



Autodisplay von Nitrilasen zur Umsetzung von Nitrilen zu Carbonsäuren

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

vorgelegt von

Christian Detzel

aus Landau in der Pfalz

Düsseldorf, November 2010

aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Joachim Jose

Koreferent: Prof. Dr. Matthias Kassack

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2010

Mein Dank gilt:

- Prof. Dr. Joachim Jose für die Möglichkeit der Promotion unter optimalen Bedingungen, sowie für das in mich gesetzte Vertrauen und die rundherum gelungene Zusammenarbeit;
- Prof. Dr. Matthias Kassack für die Übernahme des Zweitgutachtens;
- Dr. Ruth Maas für die ständige Bereitschaft mich mit Rat und Tat zu unterstützen und mich vor so manchen Irrungen und Wirrungen zu bewahren;
- Dr. Andreas Gratz für die Unterstützung bei meinen ersten Gehversuchen auf dem Gebiet der Molekularbiologie, sowie die vielen, vielen hilfreichen Diskussionen und konstruktive Kritik;
- Eva Kranen für die nette Zeit im Labor auch in stressigen Situationen, die gute Zusammenarbeit und die ständige Unterstützung bei meiner Terminverwaltung ohne die ich oft in einer misslichen Lage gewesen wäre;
- Dr. Andre Kaeßler für die vielen hilfreichen Tipps (gerade, aber nicht nur im Hinblick auf die HPLC) und die freundschaftliche Zusammenarbeit sowohl innerhalb als auch außerhalb des Labors;
- Dr. Alexandra Hamacher, Daniel Eßer, Eva Kranen, Hannes Kopitz und Bodo Hölzer für die gute Zusammenarbeit und das freundschaftliche Arbeitsklima bei der Betreuung und Organisation des Praktikums „Arzneimittelanalytik“;
- Daniel Schmidt für seine Freundschaft und die notwendige Ablenkung außerhalb der Universität;
- allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern und Kollegen (die ich jetzt nicht alle namentlich erwähne, die sich aber alle ausnahmslos angesprochen fühlen dürfen) des sich ständig vergrößernden Arbeitskreises für die kollegiale, produktive Arbeitsatmosphäre und die vielen interessanten Diskussionen und denkwürdigen Unternehmungen;

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die große Unterstützung im Studium und während der Promotion. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und Melanie für die allgegenwärtige, unermüdliche Unterstützung, ihren Rückhalt, ihre Förderung und ihr Vertrauen.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 04.11.2010

(Christian Detzel)

Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung.....	1
II.	Summary.....	3
III.	Einleitung	5
1.	Nitrilasen	6
1.1.	Entdeckung und physiologische Rolle	7
1.2.	Superfamilie der Nitrilasen	9
1.3.	Aufbau und Reaktionsmechanismus.....	9
1.4.	Anwendungen und Eigenschaften von Nitrilasen in der Biotechnologie.....	13
1.4.1.	Herbizidresistenz und Detoxifikation	13
1.4.2.	Enantioselektive Synthese	14
1.4.3.	Regioselektive Synthese.....	15
1.5.	Immobilisierung	16
2.	Das Autodisplay-System	17
3.	Ziele der Arbeit	20
IV.	Material und Methoden	21
1.	Material	21
1.1.	Geräte	21
1.2.	Software	22
1.3.	Chemikalien und Materialien	22
1.4.	Reagenziensätze („kits“)	24
1.5.	Enzyme	25
1.6.	Oligonukleotide	25
1.7.	Bakterienstämme	26
1.8.	Plasmide.....	26
1.9.	Nährmedien	27
1.9.1.	LB-Medium.....	27
1.9.2.	2xYT-Medium.....	27
1.9.3.	SOC-Medium	27
1.9.4.	PPM-Medium.....	27
1.10.	Lösungen und Puffer	27
1.10.1.	Lösungen für die Agarosegelelektrophorese.....	27
1.10.2.	Lösungen für die SDS-PAGE.....	28
1.10.3.	Lösungen für die Isolierung von Proteinen der äußeren Bakterienmembran	28
1.10.4.	Lösungen für die Plasmidisolierung nach Birnboim und Doly.....	29
1.10.5.	Lösungen für die Analytik mittels Dünnschicht-Chromatographie	29
1.10.6.	Lösungen für die Analytik mittels HPLC	29

