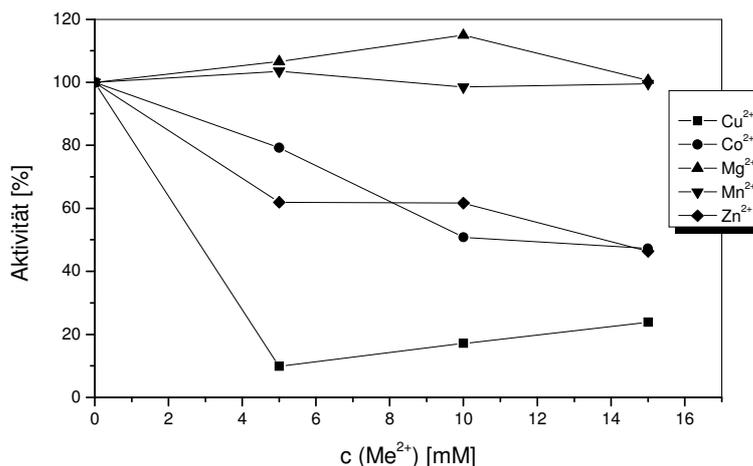


Abb. 31: Untersuchung des Einflusses von zweiwertigen Metallionen auf die Aktivität der ADH durch den Zusatz von Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} und Zn^{2+} in Konzentrationen von jeweils 5, 10 und 15 mM. Zur Kontrolle wurde die Umsetzung in Standardpuffer, welcher 1 mM MgCl_2 enthält, durchgeführt. Die Aktivität der ADH in diesem Ansatz wurde gleich 100 % gesetzt.

Wie aus der Abbildung zu erkennen ist, erniedrigt der Zusatz von Co^{2+} , Zn^{2+} und Cu^{2+} die Aktivität der ADH; wahrscheinlich inhibieren diese Ionen teilweise durch Reaktion mit SH-Gruppen des Enzyms. Während Mn^{2+} -Ionen bis zu einer Konzentration von 15 mM keine Auswirkung auf die ADH-Aktivität haben, bewirkt der Zusatz von Mg^{2+} -Ionen eine Steigerung der Aktivität. Insbesondere der Zusatz von 10 mM Mg^{2+} wirkt sich positiv aus. Im Vergleich zum Standardassay mit 1 mM MgCl_2 konnte hier eine Aktivität von 115 % beobachtet werden.

3. Entwicklung enzymatischer Regenerierungssysteme

Um die Umsetzungen mit der NADP-abhängigen ADH aus *L. kefir* (LK-ADH) effizient ablaufen zu lassen, ist es notwendig, den teuren Cofaktor NADPH, der bei der Reduktion

prochiraler Ketone oxidiert wird, zu regenerieren. Die Regenerierung von NADPH kann durch Zugabe eines zweiten ADH-Substrats erfolgen. Standardmäßig wird in solchen substrat-gekoppelten Ansätzen Isopropanol eingesetzt, das von der ADH zu Aceton oxidiert wird, während NADP reduziert wird (Abb. 32).

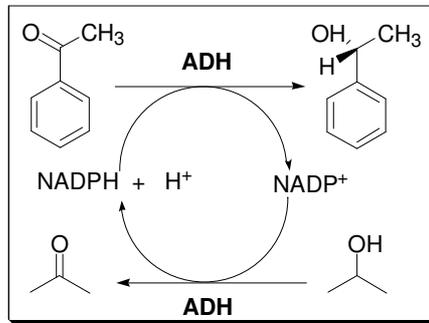


Abb. 32: Reduktion von Acetophenon durch die NADP-abhängige ADH kombiniert mit Cofaktorregenerierung durch Zugabe von Isopropanol, das durch die ADH zu Aceton oxidiert wird.

Die Regenerierung von NADPH bei der Reduktion von Acetophenon wurde als substrat-gekoppelter Ansatz mit verschiedenen Mengen an Isopropanol durchgeführt. Die Ansätze enthielten 5 mg *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3-Zellen, die LK-ADH enthalten (3.1.6), 10 mM Acetophenon und 1 mM MgCl₂ in 100 mM TEA-Puffer pH 7,5 sowie 100 mM, 1 bzw. 5 M Isopropanol pro ml. Einem Teil der Ansätze wurde außerdem 1 mM NADP zugesetzt. Die Durchführung der Umsetzungen erfolgte bei 37°C unter Schütteln. Nach bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen und mittels GC analysiert (Abb. 33).

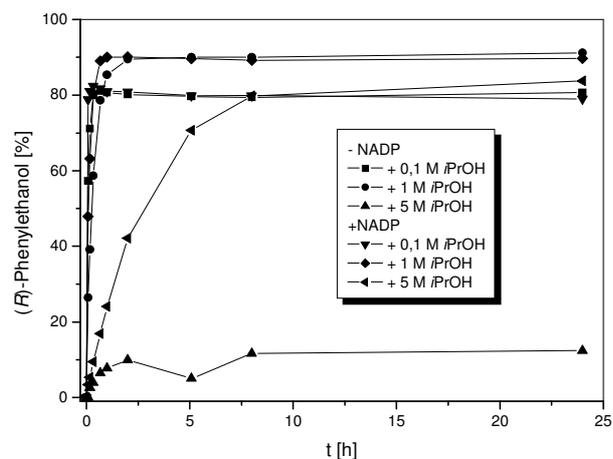


Abb. 33: Reduktion von Acetophenon zu (R)-Phenylethanol durch *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3-Zellen, die LK-ADH enthalten (3.1.6). Die NADPH-Regenerierung erfolgte durch unterschiedliche Isopropanol-Konzentrationen. Einem Teil der Ansätze wurde außerdem NADP zugesetzt.

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, wurde in keiner der Umsetzungen die vollständige Reduktion von Acetophenon erreicht. Bei der unvollständigen Umsetzung von Acetophenon ist die Produktaufarbeitung nur unter erschwerten Bedingungen möglich. Durch substrat-gekoppelten Ansatz sind demnach keine effizienten Umsetzungen möglich.

Eine weitere vielversprechende Möglichkeit ist die Cofaktorregenerierung über ein zweites Enzym. Um leistungsfähige Katalysatoren zu erhalten, sollten durch Coexpression der ADH mit NADPH-regenerierenden Enzymen Ganzzellsysteme entwickelt werden (Abb. 34).

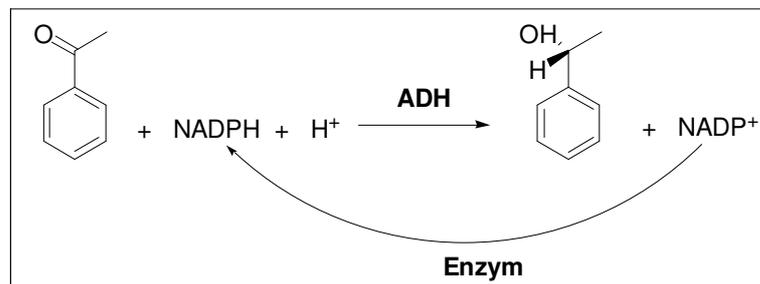


Abb. 34: Reduktion von Acetophenon durch die NADP-abhängige ADH. NADPH wird bei der Reaktion oxidiert und soll von einem zweiten Enzym regeneriert werden, um die Umsetzung effizient ablaufen zu lassen.

Für die Auswahl geeigneter Enzyme zur Entwicklung enzymatischer Regenerierungssysteme wurden mehrere Kriterien in Betracht gezogen. Wichtig war, dass die entsprechenden Gene verfügbar waren. Außerdem sollten Substrat und Produkt der Reaktion eines Enzyms die jeweils andere Reaktion nicht inhibieren. Da beide Gene in ein Plasmid kokloniert und im gleichen molaren Verhältnis exprimiert werden sollen, sollten die spezifischen Aktivitäten beider Enzyme in der gleichen Größenordnung liegen. Des Weiteren sollten die Enzyme stabil und die Substrate günstig sein. Für die Regenerierung von NADPH bieten sich mehrere Systeme an. Ein bekanntes und bewährtes System ist die NADPH-Regenerierung mit Glucose/Glucose-Dehydrogenase (GDH). Die Arbeitsgruppe um Shimizu konstruierte ein Coexpressionssystem, das neben der GDH aus *Bacillus megaterium* die Aldehyd-Reduktase aus *Sporobolomyces salmonicolor* enthält^[81]. Um ein ebenso vielversprechendes System zu schaffen, sollte die ADH aus *L. kefir* mit einer GDH gekoppelt werden.

3.1 Cofaktorregenerierung durch Glucose-Dehydrogenase (GDH): Systeme ADH-GDH (pAW-3, pAW-4)

Die Regenerierung von NADPH mit dem System Glucose/GDH weist einige Vorteile auf. Glucose ist ein günstiges Substrat und die spezifischen Aktivitäten von ADH und GDH liegen in der gleichen Größenordnung. Die GDH ist zudem sehr stabil. Sie katalysiert die Oxidation von β -D-Glucose zu D-Glucono-1,5-lacton (Abb. 35). Das gebildete Lacton hydrolysiert rasch unter Bildung von D-Gluconsäure.

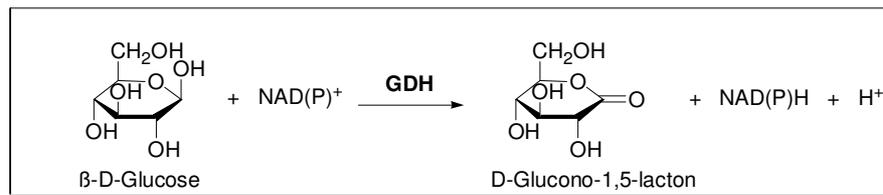


Abb. 35: Oxidation von β -D-Glucose zu D-Glucono-1,5-lacton, katalysiert durch GDH.

Die Anwendung von GDHs für die Regenerierung von NAD(P)H wurde schon in vielen Beispielen dokumentiert^[64, 82, 83].

NADP-abhängige GDHs wurden aus verschiedenen Organismen wie *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Thermoplasma acidophilum*, *Sulfolobus solfataricus*, *Thermoproteus tenax* und *Haloferax mediterranei* isoliert. Die mesophilen *Bacillus*-Stämme sind leichter zu handhaben als die genannten extremophilen Stämme. Die beiden GDHs aus *B. megaterium* und *B. subtilis* haben sehr ähnliche Eigenschaften, sie zeigen sowohl mit NAD als auch mit NADP als Cofaktor Aktivität. Als erstes Regenerierungsenzym wurde die GDH aus *B. subtilis* ausgewählt. Die Kopplung von ADH und GDH zur Schaffung eines Cofaktorregenerierungs-Systems ist in Abb. 36 dargestellt.

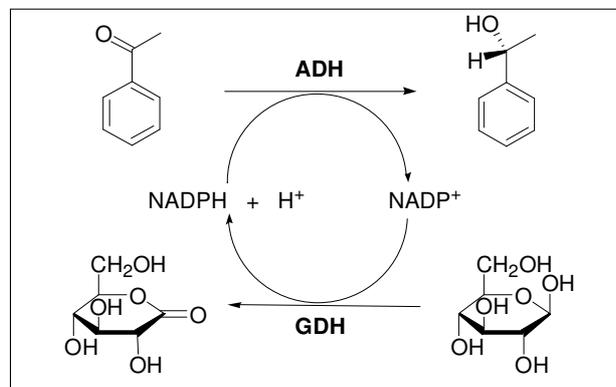


Abb. 36: Kopplung von ADH und GDH als Cofaktorregenerierungs-System.

3.1.1 Isolierung des *gdh*-Gens

Zur Isolierung des *gdh*-Gens wurde genomische DNA aus *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 isoliert und in H₂O gelöst. Anhand der bekannten Sequenz der *gdh*^[84] wurden zwei Primer konstruiert. Dem 5'-Primer GDH+*SacI* wurde hinter der Restriktionsschnittstelle *SacI* eine ribosomale Bindungsstelle am 5'-Ende des Gens eingefügt, so dass das *gdh*-Gen zur Coklonierung zur Verfügung stand. Der 3'-Primer GDH+*HindIII* enthielt die Restriktionsschnittstelle *HindIII* am 3'-Ende des Gens. Mittels PCR wurde ein DNA-Fragment amplifiziert, welches sequenziert wurde. Es konnte die gesamte 786 bp-lange Gensequenz der *gdh* gelesen werden.

3.1.2 Klonierung und Expression der *gdh*

Das *gdh*-PCR-Produkt wurde mittels des Rapid DNA Ligation Kits (Roche) in den bereits linearisierten und 5'-dephosphorylierten Expressionsvektor pET-21a(+) (Novagen) ligiert (pGDH). Anschließend erfolgte die Transformation des Plasmids pGDH in den Wirtstamm *E. coli* XL1-Blue. Zur Expression der GDH wurde pGDH in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die Expression des Gens wurde bei einer OD₆₆₀ von 0,5-0,6 mit 1 mM IPTG induziert. Nach 3 h Induktion bei 30°C wurden die Zellen geerntet. Der Rohextrakt wurde auf GDH-Aktivität getestet. Die spezifische Aktivität der GDH im Rohextrakt betrug 74,6 U/mg.

3.1.3 Reinigung der rekombinanten GDH

Die Reinigung der rekombinanten GDH erfolgte in einem Aufreinigungsschritt über Anionenaustausch-Chromatographie mittels Q-Sepharose FF (Pharmacia). Die Ergebnisse der Reinigung sind in Tab. 14 dargestellt.

Tab. 14: Reinigung der GDH zum Einsatz für die biochemische Charakterisierung.

Reinigungsschritt	Akt. [U/ml]	Protein [mg/ml]	Akt. [U/mg]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	1687,4	21,65	77,9	1
Q-Sepharose FF	617,9	2,09	295,3	4

Der Verlauf der Aufreinigung ist in Abb. 37 anhand eines SDS-Polyacrylamidgels dargestellt.

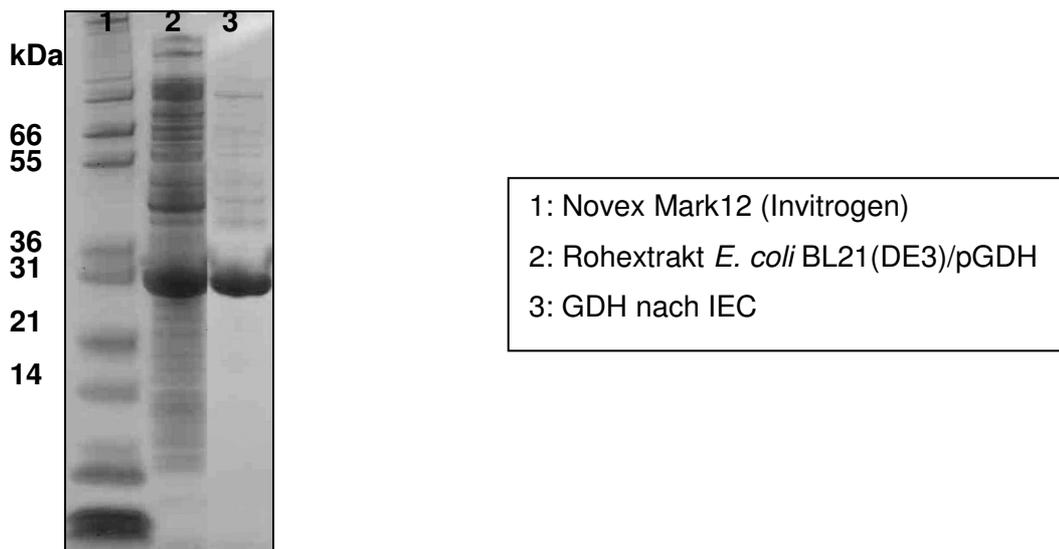


Abb. 37: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE (4-12 %) der GDH-haltigen Proben nach den jeweiligen Reinigungsschritten.

Für die biochemische Charakterisierung der rekombinanten GDH wurde auf diese Weise gereinigtes Enzympräparat verwendet. Alle Aktivitätstests wurden, soweit nicht anders aufgeführt, mit β -D-Glucose als Substrat durchgeführt.

3.1.4 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten GDH

Die GDH aus *B. subtilis* wurde von Hilt et al. biochemisch charakterisiert^[85]. Die spezifische Aktivität des rekombinanten gereinigten Enzyms lag bei 375 U/mg. Das pH-Optimum war 8,5 und die K_M -Werte für NAD und D-Glucose bei pH 8,0 und 25°C betragen 0,11 bzw. 8,7 mM. Zu den verwendeten Puffern wurden keine Angaben gemacht. Die kinetischen Konstanten des Wildtyp-Enzyms in 700 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,8 liegen nach Fujita et al. bei 0,23; 0,26 und 42,9 mM für NAD, NADP und Glucose^[86]. Die Arbeitsgruppe um Ramaley fand eine spezifische Aktivität des rekombinanten gereinigten Enzyms von 368 U/mg und einen K_M -Wert für D-Glucose von 4,8 mM bei pH 6,5^[87].

3.1.4.1 Ermittlung des Temperaturoptimums der GDH

Zur Ermittlung des Temperaturoptimums der rekombinanten GDH wurde die Aktivität des Enzyms im Temperaturbereich von 5 bis 55°C in 5°C-Schritten photometrisch bestimmt (Abb. 38).

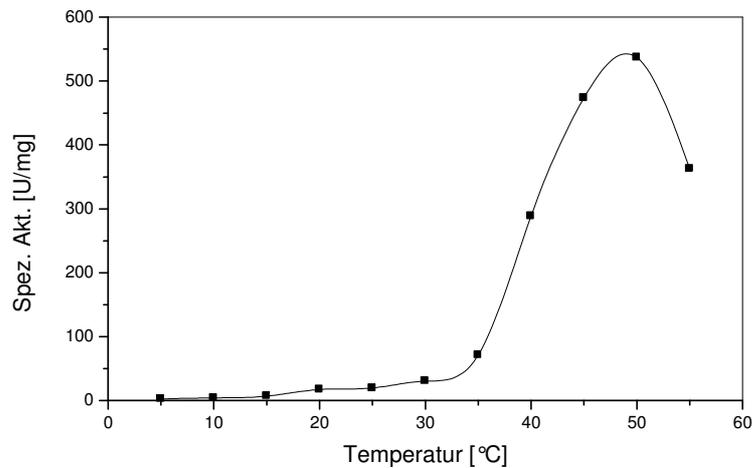


Abb. 38: Bestimmung des Temperaturoptimums der GDH. Die GDH-Aktivität wurde im Bereich von 5 bis 55 °C gemessen.

Das Temperaturoptimum der GDH liegt nach Abb. 38 bei ca. 50 °C.

3.1.4.2 Bestimmung des pH-Optimums der GDH

Zur Bestimmung des pH-Optimums der rekombinanten GDH wurde die Aktivität des Enzyms im Bereich von pH 4 bis pH 10 mit drei verschiedenen Puffern gemessen (Tab. 15).

Tab. 15: Eingesetzte Puffer für verschiedene pH-Bereiche zur Bestimmung des pH-Optimums der rekombinanten GDH.

pH-Bereich	Puffersubstanz [230 mM]
4,0-7,0	Citrat- Na_2HPO_4
7,0-8,5	TEA
8,5-10,0	Glycin-NaOH

Aus den photometrischen Messungen ergab sich die unten stehende Abb. 39.

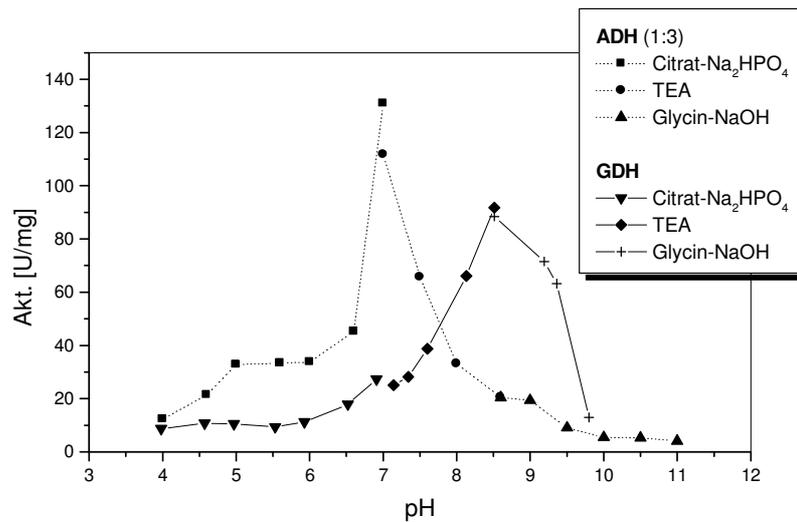


Abb. 39: Ermittlung des pH-Optimums der rekombinanten GDH mit den 0,23 M Puffern Citrat-Na₂HPO₄, TEA und Glycin-NaOH. Zum Vergleich wurde das pH-Optimum der ADH, ermittelt unter den gleichen Bedingungen, gestrichelt dargestellt. Für eine übersichtlichere Darstellung wurden die Aktivitäten der ADH im Maßstab 1 : 3 aufgetragen.

Es ergibt sich ein pH-Optimum von 8,5 für die rekombinante GDH. Weiterhin wurde festgestellt, dass TEA-Puffer im Bereich des pH-Optimums besser geeignet ist als Glycin-NaOH-Puffer. In Experimenten, bei denen neben der GDH die ADH zugegen ist, sollte ein pH-Wert von 7,5 gewählt werden.

3.1.4.3 Bestimmung der kinetischen Konstanten

Die Ermittlung der kinetischen Konstanten für die rekombinante GDH erfolgte in 100 mM TEA-Puffer pH 7,7. Für den Cofaktor NADP wurde die Kinetik im Konzentrationsbereich von 0 bis 2 mM NADP aufgenommen (Abb. 40).

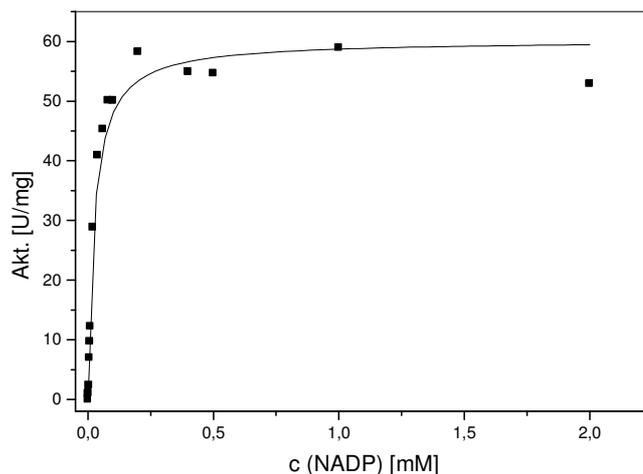


Abb. 40: Bestimmung des K_M -Wertes der rekombinanten GDH für NADP.

Aus Abb. 40 ergibt sich ein K_M -Wert von 0,025 mM sowie ein V_{\max} -Wert von 60,2 U/mg. Des Weiteren wurden die kinetischen Konstanten für β -D-Glucose sowie für NAD ermittelt. Die folgende Tabelle fasst die ermittelten Werte zusammen.

Tab. 16: Zusammenfassung der kinetischen Konstanten für die rekombinante GDH.

Substrat	V_{\max} [U/mg]	K_M [mM]
β -D-Glucose	64,4	1,465
NADP	60,2	0,025
NAD	61,8	0,039

Die ermittelten Werte zeigen, dass die Spezifität der GDH für NADP bzw. NAD unter den gewählten Bedingungen in der gleichen Größenordnung liegt.

3.1.4.4 Einfluss von Metallionen auf die GDH-Aktivität

Um den Einfluss von Metallionen auf die Aktivität der rekombinanten GDH zu untersuchen, wurden dem Puffer Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} und Zn^{2+} in Konzentrationen von jeweils 5, 10 und 15 mM zugesetzt (Abb. 41). Die Aktivität der GDH wurde photometrisch bestimmt. Als Kontrolle diente der Standardassay, welcher keine Metallionenzusätze enthielt. Die in diesem Ansatz gemessene GDH-Aktivität wurde gleich 100 % gesetzt.

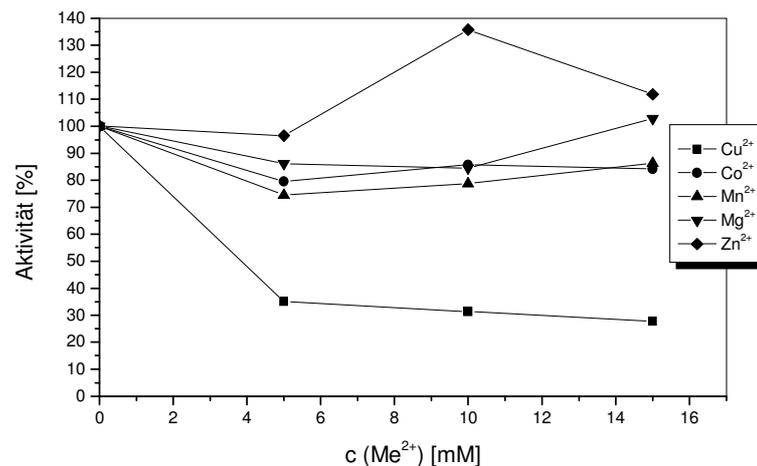


Abb. 41: Einfluss zweiwertiger Metallionen auf die Aktivität der rekombinanten GDH. Dem Puffer wurde Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} und Zn^{2+} in Konzentrationen von jeweils 5, 10 und 15 mM zugesetzt. Als Standard wurde Puffer ohne Zusatz von Metallionen gewählt. Die in diesem Ansatz gemessene Aktivität wurde gleich 100 % gesetzt.

Wie aus Abb. 41 zu erkennen ist, wird das Enzym durch die Anwesenheit von Cu^{2+} -Ionen stark inhibiert. Co^{2+} , Mn^{2+} und Mg^{2+} bewirken eine schwache Inaktivierung. Im Gegensatz dazu wurde eine Zunahme der GDH-Aktivität festgestellt, wenn im Puffer 10 mM Zn^{2+} -Ionen gelöst waren.

3.1.4.5 Vergleich der ermittelten biochemischen Daten mit Literaturangaben

Tab. 17 zeigt einen Vergleich der ermittelten biochemischen Eigenschaften der rekombinanten GDH aus *B. subtilis* mit Literaturangaben.

Tab. 17: Vergleich der ermittelten biochemischen Eigenschaften der GDH aus *B. subtilis* mit Literaturwerten.

	Hilt et al. [85]	Ramaley et al. [87]	Eigene Ergebnisse
pH-Optimum	8,5	-	8,5
Temperatur-Optimum	-	-	50 °C
K_M -Wert D-Glucose	8,7 mM	4,8 mM	1,5 mM
K_M -Wert NADP	-	-	0,03 mM
K_M -Wert NAD	0,11 mM	-	0,04 mM
Spez. Aktivität	375 U/mg	368 U/mg	295 U/mg

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass pH-Optimum sowie spezifische Aktivität des rekombinanten Enzyms in der gleichen Größenordnung liegen wie die Literaturwerte. Die ermittel-

ten K_M -Werte weichen von den Literaturwerten ab. Grund hierfür ist wahrscheinlich die unterschiedliche Zusammensetzung der verwendeten Puffer sowie verschiedene pH-Werte.

3.1.5 Untersuchung von Kreuzreaktionen

Um mögliche Kreuzreaktionen von Substraten und Produkten der ADH-Reaktion mit der GDH sowie Substraten und Produkten der GDH-Reaktion mit der ADH auszuschließen, wurde der Einfluss von (*R*)-Phenylethanol sowie Acetophenon auf die Aktivität der GDH und die potentielle Beeinflussung der ADH-Aktivität durch D-Glucose und 1,5-Gluconolacton untersucht.

Um die Auswirkungen von 1,5-Gluconolacton und D-Glucose auf die Aktivität der ADH zu testen, wurden diese Stoffe dem Standardassay in Konzentrationen von 0 bis 100 mM zugesetzt. Die Enzymaktivität wurde photometrisch bestimmt. Als Kontrolle wurde der ADH-Standardaktivitätstest durchgeführt und die ermittelte Aktivität gleich 100 % gesetzt (Abb. 42).

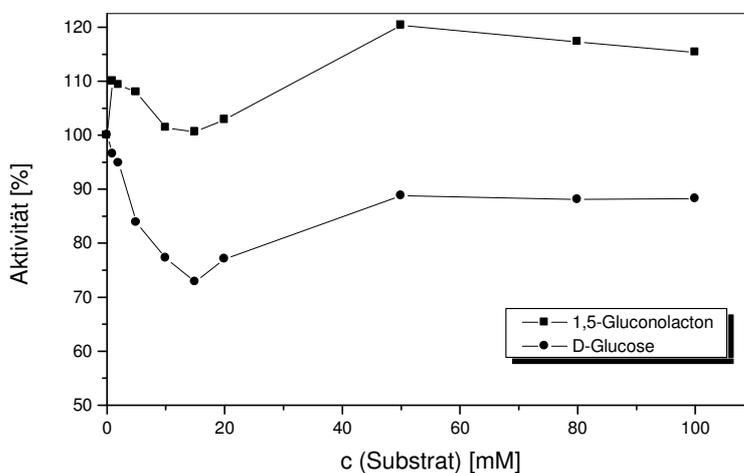


Abb. 42: Untersuchung des Einflusses von 1,5-Gluconolacton und D-Glucose auf die Aktivität der ADH.

Aus Abb. 42 wird ersichtlich, dass der Zusatz von 1,5-Gluconolacton sogar eine Steigerung der ADH-Aktivität zur Folge hat. D-Glucose in Konzentrationen bis ca. 40 mM wirkt inhibierend auf die ADH, bei höheren Konzentrationen nimmt die Inhibierung jedoch ab. Dieser Verlauf legt es allerdings nahe, dass es sich eher um unspezifische Effekte

handelt, da es wenig wahrscheinlich ist, dass eine selektive Inhibierung eines Enzyms bei höheren Konzentrationen verschwindet. Da überschüssige Glucose in lebenden Zellen gut metabolisiert wird, hat eine mögliche hemmende Wirkung der Glucose bei der Durchführung von Ganzzellbiotransformationen keine negativen Folgen.

Des Weiteren wurde untersucht, ob Substrat und Produkt der von der ADH katalysierten Reaktion, Acetophenon bzw. (*R*)-Phenylethanol, die Aktivität der GDH beeinflussen. Aufgrund der geringen Löslichkeit von Acetophenon und (*R*)-Phenylethanol in wässrigen Systemen wurden GDH-Standardassays mit Acetophenon-Konzentrationen von 0 bis 30 mM bzw. (*R*)-Phenylethanol-Konzentrationen von 0 bis lediglich 10 mM durchgeführt. Die Aktivität der GDH im Standardassay ohne Zusätze wurde gleich 100 % gesetzt (Abb. 43).

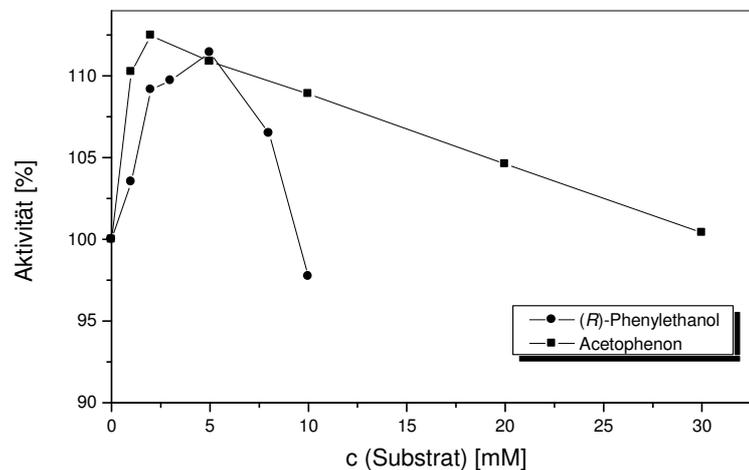


Abb. 43: Einfluss von Acetophenon und (*R*)-Phenylethanol auf die Aktivität der GDH.

Wie Abb. 43 zeigt, sind Acetophenon und (*R*)-Phenylethanol im untersuchten Konzentrationsbereich keine Inhibitoren der GDH. Bei Einsatz geringer Konzentrationen wurde die Enzymaktivität sogar leicht erhöht.

Da keine gravierenden Wechselwirkungen zwischen 1,5-Gluconolacton und D-Glucose mit der ADH sowie Acetophenon und (*R*)-Phenylethanol mit der GDH festzustellen sind, können die Umsetzungen im System mit beiden Enzymen ohne störende Kreuzreaktionen durchgeführt werden.

3.1.6 Coexpression von ADH und GDH (pAW-3)

Um einen Ganzzellbiokatalysator zu erhalten, sollten *adh* und *gdh* hintereinander in den Expressionsvektor pET-21a(+) (Novagen) kloniert werden (pAW-3, Abb. 44).

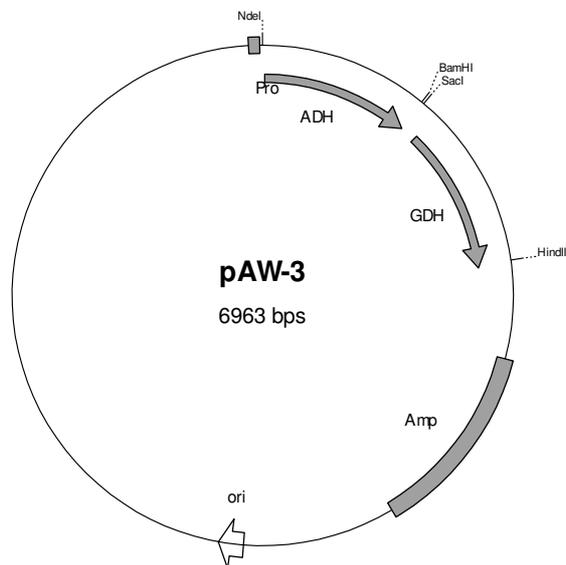


Abb. 44: Vektorkarte von pET-21a(+) mit *adh* und *gdh* (pAW-3).

Für die Coexpression von ADH und GDH wurden pADH sowie das *gdh*-Gen, welches die Restriktionsschnittstellen *SacI* und *HindIII* an seinen Enden trug, einer Restriktion mit *SacI* und *HindIII* unterzogen. Nach Ligation der beiden DNA-Fragmente erfolgte die Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen. Die Transformation führte zu einem einzigen Klon. Die nachfolgende Sequenzanalyse dieses Klons nach erfolgter Plasmidisolierung bestätigte die korrekte Sequenz beider Gene.

Für die Expression wurde pAW-3 in kompetente BL21(DE3)-, Tuner(DE3)- und Origami(DE3)-Zellen transformiert. Jeweils eine Einzelkolonie der Klone wurde in 5 ml LB_{amp}-Medium überimpft und über Nacht geschüttelt. Anschließend wurde 1 %ig in 100 ml LB_{amp}-Medium überimpft und nach Erreichen einer OD₆₆₀ von 0,5 mit 1 mM IPTG die Genexpression induziert. Nach einer Induktionszeit von drei Stunden wurden die Zellen geerntet und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Anschließend wurden Standard-Aktivitätstests auf ADH- und GDH-Aktivität durchgeführt (Tab. 18). Alle Aktivitätstests erfolgten, soweit nicht anders beschrieben, mit Acetophenon bzw. D-Glucose als Standardsubstrate.

Tab. 18: Aktivitäten von ADH und GDH im Rohextrakt von pAW-3 in BL21(DE3)-, Tuner(DE3)- bzw. BL21(DE3)-Zellen nach Ultraschallaufschluss sowie das Verhältnis an exprimierten Enzymen.

Stamm	Akt. ADH [U/mg]	Akt. GDH [U/mg]	GDH/ADH [%]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pAW-3	41,6	12,9	31,1
<i>E. coli</i> Tuner(DE3)/pAW-3	40,6	11,2	27,5
<i>E. coli</i> Origami(DE3)/pAW-3	37,7	12,4	30,6

Die Gene werden beide in aktiver Form exprimiert. Allerdings ist die ADH-Aktivität deutlich höher als die Aktivität der GDH. Das Verhältnis an exprimierter ADH zu exprimierter GDH liegt bei ca. 3 : 1. Da die Enzymaktivitäten sowie das Verhältnis GDH : ADH in *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3-Zellen am besten waren, wurden die weiteren Arbeiten mit diesem System durchgeführt.

3.1.7 Optimierung der Expressionsbedingungen

Um in den rekombinanten *E. coli*-Zellen eine möglichst hohe Expression an ADH und GDH zu erzielen, wurden die Expressionsbedingungen bezüglich IPTG-Konzentration, Induktionsdauer und Induktionstemperatur optimiert.

Um die Auswirkungen der Konzentration an Induktor auf die Genexpression zu untersuchen, wurden die *E. coli*-Zellen angezogen und die Expression der beiden Gene mit verschiedenen Mengen an IPTG im Bereich von 0,1 bis 2,0 mM induziert. Die aufgeschlossenen Zellen wurden anschließend auf ADH- und GDH-Aktivität hin untersucht (Abb. 45).

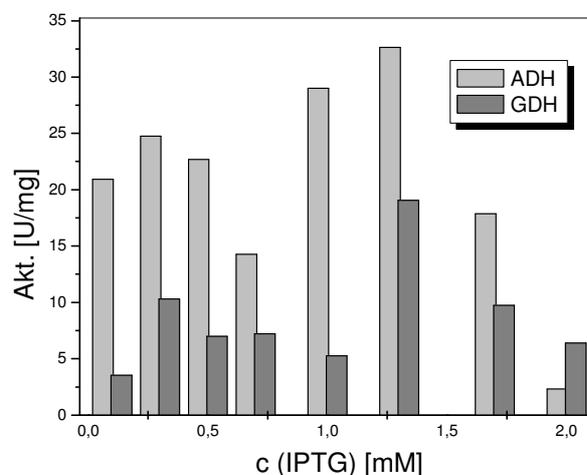


Abb. 45: Ermittlung der optimalen IPTG-Konzentration für die Expression von pAW-3.

Die höchsten spezifischen Enzymaktivitäten wurden bei einer IPTG-Konzentration von 1,3 mM erzielt, während die Aktivität bei einer Konzentration von 2,0 mM IPTG sehr niedrig war.

Des Weiteren wurde die Dauer der Induktion variiert. Nach Induktion mit 1,3 mM IPTG wurden die *E. coli*-Zellen für 1, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 20 bzw. 24 h bei 30°C inkubiert. Nach Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall erfolgte die Messung der Enzymaktivitäten (Abb. 46).

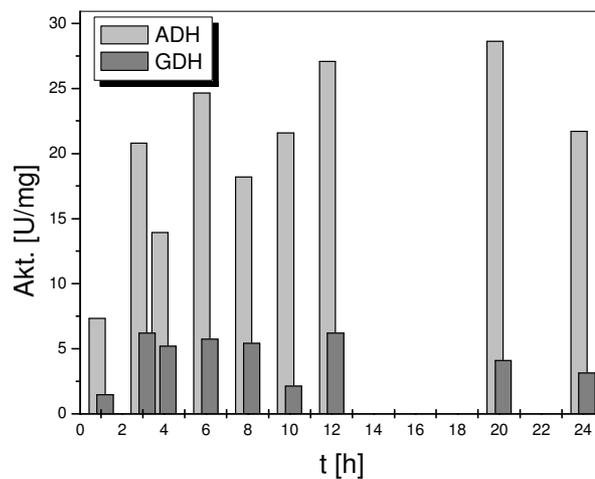


Abb. 46: Ermittlung der optimalen Induktionsdauer für das System pAW-3.

Es stellte sich heraus, dass die ADH-Aktivität nach einer Induktionsdauer von ca. 20 h ihr Maximum erreicht, während nach 3 h Induktion noch ca. 73 % der maximalen Aktivität erreicht wurden. Die Aktivität der GDH ist nach 3 bzw. 12 h Induktion am höchsten. Innerhalb dieses Zeitraumes schwankt die Aktivität nur geringfügig, abgesehen von dem Wert nach 10 h Induktion, wobei es sich um einen Messfehler handeln dürfte. Das Verhältnis an exprimierter GDH zu ADH ist nach 3 h Induktion relativ ausgeglichen, so dass in weiteren Experimenten eine Induktionsdauer von 3 h gewählt wurde.

Weiterhin wurde der Einfluss der Induktionstemperatur getestet. Die Inkubation der *E. coli*-Zellen nach der dreistündigen Induktion erfolgte bei verschiedenen Temperaturen (RT, 27°C, 30°C, 33°C, 37°C). Anschließend wurden die Aktivitäten von ADH und GDH photometrisch gemessen (Abb. 47).

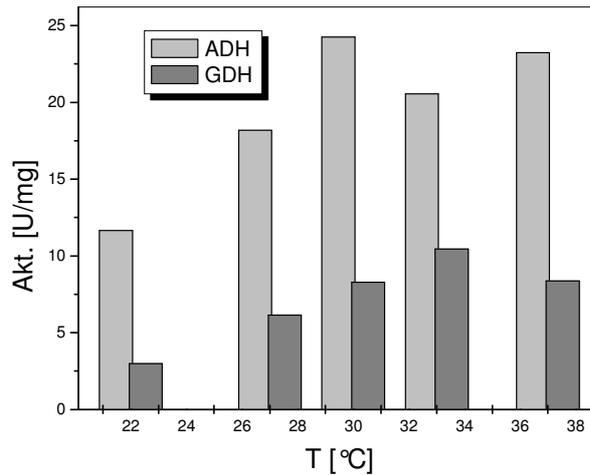


Abb. 47: Bestimmung der optimalen Induktionstemperatur des Systems pAW-3.

Abb. 47 zeigt, dass die beste Expression des Systems bei Induktionstemperaturen von 30-33°C erreicht wird. Die ADH zeigt nach Induktion bei 30°C ihre höchste Aktivität, während die GDH-Aktivität nach Inkubation bei 33°C am aktivsten ist. Da die GDH-Aktivität deutlich geringer ist als die ADH-Aktivität, erfolgte die Induktion der Gene in den nachfolgenden Experimenten bei 33°C. Das Verhältnis an exprimierter GDH zu ADH konnte auf diese Weise verbessert werden.

Die Parameter für eine optimale Expression von pAW-3 in *E. coli* BL21(DE3) sind in Tab. 19 zusammengefasst.

Tab. 19: Bedingungen für die optimale Expression von pAW-3 in *E. coli* BL21(DE3).

Parameter	Optima
Induktorkonzentration	1,3 mM
Induktionstemperatur	33°C
Induktionsdauer	3 h

3.1.8 Bestimmung der Stabilität des Rohextraktes

Zur Untersuchung der Stabilität des pAW-3-Rohextraktes nach Lagerung in 75 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,2 + 1 mM MgCl₂ bei unterschiedlichen Temperaturen erfolgte die Inkubation des Rohextraktes bei -15°C, 5°C, 20°C, 30°C, 37°C sowie 50°C. Nach bestimmten Zeitabständen wurden Proben entnommen und deren ADH- bzw. GDH-Aktivität (Abb. 48, Abb. 49) bestimmt.

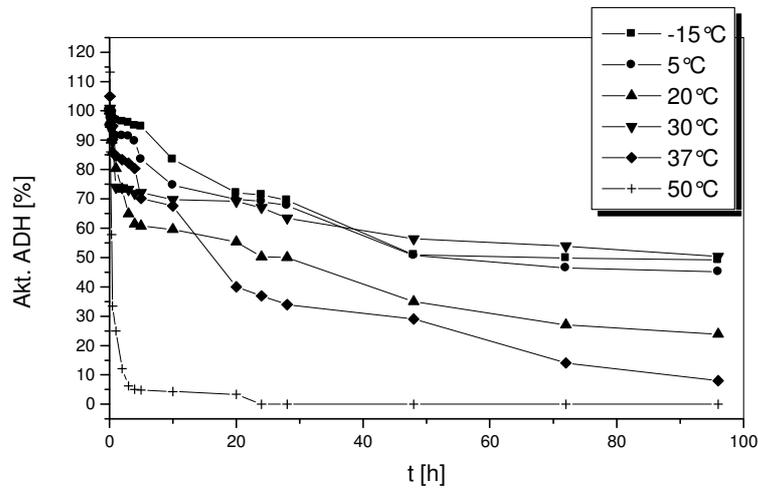


Abb. 48: Bestimmung der ADH-Aktivität im Rohextrakt pAW-3 nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen (-15 bis 50 °C).

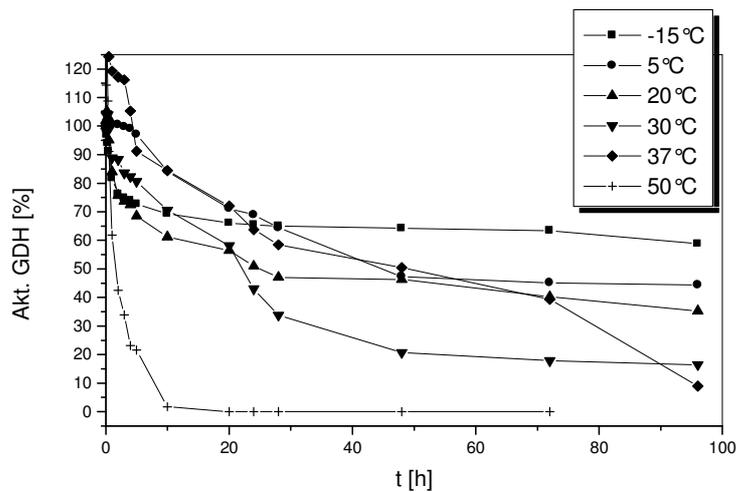


Abb. 49: Bestimmung der GDH-Aktivität im Rohextrakt pAW-3 nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen (-15 bis 50 °C).

Abb. 48 ist zu entnehmen, dass die Aktivität der ADH im Rohextrakt pAW-3 nach Inkubation bei -15°C, 5°C und 30°C nach 100 h noch etwa 50 % der Ausgangsaktivität beträgt. Nach Lagerung des Rohextraktes bei 50°C nimmt die ADH-Aktivität nach sehr kurzer Zeit auf ein Minimum ab. Lagerung bei 20°C und 37°C bewirkt eine Deaktivierung um ca. 75 bzw. 90 % nach 100 h Inkubation.

Aus Abb. 49 wird ersichtlich, dass die Lagerung des Rohextrakts pAW-3 bei -15°C für die GDH-Aktivität am günstigsten ist. Nach 100 h Lagerung sind noch ca. 60 % der Anfangsaktivität vorhanden. Auch hier bewirkt die Inkubation bei 50°C eine schnelle Deaktivierung des Enzyms. Nach Lagerung des Rohextrakts bei 5°C und 20°C sind nach 100 h noch ca. 40 % der GDH-Aktivität messbar, während eine 100-stündige Inkubation bei 30°C sowie 37°C zu einem Aktivitätsverlust von ca. 90 % führt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Lagerung des pAW-3-Rohextraktes bei -15°C für ADH sowie für GDH am günstigsten ist.

3.1.9 Trennung von ADH und GDH mittels Chromatographie

Mittels Hydrophober Interaktionschromatographie (HIC; Gelmaterial: Phenyl-650C, Tosoh) konnten ADH und GDH aus *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3 voneinander getrennt werden. Anschließend wurden ADH und GDH mittels PD-10-Säule (Pharmacia) bzw. Ultrafiltrationszelle (Amicon, Millipore) entsalzt und aufkonzentriert. Der Erfolg der Aufreinigung ist in Tab. 20 dargestellt.

Tab. 20: Aufreinigung von ADH und GDH aus *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3. Das Entsalzen und Aufkonzentrieren nach dem Chromatographie-Schritt erfolgte bei der ADH mittels PD-10-Säule und bei der GDH mittels Ultrafiltrationszelle (Amicon).

	ADH		GDH	
	Spez. Akt. [U/mg]	Reinigungsfaktor	Spez. Akt. [U/mg]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	38,7	1,0	16,8	1,0
Phenyl-650C	287,2	7,4	221,0	13,1
Amicon/PD-10	347,4	9,0	255,0	15,1

In der folgenden Abbildung (Abb. 50) ist der Verlauf der Aufreinigung von ADH und GDH anhand eines SDS-Polyacrylamidgels dargestellt.

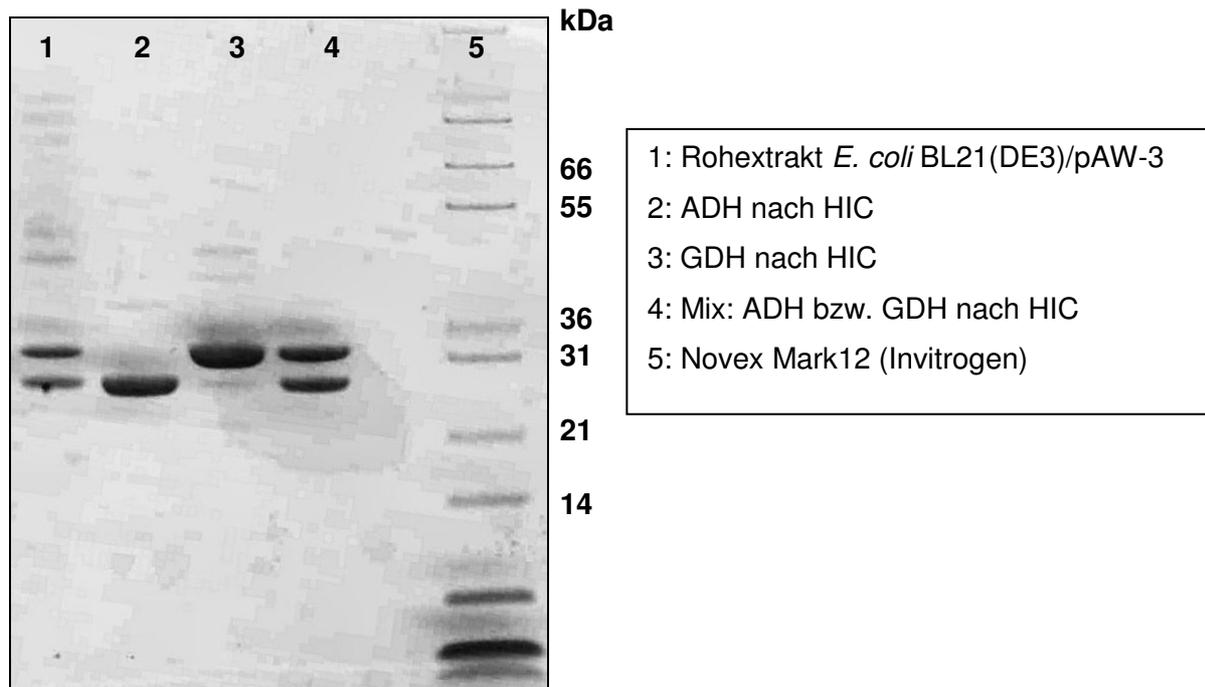


Abb. 50: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE (4-12 %) der ADH- bzw. GDH-haltigen Proben nach den jeweiligen Reinigungsschritten.

Aus Abb. 50 wird deutlich, dass die beiden Enzyme erfolgreich getrennt wurden. Auffällig beim Betrachten des SDS-Gels ist die unterschiedliche Laufstrecke der beiden Proteine. Die Molekulargewichte von ADH und GDH unterscheiden sich nur geringfügig (ADH: 26780 Da, GDH: 28089 Da), so dass die beiden Proteine nicht oder nur schwach aufgetrennt werden dürften. Die ADH-Bande zeigt im SDS-Gel die erwartete Größe, während die GDH-Bande bei höherem Molekulargewicht erscheint. Dieses Verhalten der GDH aus *B. subtilis* wurde auch von Hilt et al. beobachtet^[85].

3.1.10 Umsetzungen im zellfreien System

3.1.10.1 Ermittlung des optimalen Enzymverhältnisses

Um das optimale Enzymverhältnis ADH : GDH herauszufinden, wurden Umsetzungen mit dem Standardsubstrat Acetophenon im zellfreien System durchgeführt. Die gereinigten Enzyme wurden in den Verhältnissen ADH : GDH = 1 : 1, 2 : 1, 3 : 1, 5 : 1, 10 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 5 und 1 : 10 eingesetzt.

Die Ansätze enthielten neben ADH und GDH in den oben genannten Verhältnissen 20 mM Acetophenon, 100 mM D-Glucose, 1 mM MgCl₂ und 100 μM NADP in 50 mM TEA-Puffer pH 7,5. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 37°C unter leichtem Schütteln. Nach

bestimmten Zeitabständen wurden Proben genommen und gaschromatographisch untersucht. Die gebildete Menge an (*R*)-Phenylethanol wurde für jeden Ansatz errechnet (Abb. 51).

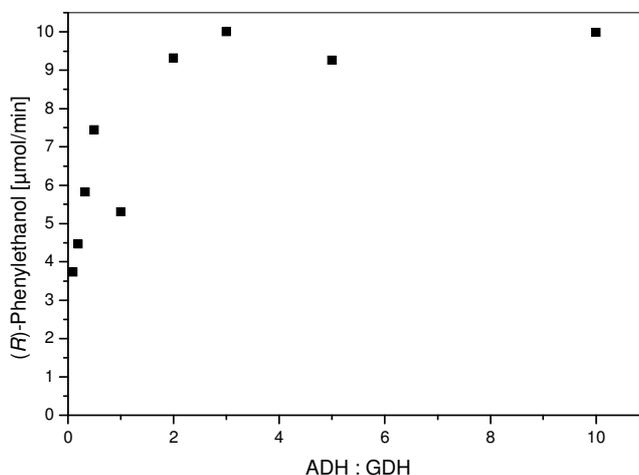


Abb. 51: Bildung von (*R*)-Phenylethanol bei der Reduktion von Acetophenon in Ansätzen mit verschiedenen Enzymverhältnissen ADH : GDH.

Die Abbildung zeigt, dass stereoselektive Reduktionen von Acetophenon mit einem Überschuss an ADH im Ansatz die besten Ausbeuten liefern. Werden ADH und GDH im Verhältnis 3 : 1 bzw. 10 : 1 eingesetzt, sind bereits nach 2 min Reaktionsdauer 100 % des eingesetzten Acetophenons umgesetzt. Die Versuche mit ADH und GDH in den Verhältnissen 1 : 2, 1 : 3, 1 : 5 und 1 : 10 lieferten die langsamsten Umsetzungen. Hier war nach 10 min Reaktionsdauer das gesamte Acetophenon reduziert.

In den pAW-3-Zellen werden ADH und GDH im Verhältnis 3:1 exprimiert. Dieses Verhältnis ist nach dem oben beschriebenen Versuchsergebnis optimal für die Durchführung von Umsetzungen.

3.1.10.2 Umsetzungen verschiedener Ketone

Für Umsetzungen der Substrate Acetophenon, 2,5-Hexandion und 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester im zellfreien System wurde das optimale Enzymverhältnis ADH : GDH = 3 : 1 gewählt. Die Ansätze mit 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion bzw. 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester enthielten neben 100 mM TEA-Puffer pH 7,5, 1 mM MgCl₂, 100 mM D-Glucose und 1 mM NADP 1 U ADH sowie 0,3 U

GDH pro ml. Alle Ansätze wurden bei 37°C inkubiert. Die nach bestimmten Zeiten genommenen Proben wurden gaschromatographisch gemessen (Abb. 52).

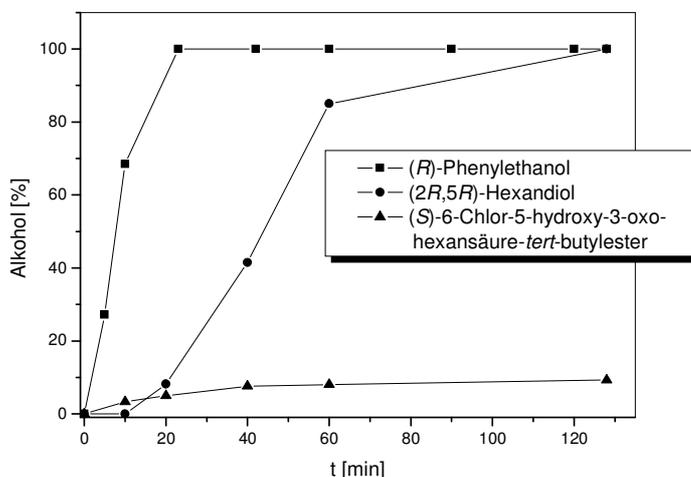


Abb. 52: Reduktion von 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion und 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit ADH und GDH im zellfreien System. Die Ansätze enthielten jeweils 1 U ADH sowie 0,3 U GDH.

Während 10 mM Acetophenon und 15 mM 2,5-Hexandion von ADH kombiniert mit GDH im Verhältnis 3 : 1 vollständig reduziert worden sind, wurden nur ca. 9 % des eingesetzten 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylesters nach 2 h Reaktionszeit umgesetzt. Alle Reduktionen verliefen stereoselektiv.

3.1.11 Ganzzellumsetzungen mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3

3.1.11.1 Ganzzellumsetzungen von verschiedenen Ketonen im wässrigen System

Zur Durchführung von Ganzzellbiotransformationen wurden bei den Umsetzungen von 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion und 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester 5 mg Zellen pro ml Ansatz eingesetzt. Da Acetophenon und 2,5-Hexandion bereits bei der ersten Probennahme vollständig reduziert waren, wurden die Umsetzungen dieser beiden Substrate mit 0,5 mg Zellen pro ml Reaktionsansatz wiederholt. Alle Ansätze enthielten außerdem 50 mM TEA-Puffer pH 7,5, 1 mM MgCl₂ sowie 100 mM D-Glucose und wurden bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Einem Teil der Ansätze wurde außerdem 1 mM NADP zugesetzt. Des Weiteren wurde ein Teil der Zellen vor der Umsetzung mit 10 µl/ml Toluol behandelt. Nach bestimmten Zeitabständen wurden Proben entnommen und mittels GC die Bildung der Alkohole detektiert (Abb. 53).

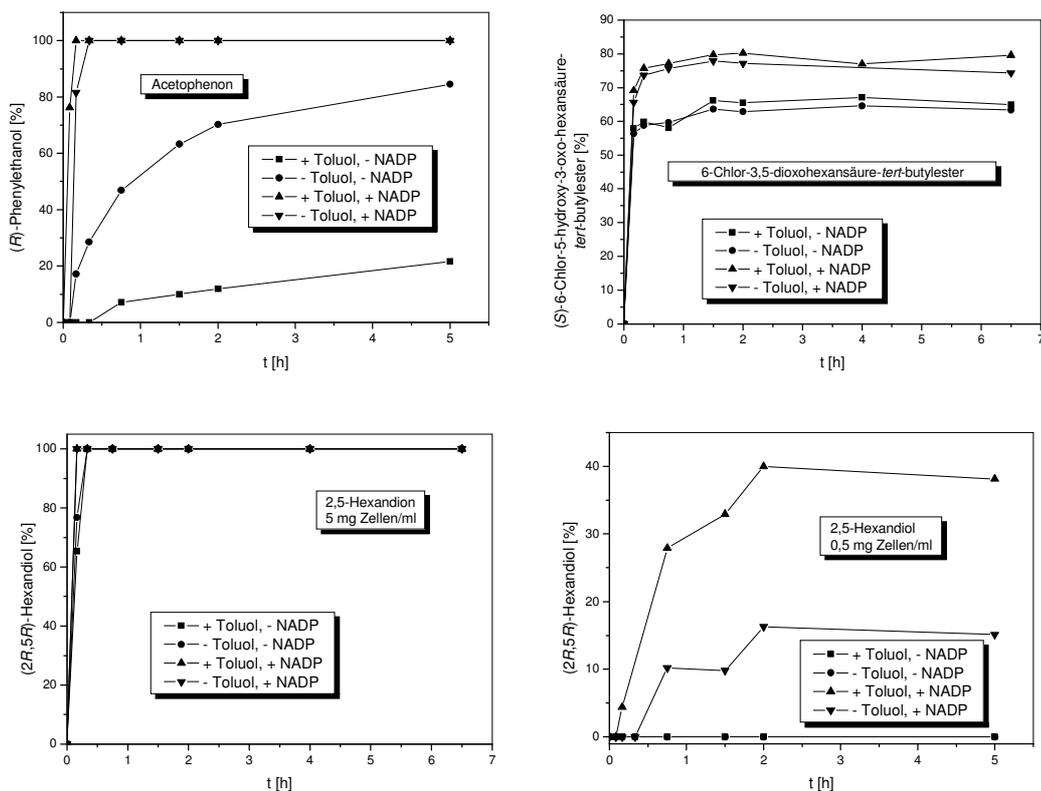


Abb. 53: Ganzzellumsetzungen mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3 von 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion und 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester. Bei der Umsetzung von 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester wurden 5 mg Zellen, bei der Umsetzung von Acetophenon 0,5 mg Zellen pro ml Reaktionsansatz eingesetzt. Die Reduktion von 2,5-Hexandion ist sowohl mit 5 als auch mit 0,5 mg Zellen pro ml Ansatz dargestellt.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die Permeabilisierung der Zellmembran durch Toluol nur in einigen Fällen einen Einfluss auf die Biotransformationen hat. So ist die Umsetzung von Acetophenon ohne NADP-Zugabe und ohne Toluol-Behandlung besser als nach Toluol-Behandlung, während die Reduktion von 2,5-Hexandion mit 0,5 mg Zellen/ml mit NADP nach Permeabilisierung mit besseren Ausbeuten verläuft. Der Zusatz von NADP zum Reaktionsansatz allerdings hat deutlich höhere Umsatzraten zur Folge. Aus der Abbildung wird klar, dass Acetophenon von diesem System besser umgesetzt wird als die anderen beiden Substrate. Acetophenon wird auch mit der geringen Zellmenge von 0,5 mg/ml vollständig stereoselektiv reduziert. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass nur 10 mM Acetophenon eingesetzt wurden, während von dem am schlechtesten umgesetzten Substrat, 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester, 25 mM im Ansatz enthalten waren.

3.1.11.2 Ganzzellumsetzungen von Acetophenon in organisch-wässrigen Zweiphasensystemen

Ganzzellumsetzungen im wässrigen System haben den Nachteil, dass die Löslichkeit vieler organischer Stoffe wie auch Acetophenon und Phenylethanol im wässrigen Milieu begrenzt ist. Das organische Milieu hingegen stellt für die meisten Enzyme ein Problem dar. Ein geeigneter Kompromiss wäre die Durchführung der Ganzzellumsetzungen in einem organisch-wässrigen Zweiphasensystem. Um ein solches System zu etablieren, wurden zunächst verschiedene organische Lösungsmittel auf ihre Eignung als organische Phase bei der Umsetzung von Acetophenon untersucht. Als Lösungsmittel wurden MTBE, *n*-Butylacetat und Toluol ausgewählt. Die wässrige Phase bestand aus 50 mM TEA-Puffer pH 7,5 sowie 500 mM Glucose, während sich die organische Phase aus dem jeweiligen Lösungsmittel sowie 50 mM Acetophenon zusammensetzte. Die beiden Phasen wurden im Verhältnis 1 : 1 eingesetzt. Pro 100 ml Ansatz wurden 100 mg Zellen zugesetzt. Der Ansatz mit MTBE als Lösungsmittel wurde zusätzlich mit permeabilisierten Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen vor Reaktionsstart mit 10 µl/ml Toluol behandelt. Die Durchführung der Ansätze erfolgte bei 30 °C und leichtem Schütteln. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben genommen und mittels Gaschromatographie analysiert. Die Zweiphasensysteme wurden anschließend mit dem wässrigen Einphasensystem verglichen (Abb. 54).

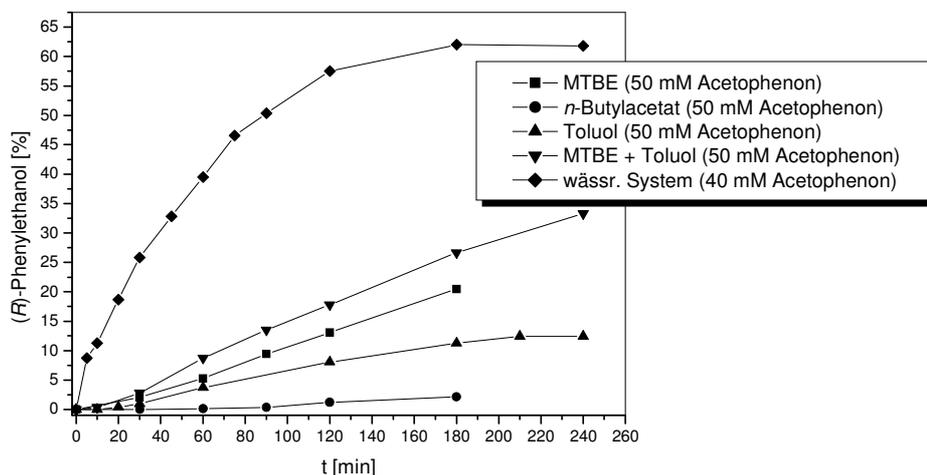


Abb. 54: Vergleich der gewählten organisch-wässrigen Zweiphasensysteme mit dem wässrigen Einphasensystem bei der Umsetzung von Acetophenon mit *E. coli* BL21(DE3)-Zellen. Die Ansätze im Zweiphasensystem enthielten 50 mM Acetophenon, während im wässrigen System nur 40 mM Acetophenon enthalten waren.

Die Abbildung zeigt, dass die Umsetzung in allen gewählten organisch-wässrigen Zweiphasensystemen deutlich schlechter ist als im wässrigen Einphasensystem, die Umsatz-

rate im Zweiphasensystem liegt bestenfalls bei ca. 50 % des rein wässrigen Systems. Hierbei muss beachtet werden, dass im wässrigen System nur 40 mM Acetophenon im Ansatz enthalten waren, während den restlichen Ansätzen 50 mM zugesetzt wurden. Ein Grund für die schlechten Umsetzungen in organisch-wässrigen Zweiphasensystemen könnte sein, dass die Zellen in organischen Lösungsmitteln nach kurzer Zeit lysieren. Der gewählte Stamm scheint somit nicht für Umsetzungen in organisch-wässrigen Zweiphasensystemen geeignet zu sein.

3.1.12 Coexpression von GDH und ADH (pAW-4)

Das Konstrukt pAW-3 enthält *adh* als erstes Gen und im Anschluss an eine ribosomale Bindungsstelle das *gdh*-Gen. In diesem System wird die ADH ca. dreimal so stark exprimiert wie die GDH. Um die Auswirkungen auf die Aktivitäten der beiden Gene zu untersuchen, wenn das *gdh*-Gen an erster Stelle im Vektor direkt hinter dem Promotor sitzt und das *adh*-Gen im Anschluss an eine ribosomale Bindungsstelle hinter dem *gdh*-Gen, wurde ein Konstrukt entwickelt, welches die Gene in umgekehrter Reihenfolge zu pAW-3 enthält (pAW-4; Abb. 55).

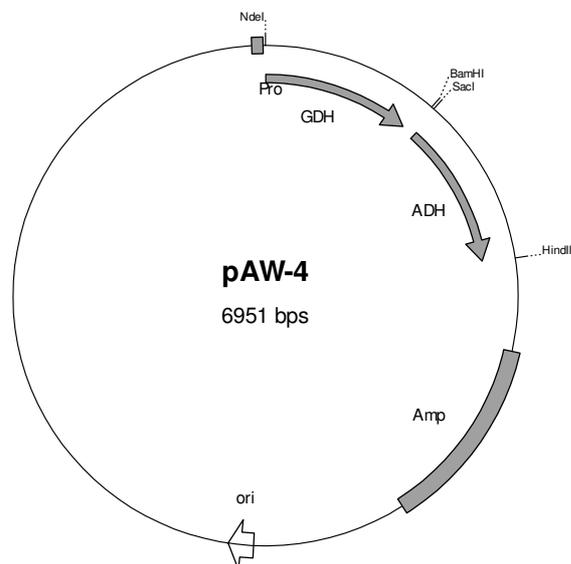


Abb. 55: Vektorkarte von pET-21a(+) mit *gdh* und *adh* (pAW-4).

Für die Konstruktion dieses Systems wurden spezifische Primer mit integrierten Restriktionsschnittstellen synthetisiert. Dem *gdh*-Gen sollten die Schnittstellen *NdeI* und *BamHI*,

dem *adh*-Gen *SacI* und *HindIII* an den Genenden eingefügt werden. Diese Primer wurden in PCR-Ansätzen eingesetzt.

Der Vektor pET-21a(+) (Novagen) und das über PCR amplifizierte *gdh*-Gen wurden einer Restriktion mit *NdeI* und *BamHI* unterzogen. Die gesamten Ansätze wurden auf ein präparatives 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen, die Banden ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert. Auf die Ligation der beiden DNA-Fragmente folgte die Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen. Nach erfolgreicher Transformation wurden 16 der Klone über Schnellisolierung der Plasmid-DNA (Miniprep-Kit, Qiagen) auf korrekte Ligation hin geprüft. Dabei wurde ein Aliquot der Plasmid-DNA durch Restriktion mit den Enzymen *NdeI* und *BamHI* geschnitten und über Elektrophorese im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Zwei der 16 Klone zeigten den pET-21a(+) Vektor und das Gen in der erwarteten Größe.

Das amplifizierte *adh*-Gen, das an den Enden die Restriktionsschnittstellen *SacI* und *HindIII* enthielt, und der *gdh*-enthaltende pET-21a(+)-Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *HindIII* verdaut und die Banden ebenfalls nach Auftragen des gesamten Restriktionsansatzes auf ein 0,8 %iges Agarosegel ausgeschnitten und eluiert. Nach der Ligation wurde das Konstrukt in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert. Zwölf der Klone wurden über Isolierung der Plasmid-DNA mit Hilfe des Miniprep-Kits (Qiagen) überprüft. Die Plasmide wurden mit *SacI* und *HindIII* verdaut und anschließend elektrophoretisch im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Drei der Klone zeigten Vektor und *adh*-Gen in der erwarteten Größe. Aliquots dieser Klone wurden sequenziert. Einer der Klone zeigte die richtige Sequenz beider Gene.

Das Plasmid mit der korrekten Sequenz (pAW-4) wurde für die Expression in die Expressionsstämme *E. coli* Tuner(DE3), BL21(DE3) und Origami(DE3) (alle von Novagen) transformiert. 5 ml LB_{amp} wurden mit jeweils einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C und 120 rpm inkubiert. Anschließend wurde 1 %ig in jeweils 100 ml LB_{amp} überimpft, bis zur OD₆₆₀ von 0,5-0,7 bei 30°C und 120 rpm wachsen lassen, mit 1,3 mM IPTG induziert und für 3 h bei 33°C und 120 rpm inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und per Ultraschall aufgeschlossen. Anschließend wurden Tests auf ADH- und GDH-Aktivität durchgeführt (Tab. 21).

Tab. 21: Aktivitäten von ADH und GDH sowie Enzymverhältnis in verschiedenen Expressionsstämmen, die pAW-4 enthalten.

Stamm	Akt. ADH [U/mg]	Akt. GDH [U/mg]	ADH/GDH [%]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pAW-4	13,77	58,01	27,7
<i>E. coli</i> Tuner(DE3)/pAW-4	9,14	32,90	23,7
<i>E. coli</i> Origami(DE3)/pAW-4	5,29	17,28	30,6

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass die ADH in diesem Konstrukt viel schwächer exprimiert wird als in pAW-3, während die Expressionsrate der GDH stark zugenommen hat. Das Enzymverhältnis ist in pAW-4 genau umgekehrt im Vergleich zu pAW-3. Daraus lässt sich schließen, dass das Gen, welches im Vektor pET-21a(+) direkt hinter dem Promotor sitzt, etwa dreimal so stark exprimiert wird wie das darauf folgende Gen.

Da die Aktivitäten beider Enzyme im Wirtstamm *E. coli* BL21(DE3) deutlich höher waren als in den anderen beiden Stämmen, wurden die weiteren Arbeiten mit diesem Stamm durchgeführt.

3.1.13 Ganzzellumsetzungen von verschiedenen Ketonen mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-4

Die Durchführung der Ganzzellumsetzungen mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-4 erfolgte bei 37°C unter leichtem Schütteln mit 1 mM MgCl₂ und 100 mM D-Glucose in 50 mM TEA-Puffer pH 7,5. Einem Teil der Ansätze wurde 1 mM NADP zugesetzt. Als Substrate wurden 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion bzw. 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester eingesetzt. Alle Ansätze enthielten 5 mg Zellen pro ml Ansatz. Da die Umsetzungen von Acetophenon und 2,5-Hexandion schon bei der ersten Probenahme vollständig abgelaufen waren, wurden diese Ansätze mit 0,5 mg Zellen pro ml Ansatz wiederholt. Um die Zellmembran zu permeabilisieren, wurde ein Teil der Zellen vor der Umsetzung mit Toluol inkubiert. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden den Ansätzen Proben entnommen und mittels Gaschromatographie auf die Bildung der Alkohole untersucht (Abb. 56).

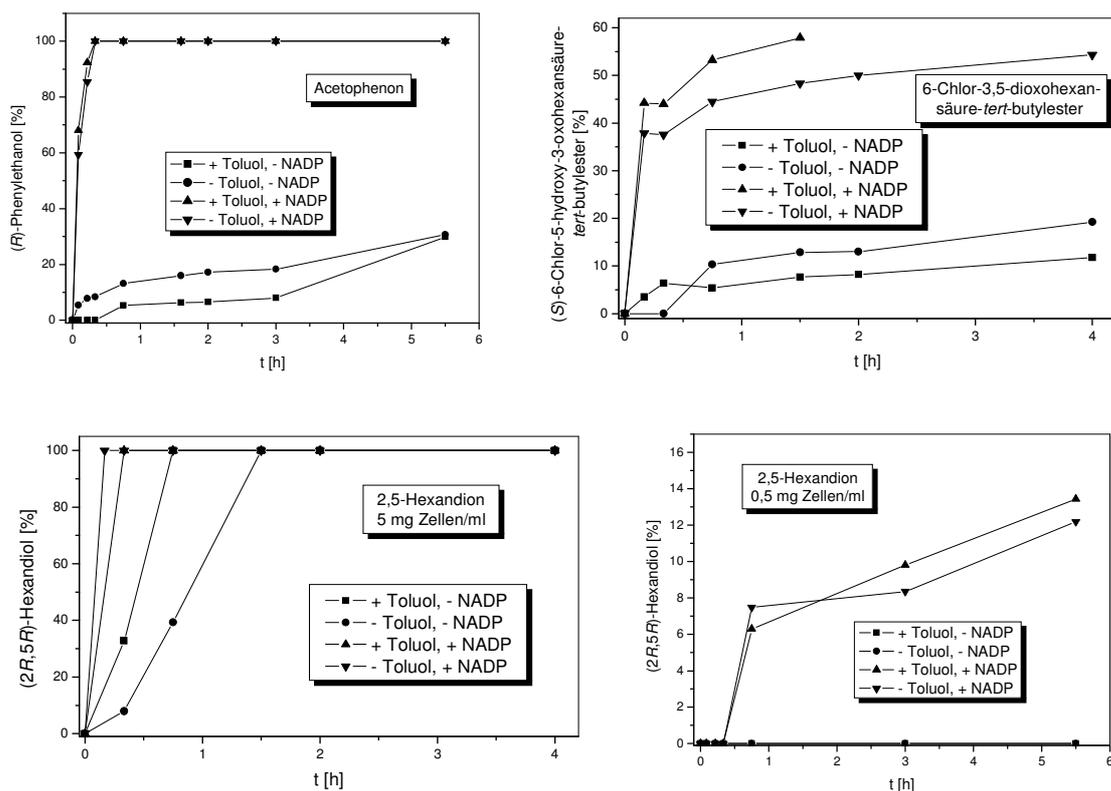


Abb. 56: Ganzzellumsetzung von 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion sowie 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-4. Ein Teil der Zellen wurde vor der Umsetzung mit Toluol behandelt. Die Umsetzungen erfolgten mit und ohne NADP-Zusatz. Der Acetophenon-Ansatz enthielt 0,5 mg, der 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester-Ansatz 5 mg Zellen pro ml Ansatz. Die Umsetzung von 2,5-Hexandion ist mit 0,5 und 5 mg Zellen pro ml Ansatz dargestellt.

Die Abbildung zeigt, dass die Behandlung der *E. coli* BL21(DE3)/pAW-4-Zellen mit Toluol einen nur vernachlässigbaren Einfluss auf die Umsetzung der eingesetzten Substrate hat. Der Zusatz von NADP dagegen bewirkt stark erhöhte Umsatzraten. Beim Vergleich der Substrate fällt auf, dass Acetophenon mit Abstand am besten von den Zellen umgesetzt wird und dass 15 mM 2,5-Hexandion besser umgesetzt werden als 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester. Sowohl Acetophenon als auch 2,5-Hexandion konnten mit 100 % Ausbeute umgesetzt werden. Die Reduktion von Acetophenon lief sogar mit der reduzierten Zellmenge von 0,5 mg/ml vollständig ab. Alle Alkohole wurden mit 100 % ee gebildet.

3.1.14 Vergleich der Systeme *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3 und pAW-4

Die beiden Stämme *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3 und pAW-4 wurden anhand der Umsetzung von Acetophenon verglichen (Abb. 57).

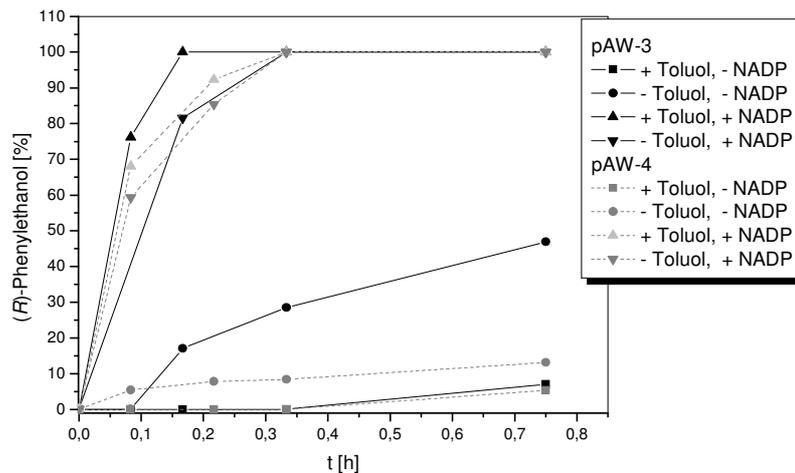


Abb. 57: Vergleich der Stämme *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3 und pAW-4 anhand der Ganzzellumsetzung von Acetophenon. Eingesetzt wurden 0,5 mg Zellen pro ml Ansatz.

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, verlaufen die Umsetzungen mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3 besser. Während Acetophenon von *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3-Zellen nach Permeabilisierung und NADP-Zusatz schon nach 10 min vollständig reduziert wurde, war dies mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-4-Zellen bei gleichen Bedingungen erst nach 20 min der Fall. Das im zellfreien System ermittelte optimale Enzymverhältnis ADH : GDH = 3 : 1 liegt in *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3-Zellen vor. Mit diesem Stamm sind höhere Umsatzraten möglich. Damit wurde das optimale Enzymverhältnis bestätigt.

3.1.15 Zusammenfassung der Systeme pAW-3 und pAW-4

Für die Enzyme ADH und GDH wurde ein optimales Enzymverhältnis von 3 : 1 ermittelt. Dieses Verhältnis liegt im Stamm *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3 vor. Obwohl auch *E. coli* BL21(DE3)/pAW-4-Zellen die drei eingesetzten Substrate sehr schnell reduzieren, sind die Umsetzungen mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3 deutlich besser. Auch ohne Zusatz von NADP sind Umsetzungen möglich, allerdings verlaufen diese deutlich schlechter. Ein weiterer Vorteil des Systems ADH-GDH ist die Ausnutzung des preiswerten Substrats D-Glucose. Ein Nachteil des Systems ist die Ansäuerung des Reaktionsmediums bei Umsetzungen im größeren Maßstab durch die Bildung von D-Gluconsäure.

3.2 Cofaktorregenerierung durch Malic Enzyme (MAE): System ADH-MAE (pAW-5)

Das am häufigsten angewandte Enzym für die Regenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren ist die FDH. Wie bereits erwähnt, weist sie wichtige Vorteile auf wie die Irreversibilität der Reaktion, die Bildung des Gases CO_2 als einzigem Produkt und der niedrige Preis des Substrats Formiat. Nachteile sind allerdings die geringe spezifische Aktivität sowie die strikte NAD-Spezifität der FDH. Bei der Recherche nach weiteren NADPH-regenerierenden Enzymen für die Konstruktion von Coexpressionssystemen wurde darauf geachtet, die oben genannten Vorteile soweit wie möglich zu nutzen.

Als alternatives NADPH-regenerierendes Enzym wurde Malic Enzyme (MAE) aus *E. coli* ausgewählt. Dieses Enzym katalysiert die Decarboxylierung von L-Malat zu Pyruvat (Abb. 58).

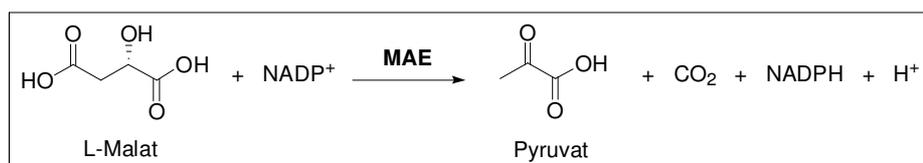


Abb. 58: Decarboxylierung von L-Malat zu Pyruvat durch Malic Enzyme (MAE).

Aufgrund der Decarboxylierung ist diese Reaktion nahezu irreversibel, was die Gleichgewichtslage der Reaktion günstig beeinträchtigt und für einen permanent hohen Level an NADPH sorgt. Weitere Vorteile sind der niedrige Preis von Malat, die Verfügbarkeit des Gens und die Möglichkeit der homologen Expression. Das NADP-abhängige MAE wurde bisher noch nicht für die Cofaktorregenerierung eingesetzt. Abb. 59 zeigt das System, indem ADH und MAE gekoppelt sind.

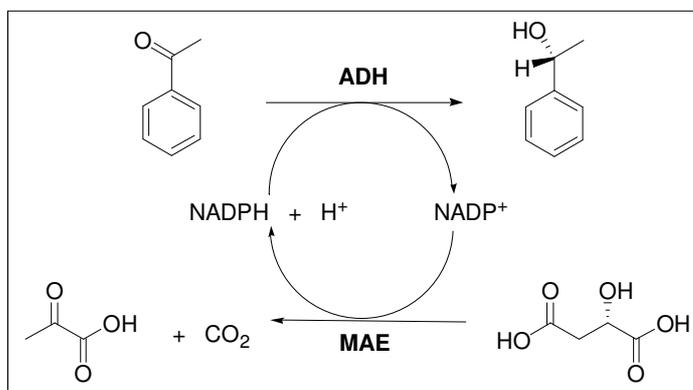


Abb. 59: Kopplung von ADH und MAE als NADPH-regenerierendes Enzym.

3.2.1 Isolierung des *mae*-Gens

Für die Herstellung eines alternativen Cofaktorregenerierungs-Systems, welches ADH aus *L. kefir* sowie MAE aus *E. coli* enthalten sollte, wurde das *mae*-Gen aus *E. coli* K12 isoliert. Das *mae*-Gen sollte die Restriktionsschnittstellen *Xho*I und *Avr*II an seinen Enden tragen. Hierzu wurden anhand der aus der Literatur bekannten Sequenz^[88] spezifische Primer konstruiert und in einer PCR eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde sequenziert; es konnte die gesamte 2280 bp lange *mae*-Sequenz gelesen werden.

3.2.2 Coklonierung von ADH und MAE

Für die Coexpression von ADH und MAE wurde der Expressionsvektor pETDuet-1 (Novagen) gewählt. Dieser Vektor enthält neben einem Ampicillin-Resistenzgen zwei multiple Klonierungsstellen, denen jeweils ein T7-Promotor sowie eine ribosomale Bindungsstelle vorausgeht. Der T7-Terminator sitzt am Ende der zweiten multiplen Klonierungsstelle. Der Vektor ist für die Coexpression zweier Gene optimal geeignet.

Für das *adh*-Gen wurden Primer konstruiert, die dem Gen die Restriktionsschnittstellen *Sac*I und *Not*I an den Enden anfügen sollten. Diese Primer wurden in einer PCR eingesetzt. Das aufgereinigte PCR-Produkt sowie der Vektor pETDuet-1 wurden anschließend einer Restriktion mit den Restriktionsenzymen *Sac*I und *Not*I unterzogen. Die DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Ligation in den kompetenten Expressionsstamm *E. coli* XL1-Blue transformiert. Zehn der Klone wurden mittels Isolierung der Plasmid-DNA auf korrekte Ligation hin untersucht. Die *adh*-Sequenz einer der Klone (pDLKADH) wurde durch Sequenzanalyse bestätigt.

Anschließend erfolgten Restriktionsansätze von pDLKADH und dem *mae*-PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Avr*II. Nach der Gelelektrophorese erfolgten die Ligation der aus dem Gel extrahierten DNA-Fragmente und die Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen. Von den nach Selektion auf LB_{amp}-Platten resultierenden Kolonien wurden 10 Klone ausgewählt und in jeweils 5 ml LB_{amp}-Medium über Nacht angezogen. Aus den Kulturen wurde die Plasmid-DNA isoliert, welche nach Restriktion auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Fünf der Klone zeigten Fragmente in der erwarteten Größe. Die Sequenzierung eines dieser Klone (pAW-5; Abb. 60) bestätigte die korrekte Gensequenz von *adh* und *mae*.

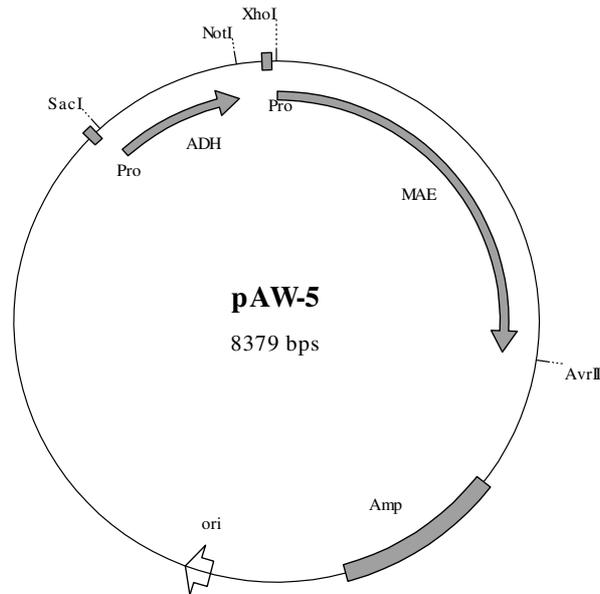


Abb. 60: Vektorkarte des Expressionsvektors pETDuet-1 (Novagen) mit *adh* aus *L. kefir* und *mae* aus *E. coli*. Jedem dieser Gene geht ein T7-Promotor voraus.

3.2.3 Expression von pAW-5

Für die Expression wurde der Vektor pAW-5 in kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert.

Zur Optimierung der Expressionsbedingungen wurde jeweils eine Einzelkolonie *E. coli* BL21(DE3)/pAW-5 in 5 ml LB_{amp} überimpft und für 16 h bei 37°C geschüttelt. 24 Kolben mit jeweils 30 ml LB_{amp} wurden 1 %ig mit dieser Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD₆₆₀ von ca. 0,5 wurde mit 25, 50, 100 bzw. 1000 µM IPTG induziert und bei 30 bzw. 37°C geschüttelt. Die Ernte der Kulturen erfolgte nach 1,5; 3 bzw. 16,5 h Wachstum. Anschließend wurden die Zellen mit Glasperlen aufgeschlossen. Die Rohextrakte wurden auf MAE- und ADH-Aktivität getestet (Abb. 61).

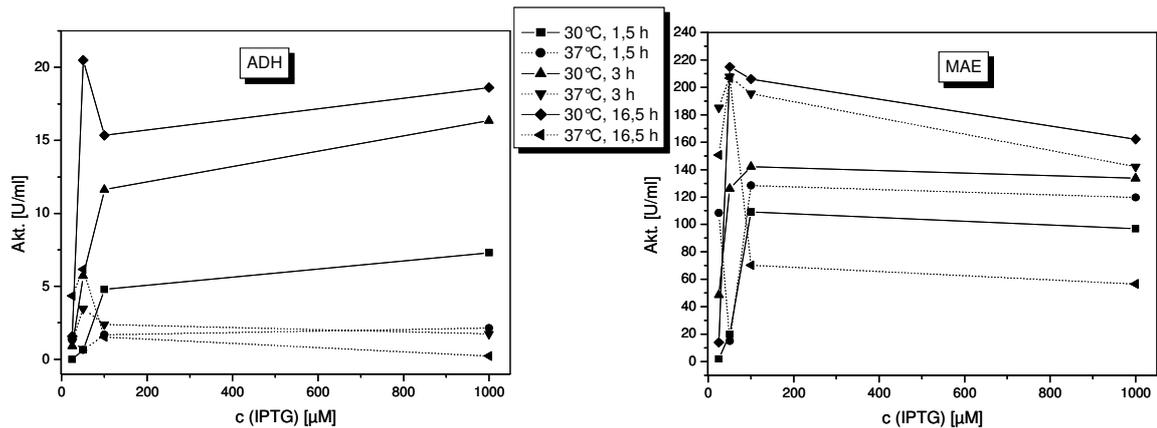


Abb. 61: Aktivitäten von ADH (links) und MAE (rechts) nach Variation der IPTG-Konzentration, der Induktionsdauer und -temperatur. Die gestrichelten Linien stellen die Expression bei 37°C dar, die durchgezogenen Linien die Expression bei 30°C.

Aus dieser Abbildung wird deutlich, dass die ADH-Aktivität sehr viel niedriger ist als die Aktivität von MAE. Aus diesem Grund war das Ziel der Expressionsoptimierung eine möglichst hohe ADH-Aktivität sowie ein soweit wie möglich ausgeglichenes Verhältnis an exprimierten Enzymen. Da aus dieser Abbildung ersichtlich wird, dass die ADH-Aktivität nach Induktion bei 30°C wesentlich höher ist als nach Induktion bei 37°C, wurde ein erneuter Versuch zur Expressionsoptimierung durchgeführt, bei dem die IPTG-Konzentration sowie die Induktionsdauer variiert wurden und die Induktionstemperatur 30°C betrug. Hierzu wurden 5 ml LB_{amp} mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-5 angeimpft, über Nacht bei 37°C geschüttelt und anschließend 1 %ig in 12 Kolben mit 30 ml LB_{amp} überimpft. Nach Erreichen einer OD_{660} von ca. 0,5 wurde mit 50, 100, 500 bzw. 1000 μ M IPTG induziert und bei 30°C geschüttelt. Die Zellernte erfolgte nach 2,5; 4,5 bzw. 16 h. Nach einem 40 %igen Aufschluss mit Glasperlen wurden Enzymtests auf MAE- und ADH-Aktivität durchgeführt (Abb. 62).

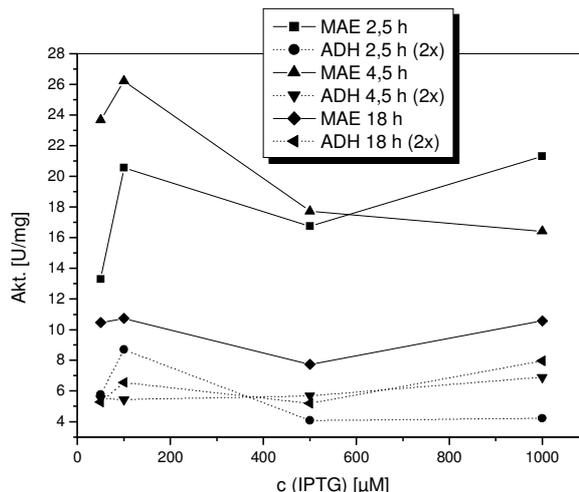


Abb. 62: Expressionsoptimierung des Systems pAW-5. Die spezifischen Aktivitäten von ADH und MAE nach Induktion bei 30 °C und verschiedenen Erntezeitpunkten wurden gegen die Induktorkonzentrationen aufgetragen. Für eine übersichtlichere Darstellung wurde die doppelte ADH-Aktivität aufgetragen.

Die Abbildung zeigt, dass die maximale ADH-Aktivität nach 2,5-stündiger Induktion mit 100 µM IPTG erzielt wurde. Die MAE-Aktivität ist bei diesen Bedingungen auch relativ gut. Um ein möglichst ausgeglichenes Enzymverhältnis zu erhalten, müssen Bedingungen gewählt werden, wo die Aktivität der ADH möglichst hoch ist, während die MAE-Aktivität relativ niedrig ist. Dieses Kriterium wird erfüllt bei einer Induktion mit 1 mM IPTG und einem Erntezeitpunkt nach 18 h. Hier beträgt die Aktivität der ADH 91 % des Maximalwertes, während die MAE-Aktivität nur 40 % beträgt.