2.	Methoden	30
2.1.	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	30
2.1.1.	Kultivierung auf Agarplatten	30
2.1.2.	Kultivierung im Schüttelkolben	30
2.1.3.	Kultivierung im Fermenter	31
2.1.4.	Stammhaltung	33
2.1.5.	Herstellung elektrokompenter Zellen	33
2.1.6.	Transformation von elektrokompenten Zellen.....	33
2.1.7.	Expression der Autotransporter Fusionsgene in <i>E. coli</i>	34
2.1.8.	Umsetzung im Mikroreaktionsgefäß.....	34
2.1.9.	Umsetzung im Fermenter	35
2.2.	Arbeiten mit Nukleinsäuren	35
2.2.1.	Plasmidisolierung.....	35
2.2.2.	Polymerasekettenreaktion	35
2.2.3.	Enzymatische Spaltung von DNA-Fragmenten	36
2.2.4.	Agarosegelelektrophorese.....	36
2.2.5.	Färbung von Agarose-Gelen.....	37
2.2.6.	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel	37
2.2.7.	Ligation.....	37
2.2.8.	DNA Sequenzanalyse.....	37
2.3.	Arbeiten mit Proteinen	38
2.3.1.	Außenmembranproteinpräparation	38
2.3.2.	Proteasesensitivitätstest.....	38
2.3.3.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.4.	Analytik	40
2.4.1.	Achirale HPLC-Analytik.....	40
2.4.2.	Mandelsäureextraktion und Kristallisation.....	42
2.4.3.	Chirale DC-Analytik	42
2.4.4.	Chirale HPLC-Analytik.....	43
2.4.5.	Kolorimetrische Bestimmung von Ammoniak	44
V.	Experimente und Ergebnisse	45
1.	Autodisplay einer Nitrilase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in <i>E. coli</i>	45
1.1.	Konstruktion eines Plasmids zum Autodisplay	45
1.2.	Expression und Oberflächenständigkeit der Nitrilase	47
1.3.	Enzymaktivität der oberflächenexprimierten Nitrilase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
1.3.1.	HPLC-Analyse.....	50
1.3.2.	Spektroskopische Methoden	51
2.	Autodisplay einer Nitrilase aus <i>Klebsiella pneumoniae</i> in <i>E. coli</i>	55
2.1.	Konstruktion eines Plasmids zum Autodisplay	55
2.2.	Expression und Oberflächenständigkeit der Nitrilase	58
2.3.	Enzymaktivität der oberflächenexprimierten Nitrilase aus <i>Klebsiella pneumoniae</i>	60
2.4.	Biochemische Charakterisierung des Ganzzell-Biokatalysators.....	68
2.4.1.	pH-Optimum	68
2.4.2.	Temperaturoptimum.....	69