Unter diesen Bedingungen erfolgte die Anzucht von Zellen im größeren Maßstab. Hierzu wurden 4,5 l LB_{amp}-Medium 1 %ig mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-5 angeimpft. Nach Wachstum bei 37 °C und Erreichen einer OD₆₆₀ von ca. 0,5 wurde mit 1 mM IPTG induziert und für 17 h bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Es konnten 24,5 g Zellen geerntet werden. Nach 40 %igem Aufschluss mittels Ultraschall erfolgten Tests auf ADH- und MAE-Aktivität. Die ADH hatte im Rohextrakt eine Aktivität von 27,2 U/ml, während die Aktivität des MAE 361,3 U/ml war. Das Verhältnis von MAE zu ADH in *E. coli* BL21(DE3)/pAW-5 ist demnach unter den gewählten Bedingungen ca. 13 : 1.

3.2.4 Trennung von ADH und MAE mittels Chromatographie

Um die biochemischen Eigenschaften von MAE zu ermitteln sowie zur Durchführung von Umsetzungen mit isolierten Enzymen war es notwendig, ADH und MAE voneinander zu

trennen. Dies geschah mittels Hydrophober Interaktionschromatographie. Als Gelmaterial wurde Phenyl-650C (Tosoh), welches mit 50 mM TEA-Puffer pH 7,0 + 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gespült wurde, verwendet. Die ADH eluierte vor MAE von der Säule. Die Elution gelang durch Verringerung der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration mittels eines linearen Gradienten. Es wurden Standard-Aktivitätstests durchgeführt, um die Aktivitäten von ADH und MAE zu bestimmen (Tab. 22 bzw. Tab. 23). Da für die weiteren Arbeiten möglichst reines MAE-Enzympräparat benötigt wurde, erfolgte ein weiterer Reinigungsschritt. Hierzu wurden die aktiven MAE-Fractionen nach dem ersten Reinigungsschritt durch Anionenaustausch-Chromatographie mittels Q-Sepharose FF (Pharmacia) weiter aufgereinigt. Die Elution der Proteine erfolgte nach Äquilibrieren der Säule mit 50 mM TEA-Puffer pH 7,0 durch Anlegen eines linearen Gradienten von 0-1 M NaCl.

Tab. 22: Partielle Aufreinigung der ADH aus dem Rohextrakt von *E. coli* BL21 (DE3)/pAW-5.

Reinigungs-schritt	ADH			Reinigungs-faktor
	Akt. [U/ml]	Protein [mg/ml]	Akt. [U/mg]	
Rohextrakt	8,47	6,15	1,38	1,0
Phenyl-650C	1,11	0,19	5,94	4,3

Tab. 23: Partielle Aufreinigung von MAE aus dem Rohextrakt von *E. coli* BL21 (DE3)/pAW-5.

Reinigungs-schritt	MAE			Reinigungs-faktor
	Akt. [U/ml]	Protein [mg/ml]	Akt. [U/mg]	
Rohextrakt	213,24	19,10	11,16	1,0
Phenyl-650C	100,50	3,10	32,42	2,9
Q-Sepharose FF	40,64	0,88	46,28	4,1

Die erfolgreiche Trennung der beiden Proteine wurde mittels SDS-PAGE dokumentiert (Abb. 63).

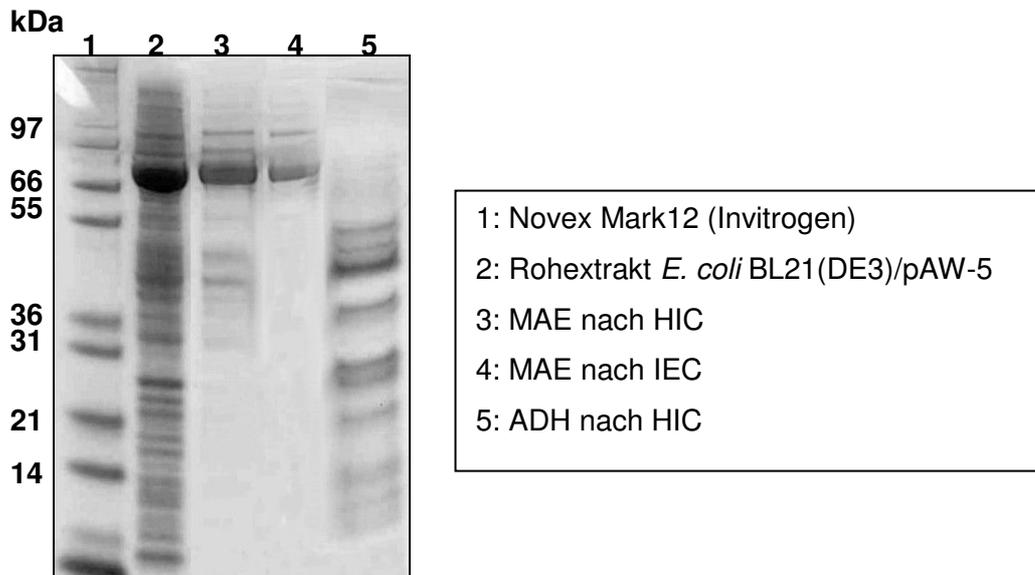


Abb. 63: SDS-PAGE gefärbt mit Simply Blue SafeStain (Invitrogen), aufgetragen sind Rohextrakt *E. coli* BL21(DE3)/pAW-5, Fraktionen nach Hydrophober Interaktions-Chromatographie, die MAE bzw. ADH enthalten, sowie eine MAE-haltige Probe nach Anionenaustausch-Chromatographie.

Die SDS-PAGE zeigt, dass die ADH im Stamm *E. coli* BL21(DE3)/pAW-5 nur sehr schwach exprimiert wird, was auch an der geringen spezifischen Aktivität des Enzyms zu erkennen ist. MAE war nach dem zweiten Aufreinigungsschritt weitgehend sauber. Aus diesem Grund konnte dieses Enzympräparat für die biochemische Charakterisierung des Enzyms verwendet werden.

3.2.5 Biochemische Charakterisierung des rekombinanten MAE

Zur biochemischen Charakterisierung von MAE aus *E. coli* wurde das Enzym von Iwakura et al. gereinigt^[89]. Das gereinigte Enzym hatte eine spezifische Aktivität von 94,5 U/mg. Das pH-Optimum des Enzyms lag bei 7,8 und der K_M -Wert für L-Malat bei pH 7,4 betrug 2,3 mM. Laut Sanwal und Smando liegt das pH-Optimum von MAE in 100 mM Tris-HCl-Puffer bei 8,2 bis 8,4 und die spezifische Aktivität des gereinigten Enzyms bei 30 U/mg^[90]. Der K_M -Wert für NADP liegt nach Sanwal bei 0,0075 mM^[91].

3.2.5.1 Bestimmung des Temperaturoptimums von MAE

Um das Temperaturoptimum des rekombinanten MAE zu ermitteln, wurde die Aktivität des Enzyms im Bereich von 5 bis 56 °C photometrisch gemessen.

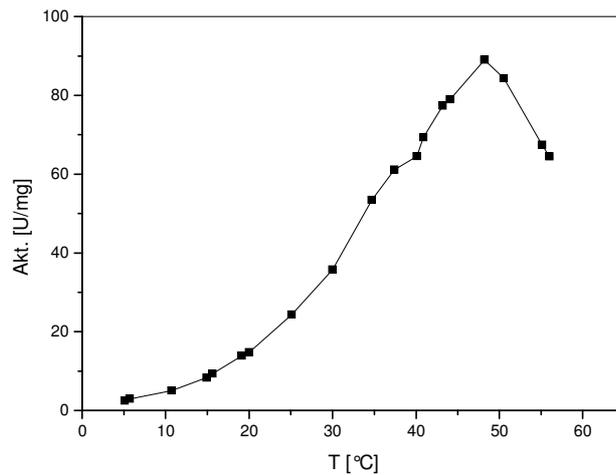


Abb. 64: Bestimmung des Temperaturoptimums von MAE. Die Aktivität wurde im Bereich von 5 bis 56 °C gemessen.

Abb. 64 ist zu entnehmen, dass das Temperaturoptimum des Enzyms bei 48 °C liegt.

3.2.5.2 Bestimmung des pH-Optimums von MAE

Die Ermittlung des pH-Optimums von MAE konnte ausschließlich in Tris-HCl-Puffer geschehen, da sich zeigte, dass das Enzym in anderen Puffern ausgesprochen instabil ist. Aus diesem Grund wurde die MAE-Aktivität lediglich in 100 mM Tris-HCl-Puffer im Bereich pH 7,2 bis 8,8 gemessen (Abb. 65).

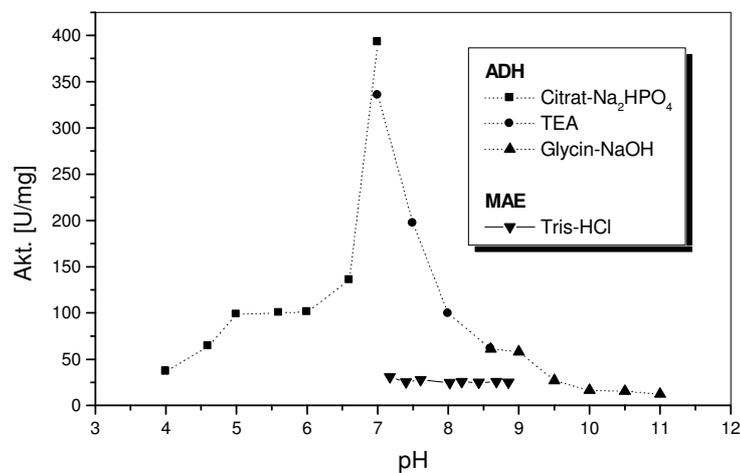


Abb. 65: Ermittlung des pH-Optimums von MAE in 100 mM Tris-HCl-Puffer im pH-Bereich 7,2 bis 8,8. Zum Vergleich wurde das pH-Optimum der ADH (gestrichelte Kurve) aufgetragen.

Im gewählten pH-Bereich ändert sich die MAE-Aktivität nur um ca. 11 % und lässt daher keine eindeutige Aussage über ein definiertes pH-Optimum des Enzyms zu. Arbeiten in Gegenwart von MAE und ADH können demnach beim pH-Optimum der ADH, also bei pH 7,0, durchgeführt werden.

3.2.5.3 Bestimmung der kinetischen Konstanten

Die Aufnahme von Michaelis-Menten-Kinetiken für die wichtigsten Substrate diente der Ermittlung der kinetischen Konstanten von MAE. Die Durchführung der Experimente erfolgte mit Standardpuffer (100 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,45), 1 mM MnCl_2 und 50 mM KCl bei 30 °C.

Um den K_M -Wert für NADP zu bestimmen, wurde die MAE-Aktivität mit 0 bis 1 mM NADP ermittelt (Abb. 66).

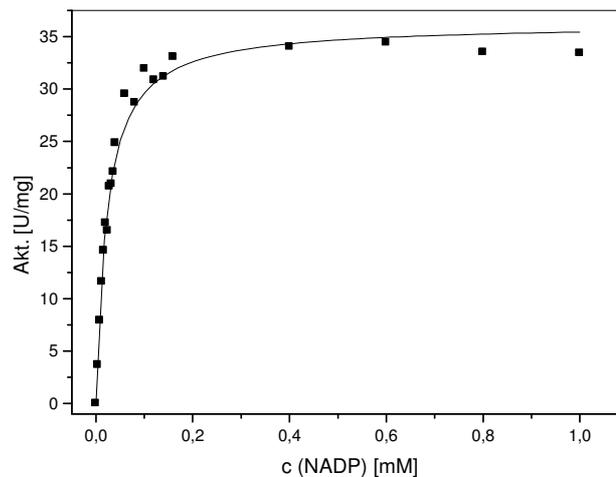


Abb. 66: Bestimmung des K_M -Wertes für NADP. Die MAE-Aktivität wurde mit 0 bis 1 mM NADP gemessen.

Der K_M -Wert für NADP beträgt nach Abb. 66 0,02 mM, als V_{\max} -Wert ergibt sich 36,2 U/mg.

Des Weiteren wurden für L-Malat sowie DL-Malat die K_M -Werte gemessen, Tab. 24 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tab. 24: Kinetische Konstanten von MAE für NADP, L-Malat und DL-Malat.

Substrat	V_{\max} [U/mg]	K_M [mM]
NADP	36,2	0,02
L-Malat	59,5	14,25
DL-Malat	12,0	17,55

Bis zu einer Konzentration von 50 mM L-Malat war keine Substratüberschuss-Inhibierung festzustellen. Der Vergleich von L- und DL-Malat zeigt allerdings einen deutlich niedrigeren V_{\max} -Wert bei Einsatz des Racemats. Dies spricht dafür, dass das D-Enantiomer ein nicht-kompetitiver Inhibitor des Enzyms ist. Untersuchungen zur Bestimmung eines K_M -Wertes für NAD zeigten, dass die Aktivität von MAE mit NAD vernachlässigbar ist.

3.2.5.4 Vergleich der ermittelten biochemischen Daten mit Literaturangaben

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die ermittelten biochemischen Eigenschaften des rekombinanten MAE im Vergleich zu den Literaturdaten für das native Enzym (Tab. 25).

Tab. 25: Vergleich der ermittelten biochemischen Eigenschaften des rekombinanten MAE mit Literaturangaben für das native Enzym.

	Iwakura et al. [89]	Sanwal et al. [90, 91]	Eigene Ergebnisse
pH-Optimum	7,8	8,2–8,4	-
Temperatur-Optimum	-	-	48 °C
K_M -Wert L-Malat	2,3 mM	-	14,25 mM
K_M -Wert NADP	-	0,0075 mM	0,02 mM
Spez. Aktivität	94,5 U/mg	30 U/mg	45,28 U/mg

Wie die Tabelle zeigt, ist die ermittelte spezifische Aktivität des rekombinanten MAE niedriger als die Literaturangaben für das native Enzym. Gründe dafür sind, dass das Enzym im Lauf der vorliegenden Arbeit nicht homogen aufgereinigt wurde und dass zwei Enzyme coexprimiert wurden. Durch die Coexpression von MAE mit ADH werden beide Enzyme im Vergleich zur Expression eines einzigen Proteins mit geringeren Raten exprimiert. Die ermittelten K_M -Werte weichen von den Literatur-bekanntem Werten ab, was an unterschiedlichen Puffern liegen könnte.

3.2.6 Untersuchung von Kreuzreaktionen

Um störende Kreuzreaktionen auszuschließen, wurde der Einfluss von L-Malat und Pyruvat auf die ADH sowie von Acetophenon und Phenylethanol auf MAE untersucht.

3.2.6.1 Untersuchung des Einflusses von L-Malat und Pyruvat auf die ADH

Der mögliche Einfluss von L-Malat auf die ADH-Aktivität wurde untersucht, indem dem ADH-Standardassay 50 mM bzw. 100 mM L-Malat zugesetzt wurden. Als Kontrolle wurde der ADH-Standardassay ohne Zusätze durchgeführt (Tab. 26).

Tab. 26: Einfluss von 50 bzw. 100 mM L-Malat auf die ADH-Aktivität.

Assay	Akt. [U/mg]
Standard	119,09
+ 50 mM L-Malat	121,65
+ 100 mM L-Malat	93,69

Wie die Tabelle zeigt, hat der Zusatz von 50 mM L-Malat keine Auswirkungen auf die Aktivität der ADH. Die Anwesenheit von 100 mM L-Malat bewirkte jedoch eine Erniedrigung der Aktivität um ca. 21 %. Da bei den Umsetzungen aber nur 30 mM L-Malat eingesetzt wurden, sollte keine Beeinflussung der ADH-Aktivität auftreten.

Aufgrund der hohen Absorption von Pyruvat bei 340 nm konnte die potentielle Inhibierung von Pyruvat auf die ADH nicht photometrisch gemessen werden. Die Durchführung dieses Experiments geschah in 100 mM TEA-Puffer pH 7,0 mit 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 5 mM KCl, 30 mM L-Malat, 10 mM Acetophenon, 1 mM NADP, 0,1 U ADH, 0,2 U MAE sowie 100 mM Pyruvat in einem Gesamtvolumen von 1 ml bei 37°C unter Schütteln. Nach bestimmten Zeiten wurden dem Ansatz Proben entnommen, mittels Ethylacetat extrahiert und die organische Phase im Gaschromatographen analysiert (Abb. 67).

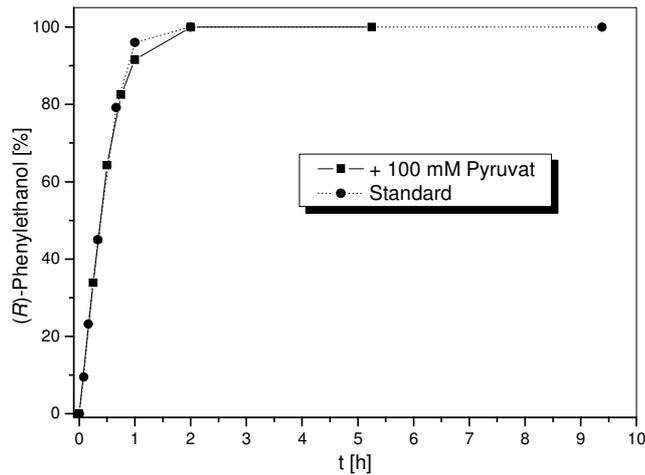


Abb. 67: Umsetzung von Acetophenon zu (*R*)-Phenylethanol unter Zusatz von 100 mM Pyruvat im Reaktionsansatz zur Überprüfung von möglichen störenden Einflüssen. Zum Vergleich wurde die gebildete (*R*)-Phenylethanol-Menge im Standardansatz ohne Zusatz von Pyruvat aufgetragen (gestrichelte Kurve).

Abb. 67 zeigt, dass nach 2 h Reaktionszeit das gesamte eingesetzte Acetophenon reduziert wurde. Beim entsprechenden Versuch ohne Zusatz von Pyruvat (gestrichelte Kurve) war die vollständige Umsetzung von Acetophenon ebenfalls nach 2 h erreicht. Bei kürzerer Reaktionszeit von 1 h sind ohne Pyruvat 96 % an (*R*)-Phenylethanol entstanden, während in Anwesenheit von Pyruvat ein leicht verminderter Umsatz von 92 % festzustellen war. Dies zeigt, dass die Umsetzung von Acetophenon bei Anwesenheit von Pyruvat kaum beeinflusst wird.

3.2.6.2 Untersuchung des Einflusses von Acetophenon und Phenylethanol auf MAE

Um den Einfluss von Acetophenon bzw. Phenylethanol auf die Aktivität von MAE zu untersuchen, wurden Standardassays mit Zusätzen von 15 mM Acetophenon bzw. 15 mM (*R,S*)-Phenylethanol durchgeführt. Als Kontrolle diente der Standardassay (Tab. 27).

Tab. 27: Einfluss von Acetophenon und Phenylethanol auf die MAE-Aktivität.

Assay	Akt. [U/mg]
Standard	14,81
+ 15 mM Acetophenon	16,31
+ 15 mM (<i>R,S</i>)-Phenylethanol	13,79

Tab. 27 sagt aus, dass beide Substanzen keinen gravierenden Einfluss auf die MAE-Aktivität haben. Der Zusatz von Acetophenon bewirkt sogar eine leichte Aktivitätssteigerung um ca. 10 %, während zugesetztes Phenylethanol die Aktivität um ca. 6,9 % erniedrigt. Diese leichte Aktivitätserniedrigung dürfte allerdings keine negativen Folgen bei Umsetzungen mit Beteiligung beider Enzyme haben.

3.2.7 Umsetzungen im zellfreien System

3.2.7.1 Ermittlung des optimalen Enzymverhältnisses

Um das optimale Enzymverhältnis ADH : MAE herauszufinden, erfolgten Umsetzungen von Acetophenon im zellfreien System mit den partiell gereinigten Enzymen ADH und MAE in den Verhältnissen 1 : 1, 1 : 2, 2 : 1 und 1 : 11. Das Verhältnis 1 : 11 wurde gewählt, da die MAE-Aktivität in den Zellen etwa 11mal so hoch ist wie die Aktivität der ADH. Die Durchführung der Umsetzungen geschah in 100 mM TEA-Puffer pH 7,0 mit 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 5 mM KCl, 30 mM L-Malat, 10 mM Acetophenon sowie 1 mM NADP bei 37°C unter Schütteln. Pro ml Reaktionsansatz wurden bei einem Enzymverhältnis von 1 : 1 0,1 U an entsprechendem Enzym zugesetzt. Nach bestimmten Zeitabständen wurden Proben entnommen und die Bildung von (*R*)-Phenylethanol mittels GC ermittelt (Abb. 68).

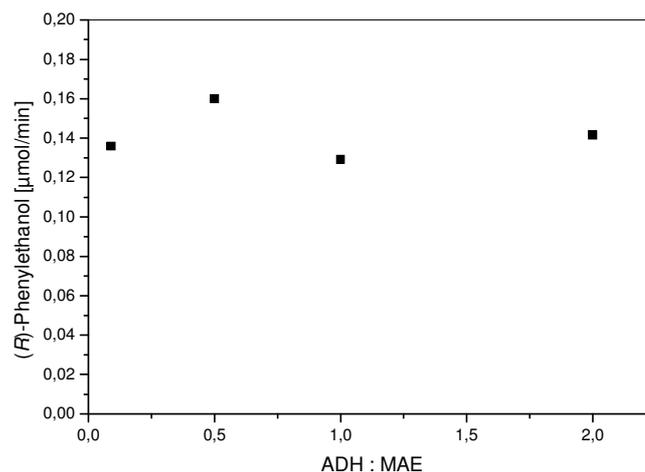


Abb. 68: Bildung von (*R*)-Phenylethanol mit ADH und MAE in unterschiedlichen Enzymverhältnissen. Bei einem Enzymverhältnis von 1 : 1 wurden 0,1 U an ADH bzw. MAE zugesetzt.

Die Abbildung zeigt, dass die Aktivitäten bei den verschiedenen Ansätzen trotz unterschiedlicher Enzymverhältnisse in der gleichen Größenordnung lagen. Die Reaktion lief am schnellsten ab, wenn doppelt so viel MAE wie ADH im Ansatz enthalten war.

3.2.7.2 Umsetzungen verschiedener Ketone

Das ermittelte optimale Enzymverhältnis ADH : MAE von 1 : 2 wurde ausgenutzt, um Umsetzungen der drei Substrate Acetophenon (10 mM), 2,5-Hexandion (15 mM) und 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester (25 mM) durchzuführen. Da die Reduktion von Acetophenon sehr viel schneller erfolgte als die Reduktion von 2,5-Hexandion bzw. 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester, wurden den Ansätzen unterschiedliche Mengen an Enzymen zugesetzt. Die Ansätze für die Umsetzungen von 2,5-Hexandion und 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester enthielten 5 U ADH und 10 U MAE, während den Ansätzen zur Reduktion von Acetophenon nur 0,1 U ADH sowie 0,2 U MAE zugesetzt wurde. Alle Ansätze enthielten 30 mM L-Malat. Die Durchführung der Biotransformationen erfolgte in 50 mM TEA-Puffer pH 7,0 bei 37 °C unter leichtem Schütteln. Nach bestimmten Zeiten wurden Proben genommen und die Bildung der Alkohole gaschromatographisch untersucht (Abb. 69).

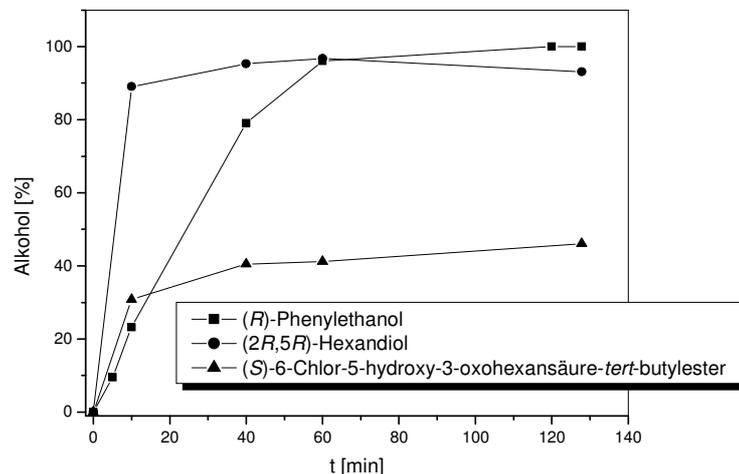


Abb. 69: Umsetzungen von 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion und 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit ADH und MAE im Verhältnis 1 : 2. 2,5-Hexandion und 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester wurden mit 5 U ADH und 10 U MAE umgesetzt, Acetophenon mit 0,1 U ADH sowie 0,2 U MAE.

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, werden 10 mM Acetophenon und 15 mM 2,5-Hexandion sehr gut umgesetzt, wobei der Acetophenon-Ansatz deutlich weniger Enzym (0,1 U

ADH sowie 0,2 U MAE) enthielt als der 2,5-Hexandion-Ansatz mit 5 U ADH und 10 U MAE. Die Umsetzung von 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester enthielt zwar genauso viel Enzym wie der 2,5-Hexandion-Ansatz, allerdings waren hier 25 mM an Substrat enthalten. Nach 2 h Reaktionszeit waren erst ca. 40 % an (*S*)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester gebildet. Alle Alkohole wurden enantiomerenrein gebildet.

3.2.8 Ganzzellumsetzungen mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-5

Mit ganzen *E. coli* BL21(DE3)/pAW-5-Zellen wurden Umsetzungen von 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion sowie 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester durchgeführt. Diese Umsetzungen erfolgten mit verschiedenen Zusammensetzungen der Ansätze. Alle Ansätze enthielten 100 mM TEA-Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂, 30 mM L-Malat sowie 5 mg Zellen pro ml Reaktionsansatz. Ein Teil der Zellen wurde zum Permeabilisieren der Zellmembran mit 10 µl/ml Toluol vorbehandelt. Des Weiteren erfolgte die Hälfte der Umsetzungen nach Zugabe von 1 mM NADP. Die Inkubation aller Ansätze erfolgte bei 37°C unter leichtem Schütteln. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben entnommen, welche gaschromatographisch auf die Reduktion der Ketone untersucht wurden (Abb. 70).

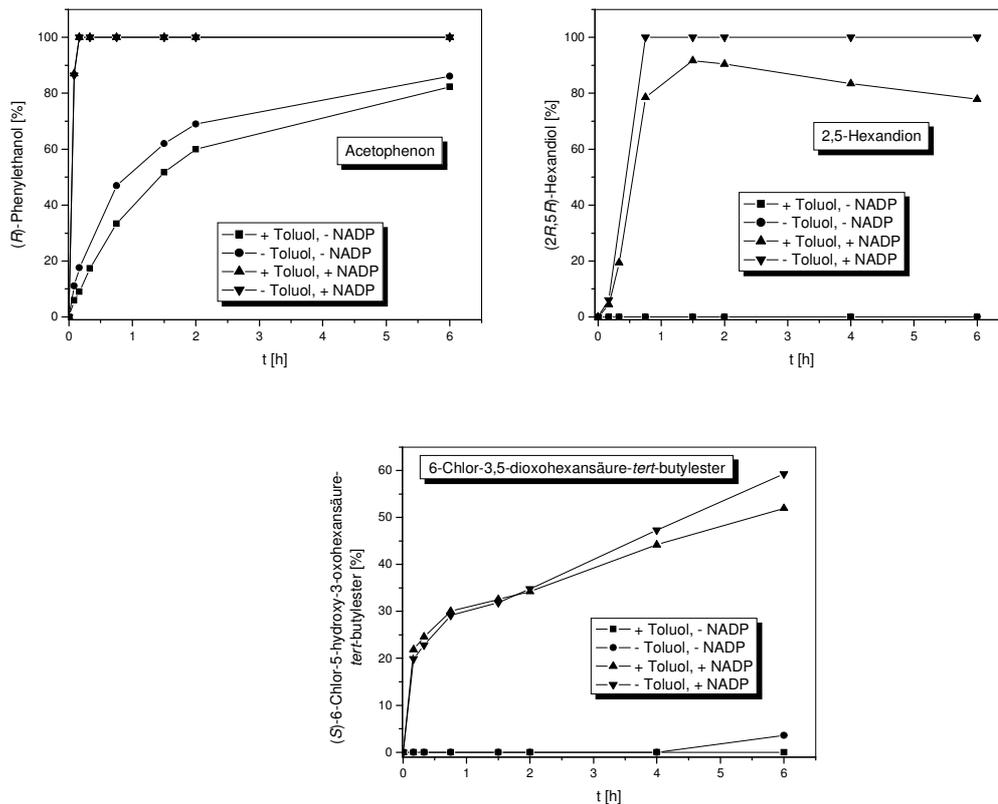


Abb. 70: Reduktion von 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion sowie 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-5-Zellen (5 mg/ml Ansatz). Die Zellen wurden teilweise zur Permeabilisierung der Zellmembran mit Toluol vorbehandelt. Einem Teil der Ansätze wurde NADP zugesetzt.

Es ist auffällig, dass die Permeabilisierung der Zellmembran mit Toluol keinen wesentlichen Einfluss auf die Reaktion hat. Reaktionsansätze, die sich lediglich durch den Zusatz von Toluol unterscheiden, zeigten einen nur minimalen Unterschied im Reaktionsverhalten. Des Weiteren zeigt die Abbildung, dass Ansätze mit zugesetztem NADP deutlich bessere Umsätze lieferten. Während Acetophenon und 2,5-Hexandion vollständig reduziert wurden, war 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester nach 6 h Reaktionsdauer erst zu ca. 60 % umgesetzt. Alle Umsetzungen verliefen stereoselektiv.

3.2.9 Zusammenfassung des Systems pAW-5

Beim System pAW-5 kann der geringe Preis des MAE-Substrats Malat ausgenutzt werden. Des Weiteren läuft die MAE-Reaktion aufgrund der Decarboxylierung von Malat nahezu irreversibel ab, wodurch das Gleichgewicht der Reaktion günstig beeinträchtigt wird. Das Verhältnis an ADH und MAE spielte bei der Reduktion von Acetophenon keine wesentliche Rolle. 10 mM Acetophenon und 15 mM 2,5-Hexandion wurden von *E. coli* BL21 (DE3)/pAW-5-Zellen vollständig reduziert. Ohne Zusatz von NADP konnte nur Acetophenon effizient umgesetzt werden.

3.3 Cofaktorregenerierung durch Isocitrat-Dehydrogenase (IDH): System ADH-IDH (pAW-6)

Ein weiterer Ganzzellbiokatalysator sollte mit der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) aus *B. subtilis* als Cofaktor-regenerierendem Enzym geschaffen werden. Dieses Enzym ist NADP-spezifisch und katalysiert die oxidative Decarboxylierung von D-Isocitrat zu α -Ketoglutarat (Abb. 71).

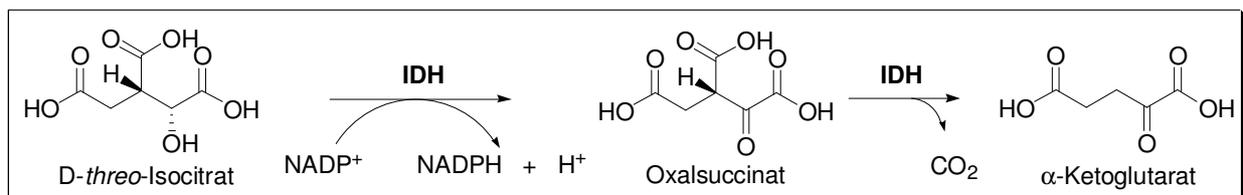


Abb. 71: Oxidative Decarboxylierung von D-Isocitrat katalysiert durch die NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase (IDH).

Die Reaktion ist aufgrund der Decarboxylierung nahezu irreversibel. Dieser Umstand führt dazu, dass das Gleichgewicht in die günstige Reaktionsrichtung gezogen wird. Ein weiterer Vorteil ist, dass das Gen verfügbar ist. Bisher wurde die IDH noch nicht als Cofaktor-regenerierendes Enzym eingesetzt. Abb. 72 zeigt das gekoppelte System aus ADH und IDH.

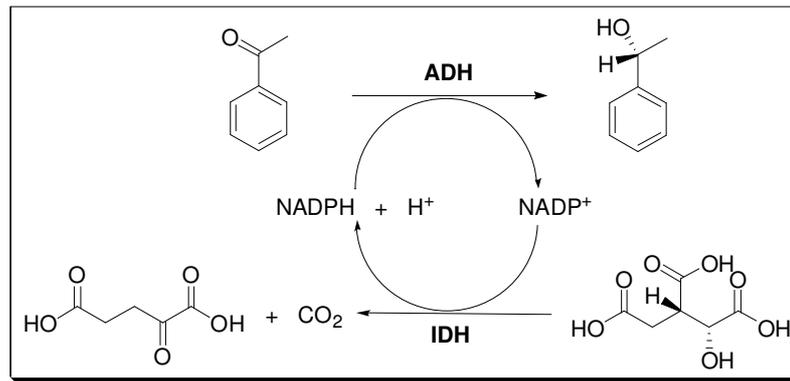


Abb. 72: Kopplung von ADH und IDH zur Schaffung eines Cofaktorregenerierungssystems.

3.3.1 Isolierung des *idh*-Gens

Zur Herstellung eines alternativen Konstrukts für die Anwendung als Ganzzellkatalysator sollten die ADH aus *L. kefir* sowie die NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) aus *B. subtilis* coexprimiert werden. Hierzu wurde die genomische DNA aus *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 verwendet. Die Sequenz des *idh*-Gens ist bekannt^[84]. An den Enden des *idh*-Gens sollten die Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Xho*I eingefügt werden. Hierfür wurden genspezifische Primer konstruiert und in einer PCR mit der genomischen DNA aus *B. subtilis* als Template eingesetzt. Die anschließende Sequenzierung des PCR-Produkts bestätigte die 1272 bp-lange *idh*-Gensequenz.

3.3.2 Coklonierung und Coexpression von ADH und IDH

Um einen effizienten Ganzzellbiokatalysator zu erhalten, sollten *adh* und *idh* cokloniert und coexprimiert werden. Als Expressionsvektor wurde wiederum pETDuet-1 (Novagen) gewählt. Für die Konstruktion dieses Systems wurden das Plasmid pDLKADH sowie das *idh*-PCR-Produkt, welches die Schnittstellen *Nde*I und *Xho*I an seinen Enden trug, mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Xho*I verdaut. Anschließend wurden die gereinigten DNA-Fragmente ligiert und in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert. Von den nach Selektion auf LB_{amp}-Platten resultierenden Klonen wurden 10 ausgewählt und damit angeimpfte Übernachtskulturen in jeweils 5 ml LB_{amp}-Medium inkubiert. Aus den Kulturen wurde die Plasmid-DNA isoliert und im Anschluss Restriktionsanalysen durchgeführt. Eines der Plasmide (pAW-6; Abb. 73) zeigte die richtige Größe im Agarosegel. Dessen Sequenzierung ergab die korrekte Sequenz des *idh*-Gens.

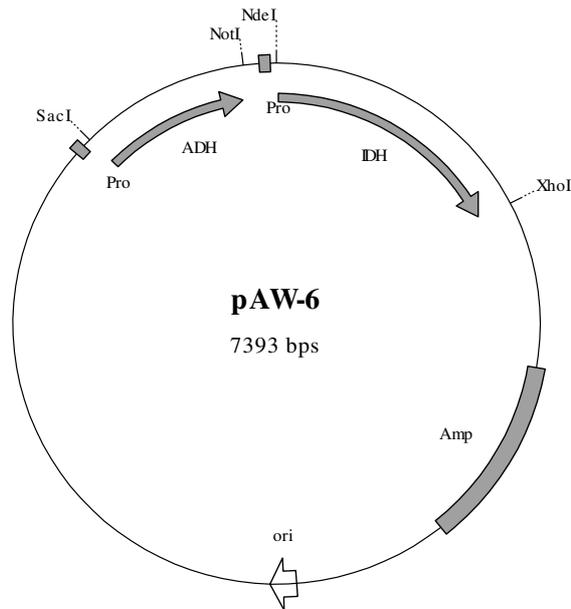


Abb. 73: Vektorkarte von pAW-6. Dieses Konstrukt basiert auf dem Expressionsvektor pETDuet-1 (Novagen) und trägt das *adh*- sowie das *idh*-Gen.

3.3.3 Expressionsoptimierung von *E. coli* BL21(DE3)/pAW-6

Für die Expression von *E. coli* BL21(DE3)/pAW-6 wurden zunächst Versuche zur Expressionsoptimierung durchgeführt. Hierzu wurde jeweils eine Einzelkolonie *E. coli* BL21 (DE3)/pAW-6 in 5 ml LB_{amp} angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die 30 ml-Hauptkulturen 1 %ig angeimpft und bis zu einer OD₆₆₀ von ca. 0,5 bei 37°C und 120 rpm inkubiert. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 100, 150, 500 sowie 1000 µM IPTG. Die weitere Inkubation der Kulturen erfolgte bei 30 bzw. 37°C und 120 rpm für 3, 5 und 19 h. Nach Ernte und Glasperlen-Aufschluss der Zellen erfolgten ADH- und IDH-Aktivitätstests (Abb. 74).

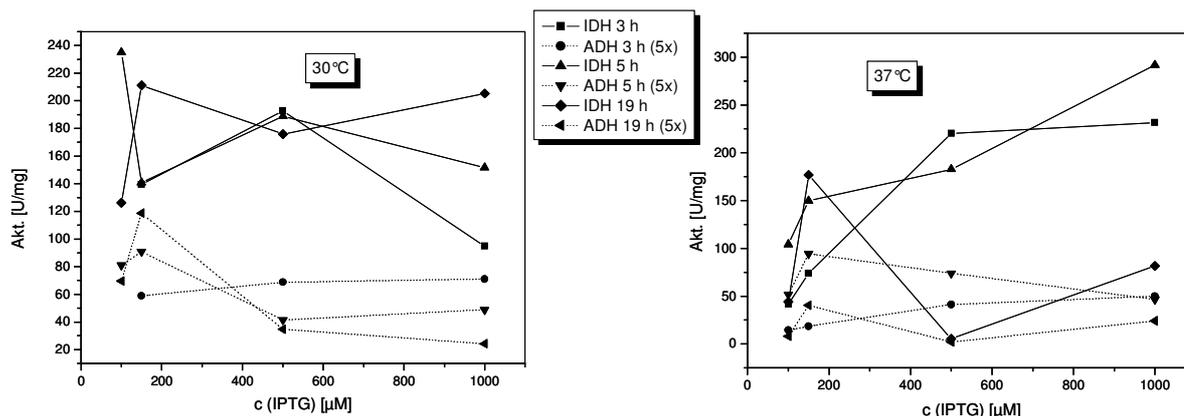


Abb. 74: Expressionsoptimierung des Systems pAW-6 bei 30°C (links) und 37°C (rechts). Für eine übersichtlichere Darstellung wurde die fünffache ADH-Aktivität aufgetragen.

Abb. 74 zeigt, dass die IDH-Aktivität um ein Vielfaches höher ist als die Aktivität der ADH. Aus diesem Grund wurde bei der Optimierung der Expression vor allem die ADH-Aktivität berücksichtigt. Diese zeigte nach Induktion bei 30°C höhere Werte als nach Induktion bei 37°C. Die höchste ADH-Aktivität wurde erreicht nach Induktion mit 150 µM IPTG und 19-stündiger Induktionszeit bei 30°C. Unter diesen Bedingungen betrug die IDH-Aktivität noch 72 % ihres Maximalwertes. Für die Anzucht größerer Mengen an Zellen wurden aus diesem Grund die genannten Bedingungen gewählt.

3.3.4 Klonierung und Expression der IDH

Die Trennung von ADH und IDH über chromatographische Methoden war nicht möglich. Um die IDH biochemisch charakterisieren zu können, war es deshalb nötig, das *idh*-Gen einzeln zu klonieren.

Für die Klonierung des *idh*-Gens wurden *idh*-PCR-Produkt sowie der Expressionsvektor pETDuet-1 (Novagen) mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Xho*I geschnitten. Nach Ligation der beiden DNA-Fragmente erfolgte die Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen. Von zehn der Klone wurden die Plasmide isoliert und auf korrekte Ligation hin überprüft. Sechs der Klone zeigten nach elektrophoretischer Auftrennung die richtige Größe. Die Sequenzierung eines dieser Klone (pDIDH) bestätigte die korrekte *idh*-Gensequenz.

Für die Expression der IDH wurde pDIDH in kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert. Zur Anzucht von Zellen wurden 100 ml LB_{amp} mit einer Gefrierkultur *E. coli* BL21

(DE3)/pDIDH angeimpft und über Nacht bei 37°C und 120 rpm geschüttelt. Die Hauptkultur bestehend aus 5 l LB_{amp} wurde 1 %ig mit der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 120 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₆₀ von ca. 0,5 wurde mit 1 mM IPTG induziert und anschließend für 5 h wiederum bei 37°C und 120 rpm geschüttelt. Diese Expressionsbedingungen gehen aus der Expressionsoptimierung für das System *E. coli* BL21(DE3)/pAW-6 hervor. Es wurden die Bedingungen gewählt, unter denen die IDH ihre höchste Aktivität erreicht.

3.3.5 Biochemische Charakterisierung der IDH

Die IDH aus *B. subtilis* wurde von Ramaley et al. aufgereinigt und biochemisch charakterisiert^[92]. Das native Enzym hatte ein pH-Optimum von 7,5 und K_M-Werte von 9,1 und 27,4 µM für Isocitrat bzw. NADP, gemessen bei 25°C. Das rekombinante Enzym wurde von Singh et al. partiell charakterisiert^[93]. Die K_M-Werte für D-Isocitrat und NADP betragen 5,9 bzw. 14,5 µM.

3.3.5.1 Aufreinigung der rekombinanten IDH

Um die biochemischen Eigenschaften der rekombinanten IDH zu untersuchen, wurde das Enzym aufgereinigt. Hierzu wurden *E. coli* BL21(DE3)/pDIDH-Zellen per Ultraschall aufgeschlossen und der erhaltene Rohextrakt auf eine Q-Sepharose FF-Säule (Pharmacia) aufgetragen. Das Säulenmaterial wurde vorher mit 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 + 5 mM MgCl₂ gespült. Die Elution der Proteine erfolgte mittels eines linearen Gradienten von 0 bis 1 M NaCl. Die aktivsten Fraktionen nach dieser Anionenaustausch-Chromatographie wurden mittels Hydrophober Interaktionschromatographie (Phenyl-650C, Tosoh) weiter aufgereinigt. Hier erfolgte die Elution der Proteine nach Äquilibrieren der Säule mit 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5 + 5 mM MgCl₂ + 1,5 M (NH₄)₂SO₄ mittels eines linearen Gradienten im gleichen Puffer von 1,5 bis 0 M (NH₄)₂SO₄. Das Reinigungsprotokoll ist in Tab. 28 wiedergegeben.

Tab. 28: Aufreinigung der IDH aus *E. coli* BL21(DE3)/pDIDH.

Reinigungsschritt	Akt. [U/ml]	Protein [mg/ml]	Akt. [U/mg]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	3630,23	23,45	154,81	1,0
Q-Sepharose FF	1350,20	2,37	569,70	3,7
Phenyl-650C	1614,80	1,06	1523,40	9,8

Der Erfolg der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE dokumentiert (Abb. 75).

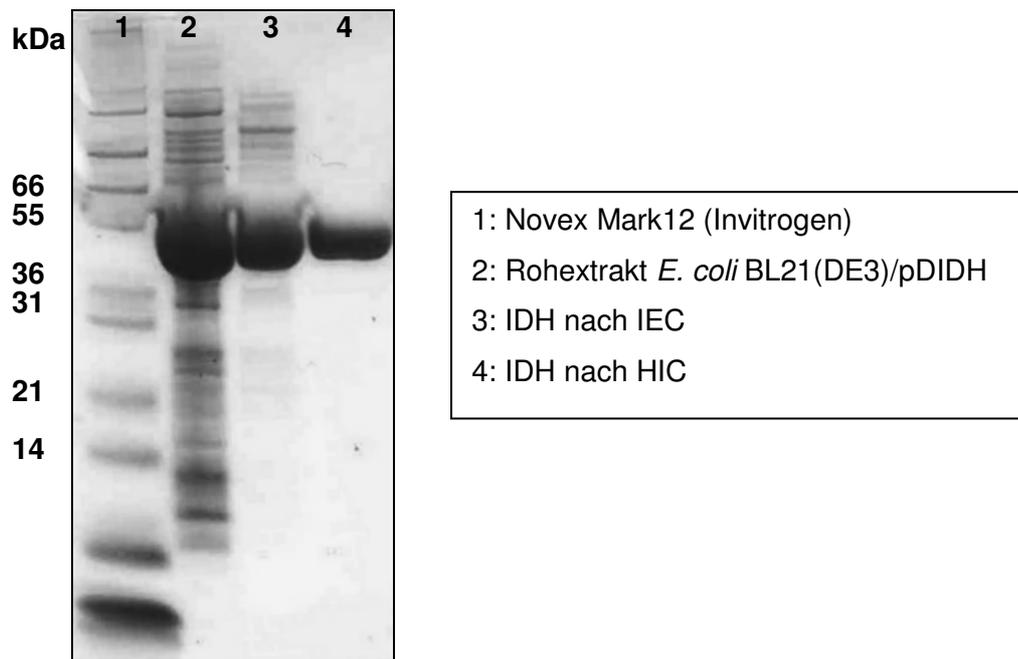


Abb. 75: SDS-Gel, gefärbt mit Simply Blue SafeStain (Invitrogen). Aufgetragen wurden IDH-Proben nach den einzelnen Reinigungsschritten.

Nach dem zweiten Aufreinigungsschritt, der Hydrophoben Interaktionschromatographie, liegt das Enzym in homogener Form vor. Die weiteren Experimente wurden mit Enzympräparat durchgeführt, das auf diese Weise gereinigt worden ist.

3.3.5.2 Ermittlung des Temperaturoptimums der rekombinanten IDH

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums der IDH wurden photometrische Standard-Aktivitätstests im Bereich von 5 bis 62°C durchgeführt. Die IDH-Aktivitäten sind in Abb. 76 graphisch aufgetragen.

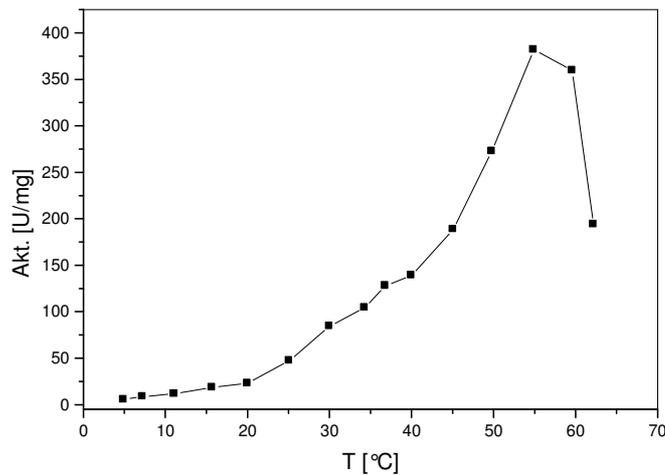


Abb. 76: Bestimmung des Temperaturoptimums der rekombinanten IDH. Die IDH-Aktivität wurde im Bereich von 5 bis 62°C gemessen.

Abb. 76 ist zu entnehmen, dass das Temperaturoptimum der IDH unter den gewählten Bedingungen bei 55°C liegt.

3.3.5.3 Bestimmung des pH-Optimums der IDH

Die Ermittlung des pH-Optimums der rekombinanten IDH erfolgte mit den in Tab. 29 aufgeführten Puffern.

Tab. 29: Verwendete Puffer zur Bestimmung des pH-Optimums der IDH.

pH-Bereich	Puffersubstanz [250 mM]
4,0–6,9	Citrat- Na_2HPO_4
7,0–9,5	Tris-HCl

Die Aktivität der IDH wurde in Schritten von ca. 0,5 pH-Einheiten mit den entsprechenden Puffern gemessen (Abb. 77).

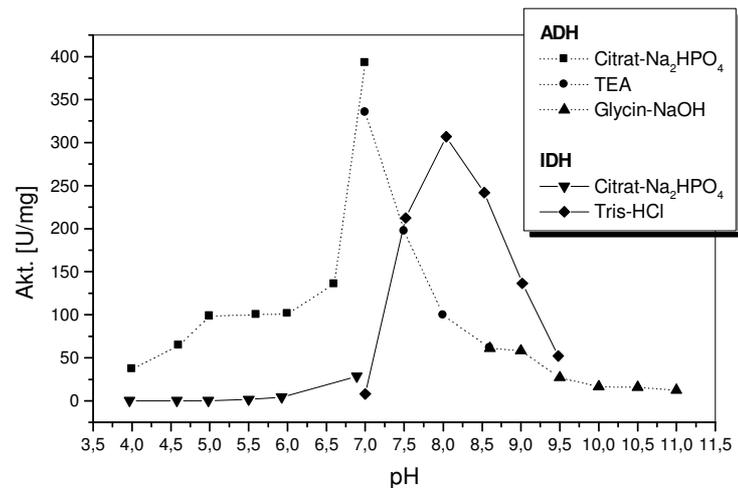


Abb. 77: Bestimmung des pH-Optimums der rekombinanten IDH. Zur Abdeckung eines breiten pH-Spektrums wurden Citrat-Na₂HPO₄-Puffer sowie Tris-HCl-Puffer verwendet. Zum Vergleich wurde das pH-Optimum der rekombinanten ADH aufgetragen (gestrichelte Kurve).

Demnach liegt das pH-Optimum der rekombinanten IDH unter den gewählten Bedingungen bei pH 8,0. Für Umsetzungen in Anwesenheit von IDH und ADH sollte ein pH-Wert im Bereich von 7,5 gewählt werden.

3.3.5.4 Ermittlung der kinetischen Konstanten der rekombinanten IDH

Die kinetischen Eigenschaften der rekombinanten IDH gegenüber D-Isocitrat, DL-Isocitrat sowie NADP sollten untersucht werden. Die Durchführung dieser Experimente geschah in 25 mM MOPS-Puffer pH 7,5 + 5 mM MgCl₂. Beim Auftragen der Reaktionsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentrationen der verschiedenen Ansätze fiel auf, dass die sich ergebenden Kurven nicht hyperbolisch, sondern sigmoid verliefen, wie Abb. 78 für das Substrat DL-Isocitrat zeigt.

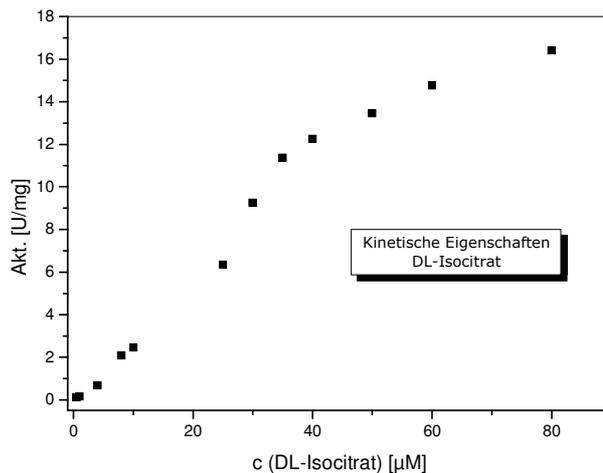


Abb. 78: Ermittlung der kinetischen Eigenschaften der IDH für DL-Isocitrat in 25 mM MOPS-Puffer pH 7,5.

Die kinetischen Eigenschaften der IDH können aus diesem Grund nicht mit dem Michaelis-Menten-Modell erklärt werden. Enzyme, welche sigmoide Kurven beim Auftragen der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration verursachen, gehören zu den allosterischen Enzymen. Bei diesen Enzymen kann die Bindung des Substrats an ein aktives Zentrum die Eigenschaften der anderen aktiven Zentren im gleichen Molekül beeinflussen. Aufgrund dieser Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Untereinheiten erfolgt die Substratbindung kooperativ, so dass die Kurve im oben genannten Diagramm sigmoid verläuft.

3.3.5.5 Vergleich der ermittelten biochemischen Eigenschaften mit Literaturangaben

In Tab. 30 sind die ermittelten biochemischen Eigenschaften der rekombinanten IDH Literaturwerten gegenüber gestellt.

Tab. 30: Vergleich der ermittelten biochemischen Eigenschaften der IDH mit Literaturdaten.

	Ramaley et al. ^[92]	Singh et al. ^[93]	Eigene Ergebnisse
pH-Optimum	7,5	-	8,0
Temperatur-Optimum	-	-	55 °C
K _M -Wert Isocitrat	9,1 µM	5,9 µM	-
K _M -Wert NADP	27,4 µM	14,5 µM	-
Spez. Aktivität	-	-	1523 U/mg

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, wurde die IDH aus *B. subtilis* bisher nicht vollständig biochemisch charakterisiert. Ursache für die abweichenden Werte beim pH-Optimum könnten unterschiedliche Bedingungen sein. Trotz Variation der Reaktionsbedingungen konnten in der vorliegenden Arbeit keine K_M-Werte bestimmt werden, da das Auftragen der Daten einen sigmoiden Kurvenverlauf zur Folge hatte und dadurch nicht durch das Michaelis-Menten-Modell erklärt werden konnte.

3.3.6 Untersuchungen auf Kreuzreaktionen

Um den möglichen Einfluss von Komponenten der ADH-Reaktion auf die Aktivität der IDH sowie von Substanzen der IDH-Reaktion auf die ADH-Aktivität zu untersuchen, wurden ADH-Standardassays mit Zusatz von DL-Isocitrat sowie α -Ketoglutarat bzw. IDH-Standardassays nach Zugabe von Acetophenon sowie (*R,S*)-Phenylethanol durchgeführt.

Die mögliche Beeinflussung der ADH-Reaktion wurde untersucht, indem dem Standardassay 0,5 sowie 2 mM DL-Isocitrat bzw. 0,5 sowie 2 mM α -Ketoglutarat zugesetzt wurden. Als Kontrolle wurde der Standard-Aktivitätstest durchgeführt. Die photometrisch gemessenen ADH-Aktivitäten sind in Tab. 31 aufgelistet.

Tab. 31: Untersuchung des Einflusses von DL-Isocitrat und α -Ketoglutarat auf die Aktivität der ADH.

Assay	Akt. [U/mg]
Standard	2,52
+ 0,5 mM DL-Isocitrat	3,29
+ 2,0 mM DL-Isocitrat	3,44
+ 0,5 mM α -Ketoglutarat	2,80
+ 2,0 mM α -Ketoglutarat	3,63

Tab. 31 zeigt, dass der Zusatz von DL-Isocitrat bzw. α -Ketoglutarat keinen inhibierenden Einfluss auf die ADH-Aktivität hat. Die ADH-Aktivität wurde nach Zugabe von 2 mM DL-Isocitrat bzw. α -Ketoglutarat sogar um ca. 40 % erhöht.

Dem IDH-Standardassay wurden 50 bzw. 100 mM (*R,S*)-Phenylethanol sowie 50 bzw. 100 mM Acetophenon zugesetzt, um die Auswirkung dieser Verbindungen auf den Test zu untersuchen. Die entsprechenden IDH-Aktivitäten sind in Tab. 32 aufgeführt.

Tab. 32: Aktivitäten der IDH in Gegenwart von 50 bzw. 100 mM (*R,S*)-Phenylethanol sowie Acetophenon. Als Kontrolle wurde der Standardassay durchgeführt.

Assay	Akt. [U/mg]
Standard	103,30
+ 50 mM (<i>R,S</i>)-Phenylethanol	93,52
+ 100 mM (<i>R,S</i>)-Phenylethanol	109,25
+ 50 mM Acetophenon	117,00
+ 100 mM Acetophenon	94,70

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass weder (*R,S*)-Phenylethanol noch Acetophenon einen signifikanten Einfluss auf die IDH-Aktivität haben. Die gemessenen Aktivitäten liegen im Bereich der Messgenauigkeit.

3.3.7 Umsetzungen im zellfreien System

3.3.7.1 Ermittlung des optimalen Enzymverhältnisses

Zur Bestimmung des optimalen Enzymverhältnisses ADH : IDH wurde die Reduktion von Acetophenon zu (*R*)-Phenylethanol mit isolierten Enzymen ADH und IDH untersucht. ADH und IDH wurden in den Verhältnissen 1 : 1, 1 : 2, 1 : 5, 1 : 10, 10 : 1, 5 : 1, 2 : 1 sowie 1 : 25 eingesetzt. Das Enzymverhältnis 1 : 25 wurde gewählt, da dieses Verhältnis in *E. coli* BL21(DE3)/pAW-6-Zellen vorliegt. Die Umsetzung wurde in 100 mM TEA-Puffer pH 7,5 durchgeführt. Die Ansätze enthielten neben 0,025 U jedes Enzyms bei einem Enzymverhältnis von 1 : 1 10 mM MgCl₂, 20 mM DL-Isocitrat, 10 mM Acetophenon sowie 1 mM NADP und wurden bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen und mittels GC auf die Bildung von (*R*)-Phenylethanol hin untersucht. Abb. 79 zeigt die entstandene Menge an (*R*)-Phenylethanol bei den verschiedenen Umsetzungen von Acetophenon unter den oben beschriebenen Bedingungen.

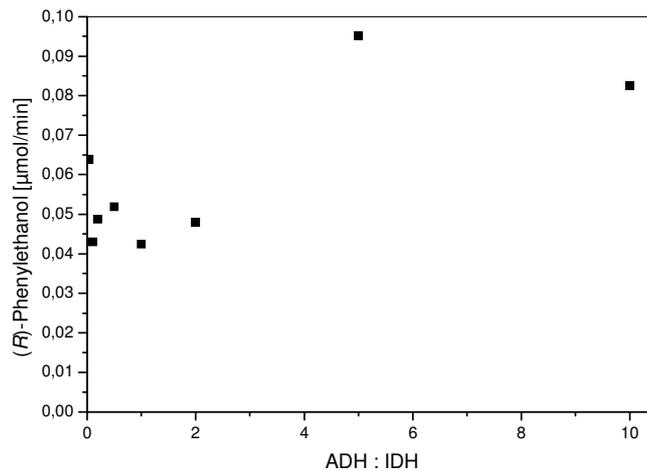


Abb. 79: Reduktion von Acetophenon zu (*R*)-Phenylethanol mit ADH und IDH in unterschiedlichen Verhältnissen. Eingesetzt wurden 0,025 pro Enzym bei einem Enzymverhältnis von 1 : 1.

Die Abbildung zeigt, dass Umsetzungen von Acetophenon mit ADH und IDH als NADPH-regenerierendem Enzym am schnellsten verlaufen, wenn die ADH im zehnfachen und vor allem im fünffachen Überschuss vorliegt. Die Umsetzungen mit den Enzymen in den anderen gewählten Verhältnissen liefen etwas langsamer ab. Bei dem in *E. coli* BL21(DE3)/pAW-6 vorherrschenden Enzymverhältnis ADH : IDH = 1 : 25 dauerte zwar die vollständige Reduktion von Acetophenon am längsten, aber auch bei diesem Verhältnis sind effiziente Umsetzungen trotz der in diesem Versuch eingesetzten geringen Enzymmengen möglich.

3.3.7.2 Umsetzungen verschiedener Ketone

Nach der Ermittlung des optimalen Enzymverhältnisses wurden Umsetzungen im zellfreien System von Acetophenon (10 mM), 2,5-Hexandion (15 mM) und 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester (25 mM) durchgeführt. Der Acetophenon-Ansatz enthielt 0,125 U ADH und 0,025 U IDH, während den anderen beiden Ansätzen jeweils 5 U ADH und 1 U IDH zugesetzt wurde. Grund hierfür war die deutlich bessere Umsetzung des Substrats Acetophenon. Alle Ansätze enthielten 50 mM DL-Isocitrat. Die Umsetzungen erfolgten in 100 mM TEA-Puffer pH 7,5 bei 37 °C unter leichtem Schütteln. Die nach bestimmten Zeiten entnommenen Proben wurden gaschromatographisch untersucht (Abb. 80).

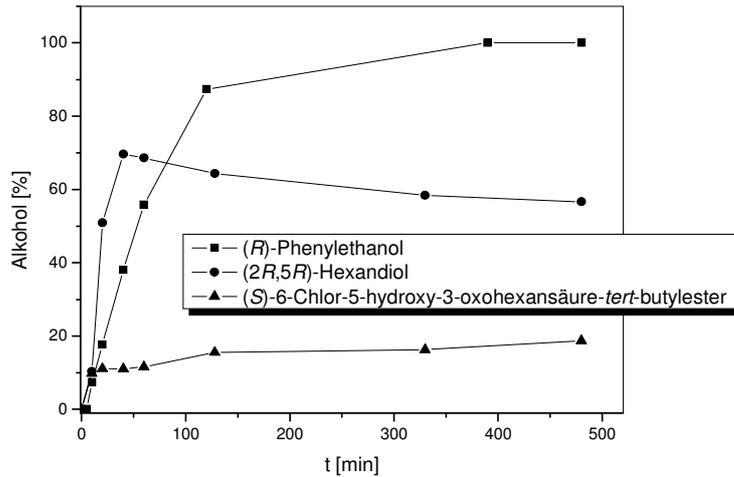


Abb. 80: Stereoselektive Umsetzungen von 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion und 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit isolierten Enzymen ADH und IDH im Verhältnis 5 : 1.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass 10 mM Acetophenon komplett reduziert wurden, während von anfänglich vorhandenen 15 mM 2,5-Hexandion nur knapp 60 % umgesetzt wurden. Nach 8 h haben sich lediglich knapp 20 % (*S*)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester aus den ursprünglich vorhandenen 25 mM Keton gebildet. Es muss beachtet werden, dass der Acetophenon-Ansatz nur 1/40 der Enzymmenge im Vergleich zu den anderen beiden Ansätzen enthielt. Acetophenon wird also eindeutig am besten umgesetzt.

3.3.8 Ganzzellumsetzungen mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-6

Die Umsetzung von 10 mM Acetophenon erfolgte mit 0,5 mg Zellen *E. coli* BL21 (DE3)/pAW-6 pro ml Ansatz in 50 mM TEA-Puffer pH 7,5, während die Umsetzungen von 15 mM 2,5-Hexandion und 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit 5 mg Zellen pro ml Ansatz unter ansonsten gleichen Bedingungen durchgeführt wurden. Weiterhin enthielten die Ansätze 10 mM MgCl₂, 50 mM DL-Isocitrat und teilweise 1 mM NADP. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurde die Hälfte der Ansätze vor den Umsetzungen mit Toluol behandelt. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben entnommen und mittels Gaschromatographie auf die Reduktion der Ketone hin untersucht (Abb. 81).

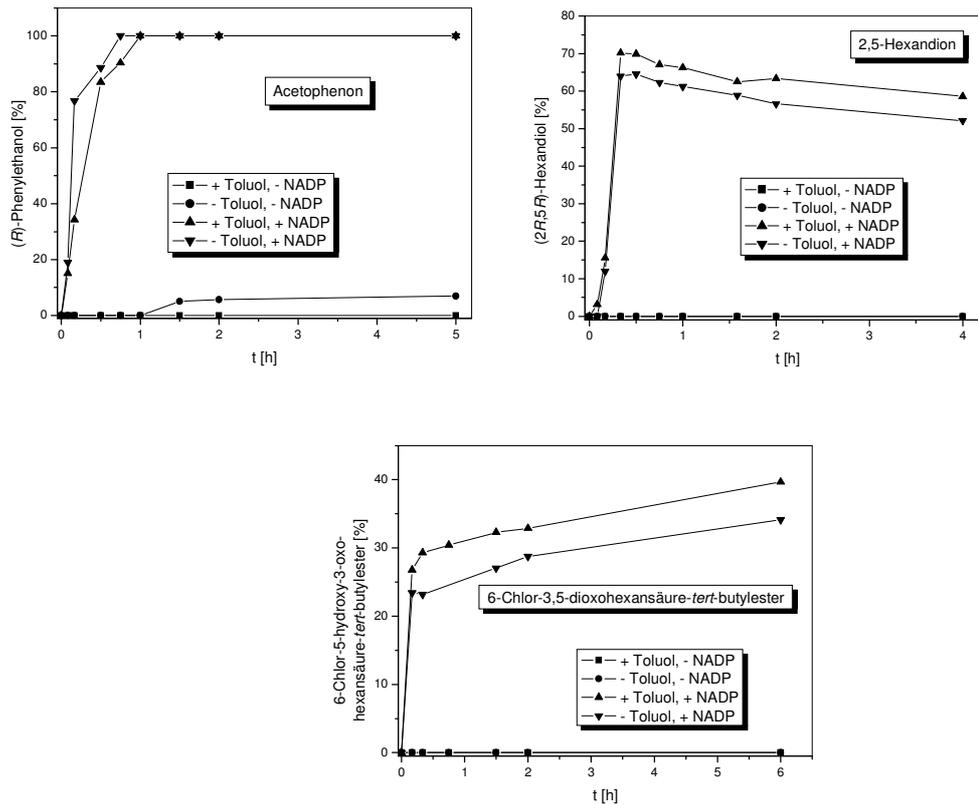


Abb. 81: Reduktion von 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion und 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit 0,5 bzw. 5 mg/ml *E. coli* BL21(DE3)/pAW-6-Zellen. Die Zellen wurden teilweise mit Toluol vorbehandelt. Bei der Hälfte der Ansätze erfolgte der Zusatz von NADP.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass ohne Zusatz von NADP die Reduktion der Ketone kaum möglich war. Die Permeabilisierung der Zellen mittels Toluol hatte dagegen keinen wesentlichen Einfluss auf die Reaktion. Weiterhin zeigt Abb. 81, dass 10 mM Acetophenon innerhalb der gewählten Zeitspanne vollständig reduziert wurden, während ca. 70 % an (2*R*,5*R*)-Hexandiol und lediglich ca. 40 % an (S)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester gebildet wurden. Bei allen Umsetzungen wurden ee -Werte von 100 % erzielt.

3.3.9 Zusammenfassung des Systems pAW-6

Das System ADH-IDH hat den Vorteil, dass das Reaktionsgleichgewicht durch die Decarboxylierungsreaktion der IDH günstig beeinflusst wird. Reduktionen von Acetophenon liefen mit ADH und IDH am besten ab, wenn die ADH im Überschuss vorlag. Dies ist im Stamm *E. coli* BL21(DE3)/pAW-6 nicht der Fall; hier ist die IDH deutlich im Überschuss. Trotzdem verliefen die Umsetzungen der drei ausgewählten Substrate mit diesem Stamm sehr gut. 10 mM Acetophenon konnten nach sehr kurzer Zeit vollständig reduziert werden. Umsetzungen ohne NADP-Zusatz verliefen deutlich schlechter und waren nur mit Acetophenon als Substrat möglich. Ein entscheidender Nachteil dieses Systems ist das teure IDH-Substrat Isocitrat.

3.4 Cofaktorregenerierung durch Isocitrat-Dehydrogenase (IDH): System ADH-IDH-AcnB (AW-11)

Das System pAW-6 (ADH und IDH) funktioniert sehr gut, hat aber den Nachteil, dass das Substrat der IDH, Isocitrat, sehr teuer ist. Aus diesem Grund sollte eine Aconitase (Acn) das pAW-6-System ergänzen. Durch diese vorgeschaltete Reaktion wird das sehr viel kostengünstigere Substrat Citrat in Isocitrat umwandelt (Abb. 82).

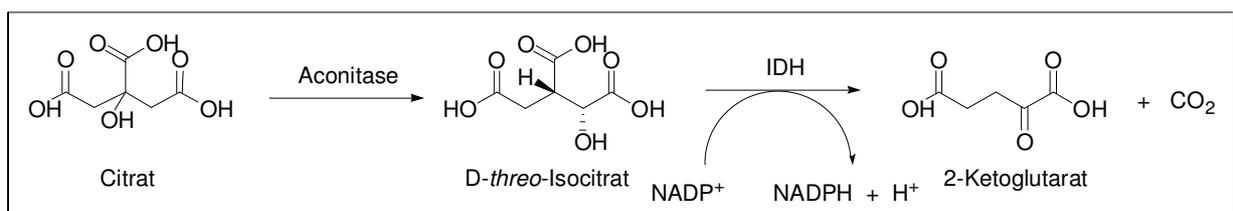


Abb. 82: Kopplung der Aconitase (Acn) mit der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) für die Regenerierung von NADPH unter Vermeidung des Einsatzes der teuren Verbindung Isocitrat.

Nach Literaturrecherche wurde eine Aconitase aus *E. coli* bevorzugt, um den Vorteil der homologen Expression zu nutzen. *E. coli* besitzt zwei Aconitasen; AcnA und AcnB. Die Gensequenzen beider Aconitasen sind bekannt^[94]. Aufgrund der höheren spezifischen Aktivität^[95] wurde AcnB ausgewählt. AcnB sollte kloniert und exprimiert werden. Für die Entwicklung eines Ganzzellbiokatalysators sollte das Plasmid, welches AcnB trägt,

anschließend mit dem Plasmid pAW-6 in einem Stamm gekoppelt werden. Dieses System wurde bisher nicht für die Regenerierung von Cofaktoren eingesetzt. In Abb. 83 sind sowohl die ADH-Reaktion als auch die Reaktionen von IDH und Acn dargestellt, die der NADPH-Regenerierung dienen.

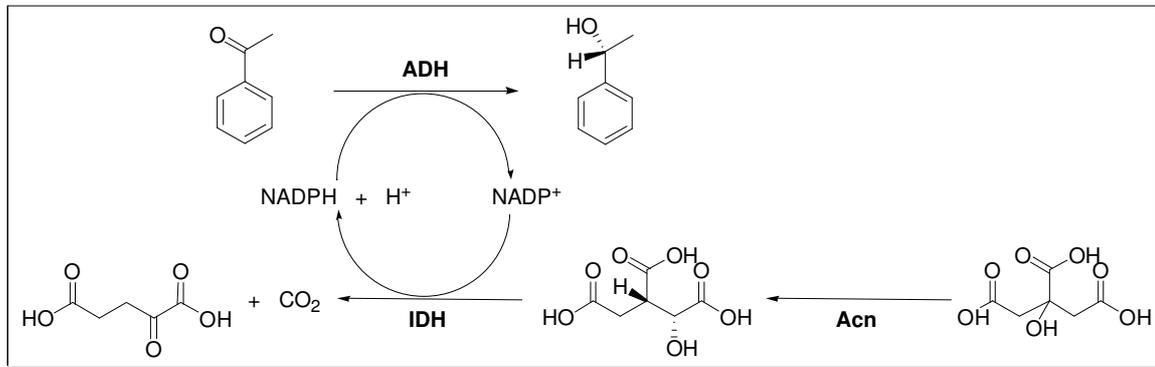


Abb. 83: System zur Cofaktorregenerierung, bei dem die ADH mit IDH und Acn gekoppelt ist.

Für die Klonierung der drei oben genannten Gene sollten die Expressionsvektoren pETDuet-1 und pACYCDuet-1 (beide von Novagen) verwendet werden. pACYCDuet-1 ist für die Coexpression von zwei Genen entwickelt worden. Er enthält zwei multiple Klonierungsstellen, welchen jeweils ein T7-Promotor//*lac*-Operator und eine ribosomale Bindungsstelle vorangeht. Am Ende der zweiten multiplen Klonierungsstelle befindet sich der T7-Terminator. Des Weiteren trägt er ein Chloramphenicol-Resistenzgen und ist in Kombination mit dem Expressionsvektor pETDuet-1 (Novagen) in einem passenden Wirtstamm für die Coexpression von bis zu vier Genen geeignet.

3.4.1 Isolierung und Klonierung des *acnB*-Gens

Für die Isolierung des *acnB*-Gens wurde eine PCR mit genomischer DNA aus *E. coli* K12 durchgeführt. Die verwendeten Restriktionsprimer, die anhand der bekannten Gensequenz entwickelt wurden, sollten dem Gen die Schnittstellen *Nde*I und *Xho*I an den Enden anfügen. Das erhaltene PCR-Produkt wurde ebenso wie der Expressionsvektor pACYCDuet-1 (Novagen) einer Restriktion mit den Enzymen *Nde*I und *Xho*I unterzogen. Nach anschließender Ligation der beiden DNA-Fragmente erfolgte die Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen. Die fünf auf Chloramphenicol-haltigem Medium gewachsenen Kolonien wurden angezogen und mittels Restriktionsanalyse auf korrekte Ligation hin überprüft. Die anschließend durchgeführte Sequenzierung eines dieser Klone (pACYCAcnB) bestätigte die exakte Sequenz des 2598 bp großen Gens (Abb. 84).

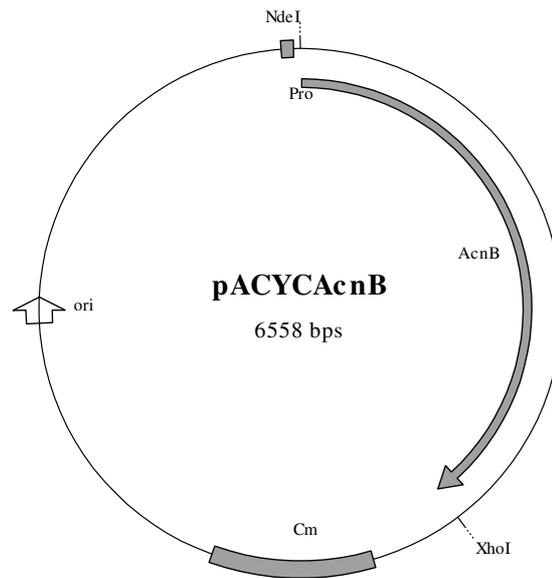


Abb. 84: Vektorkarte von pACYCAcnB, basierend auf dem Expressionsvektor pACYCDuet-1.

3.4.2 Coexpression von ADH, IDH und AcnB

Für die Coexpression von ADH, IDH und AcnB wurden zunächst kompetente *E. coli* BL21 (DE3)/pAW-6-Zellen hergestellt. Anschließend erfolgte die Transformation von pACYCAcnB in diese kompetenten Zellen. Nach Selektion auf Ampicillin- und Chloramphenicol-haltigem Medium wurden die gewachsenen *E. coli* BL21(DE3)/AW-11-Klone angezogen. Nach Induktion der Genexpression mit 1 mM IPTG und zweistündigem Schütteln bei 37°C erfolgte die Ernte der Zellen. Die gewählten Expressionsbedingungen wurden der Literatur entnommen^[95]. Nach Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall erfolgten Standard-Aktivitätstests. Die Aktivitäten von ADH, IDH und AcnB sind in Tab. 33 aufgeführt.

Tab. 33: Aktivitäten von ADH, IDH und AcnB im Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)/AW-11.

	ADH	IDH	AcnB
Akt. [U/ml]	58,01	816,84	94,97

3.4.3 Ganzzellumsetzungen mit *E. coli* BL21(DE3)/AW-11

Die Umsetzungen der drei Ketone 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion und 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester erfolgten mit 5 mg *E. coli* BL21 (DE3)/AW-11-Zellen pro ml Ansatz in 100 mM TEA-Puffer pH 7,5. Die Ansätze enthielten außerdem 100 mM Trinatriumcitrat und 5 mM MgCl₂ und wurden mit und ohne Zusatz von 1 mM NADP durchgeführt. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurde die Hälfte der Ansätze vor den Umsetzungen für 30 min mit Toluol behandelt. Nach bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen und mittels Gaschromatographie auf die Reduktion der Ketone hin untersucht (Abb. 85).

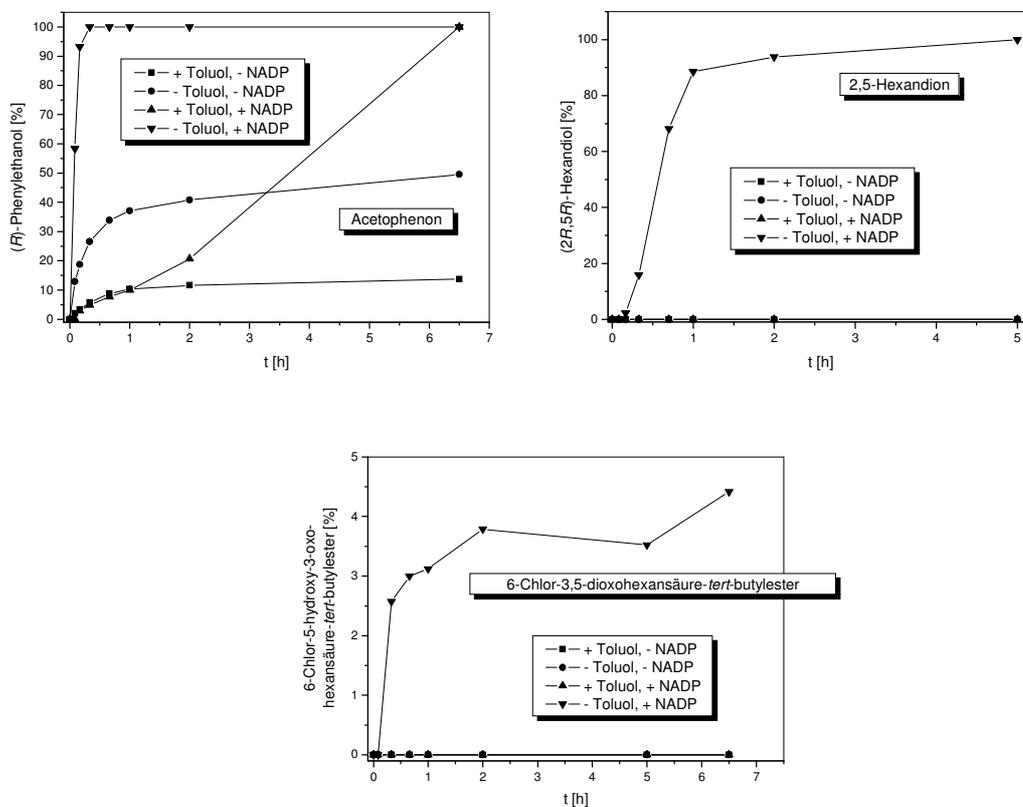


Abb. 85: Reduktion von 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion und 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit 5 mg *E. coli* BL21(DE3)/AW-11-Zellen pro ml Ansatz. Die Zellen wurden teilweise mit Toluol vorbehandelt. Bei der Hälfte der Ansätze erfolgte die Zugabe von NADP.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass sowohl 10 mM Acetophenon als auch 15 mM 2,5-Hexandion vollständig reduziert wurden. Alle Alkohole wurden mit 100 % ee gebildet. Die Behandlung der Zellen mit Toluol sowie die Anwesenheit von NADP hatten einen großen Einfluss auf die Umsetzungen. 2,5-Hexandion und 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester wurden nur reduziert, wenn die Zellen nicht permeabilisiert waren und

zugleich NADP im Ansatz vorhanden war. Acetophenon wurde auch nach Permeabilisierung der Zellen vollständig umgesetzt, wenn NADP anwesend war, allerdings nach sehr langer Reaktionszeit. Grund für die schlechten Umsatzraten nach Permeabilisierung der Zellen könnte sein, dass Toluol inhibierend auf AcnB wirkt.

3.4.4 Zusammenfassung des Systems AW-11

Das System AW-11 hat gegenüber pAW-6 den Vorteil, dass das AcnB-Substrat Citrat sehr viel billiger ist als das teure IDH-Substrat Isocitrat. Ansonsten können die Vorteile von pAW-6 ausgenutzt werden. So ist die IDH-Reaktion aufgrund der Decarboxylierung nahezu irreversibel, was das Reaktionsgleichgewicht günstig beeinflusst. Da Toluol ein Inhibitor von AcnB zu sein scheint, sind mit AW-11 nur effiziente Ganzzellumsetzungen möglich, wenn die Zellmembranen nicht mit Toluol permeabilisiert werden. 2,5-Hexandion und 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester wurden nach Permeabilisierung überhaupt nicht reduziert. Umsetzungen ohne Zusatz von NADP verliefen deutlich schlechter als mit NADP. Nur Acetophenon wurde umgesetzt, wenn kein NADP im Ansatz vorhanden war. Verglichen mit pAW-6 waren die Umsatzraten mit AW-11 deutlich niedriger. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass am System AW-11 drei Enzyme beteiligt sind, die zudem noch auf zwei verschiedenen Plasmiden verteilt sind.

3.5 Cofaktorregenerierung durch Formiat-Dehydrogenase: System LB-ADH-FDH (pAW-7)

Die NADP-abhängige (*R*)-spezifische ADH aus *Lactobacillus brevis* ist der ADH aus *L. kefir* sehr ähnlich. Auch dieses Enzym weist ein breites Substratspektrum auf. Im Laufe der Dissertation von Bettina Riebel^[41] wurde das Gen der ADH aus *L. brevis* isoliert, kloniert und exprimiert. Des Weiteren wurde das Enzym biochemisch charakterisiert.

Die ADHs aus *L. kefir* und *L. brevis* weisen neben ihrer Abhängigkeit von NADP eine NAD-Nebenaktivität auf. Um diese geringe Affinität der ADH zum Cofaktor NAD ausnutzen zu können, sollten beide ADHs mit der NAD-abhängigen FDH aus *Candida boidinii* gekoppelt werden. Die FDH aus *C. boidinii* katalysiert die Decarboxylierung von Formiat (Abb. 86).

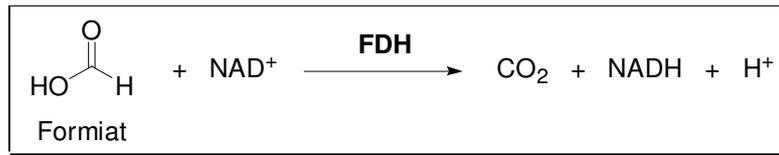


Abb. 86: Decarboxylierung von Formiat durch die NAD-abhängige FDH.

Die Reaktion verläuft irreversibel und Formiat ist ein preiswertes Substrat. Als einziges Produkt entsteht das Gas CO_2 . Das Funktionieren dieser Systeme hätte eine erhebliche Reduzierung der Kosten zur Folge, da 1 g NADPH € 399 kostet, der Preis für 1 g NADH aber nur € 53 (Biomol, 2004) beträgt. Aus ökonomischer Sicht wären diese Systeme also sehr wertvoll. Die FDH ist ein bewährtes Enzym für die NADH-Regenerierung^[96-99]. Die Kopplung von LB-ADH und FDH zur NADH-Regenerierung ist in Abb. 87 dargestellt.

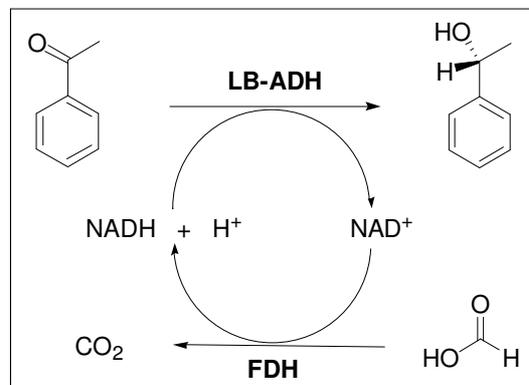


Abb. 87: Kopplung von LB-ADH und FDH zur Schaffung eines Cofaktorregenerierungssystems.

3.5.1 Coklonierung und Coexpression von LB-ADH und FDH

Zur Coexpression von LB-ADH und FDH sollten beide Gene hintereinander in den Expressionsvektor pETDuet-1 (Novagen) kloniert werden (Abb. 88).

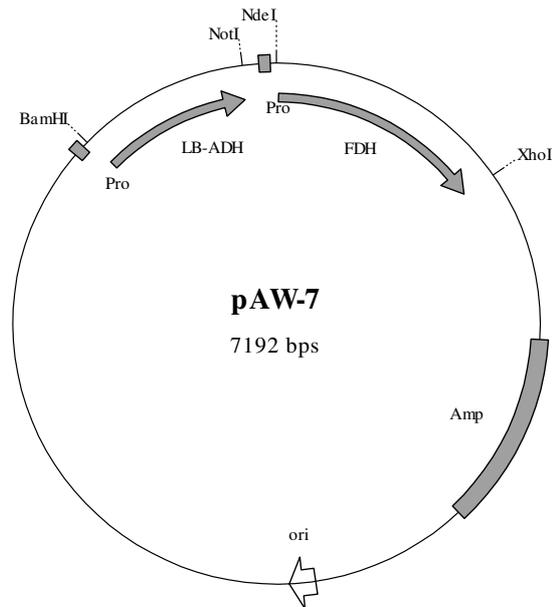


Abb. 88: Vektorkarte des Expressionsvektors pETDuet-1 mit LB-ADH und FDH (pAW-7).

Es wurden Primer synthetisiert, welche dem *lb-adh*-Gen die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Not*I an den Genenden anfügen sollten. Diese Primer wurden in einer PCR eingesetzt. Nach Aufreinigung des PCR-Produkts wurden der Expressionsvektor pETDuet-1 sowie das PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Not*I geschnitten, über Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Elution aus dem Gel ligiert sowie in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert. Von zehn der Klone erfolgten die Isolierung der Plasmide und die anschließende Überprüfung auf korrekte Ligation. Sechs dieser Klone zeigten Plasmid in der richtigen Größe. Die *lb-adh*-Sequenz eines Klons (pDLBADH) wurde durch Sequenzanalyse bestätigt.

Für die Klonierung des *fdh*-Gens wurden Primer konstruiert, welche dem *fdh*-Gen die Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Xho*I an den Genenden anfügen sollten. Nach erfolgreicher PCR mit FDH C23S in pBTac^[100] als Template erfolgte die Aufreinigung des PCR-Produkts. Nach Restriktion des *fdh*-PCR-Produkts sowie des Plasmids pDLBADH mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Xho*I wurden die beiden Fragmente ligiert und in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert. Zehn der auf LB_{amp}-Platten gewachsenen Klone wurden nach Plasmidisolierung auf korrekte Ligation hin überprüft. Sieben dieser Klone zeigten nach Agarose-Gelelektrophorese die richtige Größe. Die Sequenzanalyse des Plasmids eines Klons (pAW-7) bestätigte die korrekte Sequenz des *fdh*-Gens.

Zur Coexpression von LB-ADH und FDH wurde das Konstrukt pAW-7 in kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert.

3.5.2 Expressionsoptimierung von *E. coli* BL21(DE3)/pAW-7

Um die optimalen Bedingungen für die Expression von LB-ADH und FDH im Stamm *E. coli* BL21(DE3)/pAW-7 herauszufinden, wurden die Expressionsbedingungen bezüglich IPTG-Konzentration, Induktionstemperatur sowie -dauer variiert und die Aktivitäten von LB-ADH und FDH verglichen. Die Induktion der Genexpression erfolgte mit IPTG-Konzentrationen von 100 μM , 500 μM bzw. 1 mM über einen Zeitraum von 3, 5 bzw. 17 h und bei Temperaturen von 30 und 37 $^{\circ}\text{C}$. Die Aktivitäten von LB-ADH und FDH der einzelnen Ansätze sind in Abb. 89 dargestellt.

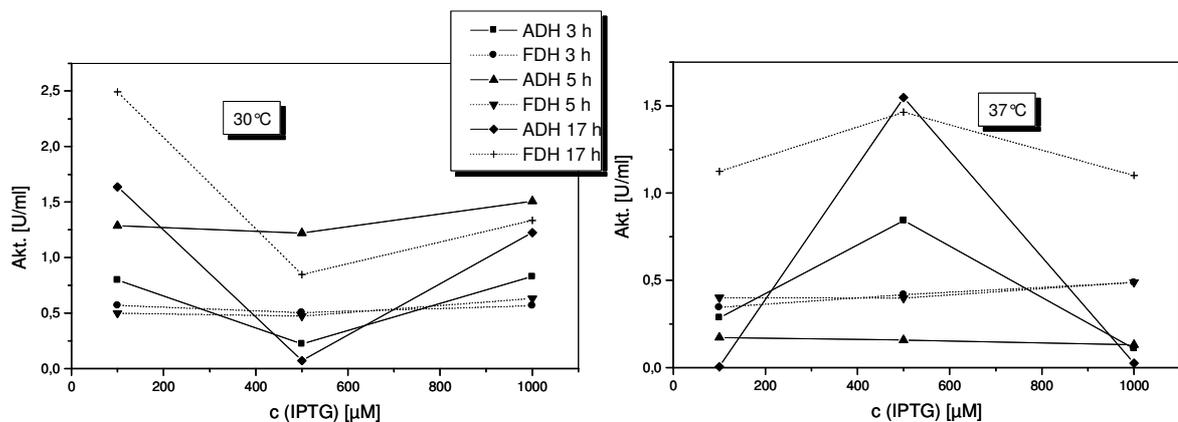


Abb. 89: Optimierung der Expressionsbedingungen für den Stamm *E. coli* BL21 (DE3)/pAW-7. Dargestellt sind die Aktivitäten von FDH und LB-ADH, gemessen mit NADPH als Cofaktor, nach Wachstum bei 30 bzw. 37 $^{\circ}\text{C}$ mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen bzw. Induktionszeiten.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die Aktivitäten von FDH und ADH in der gleichen Größenordnung liegen. Die Aktivitäten beider Enzyme sind am höchsten nach Induktion mit 100 μM IPTG für 17 h bei 30 $^{\circ}\text{C}$. Diese Bedingungen wurden daher für die Anzucht von Zellen gewählt.

Für die Aktivitätsmessung der ADH wurde der Standardassay durchgeführt. Es muss berücksichtigt werden, dass in diesem System die NAD-Abhängigkeit der ADH und nicht, wie standardmäßig, die NADP-Abhängigkeit der ADH genutzt wird. Die Aktivität des Rohextrakts nach Wachstum der Zellen bei den oben ermittelten optimalen Bedingungen wurde mit NAD als Cofaktor gemessen. Die Aktivität betrug 10 % der Aktivität mit NADP als Cofaktor. Die FDH hat also eine höhere Aktivität als die ADH, wenn die NAD-Abhängigkeit dieses Enzyms berücksichtigt wird.

3.5.3 Trennung von LB-ADH und FDH

Die Trennung von LB-ADH und FDH gelang mittels Anionenaustausch-Chromatographie mit Q-Sepharose FF (Pharmacia) als Säulenmaterial. Nach Aufschluss von *E. coli* BL21 (DE3)/pAW-7-Zellen wurde der Rohextrakt auf die mit Puffer A (50 mM TEA-Puffer pH 7,0 + 1 mM MgCl₂) gespülte Säule aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mittels eines linearen Gradienten von 0 bis 1 M NaCl. Während die FDH nicht an das Säulenmaterial gebunden hat, eluierte die LB-ADH bei ca. 224 mM NaCl. Die Aktivitäten von FDH und LB-ADH vor und nach dem Reinigungsschritt sind in Tab. 34 und Tab. 35 dargestellt.

Tab. 34: Aktivität der FDH im Rohextrakt und nach Anionenaustausch-Chromatographie aus *E. coli* BL21(DE3)/pAW-7.

Reinigungs-schritt	FDH			
	Akt. [U/ml]	Protein [mg/ml]	Akt. [U/mg]	Reinigungs-faktor
Rohextrakt	6,32	20,30	0,31	1,0
Q-Sepharose FF	1,40	0,99	1,43	4,6

Tab. 35: LB-ADH-Aktivität in *E. coli* BL21(DE3)/pAW-7-Rohextrakt und nach Anionenaustausch-Chromatographie. Die Messung erfolgte über ADH-Standardassay mit NADPH als Cofaktor.

Reinigungs-schritt	ADH (mit NADPH)			
	Akt. [U/ml]	Protein [mg/ml]	Akt. [U/mg]	Reinigungs-faktor
Rohextrakt	2,27	20,30	0,11	1,0
Q-Sepharose FF	0,22	0,45	0,49	4,5

Der Reinigungserfolg ist in Abb. 90 dokumentiert.