3.	Klonierung und Oberflächenexpression einer Nitrilase aus <i>Alcaligenes faecalis</i> zum Autodisplay in <i>E. coli</i>	70
3.1.	Klonierung des Gens für eine Nitrilase aus <i>Alcaligenes faecalis</i>	70
3.2.	Expression von NitAf-AT unter der Kontrolle eines IPTG induzierbaren Promotors	72
3.3.	Expression von NitAf-AT unter der Kontrolle eines Rhamnose induzierbaren Promotors in <i>E. coli</i> KRX	73
3.4.	Oberflächenständigkeit der Nitrilase	74
3.5.	Enzymaktivität der oberflächenexprimierten Nitrilase aus <i>Alcaligenes faecalis</i>	76
3.6.	Vergleich der Mandelsäureproduktion in <i>E. coli</i> BL21(DE3), JK321(DE3), KRX und UT5600(DE3)	78
3.7.	Nachweis der Enantiomerenreinheit der produzierten Mandelsäure mittels chiraler Dünnschicht-Chromatographie	79
3.8.	Nachweis der Enantiomerenreinheit der produzierten R-Mandelsäure mittels chiraler HPLC	80
3.9.	Einfluss der Umsetzungstemperatur auf die Enantiomerenreinheit der R-Mandelsäure	81
3.10.	Umsetzung von Phenylacetonitril	83
3.11.	Umsetzung von Prunasin	84
3.12.	Optimierung der Kulturbedingungen	88
3.12.1.	Bestimmung der optimalen Substratkonzentration	88
3.12.2.	Bestimmung der optimalen Induktionszeit von IPTG	89
3.12.3.	Einfluss des Induktionszeitpunktes auf die Mandelsäureproduktion	89
3.13.	Biochemische Charakterisierung des Ganzzell-Biokatalysators	91
3.13.1.	pH-Optimum	91
3.13.2.	Temperaturoptimum	91
3.13.3.	Einfluss der Lagerung auf die Mandelsäureproduktion	92
3.13.4.	Bestimmung von K_m und v_{max}	94
3.13.5.	Zyklische Wiederverwendbarkeit	95
4.	Untersuchungen zur Produktion von R-Mandelsäure im Fermenter durch NitAf-AT tragende Zellen	97
4.1.	Produktion von R-Mandelsäure im Milligramm-Maßstab	97
4.2.	Vorversuche für die Kultivierung im Fermenter	98
4.3.	Kultivierung im Fermenter	100
4.4.	Produktion von R-Mandelsäure im Fermenter	110
VI.	Diskussion	113
1.	Enzymaktivität von Nitrilasen im Autodisplay-System	113
2.	Einfluss der Oberflächenpräsentation auf die Substratspezifität	116
3.	Biochemische Charakterisierung von NitAf-AT und NitKp-AT	118
3.1.	Einfluss des pH auf die Aktivität der oberflächenpräsentierten Nitrilasen	118
3.2.	Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Aktivität der oberflächenpräsentierten Nitrilasen	119
3.3.	Einfluss der Oberflächenpräsentation auf den K_m -Wert	119
3.4.	Lagerstabilität NitAf-AT tragender Zellen	120
3.5.	Wiederverwendbarkeit von NitAf-AT tragenden Zellen und Vergleich mit anderen Immobilisierungstechniken	121

Inhaltsverzeichnis

4.	Kultivierung NitAf-AT tragender Zellen im Fermenter	123
4.1.	Biomassewachstum.....	123
4.2.	Einflussfaktoren auf die Mandelsäureproduktion	124
4.2.1.	Glucose	124
4.2.2.	Einfluss der Induktion durch IPTG auf die Mandelsäureproduktion	126
4.2.3.	Mercaptoethanol.....	127
5.	Biokatalytische Produktion von Mandelsäure im Fermenter	127
5.1.	Vergleich mit anderen Nitrilase Ganzzell-Biokatalysatoren	128
6.	Fazit	129
VII.	Literatur.....	131
VIII.	Anhang.....	141
1.	Abkürzungsverzeichnis	141
2.	Sequenzen	142
3.	Plasmidkarten	149
4.	Veröffentlichungen	150

I. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die putative Nitrilase aus *Saccharomyces cerevisiae* (NitSc), die Nitrilase aus *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* (NitKp) und die Nitrilase aus *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* (NitAf) als Autodisplay-Passagiere auf der Zelloberfläche von *Escherichia coli* präsentiert. Die Oberflächenständigkeit der Passagierdomäne der erzeugten Autodisplay-Fusionsproteine NitSc-AT, NitKp-AT und NitAf-AT konnte mittels Proteasezugänglichkeitstest nachgewiesen werden. Für das lediglich aufgrund von Sequenzhomologien zur Enzymklasse der Nitrilasen zählende Enzym NitSc ist bisher noch kein Substrat bekannt. Zum Nachweis einer Nitrilaseaktivität wurde deshalb eine repräsentative Auswahl an aliphatischen, aromatischen und arylaliphatischen Verbindungen als Substrat getestet. Mit der getroffenen Auswahl war es für NitSc-AT tragende *E. coli* BL21(DE3) Zellen nicht möglich eine Nitrilaseaktivität nachzuweisen. Demgegenüber konnte für NitKp-AT tragende *E. coli* BL21(DE3) Zellen eine Nitrilaseaktivität nachgewiesen werden. Dabei akzeptierte NitKp-AT, wie das freie Enzym NitKp, Bromoxynil, Chloroxynil und Ioxynil als Substrat. Desweiteren konnte für NitKp-AT das Substratspektrum mit 3-Fluor-4-hydroxybenzonitril und 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzonitril auch auf fluoridierte und nichthalogenierte Verbindungen ausgeweitet werden, die bisher noch nicht als Substrate für das freie Enzym NitKp beschrieben wurden. Durch die Expression des Autotransporter Fusionsproteins NitAf-AT in *E. coli* BL21(DE3) konnte zum ersten Mal das Autodisplay eines multihomomeren Enzyms gezeigt werden, das aus bis zu 14 identischen Untereinheiten bestehen kann. Der erzeugte Ganzzell-Biokatalysator akzeptierte Phenylacetonitril und Mandelsäurenitril als Substrat, wobei Phenylacetonitril fünf Mal schneller umgesetzt wurde als Mandelsäurenitril. Die bei 37 °C erzeugte Mandelsäure wies einen Enantiomerenüberschuss von 99,2 % für das R-Enantiomer auf. Nach fünf zyklisch wiederholten 24-stündigen Umsetzungen in Tris-HCl pH 7 bei 30 °C konnte eine Restaktivität von 58 %, bezogen auf die Mandelsäureproduktion im ersten Reaktionszyklus, nachgewiesen werden. Der mit Mandelsäurenitril als Substrat für NitAf-AT ermittelte K_m -Wert lag in der gleichen Größenordnung wie der aus der Literatur bekannte K_m -Wert für das freie Enzym NitAf. Bei der Kultivierung von NitAf-AT tragenden Zellen im Fermenter konnte eine maximale Trockenzellmasse von 6,8 g L⁻¹ erzielt werden. Die nachfolgende Umsetzung von Mandelsäurenitril zu R-Mandelsäure im Fermenter führte zu einer durchschnittlichen Raum-Zeit-Ausbeute von 0,31 g L⁻¹ d⁻¹ Mandelsäure. Im Vergleich zur Umsetzung mit Schüttelkolbenkulturen bedeutete dies eine Verdopplung der Mandelsäureproduktion. Der Enantiomerenüberschuss für die im Fermenter bei 45 °C erzeugte R-Mandelsäure lag bei 95,8 %. Somit konnte zum

ersten Mal die generelle Eignung eines Autodisplay-Ganzzell-Biokatalysators zur Kultivierung im Fermenter sowie der anschließenden Umsetzung von Mandelsäurenitril im 2 L-Maßstab belegt werden.

II. Summary

In this work a putative nitrilase from *Saccharomyces cerevisiae* (NitSc), a nitrilase from *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* (NitKp) and a nitrilase from *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* (NitAf) were displayed as Autodisplay-passengers on the surface of *E. coli*. The surface exposure of the passenger domain of the constructed Autodisplay fusion proteins NitSc-AT, NitKp-AT und NitAf-AT was verified by protease accessibility tests. Previous studies have not yet reported a substrate for the enzyme NitSc, which was assigned to the enzyme class of nitrilases based on sequence similarity. Therefore a representative selection of aliphatic, aromatic and arylaliphatic compounds was tested as substrates, however it was not possible to detect any nitrilase activity for *E. coli* BL21(DE3) cells displaying NitSc-AT. In contrast, nitrilase activity could be detected for *E. coli* BL21(DE3) cells displaying NitKp-AT. NitKp-AT accepted Bromoxynil, Chloroxynil and Bromoxynil as substrates, as did the free enzyme. Furthermore, NitKp-AT was also able to convert 3-Fluor-4-hydroxybenzonitril and 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzonitril, which were so far not described as substrates for the free enzyme NitKp. With the expression of NitAf-AT in *E. coli* BL21(DE3) this study represents the first successful surface display of a multihomomeric enzyme, which composed of up to 14 subunits. The constructed whole-cell biocatalyst accepted phenylacetonitrile as well as mandelonitrile as substrate, hydrolyzing phenylacetonitrile approximately five times faster than mandelonitrile. The mandelic acid produced at 37 °C showed an enantiomeric excess of 99.2 % for the R-enantiomer. After five 24 h cycles of repeated use in Tris-HCl pH 7 at 30 °C the whole-cell biocatalyst showed a residual activity of 58 % in comparison with the first cycle. The K_m for NitAf-AT was calculated to be between 2.75-3.64 mM, depending on cell density and therefore within the same magnitude as the reported K_m (5.75 mM) for the free enzyme NitAf. The cultivation of NitAf-AT displaying cells in a bioreactor yielded a maximal dry cell weight of 6.8 g L⁻¹. Subsequent conversion of mandelonitrile to R-mandelic acid led to an average space-time yield of 0.31 g L⁻¹ d⁻¹, almost double the yield achieved with shaking flask cultures. The enantiomeric excess for the R-mandelic acid produced at 45 °C was determined to be 95.8 %. These results show for the first time the general suitability of an Autodisplay whole-cell biocatalyst for cultivation in a bioreactor for conversion of mandelonitrile in a 2 L scale.