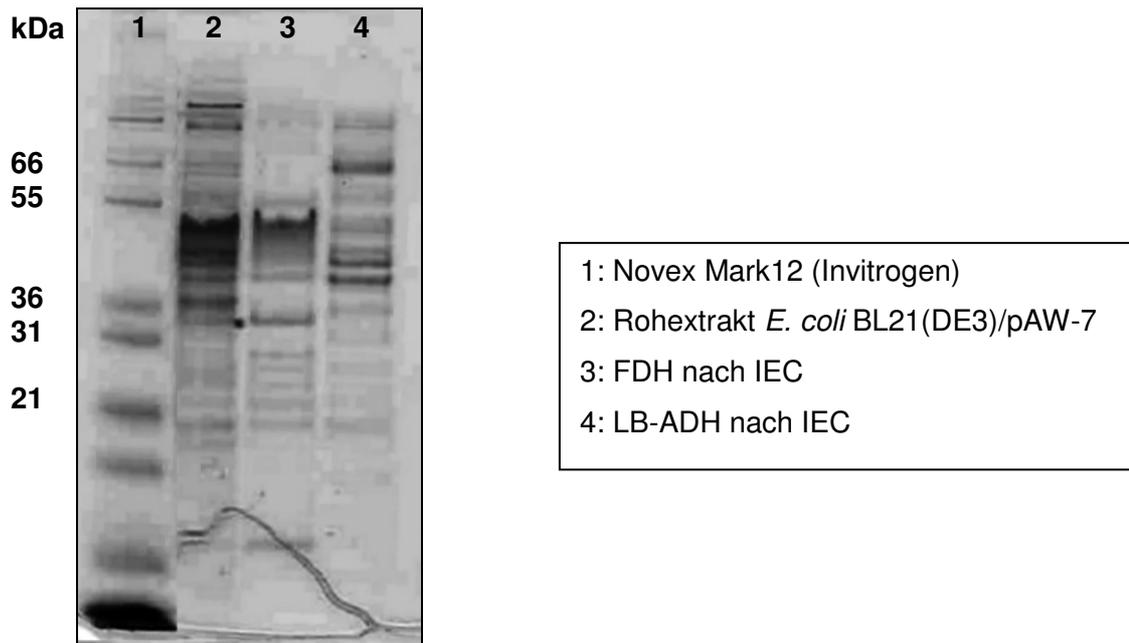


Abb. 90: SDS-PAGE gefärbt mit Simply Blue SafeStain (Invitrogen); aufgetragen ist Rohextrakt *E. coli* BL21(DE3)/pAW-7 sowie FDH- und LB-ADH-haltige Fraktionen nach Anionenaustausch-Chromatographie.

Abb. 90 bestätigt das Ergebnis der Aktivitätsmessungen. Während die Aktivität der FDH in der gewohnten Größenordnung liegt, ist die LB-ADH-Aktivität sehr niedrig. Die SDS-PAGE gibt die schwache Expression der LB-ADH wieder.

3.5.4 Untersuchung von Kreuzreaktionen

Um mögliche störende Nebenreaktionen der FDH mit Acetophenon und (*R*)-Phenylethanol sowie den Einfluss von Formiat auf die LB-ADH-Reaktion zu untersuchen, erfolgten Aktivitätstests der FDH mit Zusatz von Acetophenon sowie (*R*)-Phenylethanol im Ansatz bzw. der LB-ADH mit Formiat im Reaktionsgemisch.

Zur Untersuchung des Einflusses der Komponenten der ADH-Reaktion auf die FDH wurden dem FDH-Standardassay 10 mM Acetophenon bzw. 10 mM (*R*)-Phenylethanol zugesetzt. Als Kontrolle wurde der Standardassay ohne Zusätze durchgeführt. Die photometrisch gemessenen Aktivitäten sind in Tab. 36 dargestellt.

Tab. 36: Untersuchung des Einflusses von Acetophenon bzw. (*R*)-Phenylethanol auf die FDH-Reaktion.

Assay	Akt. [U/ml]
Standard	87,64
+ 10 mM Acetophenon	89,31
+ 10 mM (<i>R</i>)-Phenylethanol	93,30

Die Aktivitäten zeigen, dass sowohl Acetophenon als auch (*R*)-Phenylethanol keinen inhibierenden Einfluss auf die FDH-Reaktion ausüben. Die FDH-Aktivität war nach Zusatz von 10 mM (*R*)-Phenylethanol sogar leicht erhöht.

Des Weiteren wurde die mögliche Beeinflussung von Natriumformiat auf die Aktivität der LB-ADH untersucht. Hierzu wurden dem Standardassay 100 bzw. 200 mM Natriumformiat zugesetzt. Außerdem wurde der Standardassay ohne Zusätze zur Kontrolle durchgeführt (Tab. 37).

Tab. 37: Aktivität der ADH aus *L. brevis* in Anwesenheit von 100 bzw. 200 mM Natriumformiat zur Untersuchung von Kreuzreaktionen. Zur Kontrolle wurde der Standardassay durchgeführt.

Assay	Akt. [U/ml]
Standard	13,85
+ 100 mM Natriumformiat	9,00
+ 200 mM Natriumformiat	7,66

Die Aktivitätswerte zeigen, dass die Anwesenheit von Natriumformiat auf die LB-ADH inhibierend wirkt. Während der Zusatz von 100 mM Natriumformiat die Aktivität der LB-ADH um 35 % vermindert, bewirkt der Zusatz von 200 mM Natriumformiat sogar einen Aktivitätsverlust von 45 %.

3.5.5 Umsetzungen im zellfreien System

3.5.5.1 Ermittlung des optimalen Enzymverhältnisses

Für die Umsetzung von Acetophenon im zellfreien System wurden LB-ADH und FDH in verschiedenen Verhältnissen (1 : 1, 1 : 2, 2 : 1, 1 : 5, 1 : 10 und 1 : 30) eingesetzt. Das Verhältnis ADH : FDH von 1 : 30 wurde gewählt, da dieses Verhältnis bei Berücksichtigung der NAD-Spezifität der LB-ADH in *E. coli* BL21(DE3)/pAW-7-Zellen vorliegt. Das Enzymverhältnis 1 : 1 entspricht 0,5 U LB-ADH bzw. 0,5 U FDH pro ml Ansatz. Die Umsetzungen wurden mit und ohne NADP-Zusatz durchgeführt. Alle Ansätze enthielten dagegen NAD.

Nach bestimmten Zeiten wurden Proben genommen und mittels Gaschromatographie untersucht. Anhand dieser Ergebnisse wurde die entstandene Menge an (*R*)-Phenylethanol in jedem Ansatz ermittelt (Abb. 91).

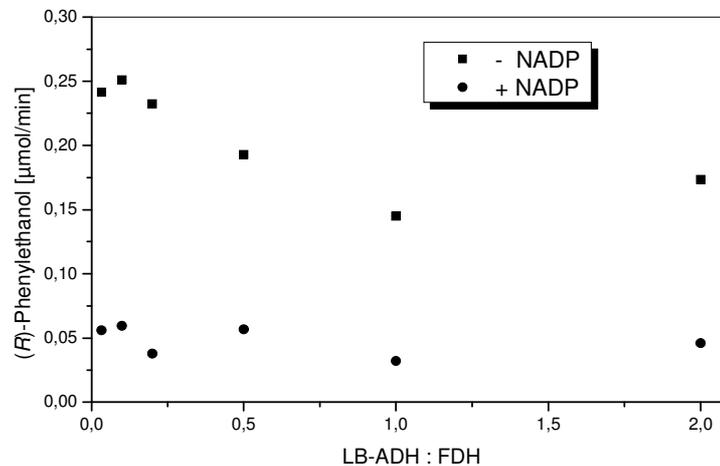


Abb. 91: Gebildete (*R*)-Phenylethanol-Menge bei der Umsetzung von Acetophenon mit isolierten Enzymen LB-ADH und FDH. Die Enzyme wurden in verschiedenen Verhältnissen eingesetzt, wobei das Verhältnis 1 : 1 0,5 U jedes Enzyms pro ml Ansatz entspricht.

Aus der Abbildung geht hervor, dass die Umsatzraten wesentlich höher waren, wenn den Ansätzen kein NADP zugesetzt wurde. Ein Grund dafür könnte sein, dass NADP ein kompetitiver Inhibitor für NAD ist. Die besten Umsetzungen wurden erzielt, wenn die FDH im Überschuss gegenüber der ADH vorlag, was auch in *E. coli* BL21(DE3)/pAW-7-Zellen der Fall ist.

3.5.5.2 Umsetzungen verschiedener Ketone

Nach Ermittlung des optimalen Enzymverhältnisses wurden mit dem Verhältnis LB-ADH : FDH von 1 : 5 Umsetzungen von 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion und 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester durchgeführt. Aufgrund der deutlich besseren Umsetzung des Substrats Acetophenon wurden den Ansätzen unterschiedliche Mengen an Enzymen zugesetzt. Während der Acetophenon-Ansatz 0,5 U LB-ADH und 2,5 U FDH enthielt, wurden den beiden anderen Ansätzen 5 U LB-ADH und 25 U FDH zugesetzt. Alle Ansätze enthielten 150 mM Natriumformiat. Die Reaktionen erfolgten in 100 mM TEA-Puffer pH 7,5 bei 37°C unter leichtem Schütteln. Den Ansätzen wurde kein NADP

zugesezt. Nach bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen und diese mittels GC analysiert (Abb. 92).

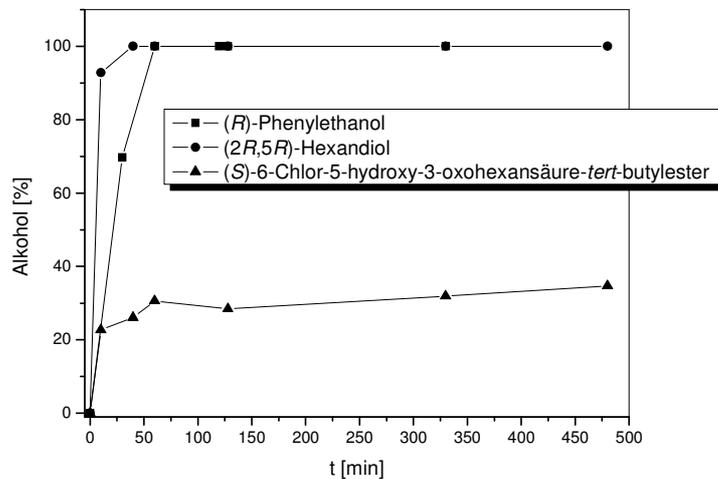


Abb. 92: Reduktion von 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion und 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit LB-ADH und FDH im Verhältnis 1 : 5. Der Acetophenon-Ansatz enthielt 0,5 U LB-ADH/2,5 U FDH, die beiden anderen Ansätze 5 U LB-ADH/25 U FDH.

Sowohl 10 mM Acetophenon als auch 15 mM 2,5-Hexandion wurden vollständig reduziert, wobei der Hexandion-Ansatz das Zehnfache der Enzymmenge enthielt. Es wurden dagegen lediglich ca. 30 % (S)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester gebildet. Dazu muss gesagt werden, dass dieser Ansatz 25 mM an Substrat enthielt, während die beiden anderen Ansätze nur 10 bzw. 15 mM enthielten. Alle gebildeten Alkohole waren enantiomerenrein.

3.5.6 Ganzzellumsetzungen mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-7

E. coli BL21(DE3)/pAW-7-Zellen wurden in Ganzzellumsetzungen für die Reduktion von 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion und 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester eingesetzt. Der Acetophenon-Ansatz enthielt 5 mg Zellen pro ml Reaktionsmischung, während den beiden anderen Ansätzen jeweils 36,5 mg Zellen pro ml zugesezt wurden. Bei einem Teil der Ansätze erfolgte die Behandlung der Zellen mit Toluol vor der Umsetzung. Des Weiteren wurde der Hälfte der Ansätze 1 mM NADP zugesezt. Alle Ansätze enthielten außerdem 1 mM NAD und wurden in 100 mM TEA-Puffer pH 7,5 bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach bestimmten Zeiten wurden Proben genommen und mittels GC analysiert (Abb. 93).

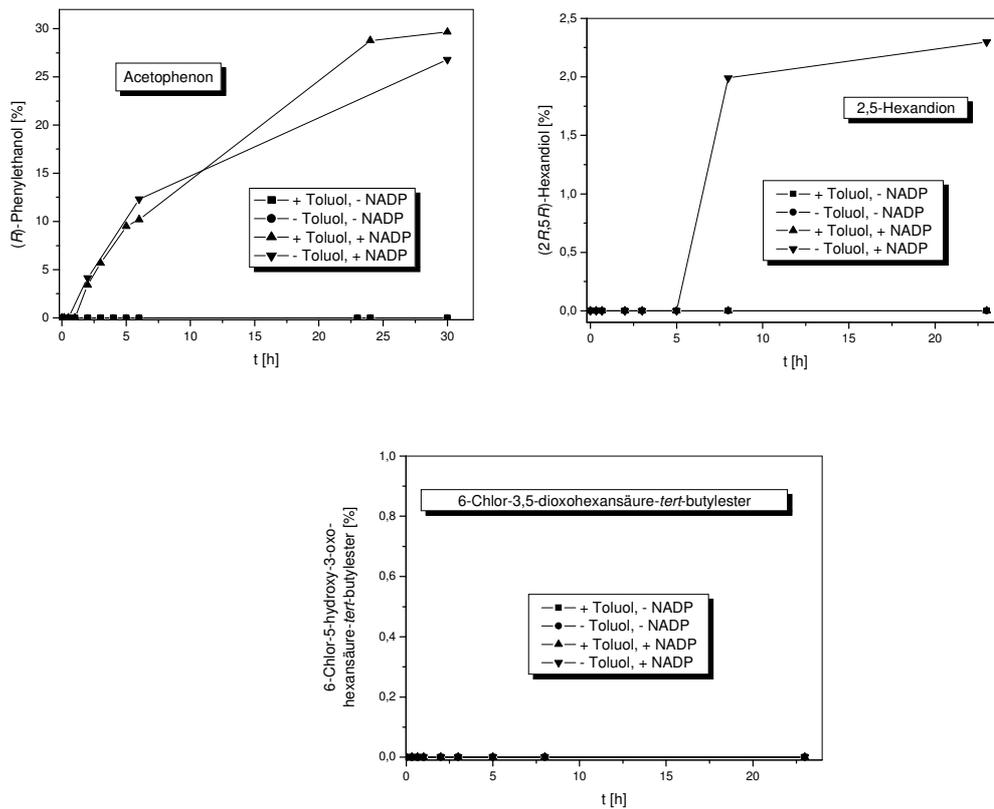


Abb. 93: Umsetzungen von 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion und 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-7-Zellen, welche zum Teil mit Toluol behandelt wurden. Einem Teil der Ansätze wurde NADP zugesetzt.

Acetophenon und 2,5-Hexandion wurden von *E. coli* BL21(DE3)/pAW-7-Zellen nur umgesetzt, wenn neben NAD auch NADP in den Reaktionsansätzen enthalten war. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der K_M -Wert der LB-ADH für NAD mit 2,94 mM sehr hoch ist^[101] und in der Zelle Enzyme vorhanden sind, die in der Lage sind, NADPH zu regenerieren. Auch die in *E. coli* enthaltene Transhydrogenase könnte die verbrauchten Cofaktoren NADPH und NAD regenerieren, so dass Umsetzung nur nach Zusatz beider Cofaktoren möglich ist. Der Zusatz von Toluol hatte nur einen geringen Einfluss auf die Umsetzung; nach Permeabilisierung der Zellmembran verlief die Reaktion mit 10 % höherer Ausbeute. Während nach 30 h Reaktionszeit etwa 3 mM Acetophenon stereoselektiv zu (R)-Phenylethanol reduziert wurden, waren nach 23 h Reaktionsdauer maximal 0,3 mM des eingesetzten 2,5-Hexandions reduziert, obwohl hier etwa sieben mal so viel Zellmaterial im Ansatz enthalten war. Es erfolgte nur Umsetzung von 2,5-Hexandion, wenn die Zellmembran nicht permeabilisiert worden war. 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester wurde von *E. coli* BL21(DE3)/pAW-7 überhaupt nicht umgesetzt.

3.5.7 Zusammenfassung des Systems pAW-7

Wichtige Vorteile des Systems LB-ADH-FDH sind der geringe Preis des FDH-Substrats Formiat, die Bildung von CO₂ als einzigem Reaktionsprodukt sowie die aufgrund der Decarboxylierung irreversibel ablaufende Reaktion. Bei der Ermittlung des optimalen Enzymverhältnisses LB-ADH-FDH wurde herausgefunden, dass die Reduktion von Acetophenon am besten war, wenn die FDH im Überschuss vorlag. Dies ist in *E. coli* BL21 (DE3)-pAW-7-Zellen der Fall. Die Umsetzungen der drei ausgewählten Substrate mit diesen Zellen verliefen sehr schlecht. Während 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester überhaupt nicht umgesetzt wurde, wurden Acetophenon und 2,5-Hexandion nur mit geringen Umsatzraten und in Anwesenheit von NADP reduziert. Grund für die schlechten Umsatzraten ist, dass das System auf der geringen NAD-Nebenaktivität der LB-ADH beruht.

3.6 Cofaktorregenerierung durch Formiat-Dehydrogenase (FDH): System LK-ADH-FDH (pAW-8)

Zur Konstruktion eines komplexen Cofaktorregenerierungs-Systems, das neben der ADH aus *L. kefir* und der FDH aus *C. boidinii* die Transhydrogenase (PNT) aus *E. coli* enthalten sollte (3.7), sollten ADH aus *L. kefir* und FDH aus *C. boidinii* kloniert werden. Beide Gene sollten in den Expressionsvektor pACYCDuet-1 (Novagen) kloniert werden (pAW-8) (Abb. 94).

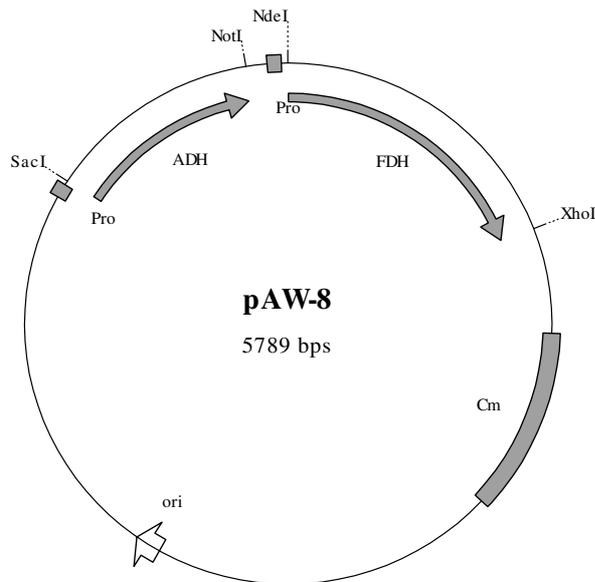


Abb. 94: Vektorkarte des Expressionsvektors pACYCDuet-1 (Novagen), welcher ADH und FDH enthält.

Zum Vergleich der beiden ADHs aus *L. kefir* und *L. brevis* sollte das System pAW-8 charakterisiert und dem Konstrukt pAW-7 gegenübergestellt werden. Abb. 95 zeigt ADH- und FDH-Reaktion, welche zur NADH-Regenerierung miteinander gekoppelt werden.

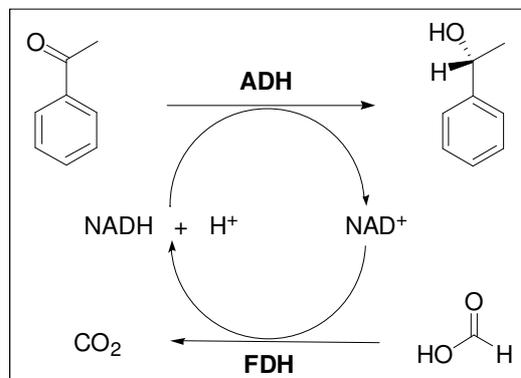


Abb. 95: Kopplung von ADH und FDH zur Regenerierung von NADH.

3.6.1 Coklonierung von ADH und FDH

Für die Klonierung des *adh*-Gens in pACYCDuet-1 wurden genspezifische Primer konstruiert, welche dem *adh*-Gen die Restriktionsschnittstellen *SacI* und *NotI* an den Genenden anfügen sollte. Mittels PCR wurde das entsprechende DNA-Fragment aus genomischer DNA von *L. kefir* isoliert und anschließend, ebenso wie der Vektor pACYCDuet-1, mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *NotI* geschnitten. Nach Ligation der beiden Fragmente

erfolgte die Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen. Von zehn der auf Chloramphenicol-haltigem LB-Medium gewachsenen Klone wurden die Plasmide isoliert und auf korrekte Ligation hin überprüft. Die Sequenzierung eines dieser Plasmide (pACYCADH) bestätigte die korrekte *adh*-Gensequenz.

Dem *fdh*-Gen sollten für die Klonierung die Schnittstellen *Nde*I und *Xho*I an den Enden angefügt werden. Es konnte das PCR-Produkt verwendet werden, welches für die Herstellung von pAW-7 isoliert wurde. Dieses *fdh*-PCR-Produkt sowie das Plasmid pACYCADH wurden mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Xho*I geschnitten. Die beiden DNA-Fragmente wurden ligiert und in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert. Von zehn der in Chloramphenicol-haltigem Medium gewachsenen Klone wurden die Plasmide isoliert und auf korrekte Ligation hin überprüft. Sieben der Klone zeigten Plasmid und Insert in der richtigen Größe. Die Sequenz eines dieser Plasmide wurde überprüft. Die Sequenzanalyse bestätigte die korrekte Sequenz des *fdh*-Gens.

3.6.2 Coexpression von ADH und FDH

Für die Expression von pAW-8 wurde das Plasmid in kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert. Die Ergebnisse der Expressionsoptimierung des Stammes *E. coli* BL21(DE3)/pAW-7 wurden auf den Stamm *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8 übertragen. Die Expression der beiden Gene wurde mit 1 mM IPTG induziert, anschließend erfolgte das Wachstum der Zellen bei 30°C für 5 h.

3.6.3 Trennung von ADH und FDH

Die Trennung von ADH und FDH erfolgte über Anionenaustausch-Chromatographie (Q-Sepharose FF, Pharmacia). Nach Äquilibrieren der Säule mit 50 mM TEA-Puffer pH 7,0 + 1 mM MgCl₂ erfolgte die Elution der Proteine über einen linearen Gradienten von 0-1 M NaCl. Zur Bestimmung der FDH-Aktivität wurden photometrische FDH-Standard-Aktivitätstests durchgeführt. Die Messung der ADH-Aktivität erfolgte über den ADH-Standardassay, bei welchem die Abnahme von NADPH bei 340 nm verfolgt wird. Des Weiteren wurden ADH-Aktivitätstests mit NADH statt NADPH als Cofaktor durchgeführt. Die Aktivitäten der Enzyme sind in Tab. 38-Tab. 40 aufgeführt.

Tab. 38: Aktivität der FDH aus *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8 im Rohextrakt und nach Anionenaustausch-Chromatographie.

Reinigungs-schritt	FDH			
	Akt. [U/ml]	Protein [mg/ml]	Akt. [U/mg]	Reinigungs-faktor
Rohextrakt	3,91	19,00	0,21	1,0
Q-Sepharose FF	0,62	0,37	1,68	8,0

Tab. 39: ADH-Aktivität in *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8-Rohextrakt und nach Anionenaustausch-Chromatographie. Die Messung erfolgte über den ADH-Standardassay mit NADPH als Cofaktor.

Reinigungs-schritt	ADH (mit NADPH)			
	Akt. [U/ml]	Protein [mg/ml]	Akt. [U/mg]	Reinigungs-faktor
Rohextrakt	44,92	19,00	2,36	1,0
Q-Sepharose FF	48,54	2,97	16,34	6,9

Tab. 40: Aktivität der ADH aus *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8, gemessen mit NADH statt NADPH als Cofaktor, im Rohextrakt und nach Anionenaustausch-Chromatographie.

Reinigungs-schritt	ADH (mit NADH)			
	Akt. [U/ml]	Protein [mg/ml]	Akt. [U/mg]	Reinigungs-faktor
Rohextrakt	2,31	19,00	0,12	1,0
Q-Sepharose FF	0,59	2,97	0,20	1,7

Der Erfolg der Aufreinigung wurde über SDS-PAGE (Abb. 96) dokumentiert.

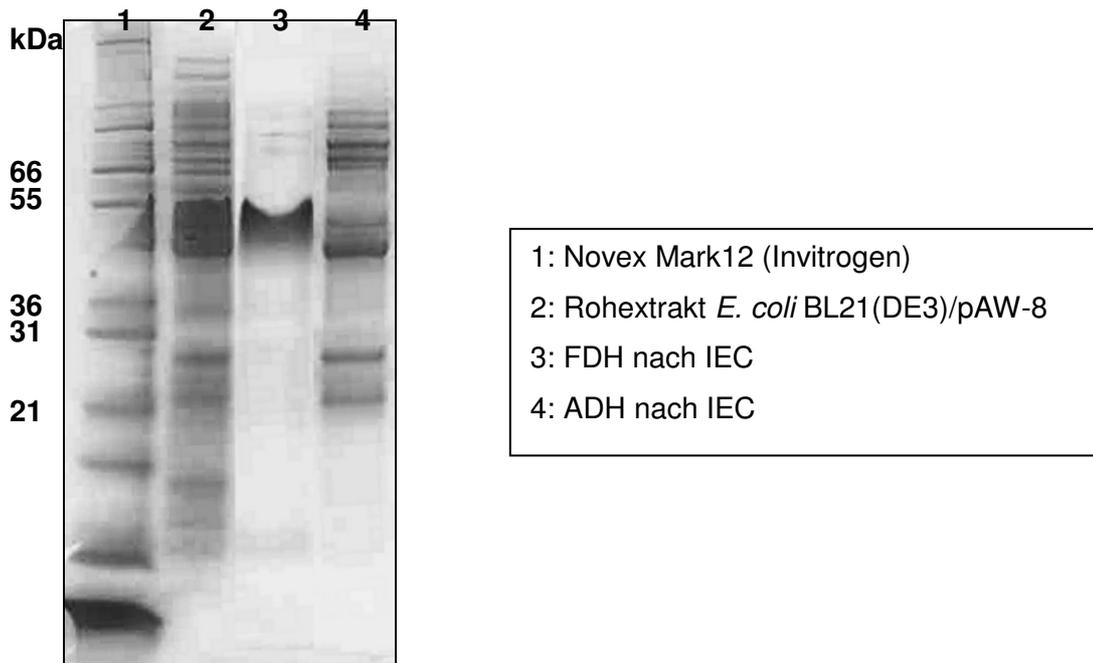


Abb. 96: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE der Trennung von ADH und FDH aus *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8-Zellen. Aufgetragen wurden Rohextrakt sowie ADH- und FDH-haltige Proben nach Anionenaustausch-Chromatographie.

Wie aus Abb. 96 zu erkennen ist, wurden ADH und FDH mittels Anionenaustausch-Chromatographie getrennt. Während die ADH-Probe noch sehr viel Fremdprotein enthielt, lag die FDH schon sehr sauber vor.

3.6.4 Untersuchung von Kreuzreaktionen

Die mögliche Beeinflussung der ADH-Reaktion durch Natriumformiat wurde durch Zusatz von 100 mM Natriumformiat zum Standard-Aktivitätstest untersucht. Die ermittelten Aktivitäten sind in Tab. 41 aufgeführt.

Tab. 41: Mögliche Beeinflussung des ADH-Aktivitätstests durch Natriumformiat.

Assay	Akt. [U/ml]
Standard	72,12
+ 100 mM Natriumformiat	74,56

Der Zusatz von Formiat bewirkte keine störenden Nebenreaktionen, sondern eine sogar leicht erhöhte ADH-Aktivität.

Der Einfluss von Acetophenon und (*R*)-Phenylethanol auf die FDH-Reaktion wurde bereits in 3.5.4 erläutert.

3.6.5 Umsetzungen im zellfreien System

3.6.5.1 Ermittlung des optimalen Enzymverhältnisses

Um das optimale Enzymverhältnis ADH : FDH herauszufinden, wurde die Reduktion von Acetophenon zu (*R*)-Phenylethanol im zellfreien System mit den Enzymverhältnissen ADH : FDH von 1 : 1, 2 : 1, 1 : 2, 1 : 10 und 10 : 1 durchgeführt. Das Verhältnis 1 : 1 entspricht 0,1 U ADH (mit NADH gemessen) bzw. 0,1 U FDH. Die Bildung von (*R*)-Phenylethanol in den verschiedenen Ansätzen wurde mittels GC analysiert (Abb. 97).

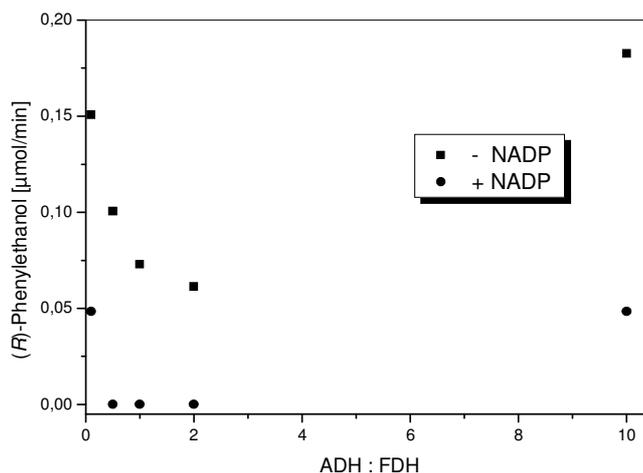


Abb. 97: Bildung von (*R*)-Phenylethanol bei der Umsetzung von Acetophenon mit ADH und FDH in verschiedenen Enzymverhältnissen im zellfreien System. Beim Verhältnis 1 : 1 wurden 0,1 U jeden Enzyms eingesetzt. Einem Teil der Ansätze wurde NADP zugesetzt.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die höchste Aktivität bei einem Verhältnis ADH : FDH = 10 : 1 erreicht wurde, wobei beim Verhältnis ADH : FDH = 1 : 10 auch noch 83 % der Aktivität erreicht wurden. Analog zum System pAW-7 waren auch hier deutlich höhere Umsatzraten in den Ansätzen ohne NADP festzustellen. Der Grund könnte auch hier sein, dass NADP ein kompetitiver Inhibitor für NAD ist.

3.6.5.2 Umsetzungen verschiedener Ketone

10 mM Acetophenon, 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester und 15 mM 2,5-Hexandion wurden mit ADH und FDH im Verhältnis 10 : 1 inkubiert. Aufgrund der deutlich besseren Umsetzung von Acetophenon enthielt der Acetophenon-Ansatz 1 U ADH und 0,1 U FDH, während den beiden anderen Ansätzen 10 U ADH sowie 1 U FDH zugesetzt wurde. Alle Ansätze enthielten 150 mM Natriumformiat. Die Durchführung der Umsetzungen erfolgte in 100 mM TEA-Puffer pH 7,5 bei 37°C unter leichtem Schütteln. Die Ansätze enthielten NAD, aber kein NADP. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben genommen und gaschromatographisch untersucht (Abb. 98).

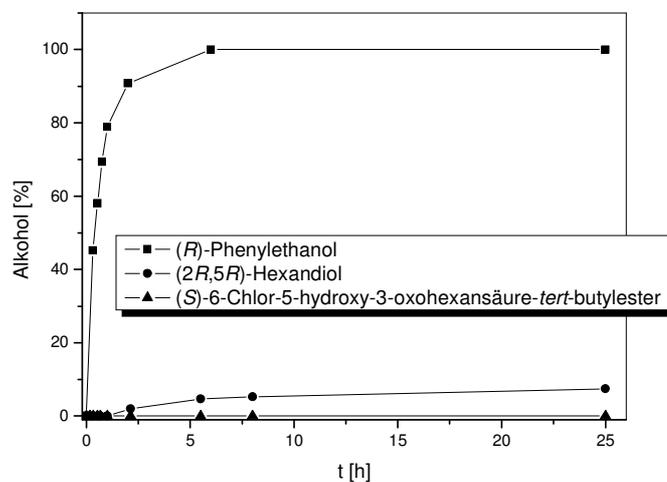


Abb. 98: Umsetzungen von 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion und 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit ADH und FDH im Verhältnis 10 : 1 im zellfreien System. Acetophenon wurde mit 1 U ADH und 0,1 U FDH, 2,5-Hexandion sowie 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit 10 U ADH sowie 1 U FDH umgesetzt.

Wie die Abbildung zeigt, wurden 10 mM Acetophenon vollständig reduziert. 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester wurde überhaupt nicht umgesetzt und von den eingesetzten 15 mM 2,5-Hexandion lediglich ca. 7 %, obwohl diese beiden Ansätze die zehnfache Menge an Enzymen verglichen mit dem Acetophenon-Ansatz enthielten.

3.6.6 Ganzzellumsetzungen mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8

Für die Durchführung von Ganzzellumsetzungen wurden *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8-Zellen teilweise mit Toluol behandelt. Der andere Teil der Zellen wurde ohne vorherige Behandlung verwendet. Alle Ansätze enthielten 1 mM NAD, ein Teil außerdem noch 1 mM NADP. Als Substrate wurden 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion bzw. 25 mM 6-Chlor-

3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester eingesetzt. Der Acetophenon-Ansatz enthielt 20 mg Zellen pro ml Reaktionsmischung, während den beiden anderen Ansätzen 36,5 mg Zellen pro ml zugesetzt wurden. Die Durchführung der Ganzzellbiotransformationen erfolgte in 100 mM TEA-Puffer pH 7,5 bei 37°C unter leichtem Schütteln. Die Bildung der chiralen Alkohole wurde mittels GC analysiert (Abb. 99).

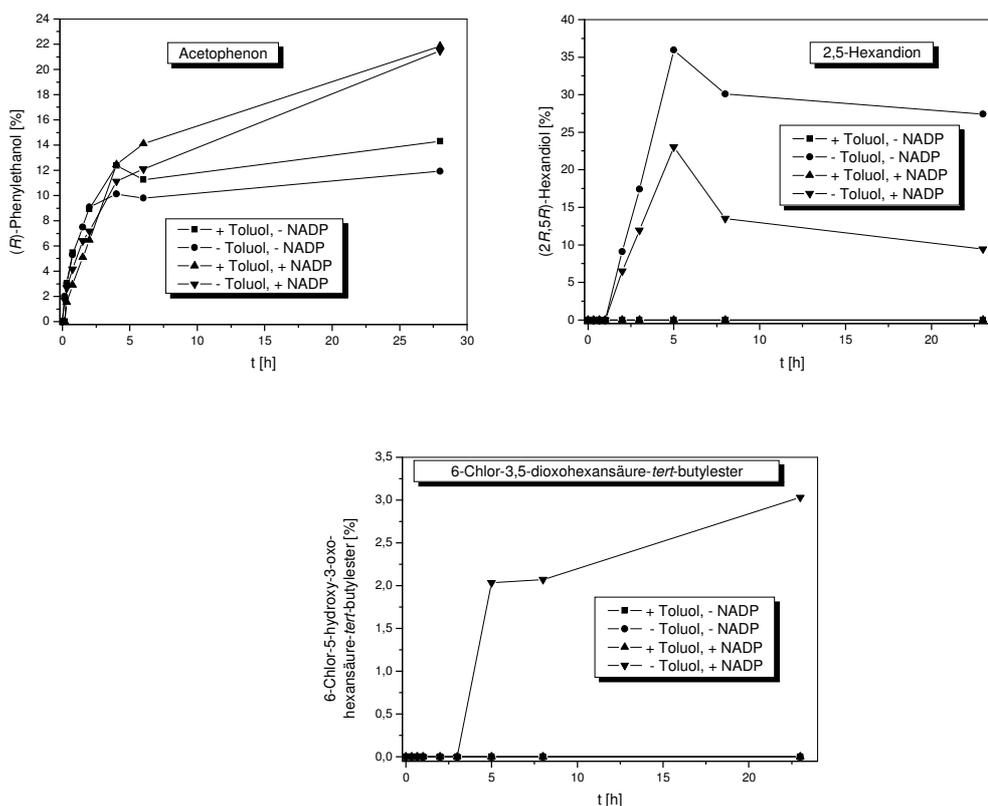


Abb. 99: Umsetzungen von 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion und 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit ganzen *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8-Zellen, welche vor den Biotransformationen zum Teil mit Toluol behandelt wurden. Während alle Ansätze NAD enthielten, wurde nur der Hälfte der Ansätze NADP zugesetzt.

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, hat die Permeabilisierung der Zellen keinen wesentlichen Einfluss auf die Reduktion von Acetophenon. Die Ansätze, die NADP enthielten, lieferten bessere Umsetzungen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass in den Zellen enthaltene Enzyme für die Regenerierung von NADPH sorgen, da der K_M -Wert der LK-ADH für NADP (0,03 mM) sehr viel niedriger ist als der für NAD (0,78 mM). Auch die *E. coli*-eigene Transhydrogenase könnte hier eine Rolle spielen, indem sie die verbrauchten Cofaktoren NADPH und NAD regeneriert. Nach 28 h Reaktionszeit wurden maximal ca. 2 mM des eingesetzten Acetophenons umgesetzt. Bei den 2,5-Hexandion-Ansätzen erfolgte nur Umsetzung, wenn die Zellen nicht mit Toluol behandelt wurden, wobei der Ansatz ohne NADP-Zusatz bessere Ausbeuten brachte. Hier wurden maximal ca. 5 mM

des eingesetzten Substrats reduziert. Allerdings waren auch fast doppelt so viele Zellen im Ansatz enthalten. 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester wurde nur umgesetzt, wenn der Ansatz NADP enthielt und die Zellen nicht permeabilisiert worden waren. Hier bildeten sich 0,75 mM an (*S*)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester nach 23 h Reaktionsdauer. Alle Umsetzungen verliefen stereoselektiv.

3.6.7 Vergleich der beiden ADHs aus *L. kefir* und *L. brevis*

Der Vergleich der ADHs aus *L. kefir* und *L. brevis* zeigt, dass die LK-ADH im pET-Expressionssystem besser exprimiert wird. Während die LB-ADH im Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)/pAW-7 nur eine Aktivität von 0,11 U/mg hatte, betrug die Aktivität der LK-ADH im Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8 2,36 U/mg. Bei der Untersuchung von Kreuzreaktionen fiel auf, dass die LB-ADH durch Natriumformiat deutlich inhibiert wird, während die LK-ADH in Anwesenheit von Natriumformiat keine Aktivitätseinbußen erlitt. Trotz dieser Inhibierung wurde Acetophenon von LB-ADH und FDH im zellfreien System schneller umgesetzt als von LK-ADH und FDH. Auch die beiden anderen Substrate wurden im zellfreien System von LB-ADH und FDH deutlich besser umgesetzt als von LK-ADH und FDH. Während 2,5-Hexandion von LB-ADH und FDH sogar vollständig reduziert wurde, erfolgte mit LK-ADH und FDH überhaupt keine Reduktion von 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester. Bei den Ganzzellumsetzungen zeigte sich, dass Acetophenon von *E. coli* BL21(DE3)/pAW-7 mit LB-ADH und FDH besser umgesetzt wurde. Hier erfolgte mit nur ¼ an eingesetzten Zellen die gleiche Umsatzrate wie mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8 mit LK-ADH und FDH. Allerdings erfolgte mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-7-Zellen nur Umsetzung von Acetophenon, wenn NADP im Ansatz vorhanden war, obwohl das System auf der NAD-Nebenaktivität der ADH beruht. Mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8-Zellen wurde Acetophenon dagegen auch ohne Zusatz von NADP reduziert. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in den kinetischen Konstanten. Während der K_M -Wert der LB-ADH für NAD bei 2,94 mM liegt, beträgt der der LK-ADH für NAD 0,78 mM. Mit der LK-ADH ist es deshalb möglich, auch ohne Zusatz von NADP Umsetzung zu erzielen, während der schlechte K_M -Wert der LB-ADH für NAD dies verhindert. Die Umsetzungen von 2,5-Hexandion und 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester waren ebenfalls mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8-Zellen deutlich besser. Grund hierfür könnte die bessere Expression der LK-ADH gegenüber der LB-ADH sein.

3.6.8 Zusammenfassung des Systems pAW-8

Beim System LK-ADH-FDH kann ebenfalls von den Vorteilen der FDH-Reaktion profitiert werden. Formiat ist ein billiges Substrat, als einziges Produkt der Reaktion entsteht das Gas CO₂ und die Reaktion verläuft irreversibel. Die drei ausgewählten Substrate wurden vom Stamm *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8 relativ schlecht umgesetzt, allerdings besser als von *E. coli* BL21(DE3)/pAW-7-Zellen, die statt der LK-ADH die LB-ADH enthalten.

3.7 Cofaktorregenerierung durch Transhydrogenase (PNT): System LK-ADH-FDH-PNT (AW-9)

Um das bei der ADH-Reaktion verbrauchte NADPH mit Hilfe der NAD-abhängigen FDH zu regenerieren, sollte ein System geschaffen werden, welches neben ADH und FDH eine Transhydrogenase enthält. Transhydrogenasen katalysieren den Transfer von Reduktionsäquivalenten zwischen NADP und NADH (Abb. 100).



Abb. 100: Reaktion, die von Transhydrogenasen katalysiert wird.

Die Transhydrogenase soll dabei das bei der ADH-Reaktion entstandene NADP und das bei der FDH-Reaktion entstandene NADH in NADPH und NAD umwandeln. Die bei beiden Reaktionen verbrauchten Cofaktoren werden also gleichzeitig regeneriert (Abb. 101).

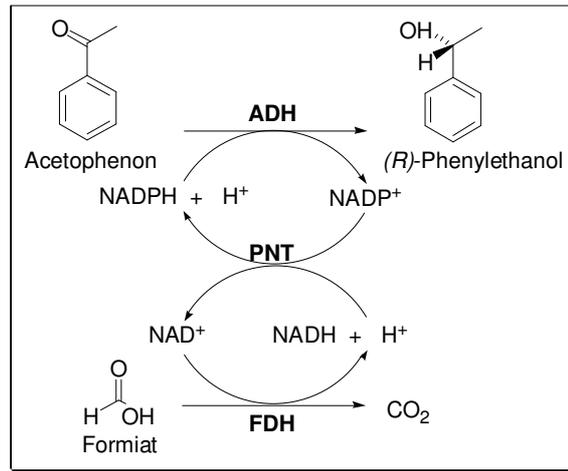


Abb. 101: NADP-abhängige ADH gekoppelt mit NAD-abhängiger FDH sowie Transhydrogenase (PNT), die simultan die verbrauchten Cofaktoren NADPH und NAD regeneriert.

Als geeignete Transhydrogenase wurde die Pyridin-Nucleotid-Transhydrogenase (PNT) aus *E. coli* ausgewählt. Dieses Enzym katalysiert bevorzugt die Reaktion in Richtung NADPH/NAD-Bildung. Bisher wurde lediglich eine lösliche Transhydrogenase aus *Pseudomonas fluorescens*, die bevorzugt die entgegengesetzte Reaktionsrichtung katalysiert, für die Cofaktorregenerierung eingesetzt^[102]. Ein weiterer Vorteil bei Verwendung der PNT aus *E. coli* ist die Ausnutzung der homologen Expression. Die ausgewählte Transhydrogenase besteht aus zwei Untereinheiten. Zwei Gene, *pntA* und *pntB*, codieren für diese beiden Untereinheiten. Die Sequenzen beider Gene sind bekannt^[103]. Für die Konstruktion des Cofaktorregenerierungs-Systems sollten die beiden Transhydrogenase-Gene in den Expressionsvektor pETDuet-1 (Novagen) kloniert werden. Anschließend sollte dieser Vektor mit dem System pAW-8 kombiniert werden.

3.7.1 Isolierung der *pnt*-Gene

Für die Isolierung der *pnt*-Gene *pntA* und *pntB* wurde zunächst genomische DNA aus *E. coli* JM83 präpariert. Anhand der bekannten Gensequenzen wurden Primer konstruiert, welche *pntA* an den Enden die Schnittstellen *Bam*HI und *Pst*I sowie *pntB* die Schnittstellen *Bgl*II und *Avr*II anhängen sollten. Diese Primer wurden in PCR-Ansätzen eingesetzt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden sequenziert. Es konnten die gesamte 1533 bp-lange Gensequenz von *pntA* und die vollständige 1389 bp-lange Gensequenz von *pntB* gelesen werden.

3.7.2 Klonierung der *pnt*-Gene

Für die Klonierung von *pntA* wurden das PCR-Produkt *pntA* sowie der Expressionsvektor pETDuet-1 (Novagen) mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Pst*I verdaut. Nach Ligation der DNA-Fragmente erfolgte die Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen. Von zehn der auf Ampicillin-haltigem LB-Medium gewachsenen Klone wurden die Plasmide isoliert und auf korrekte Ligation überprüft. Die gelelektrophoretische Auftrennung zeigte, dass vier der Klone Plasmid und Insert in der richtigen Größe trugen. Die nachfolgende Sequenzanalyse eines dieser Plasmide (ppntA) bestätigte die korrekte Sequenz von *pntA*.

PCR-Produkt *pntB* sowie Plasmid ppntA wurden mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Avr*I geschnitten, ligiert und nachfolgend in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert. Nach Schnellisolierung der Plasmide von zehn auf LB_{amp}-Medium gewachsenen Klonen zeigten sich neun Plasmide in der entsprechenden Größe im Agarosegel. Die korrekte Gensequenz von *pntB* wurde bei einem dieser Plasmide (ppntAB) durch Sequenzanalyse bestätigt (Abb. 102).

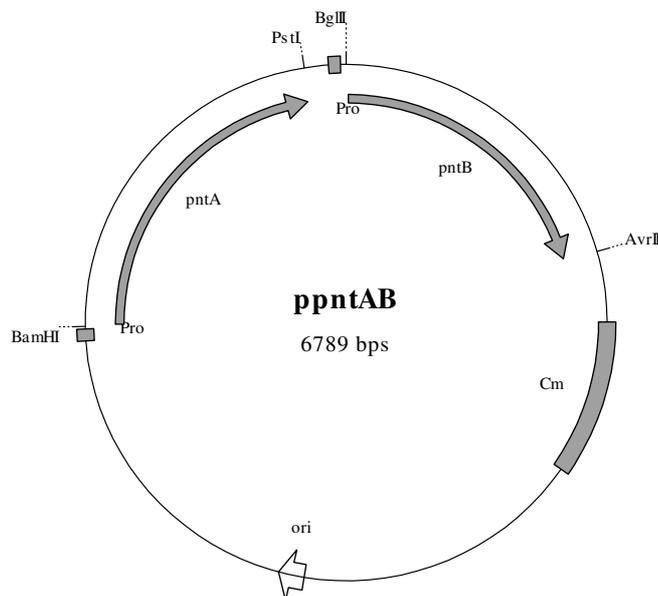


Abb. 102: Vektorkarte von pETDuet-1 (Novagen) mit *pntA* und *pntB* (ppntAB).

3.7.3 Coexpression von ADH, FDH und PNT

Für die Coexpression von ADH, FDH und Transhydrogenase wurde zunächst pAW-8 in kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert. Anschließend erfolgte die Präparation kompetenter *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8-Zellen und die Transformation des Plasmids

ppntAB in diese kompetenten Zellen. Nach Selektion auf Chloramphenicol- sowie Ampicillin-haltigem LB-Medium wurden die erhaltenen *E. coli* BL21(DE3)/AW-9-Klone angezogen. Die Induktion der Genexpression erfolgte mit 1 mM IPTG bei einer OD₆₆₀ von ca. 0,5. Nach fünfständigem Wachstum bei 30°C wurden die Zellen geerntet. Nach Aufschluss der Zellen und Herauslösen von PNT aus der Membran erfolgten Aktivitätstests. Die Aktivitäten von der mit NADPH gemessener ADH und FDH betragen 2,21 und 0,40 U/mg, während die PNT-Aktivität nach Ultrazentrifugation bei 0,07 U/ml lag.

3.7.4 Ganzzellumsetzungen mit *E. coli* BL21(DE3)/AW-9

Für die Reduktion von 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion und 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit *E. coli* BL21(DE3)/AW-9 wurden die Zellen teilweise mit Toluol vorbehandelt. Die Ansätze wurden mit und ohne NAD bzw. NADP durchgeführt. Während der Acetophenon-Ansatz 5 mg Zellen pro ml Reaktionsmischung enthielt, wurden den beiden anderen Ansätzen jeweils 30 mg Zellen pro ml zugesetzt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 37°C unter leichtem Schütteln. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben entnommen und die Umsetzung am Gaschromatographen analysiert (Abb. 103).

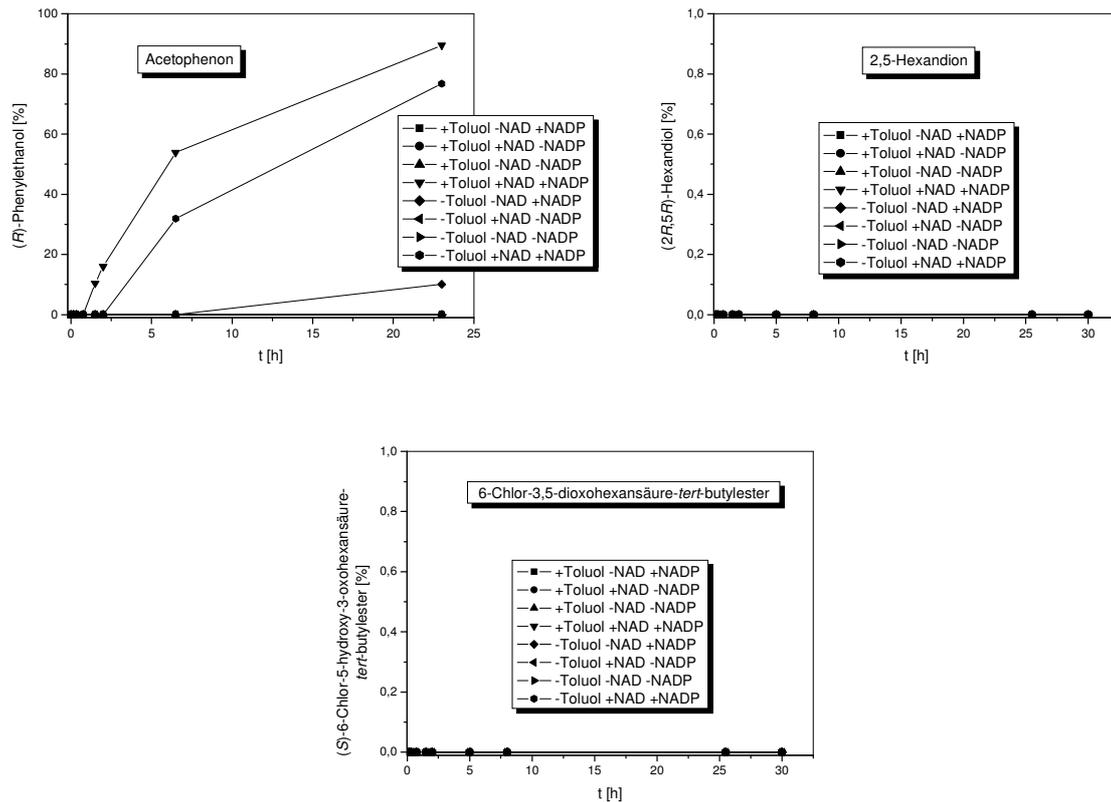


Abb. 103: Umsetzungen von 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion und 25 mM 6-Chlor-3,5-diohexansäure-*tert*-butylester mit ganzen *E. coli* BL21(DE3)/AW-9-Zellen, welche teilweise mit Toluol vorbehandelt wurden. Die Umsetzungen wurden mit und ohne NAD bzw. NADP durchgeführt.

Effiziente Umsetzung von Acetophenon war nur möglich, wenn sowohl NAD als auch NADP der Reaktionsmischung zugesetzt wurden. Ohne Zugabe von NAD und NADP bzw. nach Zusatz von nur einem der beiden Cofaktoren wurden nur geringe Umsatzraten erreicht. Waren allerdings sowohl NAD als auch NADP im Ansatz enthalten, bildeten sich nach 23 h Reaktionsdauer ca. 90 % (*R*)-Phenylethanol mit 100 % ee. Die Behandlung der Zellen mit Toluol hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Reaktion. Obwohl in den Ansätzen der beiden anderen Substrate 60 mg Zellen pro ml enthalten waren, erfolgte keine Umsetzung.

3.7.5 Vergleich der Stämme *E. coli* BL21(DE3)/AW-9 und *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8

Um zu überprüfen, ob die in AW-9 enthaltene Transhydrogenase ihre Funktion erfüllt, wurden die Stämme *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8 (ADH und FDH) und *E. coli* BL21(DE3)/AW-9 (ADH, FDH und PNT) anhand der Umsetzung von 10 mM Acetophenon direkt

miteinander verglichen. Die Durchführung des Experiments erfolgte nach Zusatz von 1 mM NAD sowie NADP in 100 mM TEA-Puffer pH 7,0 bei 37°C unter leichtem Schütteln. Die Ansätze enthielten jeweils 20 mg Zellen pro ml Ansatz. Die nach bestimmten Zeiten entnommenen Proben wurden gaschromatographisch untersucht (Abb. 104).

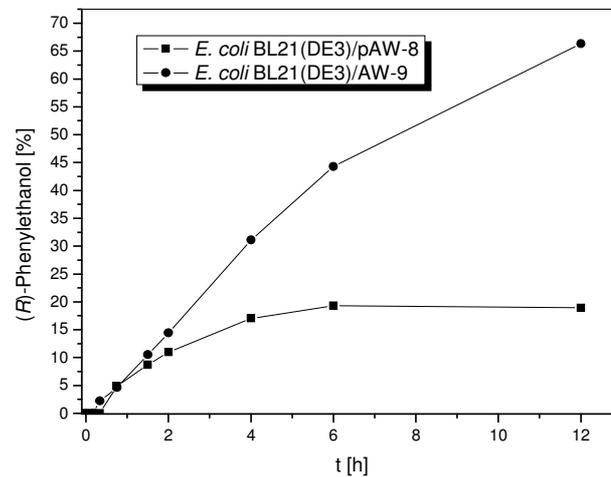


Abb. 104: Vergleich der Zellen *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8 mit *E. coli* BL21(DE3)/AW-9, welche sich nur durch die Anwesenheit von PNT in AW-9 unterscheiden, mittels der Reduktion von Acetophenon zu (*R*)-Phenylethanol.

Die Abbildung zeigt deutlich, dass die in AW-9 enthaltene Transhydrogenase ihre Funktion erfüllt. Ausgehend von 10 mM Acetophenon wurden von *E. coli* BL21(DE3)/AW-9-Zellen nach 12 h Reaktionszeit 66 % Acetophenon zu (*R*)-Phenylethanol reduziert, während unter gleichen Bedingungen nach derselben Reaktionszeit von *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8-Zellen nur 19 % (*R*)-Phenylethanol gebildet wurden.

3.7.6 Zusammenfassung des Systems AW-9

Vorteile des Systems LK-ADH-FDH-PNT sind der niedrige Preis von Formiat, die Bildung von CO₂ als einzigem Produkt und die Irreversibilität der FDH-Reaktion. Die beiden verbrauchten Cofaktoren NAD und NADPH können durch die PNT gleichzeitig regeneriert werden. Von den drei ausgewählten Substraten wurde vom Stamm *E. coli* BL21 (DE3)/AW-9 nur Acetophenon reduziert. Die Umsatzrate hier war allerdings deutlich höher als mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8-Zellen, die nur LK-ADH und FDH, aber keine PNT enthalten.

3.8 Cofaktorregenerierung durch Formiat-Dehydrogenase (FDH): System Mut2G38D-ADH-FDH (pAW-10)

Für die Herstellung eines weiteren Ganzzellkatalysators sollten die NAD-abhängige Mutante der ADH aus *L. brevis*, Mut2G38D-ADH, sowie die NAD-abhängige FDH aus *C. boidinii* miteinander gekoppelt werden. Als Grundlage für dieses System wurde das Konstrukt pAW-7 verwendet, welches die NADP-abhängige ADH aus *L. brevis* und die FDH aus *C. boidinii* enthält. Für das System pAW-10 sollte die NADP-abhängige ADH im Konstrukt pAW-7 durch die NAD-abhängige Mutante Mut2G38D-ADH ersetzt werden (Abb. 105).

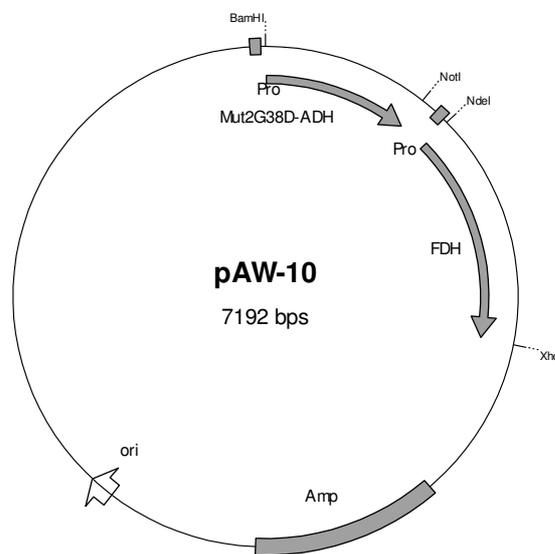


Abb. 105: Vektorkarte des Systems pAW-10, das auf dem Expressionsvektor pETDuet-1 basiert und die *mut2g38d-adh*- und *fdh*-Gene enthält.

Abb. 106 zeigt das System, in dem Mut2G38D-ADH und FDH gekoppelt sind.

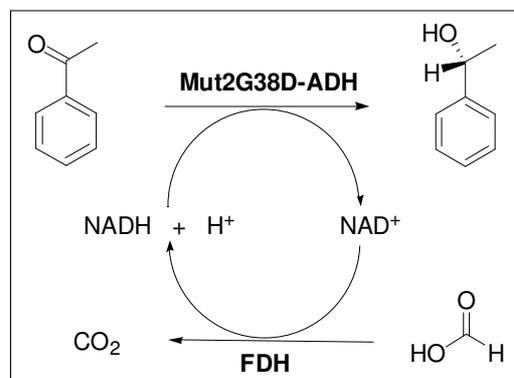


Abb. 106: Kopplung von Mut2G38D-ADH und FDH zur Schaffung eines Cofaktorregenerierungs-Systems.

3.8.1 Coklonierung und Coexpression von Mut2G38D-ADH und FDH

Zunächst wurde das *mut2g38d-adh*-Gen mittels PCR amplifiziert. Als Template für diese PCR wurde ein PCR-Produkt von B. Riebel^[104] verwendet. Die Primer entsprachen den Primern, die für die Amplifizierung des *lb-adh*-Gens eingesetzt wurden und dem Gen die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Not*I an den Genenden anfügen sollten. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte die Sequenzierung des PCR-Produktes. Die Proteinsequenz von Mut2G38D-ADH weist gegenüber der Sequenz der Wildtyp-ADH aus *L. brevis* vier Aminosäure-Austausche auf (A10G, G38D, R39L, K49M). Die bisher bekannten Mutanten der LB-ADH mit verbesserter NAD-Akzeptanz G38D bzw. Mutante 2 weisen die Austausche R39L, K49M, A10G bzw. G38D auf^[101]. Die hier isolierte Mutante beinhaltet alle vier Aminosäure-Austausche.

Das Plasmid pAW-7 sowie das PCR-Produkt *mut2g38d-adh* wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Not*I geschnitten. Nach Auftrennung im Agarosegel und Gelextraktion erfolgte die Ligation der DNA-Fragmente mit anschließender Transformation in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen. Die fünf nach Selektion auf Ampicillin-haltigem LB-Medium gewachsenen Klone wurden angezogen und deren Plasmide isoliert. Nach erfolgter Restriktion zeigte sich im Agarosegel, dass drei der fünf Klone Plasmid und Insert in den entsprechenden Größen enthielten. Die Sequenzierung eines dieser Plasmide (pAW-10) bestätigte die korrekte *mut2g38d-adh*-Sequenz.

Für die Coexpression von Mut2G38D-ADH und FDH wurde das Plasmid pAW-10 in kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert.

3.8.2 Expressionsoptimierung von *E. coli* BL21(DE3)/pAW-10

Um möglichst gute Expressionsraten von beiden Enzymen zu erzielen, wurden die Expressionsbedingungen von *E. coli* BL21(DE3)/pAW-10 optimiert. Hierzu erfolgte das Wachstum der Zellen bis zu einer OD₆₆₀ von 0,5 bei 37 °C. Nach Induktion mit 100 µM, 500 µM und 1 mM IPTG wuchsen die Zellen bei 25 °C, 30 °C und 37 °C für 3, 5 und 16,5 h. Nach Aufschluss der Zellen mittels Schwingkugelmühle erfolgten Mut2G38D-ADH- und FDH-Aktivitätstests (Abb. 107).

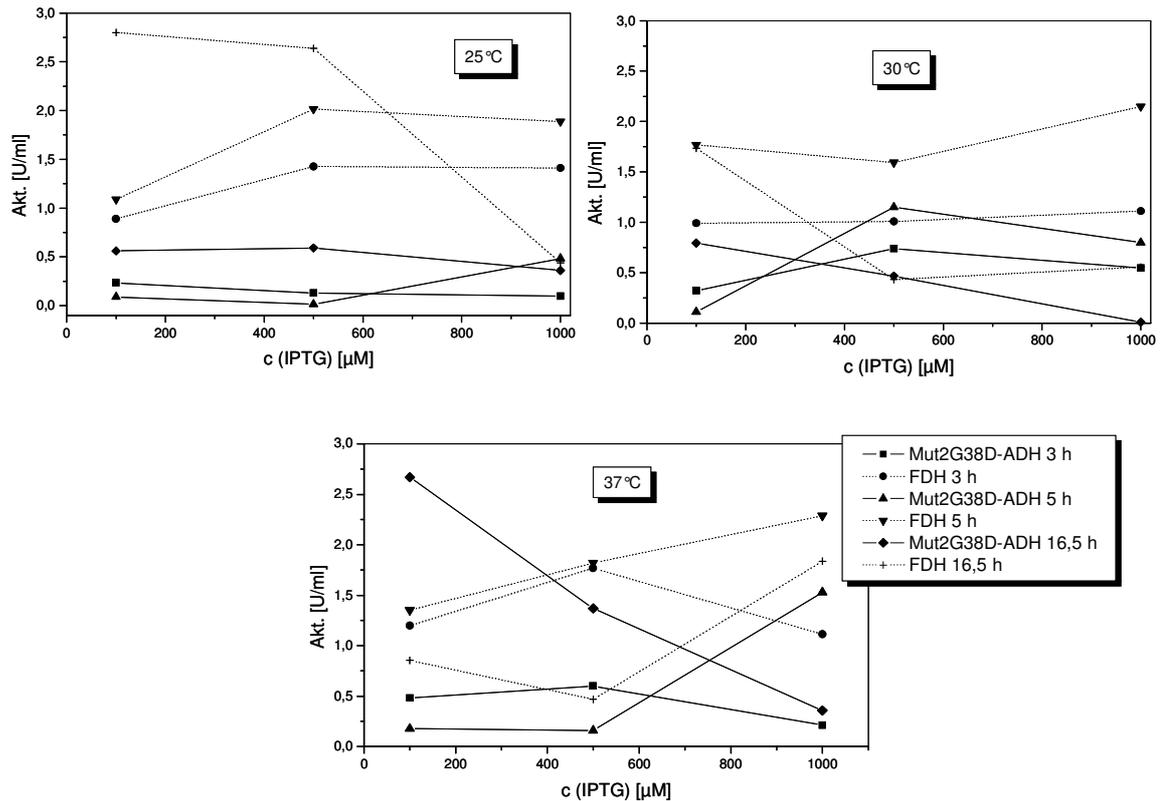


Abb. 107: Expressionsoptimierung von *E. coli* BL21(DE3)/pAW-10. Variiert wurden Induktionstemperatur, Induktionsdauer sowie Induktorkonzentration.

Die Abbildung zeigt, dass die Aktivitäten von Mut2G38D-ADH und FDH in der gleichen Größenordnung liegen. Mut2G38D-ADH zeigte nach Induktion mit 100 µM IPTG und Inkubation für 16,5 h bei 37°C mit Abstand die höchste Aktivität. Aus diesem Grund wurden diese Bedingungen für die Anzucht von *E. coli* BL21(DE3)/pAW-10-Zellen gewählt.

3.8.3 Trennung von Mut2G38D-ADH und FDH

Die Trennung von Mut2G38D-ADH und FDH gelang mittels Hydrophober Interaktionschromatographie mit Phenyl-650C (Tosoh) als Säulenmaterial. Nach Äquilibrieren der Säule mit 50 mM TEA-Puffer pH 7,0 + 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wurde *E. coli* BL21(DE3)/pAW-10-Rohextrakt aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit 50 mM TEA-Puffer pH 7,0. Während keine Bindung von Mut2G38D-ADH erfolgte, wurde die FDH vom Säulenmaterial gebunden und eluierte zu einem späteren Zeitpunkt. Die Aktivitäten von Mut2G38D-ADH und FDH vor und nach dem Reinigungsschritt sind in Tab. 42 und Tab. 43 dargestellt.

Tab. 42: FDH-Aktivität im Rohextrakt und nach Hydrophober Interaktionschromatographie aus *E. coli* BL21(DE3)/pAW-10.

Reinigungs-schritt	FDH			Reinigungs-faktor
	Akt. [U/ml]	Protein [mg/ml]	Akt. [U/mg]	
Rohextrakt	5,74	18,80	0,31	1,0
Phenyl-650C	0,79	0,39	2,02	6,5

Tab. 43: Aktivität der Mut2G38D-ADH im Rohextrakt und nach Hydrophober Interaktionschromatographie aus *E. coli* BL21(DE3)/pAW-10.

Reinigungs-schritt	Mut2G38D-ADH			Reinigungs-faktor
	Akt. [U/ml]	Protein [mg/ml]	Akt. [U/mg]	
Rohextrakt	1,98	18,80	0,11	1,0
Phenyl-650C	0,25	5,73	0,04	0,04

Aus Tab. 43 wird ersichtlich, dass die Aktivität der Mut2G38D-ADH sehr niedrig ist. Bereits nach dem ersten Aufreinigungsschritt konnte das Enzym kaum wiedergefunden werden. Aus diesem Grund wurden Experimente, die den Einsatz isolierter Enzyme erforderten, mit Rohextrakt aus *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP/Mut2G38D-ADH durchgeführt. Dieses System wurde von B. Riebel angefertigt und enthält Mut2G38D-ADH in pET-11a^[104].

3.8.4 Biochemische Charakterisierung von Mut2G38D-ADH

3.8.4.1 Ermittlung des Temperaturoptimums der Mut2G38D-ADH

Die Ermittlung des Temperaturoptimums von Mut2G38D-ADH erfolgte anhand photometrischer Standard-Aktivitätstests im Bereich von 5 bis 60 °C. Die Aktivitäten der Mut2G38D-ADH sind in Abb. 108 dargestellt.

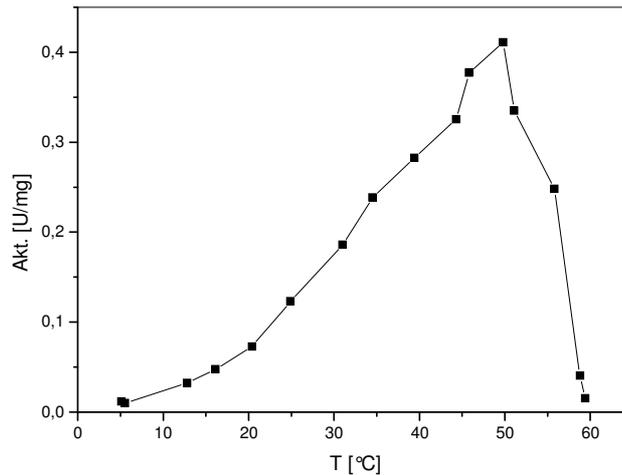


Abb. 108: Bestimmung des Temperaturoptimums von Mut2G38D-ADH. Die ADH-Aktivität wurde im Bereich von 5 bis 60 °C gemessen.

Der Abb. ist zu entnehmen, dass das Temperaturoptimum von Mut2G38D-ADH bei ca. 50 °C liegt.

3.8.4.2 Bestimmung des pH-Optimums der Mut2G38D-ADH

Die Ermittlung des pH-Optimums von Mut2G38D-ADH erfolgte mit den in Tab. 44 aufgeführten Puffern. In den einzelnen Ansätzen waren nur 2 mM Acetophenon enthalten.

Tab. 44: Verwendete Puffer zur Bestimmung des pH-Optimums von Mut2G38D-ADH.

pH-Bereich	Puffersubstanz [100 mM]
5,0-8,0	KPi
7,5-9,0	TEA
9,0-10,6	Glycin-NaOH

Die Aktivitäten von Mut2G38D-ADH wurden in Schritten von ca. 0,5 pH-Einheiten mit den entsprechenden Puffern gemessen.

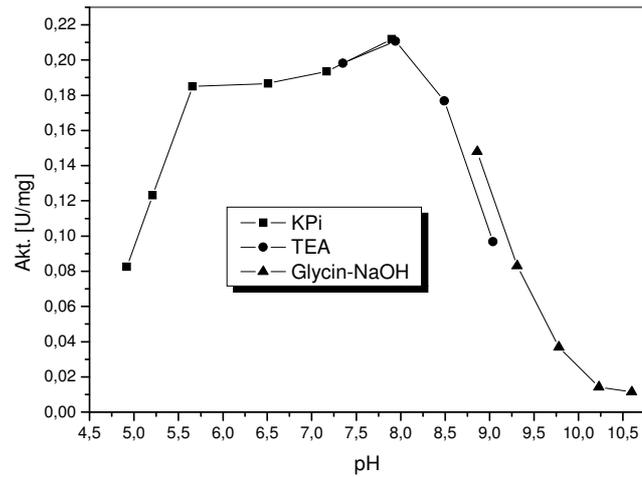


Abb. 109: Ermittlung des pH-Optimums von Mut2G38D-ADH mit den 100 mM Puffern KPi, TEA, Glycin-NaOH.

Wie Abb. 109 zeigt, liegt das pH-Optimum von Mut2G38D-ADH bei pH 7,9.

3.8.4.3 Ermittlung der kinetischen Konstanten von Mut2G38D-ADH

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten für Mut2G38D-ADH erfolgte in 100 mM KPi-Puffer pH 8,0 + 1 mM MgCl₂. Für den Cofaktor NADH wurde die Kinetik im Konzentrationsbereich von 0 bis 0,35 mM NADH aufgenommen (Abb. 110).

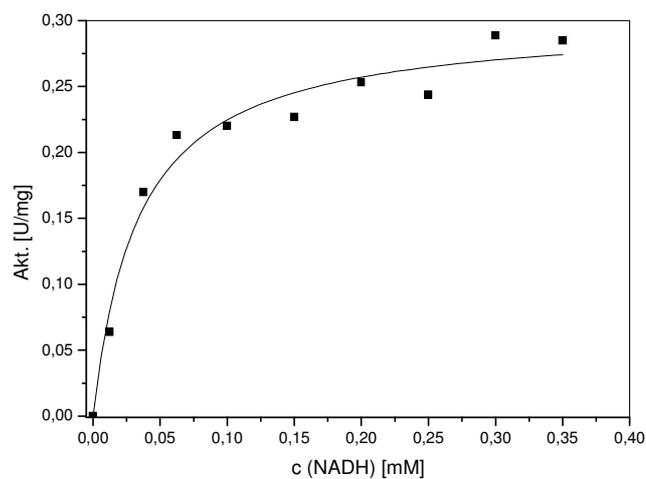


Abb. 110: Bestimmung des K_M -Wertes für NADH der Mut2G38D-ADH in 100 KPi-Puffer pH 8,0.

Aus Abb. 110 ergibt sich ein K_M -Wert von 0,03 mM sowie ein V_{max} -Wert von 0,30 U/mg. Außerdem wurde der K_M -Wert für Acetophenon bestimmt. Dieser liegt bei 0,002 mM und V_{max} bei 0,34 U/mg. Weitere kinetische Konstanten konnten aufgrund der geringen Aktivität von Mut2G38D-ADH nicht ermittelt werden.

3.8.5 Untersuchung von Kreuzreaktionen

Der Einfluss von Acetophenon und (*R*)-Phenylethanol auf die FDH-Aktivität wurde bereits in 3.4.4 besprochen.

Die mögliche Beeinflussung der Mut2G38D-ADH durch Formiat, dem Edukt der FDH-Reaktion, wurde durch Zusatz von 100 bzw. 200 mM Natriumformiat zum ADH-Standardassay untersucht. Die Aktivität der Mut2G38D-ADH unter diesen Bedingungen ist in Tab. 45 wiedergegeben.

Tab. 45: Aktivität der Mut2G38D-ADH in Anwesenheit von 100 bzw. 200 mM Natriumformiat zur Untersuchung von Kreuzreaktionen. Als Kontrolle wurde die Aktivität unter Standardbedingungen gemessen.

Assay	Akt. [U/ml]
Standard	8,38
+ 100 mM Natriumformiat	4,28
+ 100 mM Natriumformiat	4,21

Die Tabelle zeigt, dass Natriumformiat inhibierend auf die Mut2G38D-ADH wirkt. In Anwesenheit von Natriumformiat sinkt die Aktivität von Mut2G38D-ADH um ca. 49 %.

3.8.6 Umsetzungen im zellfreien System

Aufgrund der geringen Stabilität von Mut2G38D-ADH im verdünnten Zustand erfolgte keine Umsetzung von Acetophenon, 2,5-Hexandion und 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester.

3.8.7 Ganzzellumsetzungen mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-10

Trotz Variation der Reaktionsbedingungen wurden die drei eingesetzten Substrate Acetophenon, 2,5-Hexandion und 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester durch *E. coli*

BL21(DE3)/pAW-10-Zellen nicht umgesetzt. Eine Erklärung könnte die geringe Stabilität von Mut2G38D-ADH sein.

3.8.8 Zusammenfassung des Systems pAW-10

Beim System Mut2G38D-ADH-FDH könnten ebenso wie bei den anderen ADH-FDH-Systemen die Vorteile der FDH-Reaktion genutzt werden. Aufgrund der geringen Stabilität von Mut2G38D-ADH konnten die drei eingesetzten Substrate allerdings nicht umgesetzt werden.

Diskussion und Ausblick

1. „Zweite“ ADH aus *Lactobacillus kefir*

Die bisher unbekannte „zweite“ ADH aus *L. kefir* wurde aufgereinigt. Nach der Isolierung und Klonierung des Gens erfolgte die Expression in verschiedenen Expressionssystemen. Obwohl eine Vielzahl von Experimenten zur Optimierung durchgeführt wurde, konnte die ADH trotz Überexpression nicht aktiv exprimiert werden. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass das Protein nicht korrekt gefaltet wird. Weniger wahrscheinlich ist, dass das falsche Gen isoliert wurde. Da sich aber bei der Aktivitätsfärbung nur eine Bande im Gel gefärbt hat und da eine minimale Umsetzung festgestellt werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass das richtige Gen isoliert wurde. Um diese Tatsache zu bestätigen, müsste das Enzym bis zur Homogenität aufgereinigt werden und erneut N-terminal ansequenziert werden. Bei Bestätigung der Sequenz könnte das Gen in einem anderen Organismus exprimiert werden, z. B. in *Bacillus* oder *Lactobacillus*. Wenn sich eine andere Sequenz ergeben würde, könnte das entsprechende Gen isoliert, kloniert und exprimiert werden. Aus Zeitgründen wurden diese Arbeiten allerdings nicht fortgesetzt.

2. Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren

Auf der Basis der ADHs aus *L. kefir* und *L. brevis* wurden verschiedene Ganzzellbiokatalysatoren entwickelt. Bei Dehydrogenase-katalysierten Reaktionen muss neben dem primären reduzierenden Enzym auch die Regenerierung des Cofaktors berücksichtigt werden. Ein besonders einfaches System zur Cofaktorregenerierung stellt die substratgekoppelte Regenerierung mit Isopropanol dar. Das Edukt Isopropanol ist kostengünstig, Rest-Edukt und Produkt Aceton sind bei der Produktaufarbeitung leicht zu entfernen. Die substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung mit Isopropanol ist eine aus der Literatur bekannte Methode^[40,48], allerdings hat diese Methode einige Nachteile. Da sowohl Keton-Reduktion als auch Isopropanol-Oxidation mit demselben Enzym durchgeführt werden, ist zu erwarten, dass es aufgrund der hohen Isopropanol-Konzentrationen zu einer kompetitiven Inhibierung der Reduktion kommt. Zudem handelt es sich bei der Oxidation von Isopropanol um eine Gleichgewichtsreaktion, die nach dem Massenwirkungsgesetz nur bei sehr hohen Konzentrationen an Isopropanol zum vollständigen Umsatz führt. Die jeweilige Gleichgewichtslage hängt zwar von den kinetischen Daten der Einzelreaktionen ab, ein vollständiger Umsatz ist aber prinzipiell nur schwer zu erreichen. Eine verfahrens-

technische Lösung wäre, das Produkt Aceton *in situ* zu entfernen. Diese selektive Abtrennung von Aceton ist bisher allerdings nicht publiziert. Die Konzentration an Isopropanol kann zudem nicht beliebig erhöht werden, da Alkohole auf viele Enzyme deaktivierend wirken.

Auch bei der (*R*)-spezifischen ADH aus *L. kefir* bestätigt sich diese Limitierung des unvollständigen Umsatzes. Ein Ansatz mit 10 mM Acetophenon führt selbst beim hohen Überschuss von 5 M Isopropanol nur zu 84 % Ausbeute (s. Ergebnisse 3.). Höhere Eduktkonzentrationen sollten zu noch geringeren Ausbeuten führen. Eine solche mit Edukt verunreinigte Produktlösung hat einen beträchtlichen Mehraufwand und damit höhere Kosten bei der Produktisolierung und -Reinigung zur Folge. Unterschiede in den physikalischen Eigenschaften wie den Siedepunkten, die für eine Reinigung ausgenutzt werden könnten, sind häufig relativ gering, so dass ein größerer technischer Aufwand erforderlich ist.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden daher enzymatische Cofaktorregenerierungs-Systeme eingesetzt. Es wurden vor allem solche Enzyme für die Regenerierung der verbrauchten Cofaktoren verwendet, die irreversible Reaktionen katalysieren. Für die Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren wurde die NADP-abhängige ADH aus *L. kefir* mit NADPH-regenerierenden Enzymen gekoppelt. Die geringe NAD-Nebenaktivität der ADHs aus *L. kefir* und *L. brevis* wurde ausgenutzt, um Ganzzellsysteme zu konstruieren, in denen ADH und NADH-regenerierende Enzyme coexprimiert wurden. Die in dieser Arbeit verwendeten Cofaktor-regenerierenden Enzyme und ihre katalysierten Reaktionen sind in Abb. 111 dargestellt.

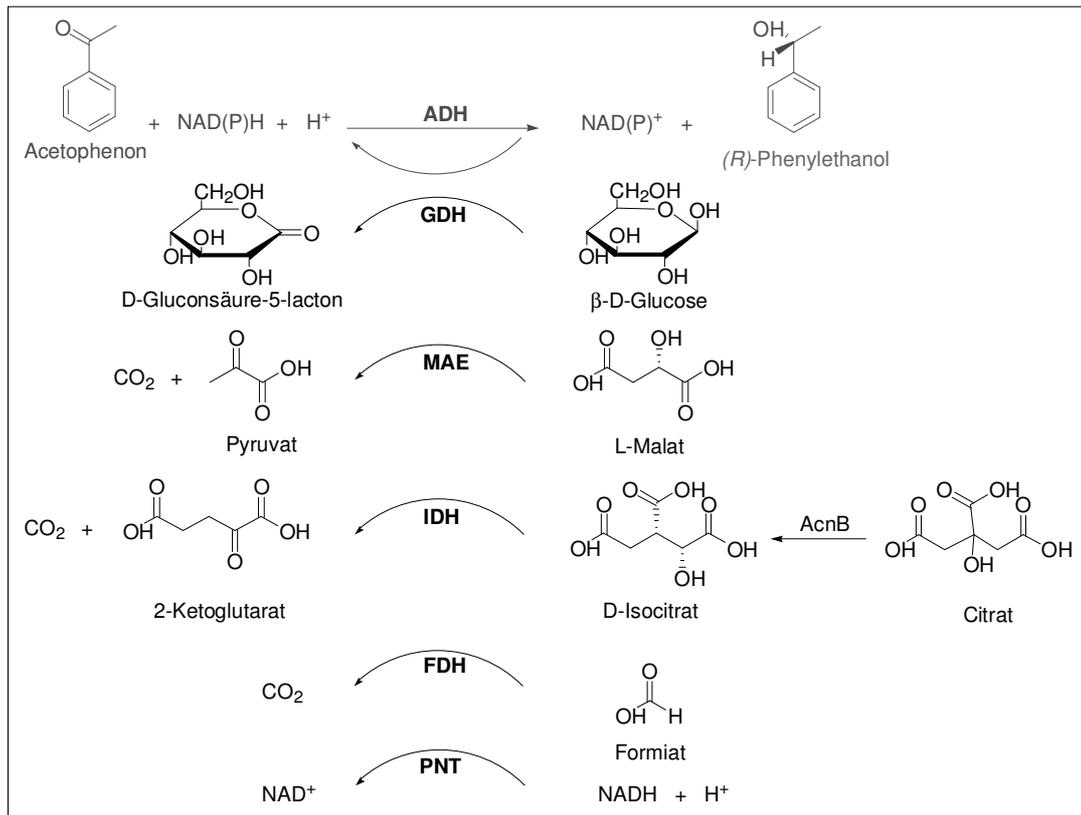


Abb. 111: Überblick über die Enzyme, die für die Regenerierung von NAD(P)H in Ganzzellbiokatalysatoren eingesetzt wurden. Die von der vorwiegend NADP-abhängigen ADH katalysierte asymmetrische Reduktion ist in grau dargestellt, die jeweils gekoppelte Regenerierungsreaktion, die in derselben Zelle abläuft, ist in schwarz dargestellt.

Eine Übersicht über die im Laufe der vorliegenden Arbeit entwickelten Plasmide, welche in Ganzzellbiotransformationen eingesetzt wurden, gibt Tab. 46.

Tab. 46: Übersicht über die im Laufe der Arbeit entwickelten Plasmide, die in Ganzzellbiotransformationen eingesetzt wurden.

Bezeichnung des Systems	Enthaltene Gene
pAW-3	LK-ADH + GDH
pAW-4	GDH + LK-ADH
pAW-5	LK-ADH + MAE
pAW-6	LK-ADH + IDH
pAW-7	LB-ADH + FDH
pAW-8	LK-ADH + FDH
AW-9	LK-ADH + FDH + PNT
pAW-10	Mut2G38D-ADH + FDH
AW-11	AcnB, LK-ADH + IDH

Die entwickelten Systeme basieren alle auf pET-Vektoren und wurden in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen exprimiert.

Ansätze mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-7- und pAW-8-Zellen, bei denen nur in Anwesenheit von NADP Umsetzung erfolgte, wurde bei den anschließenden Diskussionspunkten nicht berücksichtigt. In diesen Fällen muss davon ausgegangen werden, dass die Cofaktorregenerierung über andere, in den Zellen vorhandene Enzyme ablief und nicht, wie beabsichtigt, die NAD-Nebenaktivität der ADHs genutzt wurde (s. Ergebnisse 3.5.6. und 3.6.6.).

Mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-10-Zellen bzw. mit dem zellfreien System Mut2G38D-ADH-FDH konnten keine Umsetzungen von Acetophenon, 2,5-Hexandion und 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester erreicht werden (3.8.6, 3.8.7). Aus diesem Grund wird dieses System bei einigen Diskussionspunkten nicht erwähnt.

2.1 Einfluss der Zellpermeabilisierung auf die Ganzzellbiotransformationen

Um die Diffusion der ein- und austretenden Substanzen bei Ganzzellumsetzungen zu erleichtern, wurden Zellen vor den Biotransformationen mit Toluol behandelt. Zum Vergleich wurden unbehandelte sowie mit Toluol behandelte Zellen unter ansonsten gleichen Bedingungen in den Umsetzungen eingesetzt. Tab. 47 gibt die spezifischen Zellaktivitäten der verschiedenen Systeme wider, deren Berechnung auf den Umsetzungen von Acetophenon, 2,5-Hexandion und 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester nach 2 h Reaktionszeit basieren. Alle Ansätze enthielten 1 mM NADP bzw. NAD.

Tab. 47: Spezifische Zellaktivitäten der verschiedenen Systeme bei den Umsetzungen von Acetophenon, 2,5-Hexandion und 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit und ohne Permeabilisierung der Zellmembran. Alle Ansätze enthielten 1 mM des entsprechenden Cofaktors. Die Berechnung der Werte erfolgte auf der Grundlage der Aktivitäten nach 2 h Reaktionszeit.

<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/	Spezifische Zellaktivität [U/g ZFM] bei der Umsetzung von					
	Acetophenon		2,5-Hexandion		6-Chlor-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester	
	+ Toluol	- Toluol	+ Toluol	- Toluol	+ Toluol	- Toluol
pAW-3	166,67	166,67	99,90	40,68	33,42	32,16
pAW-4	166,67	166,67	37,39	21,89	24,12	20,83
pAW-5	16,67	16,67	22,61	25,00	14,25	14,50
pAW-6	166,67	166,67	15,83	14,15	13,70	11,98
AW-11	3,44	16,67	0	23,46	0	1,58
pAW-8	0,37	0,38	0	0,31	0	0
AW-9	2,66	0	0	0	0	0

Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, liegen die spezifischen Zellaktivitäten der einzelnen Systeme für die jeweiligen Substrate in den meisten Fällen mit und ohne Toluol-Behandlung in der gleichen Größenordnung. Beim Stamm *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3 allerdings ist die Umsetzung von 2,5-Hexandion nach Permeabilisierung der Zellmembran wesentlich besser als ohne Behandlung der Zellen mit Toluol. Deutliche Unterschiede wurden bei *E. coli* BL21(DE3)/AW-11-Zellen festgestellt. Umsetzungen von Acetophenon mit permeabilisierten *E. coli* BL21(DE3)/AW-11-Zellen lieferten nur sehr schlechte Ausbeuten, während 2,5-Hexandion und 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester überhaupt nicht reduziert wurden. Toluol scheint auf AcnB inhibierend zu wirken. Generell kann gesagt werden, dass die Umsetzungen der drei Substrate durch die Permeabilisierung der Zellen mit Toluol nicht beeinflusst wird, mit Ausnahme des AW-11-Systems. Vor den Umsetzungen waren die Zellen eingefroren. Vermutlich wurde die Zellmembran durch das Einfrieren schon so weit permeabilisiert, dass die einzelnen Stoffe leichter von der Zelle aufgenommen werden konnten.

2.2 Einfluss von zugesetzten Cofaktoren auf die Ganzzellbiotransformationen

Die Durchführung von Ganzzellbiotransformationen erfolgte zum Teil mit Zusatz von 1 mM NADP, während dem anderen Teil der Ansätze kein Cofaktor zugesetzt wurde. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob die zellinterne Cofaktormenge ausreicht, um effiziente Ganzzellumsetzungen durchzuführen. Die folgende Tab. 48 gibt einen Überblick über die spezifischen Zellaktivitäten. Diese Werte wurden aus den Aktivitäten der Ansätze, die die NADP-Aktivität der ADH nutzten, nach 2 h Reaktionszeit mit permeabilisierten Zellen errechnet. Die Werte für das System AW-11 wurden aus den Umsetzungen mit nicht-permeabilisierten Zellen errechnet. Aufgeführt sind die Zellaktivitäten aus den Ansätzen, denen kein Cofaktor zugesetzt wurde und diejenigen, die 1 mM NADP enthielten.

Tab. 48: Übersicht über die spezifischen Zellaktivitäten, die bei Ganzzellbiotransformationen der Systeme, die auf der NADP-Aktivität der ADH beruhen, mit und ohne NADP-Zusatz erzielt wurden. Die Werte wurden aus den Aktivitäten der Ansätze mit permeabilisierten Zellen nach 2 h Reaktionszeit berechnet. (Ausnahme: AW-11-Umsetzungen mit nicht-permeabilisierten Zellen).

<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/	Spezifische Zellaktivität [U/g ZFM] bei der Umsetzung von					
	Acetophenon		2,5-Hexandion		6-Chlor-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester	
	- NADP	+ NADP	- NADP	+ NADP	- NADP	+ NADP
pAW-3	19,85	166,67	0	99,90	27,30	33,42
pAW-4	10,85	166,67	0	21,89	3,42	24,12
pAW-5	9,99	16,67	0	22,61	0	14,25
pAW-6	10,47	166,67	0	15,83	0	13,70
AW-11	6,80	16,67	0	1,58	0	23,46
AW-9	0	2,66	0	0	0	0

Tab. 48 zeigt, dass der Zusatz von NADP einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbeuten hat. In vielen Fällen wurde überhaupt keine Reduktion der Ketone erzielt, wenn den Ansätzen kein Cofaktor zugesetzt wurde. Beim Betrachten dieser Ergebnisse fällt auf, dass die zellinterne Cofaktormenge nicht ausreicht, um effiziente Ganzzellumsetzungen durchzuführen. Unter normalen Wachstumsbedingungen enthalten *E. coli*-Zellen ungefähr 5,3 nmol/mg bzw. 3,6 nmol/mg Trockengewicht NAD bzw. NADP^[105]. Dies bedeutet, dass die intrazellulären Konzentrationen 1 mM NAD(H) bzw. 0,4 mM NADP(H) betragen^[106]. Der K_M -Wert der LK-ADH für NADPH beträgt 0,14 mM, während die K_M -Werte der Cofaktorregenerierenden Enzyme für NADP bzw. NAD zwischen 0,02 und 0,09 mM liegen. Aus diesem Grund können optimale Aktivitäten der Enzyme kaum erreicht werden. Der Zusatz von Cofaktoren zur Erhöhung des zellinternen Cofaktorspiegels ist deshalb unerlässlich für die Durchführung effizienter Ganzzellbiotransformationen. Um den Zusatz der teuren Cofaktoren zu umgehen, könnte bei den Umsetzungen eine größere Zellmenge eingesetzt werden. Die Umsetzungen von Acetophenon und 2,5-Hexandion durch *E. coli* BL21 (DE3)/pAW-3-Zellen (s. Ergebnisse 3.1.11.1) beispielsweise zeigten, dass mit 5 mg Zellen pro ml Ansatz bei der ersten Probennahme nach 10 min Reaktionszeit auch ohne NADP-Zusatz die gesamte Menge an entsprechendem Keton reduziert worden war, während die Umsetzungen mit 0,5 mg Zellen pro ml Ansatz ohne NADP-Zusatz deutlich schlechter waren.

2.3 Vergleich der verschiedenen Systeme

Die verschiedenen Ganzzellbiokatalysatoren wurden miteinander verglichen, indem untersucht wurde, in welchem Verhältnis die unterschiedlichen Konstrukte die drei verwendeten Substrate umsetzen und mit welcher Ausbeute die Substrate von den einzelnen Konstrukten reduziert werden.

2.3.1 Vergleich der Systeme anhand der Umsetzung verschiedener Substrate

Um zu vergleichen, in welchem Verhältnis die verschiedenen Konstrukte die drei Substrate umsetzen, wurden die relativen Aktivitäten ausgerechnet und tabellarisch gegenübergestellt (Tab. 49). Die Aktivitäten, die bei der Umsetzung von Acetophenon erreicht wurden, wurden gleich 100 % gesetzt.

Tab. 49: Übersicht über die Reduktion der einzelnen Substrate durch die verschiedenen Systeme. Dargestellt die relativen Aktivitäten sind für jedes Konstrukt. (Aktivitäten bei der Umsetzung von Acetophenon = 100 %).