III. Einleitung

Die Verwendung von Enzymen zur Katalyse chemischer Reaktionen ist bereits seit der Antike bekannt (Buchholz *et al.*, 2005). Trotz der langen Anwendung wurde die Biokatalyse erst im 19. Jahrhundert auf eine wissenschaftliche Basis gestellt. Wegführend waren die Arbeiten von Berzelius, der 1835 erkannte, dass die Hydrolyse von Stärke durch das Enzym Diastase eine katalytische Reaktion darstellte, sowie von Kühne, der 1878 erstmals dieser Klasse aktiver Substanzen den Namen Enzym gab (Bornscheuer und Buchholz, 2005).

Etwa zur gleichen Zeit begann auch die industrielle Vermarktung von standardisierten Enzym-Präparationen. Die Anzahl der verwendeten Enzyme in der organischen Synthese blieb jedoch bis in die Mitte des 20. Jahrhunderts recht überschaubar. Dies änderte sich erst mit der Entwicklung neuer Technologien auf dem Gebiet der Immobilisierung von Enzymen, die nun aufgrund ihrer erhöhten Stabilität und Wiederverwendbarkeit erstmals wirtschaftlich verwendet werden konnten (Buchholz *et al.*, 2005).

Zusätzlichen Auftrieb erhielt die industrielle Biokatalyse durch die Fortschritte in der Gentechnologie in den 1970ern. Die damals entwickelten Methoden der rekombinanten DNA-Technologie und des Gentransfers eröffneten die Möglichkeit, Proteine heterolog in Mikroorganismen zu exprimieren. Durch Überexpression rekombinanter Proteine, die bis zu 50 % des gesamten zellulären Proteingehaltes ausmachen können (Makrides, 1996), konnten hohe Produktivitätszunahmen erzielt werden. Aufgrund seiner sehr gut untersuchten Genetik, kurzen Generationszeiten und einfachen Handhabung ist das Gram-negative Enterobakterium *Escherichia coli* der zur Expression rekombinanter Proteine am häufigsten eingesetzte Organismus (Choi *et al.*, 2006). Der Einsatz von Mikroorganismen als Ganzzell-Biokatalysatoren hat den Vorteil, dass die meist kostenintensive Aufreinigung der Enzyme entfällt und sie aufgrund ihrer selbstreplikativen Fähigkeiten in fast unbegrenzter Menge zur Verfügung stehen.

Enzymkatalysierte Reaktionen weisen dabei entscheidende Vorteile gegenüber der klassischen Synthese auf. So erfolgen die Reaktionen unter milden Bedingungen wie Raumtemperatur, Atmosphärendruck, neutralem pH-Wert, sowie in wässrigen Systemen, was oftmals den Einsatz organischer Lösungsmittel stark reduziert.

Die Leistungsfähigkeit enzymatischer Prozesse belegt eindrucksvoll die biokatalytische Umsetzung von Glucose zu Fructose durch das Enzym Glucose-6-phosphat-Isomerase. Mit einer Jahresproduktion von mehr als 10.000.000 Tonnen ist

dies eine der mengenmäßig bedeutendsten enzymatisch katalysierten Reaktionen überhaupt (Buchholz *et al.*, 2005).