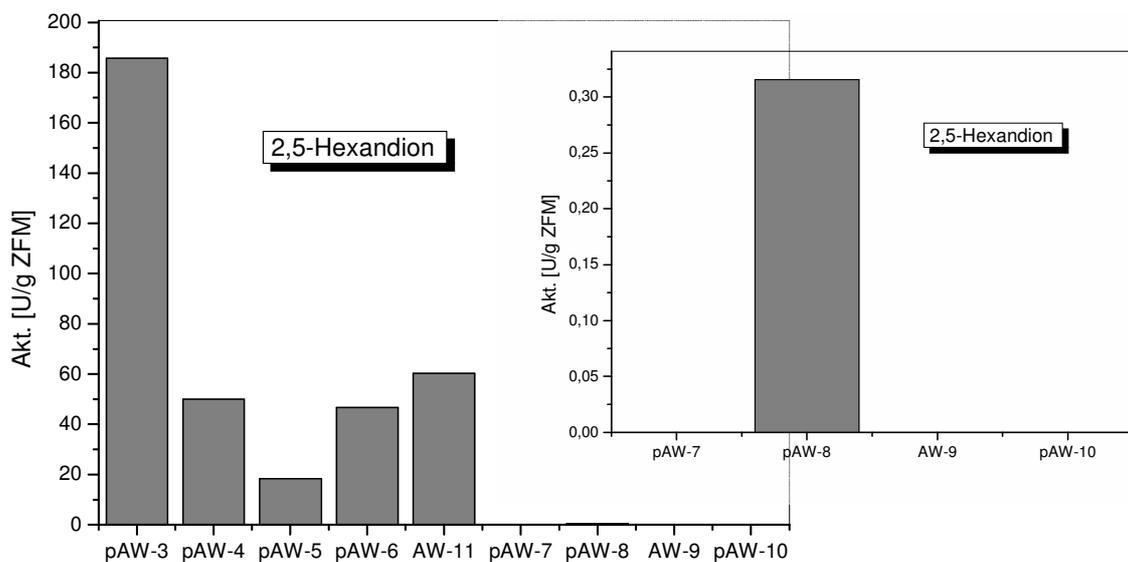
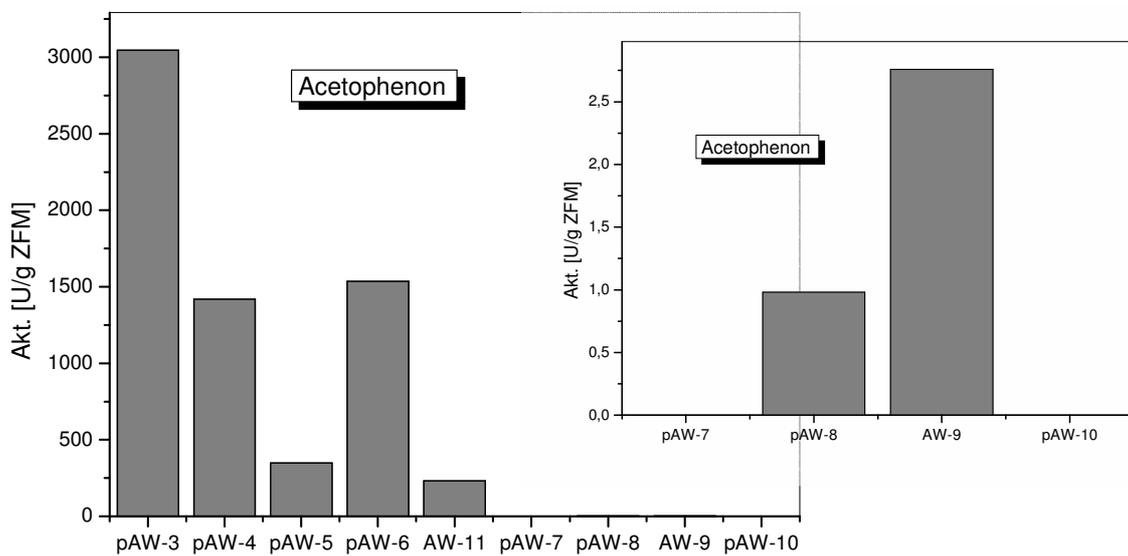
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/	Reduktion von		
	Acetophenon [%]	2,5-Hexandion [%]	6-Chlor-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester [%]
pAW-3	100	6,10	11,36
pAW-4	100	3,52	15,56
pAW-5	100	5,17	31,32
pAW-6	100	3,06	8,73
AW-11	100	25,77	4,00
pAW-8	100	33,88	0
AW-9	100	0	0

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass Acetophenon durch alle Konstrukte am besten umgesetzt wird. Die Systeme pAW-8 und AW-11 setzen 2,5-Hexandion besser um als 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass FDH und AcnB durch 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester inhibiert werden. Im Gegensatz dazu setzen alle anderen Systeme 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit höheren Ausbeuten um als 2,5-Hexandion. Der Stamm *E. coli* BL21(DE3)/AW-9 setzt von den drei ausgewählten Substraten nur Acetophenon um. In weiteren Arbeiten könnten

weitere ADH-Substrate anhand ihrer Umsetzung durch die verschiedenen Systeme untersucht werden.

2.3.2 Vergleich der Reduktionsaktivitäten der verschiedenen Ganzzellsysteme

Die verschiedenen Ganzzellsysteme wurden anhand der Reduktion der ausgewählten Substrate verglichen. Die spezifischen Zellaktivitäten der einzelnen Systeme für die Reduktion der drei Substrate sind in Abb. 112 dargestellt.



(Fortsetzung nächste Seite)

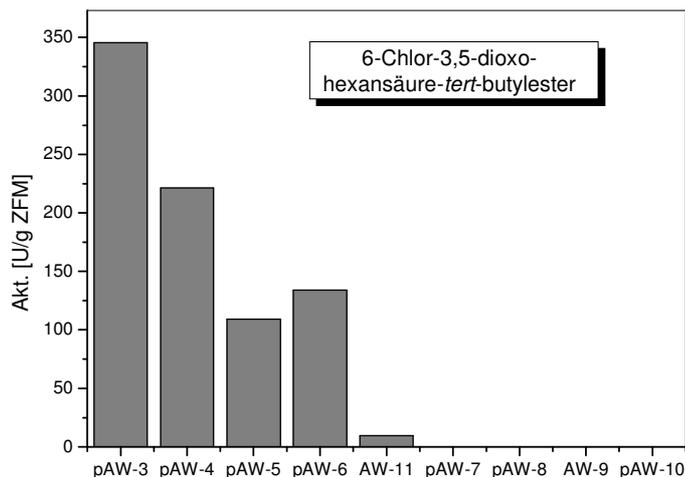


Abb. 112: Spezifische Zellaktivitäten bei den Umsetzungen von 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion und 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit den verschiedenen Stämme *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3 bis AW-11. Für eine übersichtlichere Darstellung wurden einzelne Bereiche vergrößert dargestellt.

Die Abbildung zeigt, dass pAW-3 eindeutig das beste System ist. Es setzt alle drei ausgewählten Substrate mit Abstand am besten um. Das Konstrukt pAW-4, das ebenfalls ADH und GDH, aber in umgekehrter Reihenfolge auf dem Plasmid enthält, liefert wesentlich niedrigere Ausbeuten. Dieses Phänomen macht deutlich, dass das Verhältnis an exprimierten Enzymen eine wichtige Rolle spielt. Das im Vorversuch ermittelte optimale Enzymverhältnis ADH : GDH = 3 : 1 wurde hiermit bestätigt.

Ein weiteres Kriterium, das im Rahmen dieser Arbeit nicht systematisch untersucht wurde, betrifft die Umsetzung höherer Substratkonzentrationen. Aus der Literatur ist allerdings bekannt, dass Reaktionslösungen bei Verwendung von D-Glucose/GDH aufgrund der Bildung des Hydrolyseprodukts D-Gluconsäure stark angesäuert werden. Bereits in einer 1 %igen wässrigen D-Gluconsäure-5-lacton-Lösung fällt der pH-Wert innerhalb von 30 min von 6,6 nach 3,0^[107]. Dieser Nachteil entfällt bei den Konstrukten pAW-5 (ADH-MAE), pAW-6 (ADH-IDH) und AW-11 (ADH-AcnB-IDH). Beim System pAW-5 entsteht im Verlauf der MAE-Reaktion aus der Dicarbonsäure Malat die Monocarbonsäure Pyruvat, während die IDH in den Systemen pAW-6 und AW-11 die Reaktion von der Tricarbonsäure D-Isocitrat zur Dicarbonsäure 2-Ketoglutarat katalysiert. Bei beiden Reaktionen entsteht aus einer starken Säure wiederum eine starke Säure, was keinen wesentlichen Einfluss auf den pH-Wert der abgepufferten Lösung hat. Das Konstrukt pAW-6 liefert ungefähr gleiche Ausbeuten wie pAW-4. pAW-6 hat allerdings den großen Nachteil, dass es aufgrund des hohen Preises von Isocitrat, 246,40 € pro g D_S-(+)-*threo*-Isocitronensäure Monokaliumsalz (Fluka), aus ökonomischen Gründen nicht für Umsetzungen im größeren

Maßstab eingesetzt werden kann. Aus diesem Grund wurde die Aconitase, welche die Reaktion von Citrat zu Isocitrat katalysiert, in das pAW-6-System integriert. Mit diesem neuen Konstrukt AW-11 können aufgrund des niedrigen Preises von Citrat, 28,80 € pro kg Citronensäure Monohydrat (Fluka), Biotransformationen auch im großen Maßstab durchgeführt werden.

Alle Systeme, die die FDH enthalten, lieferten nur sehr schlechte Ausbeuten. Mit dem System pAW-10 ist überhaupt keine Umsetzung der drei eingesetzten Ketone möglich. Dies beruht auf der geringen Stabilität von Mut2G38D-ADH. Während das Konstrukt pAW-7, das LB-ADH und FDH enthält, keines der ausgewählten Substrate ohne NADP-Zusatz reduzierte, setzte pAW-8, das die LK-ADH neben der FDH enthält, zwar Acetophenon und 2,5-Hexandion um, allerdings im Vergleich zu den oben besprochenen Systemen sehr schlecht. *E. coli* BL21(DE3)/AW-9 mit LK-ADH, FDH und PNT reduzierte zwar von den ausgewählten Substraten nur Acetophenon, aber beim Vergleich mit pAW-8, das ausschließlich LK-ADH und FDH enthält, fällt deutlich auf, dass die in AW-9 integrierte Transhydrogenase den Transfer von Redoxäquivalenten zwischen NADP und NADH katalysiert und somit im Gegensatz zu pAW-8 die NADP-Abhängigkeit der LK-ADH ausgenutzt wird. Acetophenon wird hier mit deutlich höheren Ausbeuten umgesetzt als beim Einsatz des pAW-8-Konstrukts. Dies zeigt, dass mit den Systemen, die auf der NADP-Abhängigkeit der ADHs beruhen, deutlich effizientere Umsetzungen durchgeführt werden können als mit den Konstrukten pAW-7 und pAW-8, die auf der geringen NAD-Nebenaktivität der ADHs aus *L. kefir* und *L. brevis* basieren.

Für die schwache Reduktionskapazität der FDH-gekoppelten Systeme gibt es zumindest zwei Gründe. Beim Versuch, die NAD-Nebenaktivität des eigentlich NADP-abhängigen Enzyms auszunutzen, kann zwar die höhere intrazelluläre Konzentration von NAD ausgenutzt werden, dafür ist die Affinität des Enzyms zu diesem Cofaktor, der K_M -Wert, allerdings deutlich schlechter. Wird dagegen versucht, das durch die FDH gebildete NADH mit Hilfe der Transhydrogenase als NADPH nutzbar zu machen, ist zu vermuten, dass durch diese zwischengeschaltete Gleichgewichtsreaktion zu geringe Konzentrationen an NADPH für die ADH zur Verfügung stehen. Bei Kenntnis aller kinetischen Daten könnte dies berechnet werden, allerdings sind diese notwendigen Daten für die membranständige Transhydrogenase nicht verfügbar.

2.3.3 Vergleich der Systeme anhand der Aktivitäten der einzelnen Enzyme

Um die Expression der verschiedenen Enzyme in den einzelnen Konstrukten vergleichen zu können, wurden die spezifischen Aktivitäten der Enzyme in den Rohextrakten aus *E. coli* BL21(DE3)-Zellen gegenübergestellt (Tab. 50). Die ADH-Aktivitäten in den Konstrukten pAW-7, pAW-8 und pAW-10 und wurden mit NADH als Cofaktor gemessen, da hier die NAD-Nebenaktivität der ADH ausgenutzt werden sollte. gegenüberstellen

Tab. 50: Übersicht über die Enzymaktivitäten in den Rohextrakten der einzelnen Konstrukte in *E. coli* BL21(DE3). Die ADH-Aktivitäten von pAW-7, pAW-8 und pAW-10 und wurden mit NADH als Cofaktor bestimmt.

<i>E. coli</i> BL21(DE3)/	Akt. ADH [U/mg]	Akt. regenerierendes Enzym [U/mg]
pAW-3	41,60	12,90
pAW-4	13,77	58,01
pAW-5	1,38	11,16
pAW-6	8,51	136,24
AW-11	1,71	AcnB: 2,79; IDH: 24,02
pAW-7	0,01 (NADH)	0,31
pAW-8	0,12 (NADH)	0,21
AW-9	2,21	0,40 (FDH)
pAW-10	0,11 (NADH)	0,31

Die Tabelle zeigt deutliche Unterschiede in der Aktivität der einzelnen Enzyme. Beim Betrachten der ADH-Aktivitäten fällt auf, dass diese im Konstrukt pAW-3 mit Abstand am höchsten ist. Mit diesem System wurden auch die besten Umsatzraten erreicht. In den Systemen pAW-4 und pAW-6, bei denen die Umsatzraten in der gleichen Größenordnung lagen, sind auch die ADH-Aktivitäten ähnlich. In den Konstrukten pAW-5 und AW-11 wird die ADH deutlich schlechter exprimiert, was auch an den entsprechenden spezifischen Zellaktivitäten zu sehen ist.

Die Systeme pAW-7, pAW-8 und pAW-10, die neben der FDH unterschiedliche ADHs enthalten, zeigen relativ niedrige ADH-Aktivitäten. Mit diesen Konstrukten konnten auch in den Ganzzellbiotransformationen keine guten Ergebnisse erzielt werden. Eine Ausnahme bildet der Stamm *E. coli* BL21(DE3)/AW-9. Hier ist die ADH-Aktivität verhältnismäßig hoch im Vergleich zu den Umsatzraten. Die Funktionsweise dieses Systems ist allerdings relativ kompliziert, da die PNT die verbrauchten Cofaktoren aus zwei Reaktionen gleichzeitig regenerieren muss. Dies ist vermutlich der Grund für die vergleichbar schlechten Umsetzungen mit AW-9. Die Aktivität von Mut2G38D-ADH liegt in der gleichen Größen-

ordnung wie der der ADH in pAW-8. Aufgrund der geringen Stabilität von Mut2G38D-ADH konnten die eingesetzten Substrate allerdings nicht umgesetzt werden.

Der Vergleich der ADH-Aktivitäten in den Rohextrakten der einzelnen Systeme in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen zeigt demnach, dass die mit den einzelnen Systemen erzielten Umsatzraten mit den entsprechenden ADH-Aktivitäten korrelieren. Zwischen den Aktivitäten der regenerierenden Enzyme und den Umsatzraten besteht dagegen kein Zusammenhang. Die IDH weist mit Abstand die höchste Aktivität auf, während das System pAW-6 keine höheren Zellaktivitäten zeigt als die anderen Konstrukte.

Außerdem zeigt diese Tabelle, dass die ADH im Vektor pET-21a(+), auf dem die Systeme pAW-3 und pAW-4 basieren, stärker exprimiert wird als in pETDuet-1 und pACYC-Duet-1, die den anderen Konstrukten zugrunde liegen. Alle verwendeten Vektoren enthalten T7-Promotoren. Während pET-21a(+) nur einen Promotor enthält, sind in pETDuet-1 und pACYC-Duet-1 jeweils zwei Promotoren vorhanden. Alle verwendeten Vektoren enthalten jeweils eine Terminatorsequenz. Die um das Dreifache höhere Expression des Gens, das direkt hinter dem Promotor in pET-21a(+) sitzt, kann durch vorzeitigen Abbruch der Transkription erklärt werden, wodurch das zweite Gen nicht vollständig transkribiert wird und somit das erste Gen stärker exprimiert wird. Bei Verwendung der Vektoren pETDuet-1 und pACYC-Duet-1, die jeweils zwei T7-Promotoren, aber nur einen Terminator enthalten, kann die RNA-Polymerase an beiden Promotoren binden. Bindet die RNA-Polymerase an den zweiten Promotor, erfolgt die Transkription des zweiten Gens. Bei Bindung der RNA-Polymerase an den ersten Promotor findet dagegen die Transkription beider Gene statt, da zwischen den beiden Genen keine Terminatorsequenz liegt. Somit dürfte bei Verwendung dieser beiden Vektoren das zweite Gen stärker exprimiert werden. In allen entwickelten Konstrukten, die auf pETDuet-1 bzw. pACYC-Duet-1 basieren, sitzt die ADH hinter dem ersten Promotor. Beim Betrachten der ADH-Aktivitäten und der angefertigten SDS-Gele fällt auf, dass die ADH vergleichsweise schlecht exprimiert wird. Dies könnte an der oben besprochenen relativ schlechten Expression des Gens in der ersten multiplen Klonierungsstelle dieser Vektoren liegen. Da festgestellt wurde, dass die ADH-Aktivitäten mit den Umsatzraten der einzelnen Systeme korrelieren, sollte die ADH besser in der zweiten multiplen Klonierungsstelle der oben besprochenen Vektoren sitzen, um eine möglichst hohe ADH-Aktivität und dadurch erhöhte Umsatzraten zu erzielen. Aus diesem Grund könnten in weiteren Arbeiten Konstrukte entwickelt werden, in denen sich das regenerierende Enzym in der ersten und die ADH in der zweiten multiplen Klonierungsstelle der oben genannten Vektoren befindet.

2.4 Beurteilung der Qualität der Ganzzellumsetzungen

Um abzuschätzen, wie gut die Ausnutzung der intrazellulären Enzymaktivität ist, wurden die berechneten Zellaktivitäten der einzelnen Systeme den in den entsprechenden Stämmen enthaltenen Enzymaktivitäten gegenübergestellt (Tab. 51).

Tab. 51: Vergleich der Zellaktivitäten bei der Reduktion von Acetophenon mit den Enzymaktivitäten pro g Zellen (Feuchtgewicht) für die einzelnen Systeme.

<i>E. coli</i> BL21 (DE3)/	Zellaktivität [$\mu\text{mol Produkt/min} \times \text{g Zellen}$] \triangleq [U/g Zellen]	Enzymaktivitäten pro g Zellen [U]	
pAW-3	3047,16	ADH: 3801,85	GDH: 2199,65
pAW-4	1419,83	ADH: 453,40	GDH: 3870,93
pAW-5	347,98	ADH: 87,15	MAE: 1010,00
pAW-6	1535,10	ADH: 903,80	IDH: 8706,00
AW-11	233,76	ADH: 163,74	IDH: 2305,60 AcnB: 268,07
pAW-8	0,76	ADH _{NAD} : 11,23	FDH: 9,77

Beim Betrachten von Tab. 51 fällt auf, dass die Zellaktivitäten der Stämme, mit denen effiziente Umsetzungen möglich sind (*E. coli* BL21(DE3)/pAW-3, pAW-4, pAW-5, pAW-6 und AW-11), in der gleichen Größenordnung liegen wie die entsprechenden ADH-Aktivitäten bzw. sogar um ein Vielfaches höher sind. Höhere Zellaktivitäten als entsprechende ADH-Aktivitäten können möglich sein, da beim Zellaufschluss Verluste auftreten können. Die Gegenüberstellung der Aktivitäten dieser „effizienten“ Systeme zeigt jedoch, dass die intrazellulären Enzymaktivitäten optimal ausgenutzt werden. Dies beweist die hohe Qualität der meisten entwickelten Ganzzellbiokatalysatoren. Das auf der NAD-Nebenaktivität der ADH beruhende System *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8 weist allerdings eine deutlich niedrigere Zellaktivität als ADH-Aktivität auf. Aufgrund der niedrigen NAD-Nebenaktivität der ADH und des relativ hohen K_M -Wertes für NAD sind mit diesem System, ebenso mit pAW-7, keine effizienten Umsetzungen möglich.

2.5 Vergleich der Ganzzellumsetzungen mit den Umsetzungen im zellfreien System

Umsetzungen im zellfreien System wurden mit dem zuvor ermittelten optimalen Enzymverhältnis an ADH und entsprechendem regenerierendem Enzym durchgeführt. Die Umsetzungen enthielten ebenso wie ein Teil der Ganzzellumsetzungen 1 mM an ent-

sprechendem Cofaktor. Die Reaktionsbedingungen und Konzentrationen an eingesetzten Stoffen waren identisch bei entsprechenden Ganzzellumsetzungen und Umsetzungen im zellfreien System. Beim Vergleich der zellfreien Umsetzungen fällt auf, dass die Umsetzungen mit MAE als regenerierendem Enzym die höchsten Ausbeuten lieferten, gefolgt von den Umsetzungen mit GDH und IDH als regenerierenden Enzymen. Die Umsetzungen mit der FDH als regenerierendem Enzym waren zwar schlechter als alle anderen, die Aktivitäten lagen aber in der gleichen Größenordnung.

Bei den Umsetzungen im zellfreien System ist die Aktivitätsverteilung demnach anders als bei den entsprechenden Ganzzellbiotransformationen. Grund hierfür ist sicherlich die unterschiedliche Expressionsleistung der einzelnen Stämme. Während bei den Umsetzungen in zellfreien Systemen definierte Bedingungen vorherrschen, da bekannt ist, wie viele U an entsprechendem Enzym im Reaktionsgemisch vorliegen, kann dies bei den Ganzzellumsetzungen nur aufgrund der Enzymaktivitäten im Rohextrakt von parallel aufgeschlossenen Zellen abgeschätzt werden. Die Enzymverhältnisse, die in den einzelnen Stämmen vorherrschen, entsprechen zumeist nicht den ermittelten optimalen Enzymverhältnissen (Tab. 52).

Tab. 52: Optimale Enzymverhältnisse von ADH und jeweiligem Cofaktor-regenerierendem Enzym sowie Verhältnisse in den entsprechenden Ganzzellsystemen.

System (<i>E. coli</i> BL21(DE3))	Enzyme	Optimales Enzymverhältnis	Verhältnis im Ganzzellbiokatalysator
pAW-3	LK-ADH : GDH	3 : 1	3 : 1
pAW-4	GDH : LK-ADH	1 : 3	3 : 1
pAW-5	LK-ADH : MAE	1 : 2	1 : 11
pAW-6	LK-ADH : IDH	5 : 1	1 : 25
pAW-7	LB-ADH _{NAD} : FDH	1 : 5	1 : 30
pAW-8	LK-ADH _{NAD} : FDH	10 : 1	1 : 2

Wie Tab. 52 zeigt, unterscheiden sich die ermittelten optimalen Enzymverhältnisse deutlich. Während in manchen Fällen die ADH im Überschuss sein sollte, ist es in anderen Fällen besser, wenn das Cofaktor-regenerierende Enzym überwiegt. Beim System LK-ADH-GDH ist es vorteilhaft, wenn die ADH im dreifachen Überschuss vorliegt. Dies ist in *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3-Zellen der Fall. Im Konstrukt pAW-4 dagegen liegen LK-ADH und GDH im umgekehrten Verhältnis von 1 : 3 vor. Die Umsetzungen mit diesen Zellen, die deutlich schlechter sind, bestätigen, dass für eine gute Umsetzung ein Enzymverhältnis vorliegen sollte, wie es in zellfreien Versuchen gefunden wurde.

Die Enzymverhältnisse, die in den anderen Stämmen vorherrschen, entsprechen nicht den ermittelten optimalen Verhältnissen. In vielen Fällen wird sogar das Enzym stärker exprimiert, das laut optimalem Enzymverhältnis im Unterschuss vorliegen sollte. Aus diesem Grund laufen diese Umsetzungen nicht unter optimalen Bedingungen ab. Dies könnte in weiteren Arbeiten dadurch erreicht werden, dass die Gene durch Promotoren reguliert würden, die einzeln induziert werden könnten.

3. Vergleich verschiedener Verfahren zur Synthese von (*R*)-Phenylethanol, (*2R,5R*)-Hexandiol und (*S*)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester

Um die Qualität der entwickelten Systeme zu untersuchen, wurden die Umsetzungen der drei ausgewählten Substrate Literatur-bekanntem chemisch-katalysierten sowie enzym-katalysierten Synthesen von (*R*)-Phenylethanol, (*2R,5R*)-Hexandiol und (*S*)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester gegenübergestellt.

Die Reduktion von Acetophenon zu (*R*)-Phenylethanol kann chemisch durch enantio-selektive Transferhydrierung mit Hilfe von Übergangsmetallkatalysatoren mit unterschiedlichen Liganden erfolgen. Beim Einsatz eines Ir-Bisoxazolin-Systems konnten 30 mM Acetophenon mit Isopropanol als Wasserstoffquelle mit 77 % Ausbeute und 18 % *ee* zu (*R*)-Phenylethanol reduziert werden^[108] (Abb. 113).

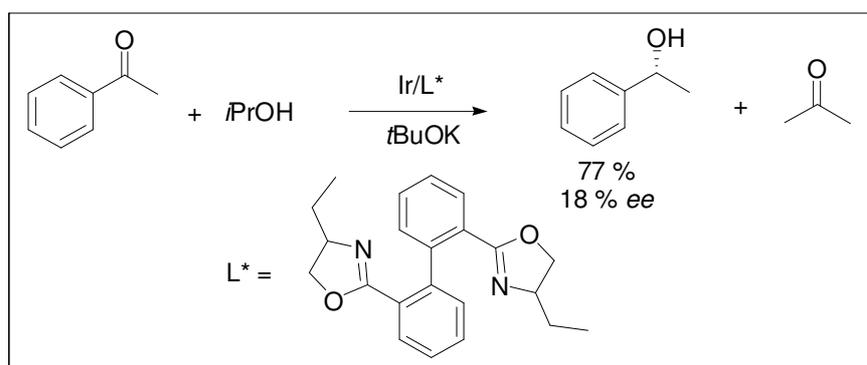


Abb. 113: Reduktion von Acetophenon zu (*R*)-Phenylethanol durch Transferhydrierung mit einem Ir-Bisoxazolin-System als Katalysator.

Höhere optische Ausbeuten in asymmetrischen Transferhydrierungen von Acetophenon werden mit Ru-Komplexen und Aminophosphin-Liganden erreicht. (*R*)-Phenylethanol

konnte aus 90 mM Acetophenon mit einem chiralen Aminophosphin und $[\text{RuCl}_2(p\text{-Cymol})]_2$ mit 95 % Ausbeute und 93 % *ee* bei 83 °C synthetisiert werden^[109] (Abb. 114).

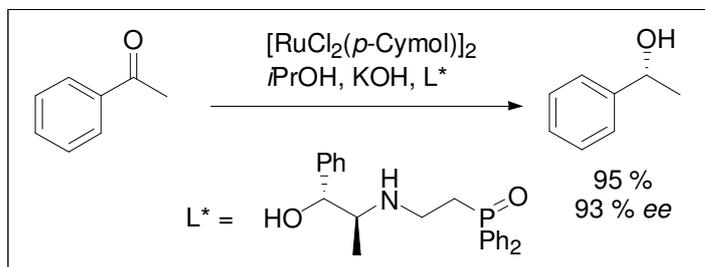


Abb. 114: Asymmetrische Transferhydrierung von Acetophenon zu (*R*)-Phenylethanol mit einem chiralen Aminophosphin und $[\text{RuCl}_2(p\text{-Cymol})]_2$ als Katalysator.

Durch Hydroborierung in Anwesenheit von chiralen Oxazaborolidinen, sog. CBS-Reduktionen, können Ketone wie Acetophenon in guten Ausbeuten zu Alkoholen reduziert werden. Mit einem B-methylierten Oxazaborolidin als Katalysator konnte (*R*)-Phenylethanol bei 2 °C mit 100 % Ausbeute und 96,5 % *ee* erhalten werden^[4] (Abb. 115).

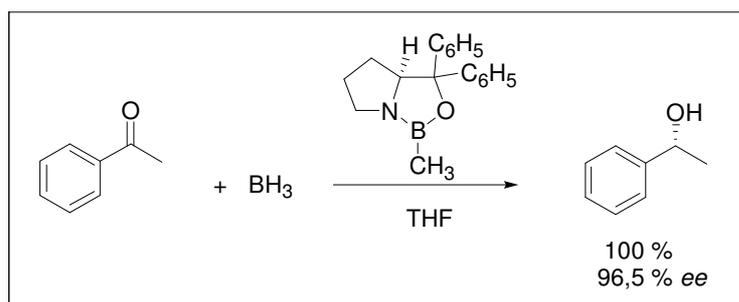


Abb. 115: Stereoselektive Reduktion von Acetophenon durch asymmetrische Hydroborierung mit (*S*)-Bor-methyliertem Oxazaborolidin als Katalysator.

Zn-Diamin-katalysierte asymmetrische Hydrosilylierungen von prochiralen Ketonen mit Polymethylhydrosiloxan (PMHS) führen zu chiralen Alkoholen mit hohen Enantiomerenreinheiten. Auf diese Weise konnten ca. 0,89 M Acetophenon unter Stickstoff mit ZnEt_2 und einem chiralen Diaminliganden nach 288 h Reaktionszeit zu 66 % (*R*)-Phenylethanol mit 91 % *ee* reduziert werden^[110] (Abb. 116).

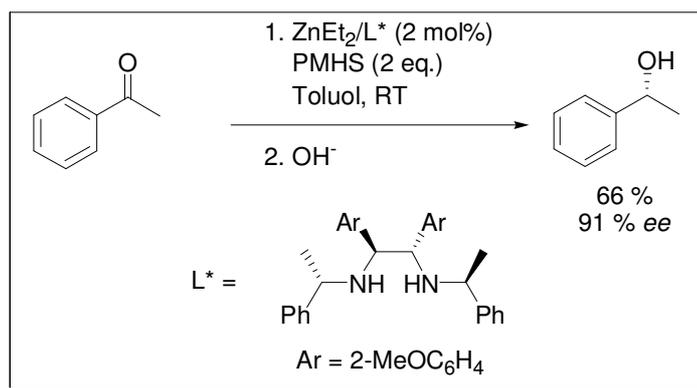


Abb. 116: Zink-katalysierte Reduktion von Acetophenon mit PMHS (Polymethylhydrosiloxan) und einem chiralen Diaminliganden.

Durch asymmetrische Elektroreduktion konnte Acetophenon durch die ADH aus *T. Brockii* nach 30 h Reaktionszeit zu (*R*)-Phenylethanol mit 61 % Ausbeute und 98 % ee reduziert werden. Es wurden 3 mM Acetophenon eingesetzt. Die Regenerierung von NADPH erfolgte hier über Ferredoxin-NADP-Reduktase (FNR) und Methylviologen (1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridiniumdichlorid, MV) als Elektronenmediator^[111] (Abb. 117).

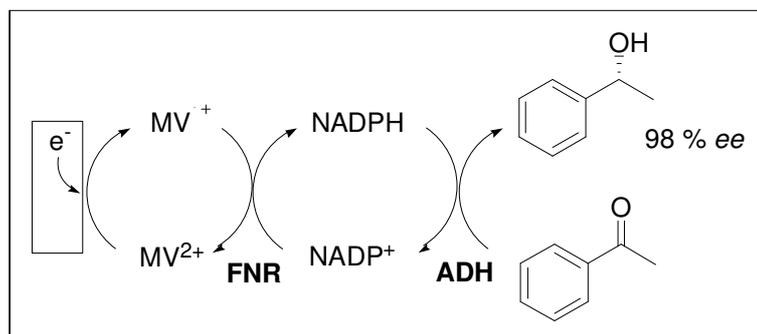


Abb. 117: Elektrochemisches Reduktionssystem mit TB-ADH als Katalysator und Ferredoxin-NADP-Reduktase (FNR) sowie Methylviologen (MV^{2+}) für die NADPH-Regenerierung.

Bei der Reduktion von Acetophenon mit biokatalytischen Methoden können Zellen des Pilzes *Trichothecium* sp. eingesetzt werden. Nach 72 h Reaktionszeit entstand aus 1,39 mM Acetophenon (*R*)-Phenylethanol mit einer Ausbeute von 85 % und 93,5 % ee^[112].

Durch Racematspaltung von 10 mM Phenylethanol katalysierten *Hansenula capsulata* IFO 0974-Zellen die Oxidation von (*S*)-Phenylethanol mit 47,5 % Ausbeute, so dass lediglich das (*R*)-Enantiomer mit 90,5 % ee in der Reaktionsmischung verblieb^[113].

Die NAD-abhängige ADH aus *Pseudomonas* sp. katalysierte die Reduktion von 48 mM Acetophenon zu (*R*)-Phenylethanol mit 34 % Ausbeute und 94 % ee^[114]. Die Reaktion

erfolgte mit *in situ*-Regenerierung von NADH mittels Isopropanol als zweites ADH-Substrat.

Die in dieser Arbeit eingesetzte ADH aus *L. kefir* reduzierte 10 mM Acetophenon zu (*R*)-Phenylethanol mit > 90 % Ausbeute und 100 % *ee*, wenn NADPH durch das System Formiat/NADP-abhängige FDH regeneriert wurde. Erfolgte die NADPH-Regenerierung über Isopropanol als zweites ADH-Substrat, entstand (*R*)-Phenylethanol sogar mit 100 % Ausbeute und 100 % *ee*^[115].

Die in den oben vorgestellten Synthesen von (*R*)-Phenylethanol erzielten *ee*-Werte betragen maximal 98 %, während die Ausbeuten bis auf die CBS-Reduktion durch Corey^[4], bei der allerdings die Menge an eingesetztem Substrat nicht bekannt ist, unter 100 %, oft trotz niedriger Substratkonzentration sogar unter 70 % liegen. Nur durch die ADH aus *L. kefir* ist es möglich, (*R*)-Phenylethanol mit einer Enantiomerenreinheit sowie einer Ausbeute von 100 % zu produzieren. Mit den im Verlauf der vorliegenden Arbeit konstruierten rekombinanten Ganzzellbiokatalysatoren kann die Reduktion von Acetophenon zudem mit geringen Mengen an Katalysator und ohne Zusatz eines zweiten Enzyms effizient durchgeführt werden.

Die chemische Darstellung von (*2R,5R*)-Hexandiol gelang über asymmetrische Reduktion von 3-Oxobutansäure mit Ru-BINAP als Katalysator und anschließender Kolbe-Elektrolyse^[116] der korrespondierenden Säure^[117] (Abb. 118). Aus den ursprünglich vorhandenen 1 M (*3R*)-Hydroxybuttersäure wurde (*2R,5R*)-Hexandiol mit 48 % Ausbeute gebildet.

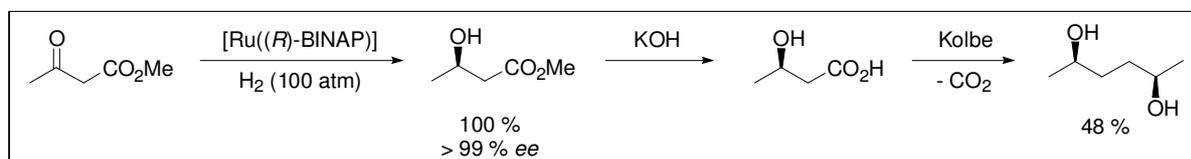


Abb. 118: Synthese von (*2R,5R*)-Hexandiol ausgehend von 3-Oxobutansäure.

In einer weiteren chemischen Synthese von (*2R,5R*)-Hexandiol wurde D-Mannitol als Edukt verwendet^[118]. Die Hydroxylgruppen von Mannitol-Diacetonid wurden hierbei als Tosylate derivatisiert. Nach Hydrolyse der Acetonidgruppen und Behandlung des entstandenen Tetraols mit *p*-Tosylchlorid in Pyridin entstand neben einem Tritosylat ein Tetra-

tosylat, welches mit LiAlH_4 zu $(2R,5R)$ -Hexandiol reduziert wurde. Die Ausbeute dieser Synthese lag bei 30 %.

Eine weitere Methode zur Darstellung von $(2R,5R)$ -Hexandiol beruht auf der Kombination chemischer und enzymatischer Katalyse^[119]. Ein *meso-dl*-Gemisch der 2,5-Hexandiole wurde unter Argon bei 70 °C mit einem Ru-Katalysator, Novozym 435 (*Candida antarctica* Lipase B) sowie 4-Chlorphenylacetat als Acyldonor zum Diacetat umgewandelt. Hierbei entstand eine 86 : 14-Mischung aus dem (R,R) -Diacetat (> 99 % *ee*) und dem *meso*-Diacetat (Abb. 119). Nach Trennung der beiden Substanzen und Hydrolyse des (R,R) -Diacetats konnte das (R,R) -Diol erhalten werden.

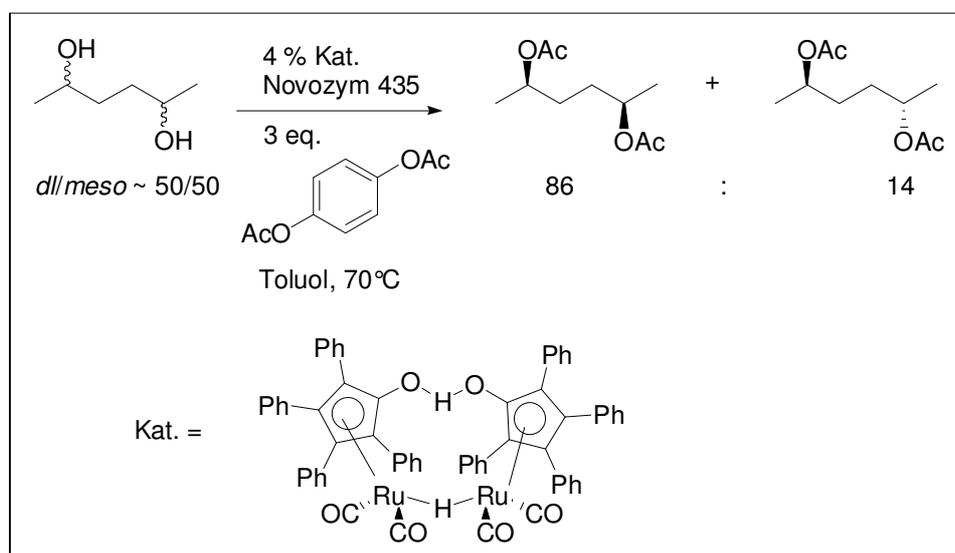


Abb. 119: Kinetische Racematspaltung von 2,5-Hexandiol gekoppelt mit Ruthenium- und enzymatischer Katalyse. Das (R,R) -Diacetat wurde mit > 99 % *ee* erhalten.

Mit Hilfe der Lipase AK aus *Pseudomonas* sp. konnte $(2R,5R)$ -Hexandiol mit einer Ausbeute von 17 %, > 98 % *de* und > 98 % *ee* aus kommerziell erhältlichem 2,5-Hexandiol, das aus drei Stereoisomeren besteht, hergestellt werden^[120]. Die Lipase katalysierte die Umesterung in Gegenwart von Vinylacetat. Die Reaktion wurde abgestoppt, als ein Verhältnis Diol/Monoacetat/Diacetat von 1 : 2 : 1 vorlag. Um die geringen *de*-Werte zu erhöhen, wurden Mono- und Diacetat hydrolysiert und die Diole anschließend wiederum der Lipase ausgesetzt. Abschließend erfolgte die Hydrolyse des Diacetats zum gewünschten (R,R) -Diol (Abb. 120).

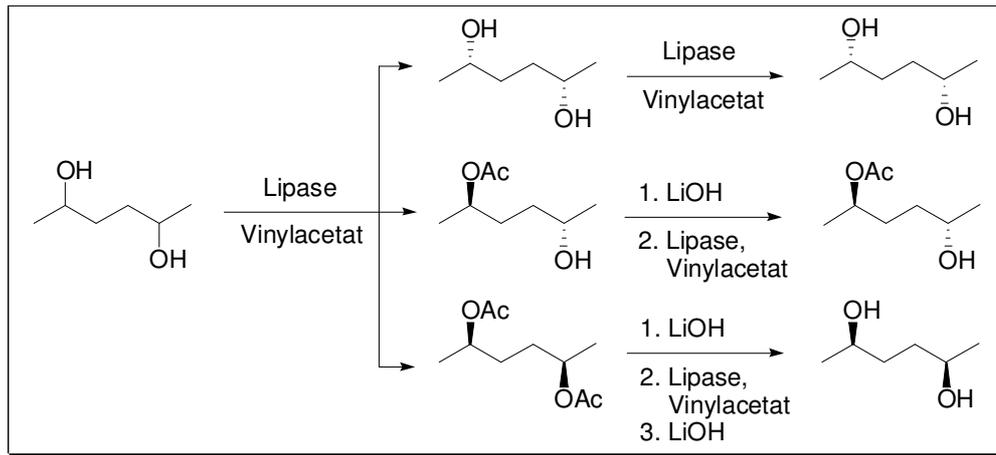


Abb. 120: Lipase-katalysierte Umesterung zur Darstellung aller drei Stereoisomeren von 2,5-Hexandiol.

Pichia farinosa IAM 4682-Zellen katalysierten die Reduktion von 44 mM 2,5-Hexandion zu (2*R*,5*R*)-Hexandiol mit 83 % Ausbeute, 95 % *de* und > 99 % *ee*. Die Reaktion lief bei 30 °C über zwei Tage in Glucose-Medium unter anaeroben Bedingungen ab^[121].

Die in dieser Arbeit eingesetzte ADH aus *L. kefir* reduziert 2,5-Hexandion stereoselektiv zu (2*R*,5*R*)-Hexandiol^[122]. Um das Problem der NADPH-Regenerierung beim Einsatz des isolierten Enzyms zu vermeiden, wurden ganze *L. kefir*-Zellen zur Reduktion von 2,5-Hexandion eingesetzt^[123]. Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte (2*R*,5*R*)-Hexandiol mit > 99 % *ee* und > 99 % *de* mit Glucose als Cosubstrat bei pH 6,0 produziert werden^[124]. Die Raum-Zeit-Ausbeute dieser Synthese lag bei 64 g pro l und Tag.

In den oben vorgestellten Synthesen von (2*R*,5*R*)-Hexandiol wurden zwar relativ hohe *ee*- und *de*-Werte erreicht, allerdings waren die Ausbeuten bis auf die Synthesen mit LK-ADH als Katalysator sehr gering. Die im Verlauf der vorliegenden Arbeit entwickelten Ganzzellbiokatalysatoren reduzieren 2,5-Hexandion stereoselektiv zu (2*R*,5*R*)-Hexandiol mit 100 % *ee*. Diese Enantiomerenreinheit wird in keiner der hier vorgestellten chemischen sowie biokatalytischen Synthesen erreicht. Auch der mit den im Laufe der vorliegenden Arbeit entwickelten Katalysatoren erzielte Diastereomerenüberschuss von 100 % wird in keinem der oben vorgestellten Verfahren erreicht.

Die Synthese von β,δ -Dihydroxyestern sowie δ -Hydroxy- β -ketoestern ist von großem Interesse, da diese Verbindungen vor allem als Vorstufen der cholesterolsenkenden HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren Bedeutung erlangt haben. Ein Beispiel für einen solchen

Wirkstoff ist Atorvastatin, dessen Seitenkette eine β,δ -Dihydroxyester-Struktur mit der für die Wirkung entscheidenden *syn*-(*R,R*)-Konfiguration aufweist^[125, 126] (Abb. 121).

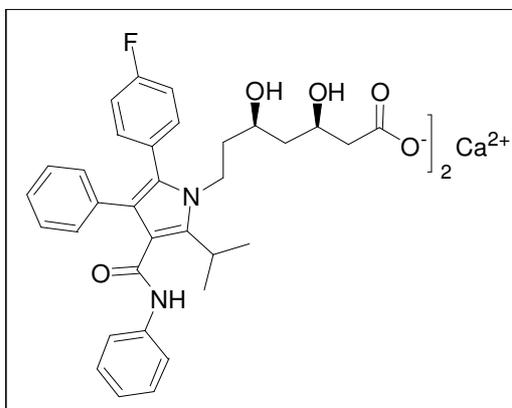


Abb. 121: Struktur des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Atorvastatin^[127].

2,5-Dioxyhexansäuremethylester konnte durch einen Ru-BINAP-Katalysator hydriert werden. Hierbei entstand *syn*-(3*S*,5*R*)-Dihydroxyhexansäuremethylester mit 78 % Ausbeute und 99 % *ee*^[128, 129] (Abb. 122).

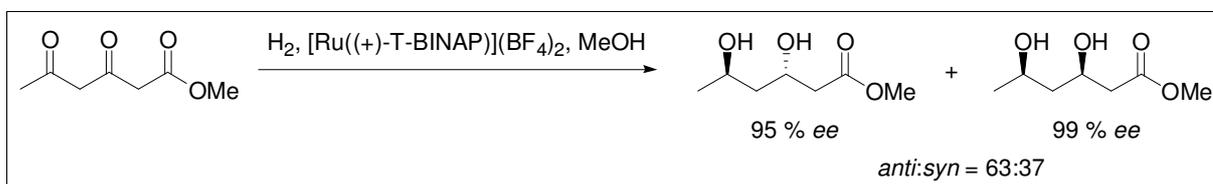


Abb. 122: Hydrierung von 2,5-Dioxyhexansäuremethylester mit $[\text{Ru}((+)\text{-T-BINAP})](\text{BF}_4)_2$ als Katalysator zu den *syn*- und *anti*-Dihydroxyverbindungen.

Die Reduktion der β -Ketogruppe von 3,5-Dioxyhexansäuremethylester gelang mit verschiedenen Ru-Katalysatoren zur korrespondierenden (*R*)-3-Hydroxyverbindung mit *ee*-Werten bis zu 78 %^[130].

Ausgehend von 4-Chlor-3-oxobutansäureethylester konnte 6-Benzyloxy-(3*R*,5*S*)-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester über mehrere Reaktionsschritte produziert werden^[131]. Die Reduktion der β -Ketogruppe erfolgte hierbei mittels eines Ru-BINAP-Katalysators. Durch Claisen-Kondensation wurde anschließend der C6-Körper synthetisiert. Die Reduktion der δ -Ketogruppe geschah mit $\text{BEt}_3/\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$ (Abb. 123).

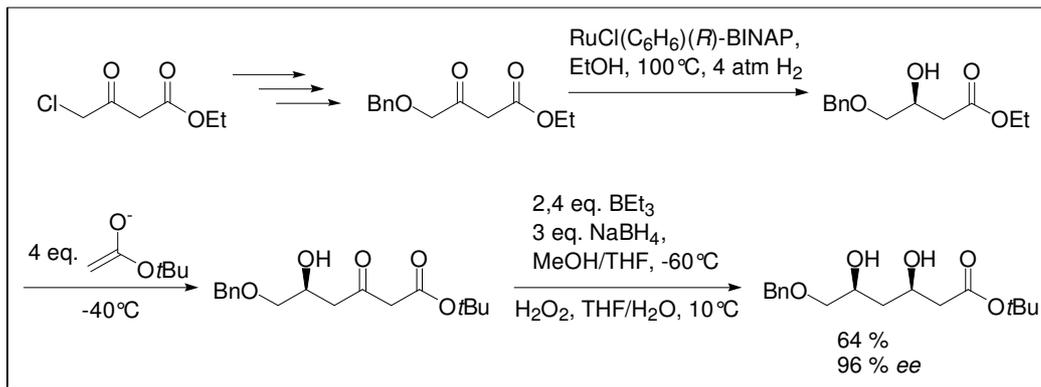


Abb. 123: Synthese von 6-Benzyloxy-(3*R*,5*S*)-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester ausgehend von 4-Chlor-3-oxobutansäureethylester.

Die Synthese der gewünschten Hexansäureester mit *syn*-(*R,R*)-Konfiguration gelang der Arbeitsgruppe um Patel durch stereoselektive mikrobielle Reduktion von 38 mM 6-Benzyloxy-3,5-dioxohexansäureethylester zur korrespondierenden *syn*-(3*S*,5*R*)-Dihydroxyverbindung mit Zellextrakten aus *Acinetobacter calcoaceticus* SC 13786^[24]. Die NADH-Regenerierung erfolgte durch Glucose und GDH. Die Ausbeute der Reaktion lag bei 92 % und die optische Reinheit bei > 99 %. Auch die Monohydroxyverbindungen konnten isoliert werden (Abb. 124).

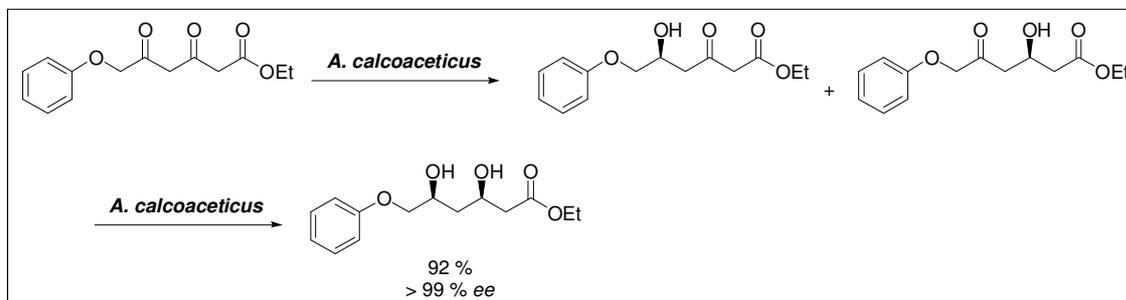


Abb. 124: Enantioselektive Reduktion von 6-Benzyloxy-3,5-dioxohexansäureethylester zur korrespondierenden *syn*-(3*S*,5*R*)-Dihydroxyverbindung über die Monohydroxyverbindungen mit Zellextrakten aus *Acinetobacter calcoaceticus*. Für die Regenerierung von NADH wurde das System Glucose/GDH verwendet.

Mit der in dieser Arbeit eingesetzten ADH aus *L. brevis* ist es möglich, 3,5-Dioxohexansäureester regio- und enantioselectiv zu den 3-Hydroxy-5-oxoderivaten zu reduzieren^[132]. Die Reduktion von 29,5 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester zu (*S*)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester gelang mit 72 % Ausbeute und > 99,5 % *ee*^[40]. Die Regenerierung von NADPH erfolgte als substrat-gekoppelter Ansatz über Isopropanol (Abb. 125).

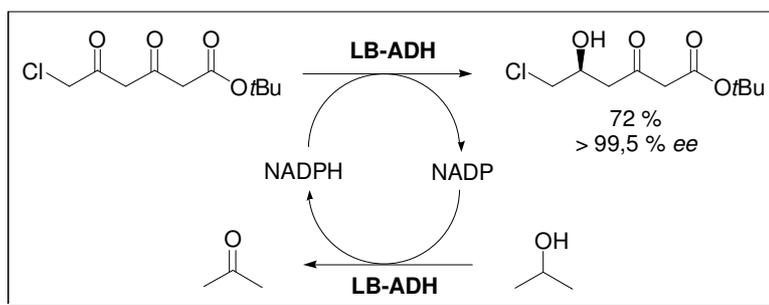


Abb. 125: Reduktion von 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester zu (*S*)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester mit der ADH aus *L. brevis*. Für die NADPH-Regenerierung wurde Isopropanol eingesetzt.

Die Reduktion des erhaltenen (*S*)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylesters zur korrespondierenden *syn*-(3*S*,5*R*)-Dihydroxyverbindung gelang nach Prasad^[133] mit B(OMe)Et₂ in THF/MeOH und NaBH₄ bei -70 °C. Das gewünschte Produkt konnte mit 93 % *de* erhalten werden^[40, 134].

Auch bei der Darstellung von (*S*)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester aus 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester werden mit den in dieser Arbeit entwickelten Ganzzellsystemen sowohl *ee*- als auch *de*-Werte von 100 % erreicht. Diese Reinheiten werden von keiner der hier vorgestellten Synthesen dieser Verbindungen erzielt.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass im Gegensatz zu anderen sowohl chemischen als auch biokatalytischen Synthesereaktionen mit den im Laufe dieser Dissertation konstruierten Ganzzellbiokatalysatoren die Darstellung chiraler Alkohole aus den ausgewählten prochiralen Ketonen mit Enantiomeren- und ggf. Diastereomerenüberschüssen von 100 % möglich ist. Eine hohe Enantiomerenreinheit ist bei der Produktion von Pharmazeutika wichtig. Hier werden > 99,5 % *ee* gefordert. Diese Reinheit wird mit Ausnahme der im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Umsetzungen von keiner der vorgestellten Synthesen erreicht. Die eingesetzten Mengen an Acetophenon und 2,5-Hexandion werden durch einige der entwickelten Ganzzellbiokatalysatoren mit 100 % Ausbeute reduziert. Dies ist durch substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung über Isopropanol nicht möglich. Des Weiteren dürfen keine Schwermetall- und organischen Lösungsmittlrückstände in pharmazeutischen Wirkstoffen enthalten sein. Die hier verwendeten Biokatalysatoren werden diesen Anforderungen aufgrund der Durchführung der Reaktionen im wässrigen Milieu und des Verzichts auf Schwermetallkatalysatoren gerecht. Bei der Übertragung der Umsetzungen in den industriellen Maßstab sollten höhere Eduktkonzentrationen eingesetzt werden. Da die Aufarbeitung von Produkten gerade in Gegenwart von schwer definierbarem Material wie Zellen nicht trivial ist, müssen Schritte

für die Produktisolierung ausgearbeitet werden. Ansonsten sind die in dieser Arbeit entwickelten Ganzzellsysteme ohne weitere Anpassungen in den industriellen Maßstab übertragbar. Durch die Anzucht der rekombinanten Stämme in Hochzelldichte-Fermentationen können in kurzer Zeit nahezu unbegrenzte Mengen an Katalysator hergestellt werden.

Zusammenfassung

Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren

Für die Synthese chiraler Alkohole wurden neun neuartige Ganzzellbiokatalysatoren entwickelt, die jeweils eine NADP-abhängige (*R*)-ADH aus *Lactobacillus* sp. sowie ein oder mehrere Enzyme für die Regenerierung des reduzierten Nicotinamid-Cofaktors enthalten. Basisenzym für die Kopplung war eine (*R*)-spezifische ADH aus *Lactobacillus kefir* (LK-ADH), die ein breites Spektrum an Ketonen und Ketoestern hoch stereoselektiv reduziert. Anhand der teilweise bekannten Proteinsequenz der ADH gelang die Isolierung des *adh*-Gens. Nach Klonierung und Expression wurde das rekombinante Enzym bis zur Homogenität gereinigt und biochemisch charakterisiert. Die spezifische Aktivität des gereinigten Enzyms beträgt 558 U/mg. Die rekombinante ADH hat ein Temperaturoptimum von 50°C und ein pH-Optimum von 7,0. Die K_M -Werte für Acetophenon und NADPH betragen 1,9 und 0,14 mM.

Für die Regenerierung des von der LK-ADH verbrauchten NADPH wurden die Enzyme Glucose-DH (GDH) aus *Bacillus subtilis*, Malic Enzyme (MAE) aus *E. coli*, Isocitrat-DH (IDH) aus *B. subtilis* sowie die gekoppelten Systeme IDH in Verbindung mit Aconitase (AcnB) aus *E. coli* sowie die NAD-abhängige Formiat-DH (FDH) aus *Candida boidinii* in Verbindung mit Pyridin-Nucleotid-Transhydrogenase (PNT) aus *E. coli* eingesetzt. Sowohl die ADH aus *L. kefir* als auch die ebenfalls eingesetzte ADH aus *L. brevis* (LB-ADH) zeigen eine NAD-Nebenaktivität, die durch Kopplung mit der FDH ausgenutzt werden soll. Ein weiteres System wurde entwickelt, indem eine NAD-abhängige Mutante der ADH aus *L. brevis*, Mut2G38D-ADH, mit der FDH kombiniert wurde. Zur Herstellung der Ganzzellbiokatalysatoren wurden ADH und das jeweilige Regenerierungssystem coexprimiert. Nach Expressionsoptimierung der einzelnen Systeme erfolgten die Reinigung der einzelnen Enzyme und die biochemische Charakterisierung von GDH, MAE, IDH und Mut2G38D-ADH. Anhand dieser Daten konnten die Reaktionsbedingungen für Umsetzungen mit gekoppelten Enzymsystemen definiert werden. Anschließend wurden Tests auf Kreuzreaktionen durchgeführt, um zu untersuchen, ob Substrat und Produkt der produzierenden Reaktion die regenerierende Reaktion beeinflussen und umgekehrt. Formiat ist ein Inhibitor der LB-ADH, ansonsten traten keine Kreuzreaktionen auf.

Umsetzungen im zellfreien System

Zur Ermittlung des optimalen Enzymverhältnisses an ADH und regenerierenden Enzymen wurden Umsetzungen von Acetophenon im zellfreien System mit unterschiedlichen

Mengen an Enzymen durchgeführt. Die ermittelten optimalen Enzymverhältnisse wichen stark voneinander ab. Beim Einsatz von GDH, IDH und FDH als regenerierenden Enzymen wurden mit LK-ADH im Überschuss bessere Umsatzraten erreicht, während das regenerierende Enzym überwiegen sollte, wenn LK-ADH und MAE bzw. LB-ADH und FDH gekoppelt werden.

Als Substrate wurden in allen nachfolgenden Umsetzungen 10 mM Acetophenon, 15 mM 2,5-Hexandion und 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester verwendet. Die isolierten Enzyme wurden im zuvor ermittelten optimalen Enzymverhältnis für die Reduktion dieser prochiralen Ketone eingesetzt. Acetophenon wurde von allen Systemen, 2,5-Hexandion von den Systemen ADH-GDH, ADH-MAE sowie LB-ADH-FDH vollständig reduziert. Von den eingesetzten 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester wurden maximal 40 % umgesetzt. Die erzielten *ee*- und ggf. *de*-Werte aller gebildeten Alkohole lagen bei 100 %.

Durchführung von Ganzzellbiotransformationen

Die entwickelten Stämme wurden in Ganzzellbiotransformationen eingesetzt. Die eingesetzten Substrate wurden, falls Umsetzung erfolgte, durch alle Systeme zu (*R*)-Phenylethanol, (*2R,5R*)-Hexandiol bzw. (*S*)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester mit 100 % *ee* sowie ggf. 100 % *de* reduziert.

Die Ansätze, die auf der NAD-Abhängigkeit der beiden ADHs basieren, zeigten sehr schlechte Umsatzraten. Keines der eingesetzten Substrate wurde durch *E. coli* BL21 (DE3)/pAW-7-Zellen (LB-ADH + FDH) umgesetzt. Mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-8-Zellen (LK-ADH + FDH) war zwar die Reduktion von Acetophenon und 2,5-Hexandion möglich, allerdings verliefen diese Ansätze mit schlechten Umsatzraten. Im Vergleich dazu setzte der Stamm *E. coli* BL21(DE3)/AW-9, der neben LK-ADH und FDH PNT enthielt und somit auf der NADP-Abhängigkeit der ADH basiert, zwar lediglich Acetophenon um, dies aber mit wesentlich höherer Umsatzrate als das Konstrukt pAW-8, das nur LK-ADH und FDH enthält. Durch die komplizierte Funktionsweise des AW-9-Systems waren ebenso wie mit den Konstrukten pAW-7 und pAW-8 keine effizienten Umsetzungen möglich.

Ganzzellbiotransformationen mit den Stämmen *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3 (ADH + GDH), pAW-4 (GDH + ADH) und pAW-6 (ADH + IDH) lieferten deutlich bessere Ausbeuten. Durch das Konstrukt pAW-3 wurden alle drei Substrate mit Abstand am besten reduziert, gefolgt von den Systemen pAW-4, pAW-6, pAW-5 (ADH + MAE) und AW-11 (ADH, AcnB + IDH). Acetophenon konnte durch alle oben genannten Konstrukte vollständig umgesetzt

werden; 2,5-Hexandion wurde durch alle Systeme bis auf pAW-6 komplett reduziert. Von den eingesetzten 25 mM 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester wurden maximal ca. 80 % umgesetzt. Alle Reduktionen verliefen hoch stereoselektiv mit 100 % *ee* und ggf. 100 % *de*.

Die Permeabilisierung der Zellmembranen durch Toluol hatte, mit Ausnahme des Systems AW-11, keinen wesentlichen Einfluss auf die Umsatzraten. Im Gegensatz dazu wurden die Ausbeuten durch Zusatz des entsprechenden Cofaktors deutlich erhöht. Die zellinterne Cofaktormenge ist demnach für effiziente Umsetzungen nicht ausreichend. Ganzzellbiotransformationen mit *E. coli* BL21(DE3)/pAW-3-Zellen wurden außerdem in organisch-wässrigen Zweiphasensystemen durchgeführt. Hier wurden allerdings deutlich schlechtere Umsatzraten erreicht als bei entsprechenden Ansätzen in wässrigen Einphasensystemen. Die Umsatzraten, die mit den einzelnen Systemen erzielt wurden, korrelieren mit den ADH-Aktivitäten in den jeweiligen Konstrukten. In den Systemen, mit denen die höchsten Umsatzraten in Ganzzellbiotransformationen erreicht wurden, waren auch die ADH-Aktivitäten am höchsten. Mit den im Laufe dieser Arbeit entwickelten rekombinanten Ganzzellbiokatalysatoren ist es im Gegensatz zu bisher bekannten Synthesen möglich, im wässrigen Milieu unter moderaten Reaktionsbedingungen chirale Alkohole mit optischen Reinheiten von 100 % zu produzieren.

Anhang

1. Verwendete Primer

1.1 Klonierungsprimer

Tab. 53 zeigt die Sequenzen der in dieser Arbeit eingesetzten Klonierungsprimer.

Tab. 53: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Klonierungsprimer.

Enzym	Name des Primers	Sequenz von 5' nach 3'
„Zweite“ ADH aus <i>L. kefir</i>	GG-N	CTG GTC TCC GCT AGA CAT TA
	GG-C	TCT CAA AAG TCG CCT TCA TG
	01Primer3'	TCT AGT CAC AAG GAT CCT TAT TGC GCC G
	01Primer5'	GGG AGG TCG ATA CAT ATG GGG CGT TTA
	02Primer3'	GCG CAA GCT TTT ATT GCG CCG TAT AAC C
	02Primer5'	GCG CGA ATC CAT GGG GCG TTT AGA TAA AAA A
ADH aus <i>L. kefir</i>	1_LKADH GG-N	CGG CAT TCA AAT AAT AGA GTG GGA CAA AAG GC
	1_LKADH GG-C	GCC CGG GCT GGT AAA TAA ATC AGT TCG C
	1_LKADH-Nde	GAA TCC ATC ATA TGA CTG ATC GTT TAA AAG GC
	1_LKADH-Bam	GCC GGA TCC TTA TTG AGC AGT GTA TCC ACC AT
	1_LKADH-SacI	GAA TCC ATG AGC TCA TGA CTG ATC GTT TAA AAG GC
	1_LKADH-NotI	GCG GCG GCC GCT TAT TGA GCAG TGT ATC CAC C
	1_LKADH-HindIII	GCC AAG CTT TTA TTG AGC AGT GTA TCC ACC ATC
GDH aus <i>B. subtilis</i>	GDH+SacI	GCG CGA GCT CAG GAG GTA TTA TAT GTA TCC GGA TTT AAA AGG AAA AGT CGT C
	GDH+HindIII	GCG CAA GCT TCT ACT ATT AAC CGC GGC CTG CCT GGA AT
	GDH-NdeI	GCG CCA TAT GTA TCC GGA TTT AAA AGG AAA AGT C
	GDH-BamHI	GCG CGG ATC CCT ACT ATT AAC CTC G
MAE aus <i>E. coli</i>	MAE-XhoI	GCG CCT CGA GAT GGA TGA CCA GTT AAA ACA AAG TGC
	MAE-AvrII	GCG CCC TAG GCT ACT ATT ACA GCG GTT GGG TTT GCG CTT CT

(Fortsetzung nächste Seite)

(Fortsetzung Tab. 53)

Enzym	Name des Primers	Sequenz von 5' nach 3'
PNT aus <i>E. coli</i>	pntA- <i>Bam</i>	GCG GGA TCC ATG CGA ATT GGC ATA CCA AGA G
	pntA- <i>Pst</i>	GCG CTG CAG TTA ATT TTT GCG GAA CAT TTT CAG C
	pntB- <i>Bgl</i>	GCG AGA TCT ATG TCT GGA GGA TTA GTT ACA GCT G
	pntB- <i>Avr</i>	GCG CCT AGG TTA CAG AGC TTT CAG GAT TGC ATC C
ADH aus <i>L. brevis</i>	LBADH- <i>Bam</i>	GCG CGG ATC CGC GAT GTC TAA CCG TTT GGA TGG
	LBADH- <i>Not</i>	ATA AGA ATG CGG CCG CTA AAC TAT CTA TTG AGC AGT GTA GCC A
FDH aus <i>C. boidinii</i>	FDH- <i>Nde</i>	GGG AAT TCC ATA TGA AGA TTG TCT TAG TTC TTT ATG ATG C
	FDH- <i>Xho</i>	CCG CTC GAG CGG TTA TTT CTT ATC GTG TTT ACC GTA AGC
IDH aus <i>B. subtilis</i>	IDH- <i>Nde</i>	GGG AAT TCC ATA TGG TGG CAC AAG GTG AAA AAA TTA C
	IDH- <i>Xho</i>	CCG CTC GAG CGG TTA GTC CAT GTT TTT GAT CAG TTC TTC TC
AcnB aus <i>E. coli</i>	AcnB- <i>Nde</i>	GGG AAT TCC ATA TGG TGC TAG AAG AAT ACC GTA AGC ACG TAG
	AcnB- <i>Xho</i>	CCG CTC GAG CGG TTA AAC CGC AGT CTG GAA AAT CAC CCC

1.2 Primer zur Isolierung der *adh*-Gene

In Tab. 54 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer zur Isolierung der *adh*-Gene aufgeführt.

Tab. 54: Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Primer zur Isolierung der *adh*-Gene.

Enzym	Name des Primers	Sequenz von 5' nach 3'
ADH aus <i>L. kefir</i>	1_LKADH-Cwalk1	CTT GAA GGG GCA GAA GAA ATG ATG TCA CAG C
	1_LKADH-Cwalk2	AAC GAT ATC GCT TGG ATC TGT GTT TAC CTG GC
	1_LKADH-Nwalk1	GGA CAA AAC GGA TAA CGT CTG TGC CGC
	1_LKADH-Nwalk2	GAC GGC CGG TAA TAA CAA CCT TTG CGC
„Zweite“ ADH aus <i>L. kefir</i>	N1	GAT AAG AAG GTT GCT ATT ATT A
	C1	GCT TCA TCA GCG TGT TGA TCA TC
	Ndeg1	GAY AAG AAG GTY GCY ATY ATY A
	Cdeg1	GCT TCR TCR GCR TGT TGR TCR TC
	Cwalk1	GCG TCA AAG GCT TCG GAC TTG CAA TGG CTA AG
	Cwalk2	CTG TTT GTT AAG GAA GGC GCC AAA GTA GTG ATT ACT GAT G
	Nwalk1	AAC ATC AGT AAT CAC TAC TTT GGC GCC TTC CTT AAC AAA CAG
	Nwalk2	GCT TAG CCA TTG CAA GTC CGA AGC CTT TGA CG

2. Sequenz der ADH aus *L. kefir*

Im Folgenden sind die Nucleotidsequenz der ADH aus *L. kefir* sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz dargestellt.

1	ATG ACT GAT CGT TTA AAA GGC AAA GTA GCA ATT GTA ACT GGC GGT ACC	48
1	M T D R L K G K V A I V T G G T	16
49	TTG GGA ATT GGC TTG GCA ATC GCT GAT AAG TTT GTT GAA GAA GGC GCA	96
17	L G I G L A I A D K F V E E G A	32
97	AAG GTT GTT ATT ACC GGC CGT CAC GCT GAT GTA GGT GAA AAA GCT GCC	144
33	K V V I T G R H A D V G E K A A	48
145	AAA TCA ATC GGC GGC ACA GAC GTT ATC CGT TTT GTC CAA CAC GAT GCT	192
49	K S I G G T D V I R F V Q H D A	64
193	TCT GAT GAA GCC GGC TGG ACT AAG TTG TTT GAT ACG ACT GAA GAA GCA	240
65	S D E A G W T K L F D T T E E A	80
241	TTT GGC CCA GTT ACC ACG GTT GTC AAC AAT GCC GGA ATT GCG GTC AGC	288
81	F G P V T T V V N N A G I A V S	96
289	AAG AGT GTT GAA GAT ACC ACA ACT GAA GAA TGG CGC AAG CTG CTC TCA	336
97	K S V E D T T T E E W R K L L S	112
337	GTT AAC TTG GAT GGT GTC TTC TTC GGT ACC CGT CTT GGA ATC CAA CGT	384
113	V N L D G V F F G T R L G I Q R	128
385	ATG AAG AAT AAA GGA CTC GGA GCA TCA ATC ATC AAT ATG TCA TCT ATC	432
129	M K N K G L G A S I I N M S S I	144
433	GAA GGT TTT GTT GGT GAT CCA ACT CTG GGT GCA TAC AAC GCT TCA AAA	480
145	E G F V G D P T L G A Y N A S K	160
481	GGT GCT GTC AGA ATT ATG TCT AAA TCA GCT GCC TTG GAT TGC GCT TTG	528
161	G A V R I M S K S A A L D C A L	176
529	AAG GAC TAC GAT GTT CGG GTT AAC ACT GTT CAT CCA GGT TAT ATC AAG	576
177	K D Y D V R V N T V H P G Y I K	192
577	ACA CCA TTG GTT GAC GAT CTT GAA GGG GCA GAA GAA ATG ATG TCA CAG	624
193	T P L V D D L E G A E E M M S Q	208
625	CGG ACC AAG ACA CCA ATG GGT CAT ATC GGT GAA CCT AAC GAT ATC GCT	672
209	R T K T P M G H I G E P N D I A	224
673	TGG ATC TGT GTT TAC CTG GCA TCT GAC GAA TCT AAA TTT GCC ACT GGT	720
225	W I C V Y L A S D E S K F A T G	240
721	GCA GAA TTC GTT GTC GAT GGT GGA TAC ACT GCT CAA TAA	759
241	A E F V V D G G Y T A Q *	253

3. Sequenz der „zweiten“ ADH aus *L. kefir*

Nachfolgend sind die Nucleotidsequenz der „zweiten“ ADH aus *L. kefir* sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz aufgeführt.

1	ATG GGG CGT TTA GAT AAA AAA GTT GCC ATT ATT ACC GGT GGC GTC AAA	48
1	M G R L D K K V A I I T G G V K	16
49	GGC TTC GGA CTT GCA ATG GCT AAG CTG TTT GTT AAG GAA GGC GCC AAA	96
17	G F G L A M A K L F V K E G A K	32
97	GTA GTG ATT ACT GAT GTT GAT GAT CAG CAC GCG GAT GAG GCC CTT GAT	144
33	V V I T D V D D Q H A D E A L D	48
145	GAA ATT GGT CGG GCT AAC GCA ATT TTT ACC AAA CAG GAC GTT TCA CAA	192
49	E I G R A N A I F T K Q D V S Q	64
193	GAG GCT GGC TGG GAA CCG GTA TTC AAA ACG GCC GTT GAA AAA TTT GGC	240
65	E A G W E P V F K T A V E K F G	80
241	AAA GTC AAC ATT CTG ATT AAC AAT GCT GGG ATC TTG TCG TTT AAC GAT	288
81	K V N I L I N N A G I L S F N D	96
289	GCT GAA ACC ATT GAT CTT GCA ACT TGG CAC AAG ATC TTA TCC GTA GAT	336
97	A E T I D L A T W H K I L S V D	112
337	TTG GAT GGT GTC ATG TTG GGC ACC AAG TGC GCA ATC AAG TTC ATG AAA	384
113	L D G V M L G T K C A I K F M K	128
385	GAA AAT GGT GGC TCA ATC GTC AAC ATT TCG TCA ATT GCC GGC TTA ATC	432
129	E N G G S I V N I S S I A G L I	144
433	GGC ATT AGC AAC CTC TAT GCG TAT AAC GCT GCC AAG GGT GGA GTT CGC	480
145	G I S N L Y A Y N A A K G G V R	160
481	ATG CTC ACC AAA TCA GCA GCT CTG TAC TGT GCA GAA AAG CAT TAT GCC	528
161	M L T K S A A L Y C A E K H Y A	176
529	ATT CGG GTC AAT TCC GTT CAT CCC GGG TAC GCT CAC ACG CCA ATG GTG	576
177	I R V N S V H P G Y A H T P M V	192
577	GAT GCC TAT CCT GAA ATG CGT CAG AAA TTG GAA AGC CTG CAT CCA ATG	624
193	D A Y P E M R Q K L E S L H P M	208
625	GGT CGT TTG GGA ACG GCT GAT GAA ATT GCC AAT GCG GCG CTT TAT TTG	672
209	G R L G T A D E I A N A A L Y L	224
673	GCA TCC GAT GAG TCT TCA TTC TCG ACC GGT TCG GAA TTG GTT GTC GAT	720
225	A S D E S S F S T G S E L V V D	240
721	GGT GGT TAT ACG GCG CAA TAA	741
241	G G Y T A Q *	247

Literaturverzeichnis

- [1] M. O'Brien, B. Vanasse, *Current Opinion in Drug Discovery & Development* **2000**, 3, 793
- [2] A. M. Rouhi, *Chemical & Engineering News* **2004**, 82, 47.
- [3] M. Wills, J. Hannedouche, *Current Opinion in Drug Discovery & Development* **2002**, 5, 881.
- [4] E. J. Corey, R. K. Bakshi, S. Shibata, C. P. Chen, V. K. Singh, *Journal of the American Chemical Society* **1987**, 109, 7925.
- [5] E. J. Corey, J. O. Link, *Tetrahedron Letters* **1990**, 31, 601.
- [6] G. H. Ladouceur, J. H. Cook, E. M. Doherty, D. Giebel, W. R. Schoen, *Tetrahedron Letters* **2002**, 43, 4455.
- [7] R. Noyori, *Asymmetric Catalysis In Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, **1994**.
- [8] J. Bakos, I. Toth, B. Heil, L. Marko, *Journal of Organometallic Chemistry* **1985**, 279, 23.
- [9] M. Kitamura, T. Ohkuma, H. Takaya, Noyori, R., *Tetrahedron Letters* **1988**, 29, 1555.
- [10] R. Noyori, S. Hashiguchi, *Accounts of Chemical Research* **1997**, 30, 97.
- [11] R. Hartmann, P. Chen, *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, 40, 3581.
- [12] K. K. Park, W. J. Sim, J. W. Park, *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry* **1997**, 27, 41.
- [13] A. R. Schmitzer, S. Franceschi, E. Perez, I. Rico-Lattes, A. Lattes, L. Thion, M. Erard, C. Vidal, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, 5956.
- [14] J. F. Larrow, K. E. Hemberger, S. Jasmin, H. Kabir, P. Morel, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 3589.
- [15] A. Zaks, D. R. Dodds, *Drug Discovery Today* **1997**, 2, 513.
- [16] R. Hayakawa, M. Shimizu, T. Fujisawa, *Tetrahedron Letters* **1996**, 37, 7533.
- [17] K. Mori, H. Mori, *Organic Syntheses* **1990**, 68, 56.
- [18] B. A. Anderson, M. M. Hansen, A. R. Harkness, C. L. Henry, J. T. Vicenzi, M. J. Zmijewski, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, 12358.
- [19] R. N. Patel, R. S. Robison, L. J. Szarka, J. Kloss, J. K. Thottathil, R. H. Mueller, *Enzyme and Microbial Technology* **1991**, 13, 906.
- [20] J. Goswami, R. L. Bezbaruah, A. Goswami, N. Borthakur, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12, 3343.

- [21] R. N. Patel, A. Banerjee, C. G. McNamee, L. J. Szarka, *Applied Microbiology and Biotechnology* **1993**, *40*, 241.
- [22] R. N. Patel, C. G. McNamee, A. Banerjee, J. M. Howell, R. S. Robison, L. J. Szarka, *Enzyme and Microbial Technology* **1992**, *14*, 731.
- [23] M. Wolberg, *Dissertation*, Universität Oldenburg **2002**.
- [24] R. N. Patel, A. Banerjee, C. G. McNamee, D. Brzozowski, R. L. Hanson, L. J. Szarka, *Enzyme and Microbial Technology* **1993**, *15*, 1014.
- [25] A. Chadha, M. Manohar, T. Soundararajan, T. S. Lokeswari, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1571.
- [26] G. W. Huisman, D. Gray, *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, *13*, 352.
- [27] M. Breuer, M. Pohl, B. Hauer, B. Lingen, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2002**, *374*, 1069.
- [28] R. ter Halle, Y. Bernet, S. Billard, C. Bufferne, P. Carlier, C. Delaitre, C. Flouzat, G. Humblot, J. C. Laigle, F. Lombard, S. Wilmouth, *Organic Process Research & Development* **2004**, *8*, 283.
- [29] E. Keinan, E. K. Hafeli, K. K. Seth, R. Lamed, *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108*, 162.
- [30] M. De Amici, C. De Micheli, G. Carrea, S. Spezia, *Journal of Organic Chemistry* **1989**, *54*, 2646.
- [31] D. Drochner, M. Müller, *European Journal of Organic Chemistry* **2001**, 211.
- [32] L. Ribas De Pouplana, S. Atrian, R. Gonzalez-Duarte, L. A. Fothergill-Gilmore, S. M. Kelly, N. C. Price, *Biochemical Journal* **1991**, *276*, 433.
- [33] H. Jörnvall, *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1999**, *463*, 359.
- [34] B. Persson, M. Krook, H. Jörnvall, *European Journal of Biochemistry* **1991**, *200*, 537.
- [35] H. Jörnvall, J. O. Hoog, B. Persson, *FEBS Letters* **1999**, *445*, 261.
- [36] B. Persson, Y. Kallberg, U. Oppermann, H. Jörnvall, *Chemico-Biological Interactions* **2003**, *143-144*, 271.
- [37] C. N. Ryzewski, R. Pietruszko, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1977**, *183*, 73.
- [38] F. M. Dickinson, K. Dalziel, *Nature* **1967**, *214*, 31.
- [39] A. D. Winer, *Acta Chemica Scandinavica* **1958**, *12*, 1695.
- [40] M. Wolberg, W. Hummel, C. Wandrey, M. Müller, *Angewandte Chemie* **2000**, *112*, 4476.
- [41] B. Riebel, *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **1996**.
- [42] W. Kruse, W. Hummel, U. Kragl, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1996**, *115*, 239.

- [43] W. Hummel, B. Riebel, *Enzyme Engineering* **1996**, *13*, 713.
- [44] W. Hummel, K. Abokitse, K. Drauz, C. Rollmann, H. Gröger, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2003**, *345*, 153.
- [45] K. Abokitse, W. Hummel, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2003**, *62*, 380
- [46] E. Keinan, K. K. Seth, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1987**, *501*, 130.
- [47] R. J. Lamed, E. Keinan, J. G. Zeikus, *Enzyme and Microbial Technology* **1981**, *3*, 144.
- [48] E. Keinan, E. K. Hafeli, K. K. Seth, R. Lamed, *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108*, 162.
- [49] O. Kleifeld, A. Frenkel, O. Bogin, M. Eisenstein, V. Brumfeld, Y. Burstein, I. Sagi, *Biochemistry* **2000**, *39*, 7702.
- [50] L. S. Alkassim, C. S. Tsai, *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire* **1990**, *68*, 907.
- [51] M. Peretz, O. Bogin, S. TelOr, A. Cohen, G. S. Li, J. S. Chen, Y. Burstein, *Anaerobe* **1997**, *3*, 259.
- [52] D. W. Green, H. W. Sun, B. V. Plapp, *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268*, 7792.
- [53] A. J. Ganzhorn, D. W. Green, A. D. Hershey, R. M. Gould, B. V. Plapp, *Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262*, 3754.
- [54] F. M. Dickinson, G. P. Monger, *Biochemical Journal* **1973**, *131*, 261.
- [55] F. M. Dickinson, S. Dack, *Chemico-Biological Interactions* **2001**, *130 -132*, 417.
- [56] V. Leskovac, S. Trivic, *The FASEB Journal* **1993**, *7*, A1071.
- [57] A. Trincone, B. Nicolaus, L. Lama, F. Marsiglia, A. Gambacorta, *Biotechnology Letters* **1991**, *13*, 31.
- [58] S. Ammendola, C. A. Raia, C. Caruso, L. Camardella, S. Dauria, M. Derosa, M. Rossi, *Biochemistry* **1992**, *31*, 12514.
- [59] C. A. Raia, S. Dauria, M. Rossi, *Biocatalysis* **1994**, *11*, 143.
- [60] K. Nakamura, R. Yamanaka, T. Matsuda, T. Harada, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2659.
- [61] F. Hollmann, A. Schmid, *Biocatalysis and Biotransformation* **2004**, *22*, 63.
- [62] J. Komoschinski, E. Steckhan, *Tetrahedron Letters* **1988**, *29*, 3299.
- [63] W. Hummel, *Applied Microbiology and Biotechnology* **1990**, *34*, 15.
- [64] M. Kataoka, L. P. Rohani, K. Yamamoto, M. Wada, H. Kawabata, K. Kita, H. Yanase, S. Shimizu, *Applied Microbiology and Biotechnology* **1997**, *48*, 699.
- [65] D. M. Clarke, P. D. Bragg, *Journal of Bacteriology* **1985**, *162*, 367.
- [66] M. M. Bradford, *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*, 248.

- [67] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680.
- [68] H. Schägger, G. Vonjagow, *Analytical Biochemistry* **1987**, *166*, 368.
- [69] J. Kyhse-Andersen, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **1984**, *10*, 203.
- [70] H. Blum, H. Beier, H. J. Gross, *Electrophoresis* **1987**, *8*, 93.
- [71] P. Edman, G. Begg, *European Journal of Biochemistry* **1967**, *1*, 80.
- [72] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **1989**.
- [73] D. Hanahan, *Journal of Molecular Biology* **1983**, *166*, 557.
- [74] H. C. Birnboim, J. Doly, *Nucleic Acids Research* **1979**, *7*, 1513.
- [75] B. Wilms, A. Wiese, C. Syldatk, R. Mattes, J. Altenbuchner, *Journal of Biotechnology* **2001**, *86*, 19.
- [76] S. Altschul, T. Madden, A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. Lipman, *Nucleic Acids Research* **1997**, *25*, 3389.
- [77] J. Thompson, D. Higgins, T. Gibson, *Nucleic Acids Research* **1994**, *22*, 4673.
- [78] W. Hummel, *Applied Microbiology and Biotechnology* **1990**, *34*, 15.
- [79] W. Hummel, *Biotechnology Letters* **1990**, *12*, 403.
- [80] C. W. Bradshaw, W. Hummel, C.-H. Wong, *Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57*, 1532.
- [81] M. Kataoka, K. Yamamoto, H. Kawabata, M. Wada, K. Kita, H. Yanase, S. Shimizu, *Applied Microbiology and Biotechnology* **1999**, *51*, 486.
- [82] T. Eguchi, Y. Kuge, K. Inoue, N. Yoshikawa, K. Mochida, T. Uwajima, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **1992**, *56*, 701.
- [83] R. L. Hanson, M. D. Schwinden, A. Banerjee, D. B. Brzozowski, B. C. Chen, B. P. Patel, C. G. McNamee, G. A. Kodersha, D. R. Kronenthal, R. N. Patel, L. J. Szarka, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1999**, *7*, 2247.
- [84] F. Kunst, N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, N. J. Cummings, R. A. Daniel, F. Denizot, K. M. Devine, A. Dusterhoft, S. D. Ehrlich, P. T. Emmerson, K. D. Entian, J. Errington, C. Fabret, E. Ferrari, D. Foulger, C. Fritz, M. Fujita, Y. Fujita, S. Fuma, A. Galizzi, N. Galleron, S. Y. Ghim, P. Glaser, A. Goffeau, E. J. Golightly, G. Grandi, G. Guiseppi, B. J. Guy, K. Haga, J. Haiech, C. R. Harwood, A. Henaut, H. Hilbert, S. Holsappel, S. Hosono, M. F. Hullo, M. Itaya, L. Jones, B. Joris, D. Karamata, Y. Kasahara, M. KlaerrBlanchard, C. Klein, Y. Kobayashi, P. Koetter, G. Koningstein, S. Krogh, M. Kumano, K. Kurita, A. Lapidus, S. Lardinois,

- J. Lauber, V. Lazarevic, S. M. Lee, A. Levine, H. Liu, S. Masuda, C. Mael, C. Medigue, N. Medina, R. P. Mellado, M. Mizuno, D. Moestl, S. Nakai, M. Noback, D. Noone, M. O'Reilly, K. Ogawa, A. Ogiwara, B. Oudega, S. H. Park, V. Parro, T. M. Pohl, D. Portetelle, S. Porwollik, A. M. Prescott, E. Presecan, P. Pujic, B. Purnelle, et al., *Nature* **1997**, *390*, 249.
- [85] W. Hilt, G. Pfeleiderer, P. Fortnagel, *Biochimica Et Biophysica Acta* **1991**, *1076*, 298.
- [86] Y. Fujita, R. Ramaley, E. Freese, *Journal of Bacteriology* **1977**, *132*, 282.
- [87] R. F. Ramaley, N. Vasanth, *Journal of Biological Chemistry* **1983**, *258*, 12558.
- [88] R. A. Welch, V. Burland, G. Plunkett, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E. L. Buckles, S. R. Liou, A. Boutin, J. Hackett, D. Stroud, G. F. Mayhew, D. J. Rose, S. Zhou, D. C. Schwartz, N. T. Perna, H. L. T. Mobley, M. S. Donnenberg, F. R. Blattner, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 17020.
- [89] M. Iwakura, J. Hattori, Y. Arita, M. Tokushige, H. Katsuki, *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **1979**, *85*, 1355.
- [90] B. D. Sanwal, R. Smando, *Journal of Biological Chemistry* **1969**, *244*, 1817.
- [91] B. D. Sanwal, J. A. Wright, R. Smando, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1968**, *31*, 623.
- [92] R. F. Ramaley, M. O. Hudock, *Biochimica Et Biophysica Acta* **1973**, *315*, 22.
- [93] S. K. Singh, S. P. Miller, A. Dean, L. J. Banaszak, D. C. LaPorte, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 7567.
- [94] F. R. Blattner, G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. ColladoVides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, Y. Shao, *Science* **1997**, *277*, 1453.
- [95] P. A. Jordan, Y. Tang, A. J. Bradbury, A. J. Thomson, J. R. Guest, *Biochemical Journal* **1999**, *344*, 739.
- [96] A. Galkin, L. Kulakova, T. Yoshimura, K. Soda, N. Esaki, *Applied and Environmental Microbiology* **1997**, *63*, 4651.
- [97] R. L. Hanson, J. M. Howell, T. L. LaPorte, M. J. Donovan, D. L. Cazzulino, V. Zannella, M. A. Montana, V. B. Nanduri, S. R. Schwarz, R. F. Eiring, S. C. Durand, J. M. Wasylyk, W. L. Parker, M. S. Liu, F. J. Okuniewicz, B. Chen, J. C. Harris, K. J. Natalie, K. Ramig, S. Swaminathan, V. W. Rosso, S. K. Pack, B. T. Lotz, P. J. Bernot, A. Rusowicz, D. A. Lust, K. S. Tse, J. J. Venit, L. J. Szarka, R. N. Patel, *Enzyme and Microbial Technology* **2000**, *26*, 348.
- [98] Z. Shaked, G. M. Whitesides, *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102*, 7104.

- [99] R. Wichmann, C. Wandrey, A. F. Buckmann, M.-R. Kula, *Biotechnology and Bioengineering* **1981**, *23*, 2789.
- [100] H. Slusarczyk, persönliche Mitteilung.
- [101] W. Hummel, B. Riebel, DE 100 37 101.9, **2001**.
- [102] B. Boonstra, D. A. Rathbone, C. E. French, E. H. Walker, N. C. Bruce, *Applied and Environmental Microbiology* **2000**, *66*, 5161.
- [103] D. M. Clarke, T. W. Loo, S. Gillam, P. D. Bragg, *European Journal of Biochemistry* **1986**, *158*, 647.
- [104] B. Riebel, persönliche Mitteilung.
- [105] E. M. Lilius, V. M. Multanen, V. Toivonen, *Analytical Biochemistry* **1979**, *99*, 22.
- [106] A. Z. Walton, J. D. Stewart, *Biotechnology Progress* **2004**, *20*, 403.
- [107] B. Dill, F. R. Heiker, A. Kirschning (Hrsg.), *Römpp-Lexikon Chemie*, Thieme, Stuttgart, **2004**.
- [108] M. Gomez, S. Jansat, G. Muller, M. C. Bonnet, J. A. J. Breuzard, M. Lemaire, *Journal of Organometallic Chemistry* **2002**, *659*, 186.
- [109] M. S. Rahman, M. Olliana, K. K. M. Hii, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1835.
- [110] V. Bette, A. Mortreux, D. Savoia, J.-F. Carpentier, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2837.
- [111] R. Yuan, S. Watanabe, S. Kuwabata, H. Yoneyama, *Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62*, 2494.
- [112] D. Mandal, A. Ahmad, M. Islam Khan, R. Kumar, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2004**, *27*, 61.
- [113] Y. Hasegawa, S. Adachi, R. Matsuno, *Journal of Fermentation and Bioengineering* **1997**, *83*, 346.
- [114] C. W. Bradshaw, H. Fu, G.-J. Shen, C.-H. Wong, *Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57*, 1526.
- [115] W. Hummel, *Trends in Biotechnology* **1999**, *17*, 487.
- [116] H. J. Schäfer, *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1981**, *20*, 911.
- [117] M. J. Burk, J. E. Feaster, R. L. Harlow, *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, *2*, 569.
- [118] P. Saravanan, S. Raina, T. Sambamurthy, V. K. Singh, *Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62*, 2669.
- [119] B. A. Persson, F. F. Huerta, J. E. Bäckvall, *Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64*, 5237.
- [120] M. J. Kim, I. S. Lee, N. C. Jeong, Y. K. Choi, *Journal of Organic Chemistry* **1993**, *58*, 6483.
- [121] H. Ikeda, E. Sato, T. Sugai, H. Ohta, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 8113.
- [122] W. Hummel, A. Liese, C. Wandrey, EP 00113127.51-2110, **1999**.

- [123] J. Haberland, A. Kriegesmann, E. Wolfram, W. Hummel, A. Liese, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2002**, *58*, 595.
- [124] J. Haberland, W. Hummel, T. Dausmann, A. Liese, *Organic Process Research & Development* **2002**, *6*, 458.
- [125] A. Endo, K. Hasumi, *Natural Product Reports* **1993**, *10*, 541.
- [126] F. G. Kathawala, *Medicinal Research Reviews* **1991**, *11*, 121.
- [127] K. L. Baumann, D. E. Butler, C. F. Deering, K. E. Mennen, A. Millar, T. N. Nanninga, C. W. Palmer, B. D. Roth, *Tetrahedron Letters* **1992**, *33*, 2283.
- [128] T. Saito, N. Sayo, R. Noyori, H. Takaya, S. Akutagawa, H. Kumobayashi, *Chemical Abstracts* **1989**, *111*, 620.
- [129] T. Saito, N. Sayo, R. Noyori, H. Takaya, S. Akutagawa, H. Kumobayashi (Takasago International Corp.), EP 0297752, **1989**. [*Chemical Abstracts* **1989**, *111*, 114745n].
- [130] V. Blandin, J. F. Carpentier, A. Mortreux, *European Journal of Organic Chemistry* **1999**, 3421.
- [131] G. Beck, H. Jendralla, K. Kessler, *Synthesis* **1995**, 1014.
- [132] M. Wolberg, M. Müller, W. Hummel, DE 198 57 302 A 1, **1998**.
- [133] K.-M. Chen, G. E. Hardtmann, Prasad, Kapa, O. Repic, M. J. Shapiro, *Tetrahedron Letters* **1987**, *28*, 155.
- [134] M. Wolberg, W. Hummel, M. Müller, *Chemistry* **2001**, *7*, 4562.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen recht herzlich bedanken, die durch Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere danke ich

Herrn Prof. Dr. Werner Hummel für die Überlassung des Themas, die stete Diskussionsbereitschaft, die vielen konstruktiven Anregungen sowie die ausgezeichnete Betreuung;

Herrn Prof. Dr. Manfred Braun für die freundliche Übernahme des Korreferats;

Frau Prof. Dr. Maria-Regina Kula und Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger für die Möglichkeit, an ihrem Institut unter hervorragenden Bedingungen diese Arbeit durchführen zu können;

Herrn Prof. Dr. Michael Müller für die stete Diskussionsbereitschaft, sein Interesse an der Arbeit sowie die Bereitstellung von Substraten;

Frau Jessica Mötter, Herrn Marcel Driessen und ganz besonders Frau Annika Sterlein für die tatkräftige Unterstützung und engagierte Mitarbeit im Labor;

Herrn Dr. Sebastian Neumann für die Einführung in die molekularbiologischen Arbeiten sowie die sehr gute Zusammenarbeit;

Frau Bea Paschold für die technische Unterstützung und die vielen guten Ratschläge;

Frau Birgit Henßen für die Durchführung der Proteinsequenzierung;

Frau Dipl.-Chem. Silke Bode und Frau Petra Geilenkirchen für die zügige Bereitstellung von wichtigen Substraten;

Frau Dipl.-Biol. Julia Schümers für die kritische Durchsicht dieser Arbeit sowie das heitere Arbeitsklima;

Frau Dr. Birgit Geueke, Herrn Dr. Kofi Abokitse und Herrn Dipl.-Biol. Mutlu Kuzu für die stete Diskussionsbereitschaft und die schöne Zeit im gemeinsamen Büro;

allen, auch ehemaligen Mitarbeitern des IMET für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre, insbesondere Frau Dr. Petra Heim, Frau Dipl.-Ing. Stefanie Kattenbach, Herrn Dr. Lutz Krieg und Frau Dipl.-Biol. Anne Lammerding;

der DBU für die finanzielle Unterstützung von Teilen dieser Arbeit im Rahmen des Verbundprojekts Biohydrierung;

meinen Eltern, dass sie mir eine Ausbildung in diesem Rahmen ermöglicht haben, und meiner gesamten Familie sowie meinem Freund Marcel für die fortwährende Unterstützung und Aufmunterung während der letzten Jahre.