Weitere Vorteile enzymkatalysierter Reaktionen sind die hohen Enantio-, Regio- und Chemoselektivität, die aufgrund der hohen Substratspezifität von Enzymen erreicht werden können. Dabei kommt gerade der Enantioselektivität eine ständig steigende Bedeutung für die pharmazeutische Industrie zu. Um die von den Zulassungsbehörden (z.B. FDA und EMEA) geforderte Unbedenklichkeit des Arzneimittels gewährleisten zu können, ist es häufig notwendig ein enantiomerenreines Produkt auf den Markt zu bringen. Im Jahr 2000 lagen über 50 % der 500 weltweit meistverkauften Medikamente in enantiomerenreiner Form vor (O'Brien und Vanasse, 2000). Berücksichtigt man zusätzlich noch, dass in ca. 80 % aller organischen Synthesen Katalysatoren verwendet werden, erhält man eine ungefähre Vorstellung des riesigen Potentials der Biokatalyse (Gates, 1992).

Betrachtet man die Enzymklassen, die in der industriellen Biokatalyse Verwendung finden, so stellen Hydrolasen mit etwa 42 % den größten Anteil dar (Straathof *et al.*, 2002). Dabei kommt der zu den CN-Hydrolasen zählenden Klasse der Nitrilasen eine ständig wachsende Bedeutung zu, da die von ihnen gebildeten Produkte in einer Vielzahl organischer Synthesen wichtige Zwischenprodukte darstellen (Martínková *et al.*, 2008).

1. Nitrilasen

Nitrilasen (EC 3.5.5.1) katalysieren die Hydrolyse von Nitrilen zu den korrespondierenden Carbonsäuren und Ammoniak (Abbildung 1).

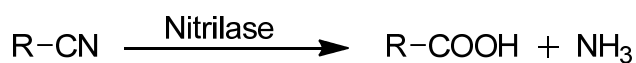


Abbildung 1: Reaktionsschema der Nitrilase-Reaktion.

Diese enge Definition wurde jedoch in den letzten Jahren erweitert, da gezeigt werden konnte, dass bei einigen Nitrilasen in Abhängigkeit vom verwendeten Substrat neben der korrespondierenden Carbonsäure, auch das Amid in unterschiedlichem Verhältnis gebildet werden kann (Pollmann *et al.*, 2002).

1.1. Entdeckung und physiologische Rolle

Eine enzymatische Aktivität in Pflanzen, die ein Nitril zu einer Carbonsäure hydrolysiert, wurde zum ersten Mal von Thimann und Mahadevan (1958) bei dem Versuch, die Biosynthese des Pflanzenhormons Indol-3-essigsäure aufzuklären, beschrieben. Das für diese Aktivität verantwortliche Enzym wurde aus Gerste (*Hordeum vulgare*) angereichert und ist aufgrund seiner Aktivität gegenüber Indolacetonitril zuerst als Indolacetonitrilase bezeichnet worden. Da Untersuchungen an weiteren Substraten zeigten, dass das Enzym ein viel größeres Substratspektrum aufwies, wurde es in Nitrilase umbenannt (Mahadevan und Thimann, 1964; Thimann und Mahadevan, 1964). Gingen Thimann und Mahadevan noch davon aus, dass Nitrilaseaktivität eher die Ausnahme, als die Regel in Pflanzen ist, konnte durch moderne Sequenzanalyse gezeigt werden, dass Nitrilasen ubiquitär in landbewohnenden Pflanzen vorkommen (Piotrowski, 2008).

Dieser Befund ist nicht weiter überraschend, berücksichtigt man die weite Verbreitung von Nitrilen, den Substraten der Nitrilasen, in der Natur. Nitrile werden dabei sowohl von Pflanzen, als auch von Mikroorganismen synthetisiert (Legras *et al.*, 1990). Ein Großteil der Nitrile liegen dabei als cyanogene Glykoside vor (Conn, 1979). Sie spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Fraßfeinden bei Pflanzen und Mikroorganismen. Dies geschieht einerseits durch Freisetzung giftiger Blausäure aus der Hydrolyse von Nitrilen und andererseits durch den für die cyanogenen Glykoside typischen bitteren Geschmack (Zagrobelny *et al.*, 2008). Desweiteren sind cyanogene Glykoside eine Speicherform für Glucose und Stickstoff (Selmar *et al.*, 1988).

Alle bisher untersuchten pflanzlichen Nitrilasen lassen sich aufgrund ihrer Substratspezifität in zwei Gruppen einteilen. Einerseits in die Gruppe mit einer hohen katalytischen Aktivität gegenüber Arylacetonitrilen und in die Gruppe mit hoher katalytischer Aktivität gegenüber β -Cyanoalanin (Howden und Preston, 2009). Bisher am besten charakterisiert sind die Nitrilasen aus *Arabidopsis thaliana*. *A. thaliana* besitzt vier unterschiedliche Nitrilasen, die nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung *Nit1–Nit4* benannt wurden und in der Pflanze unterschiedliche physiologische Bedeutung besitzen. Die ubiquitär in landbewohnenden Pflanzen vorkommenden *Nit4* Enzyme scheinen eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von Cyanid und somit der Wiederverwendung und Rückgewinnung von Stickstoff zu spielen (Piotrowski, 2008).

Im Laufe der Zeit nach Thimann's und Mahadevan's wegweisender Arbeit konnte Nitrilaseaktivität auch in Bakterien (Hook und Robinson, 1964; Robinson und Hook, 1964), Pilzen (z.B. *Aspergillus niger* (Thimann und Mahadevan, 1964) und

Saccharomyces cerevisiae (Churcher *et al.*, 1997)) und Archaeobakterien (Mueller *et al.*, 2006) nachgewiesen werden. Bakterien weisen jedoch deutlich seltener als Pflanzen Nitrilaseaktivität auf. Von über 150 sequenzierten Bakteriengenomen enthielten lediglich 10 Nitrilasegene (Podar *et al.*, 2005). Ein Großteil der bisher untersuchten mikrobiellen Nitrilasen mit Aktivität gegenüber aliphatischen Nitrilen wurde in den Genera *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Comamonas* und *Pseudomonas* nachgewiesen. Während Nitrilasen mit einer Aktivität gegen Arylacetonitrilen hauptsächlich in *Alcaligenes*, *Pseudomonas* und *Halomonas* gefunden wurden (Martínková und Křen, 2010). Aktivität gegenüber aromatischen Nitrilen konnte für *Klebsiella*, *Norcadia* und *Rhodococcus* nachgewiesen werden (Thuku *et al.*, 2009).

Da die bisherige Charakterisierung bakterieller Nitrilasen eher im Hinblick auf die Verwendbarkeit als Biokatalysator für industriell verwertbare Produkte geschah, ist die physiologische Rolle der bakteriellen Nitrilasen noch immer nur unvollständig aufgeklärt (Howden und Preston, 2009). Nitrilasen scheinen aber auch in Bakterien eine ähnliche physiologische Rolle wie in Pflanzen einzunehmen. Sie sind involviert in die Entgiftung von Nitrilen, die Rückgewinnung von Stickstoff und die Synthese von Pflanzenhormonen (Howden *et al.*, 2009a). Die Beobachtung von Banerjee *et al.* (2002), dass der Großteil der bisher charakterisierten mikrobiellen Nitrilasen nicht konstitutiv, sondern durch Nitrile induzierbar exprimiert werden, scheint die Vermutung zu bestätigen, dass die Nitrilasen an der Nährstoffversorgung und Detoxifikation beteiligt sind. Dies stimmt auch mit Untersuchungen überein, die an einigen Pseudomonaden durchgeführt wurden. Für diese konnte gezeigt werden, dass sie eine Nitrilase vom Typ *Nit4* exprimieren, die eine hohe Sequenzhomologie mit Pflanzennitrilasen aufweist. Diese Nitrilase katalysiert die Hydrolyse von β -Cyanoalanin zu Asparaginsäure. Dadurch erhält das Bakterium die Fähigkeit in einer ansonsten toxischen, β -Cyanoalanin reichen Umgebung zu wachsen und dieses Substrat zur Stickstoffgewinnung einzusetzen (Howden *et al.*, 2009b).

Besonders gut untersucht ist die Fähigkeit von Bakterien das Pflanzenhormon Indol-3-essigsäure (IAA) zu synthetisieren. IAA kontrolliert so wichtige physiologische Prozesse wie das Zellwachstum und -teilung, sowie die Gewebedifferenzierung in Pflanzen (Spaepen *et al.*, 2007). Andererseits ist IAA ein wichtiger Pathogenitätsfaktor vieler Bakterien. Für einige Bakterienstämme konnte die Produktion von IAA durch den Nitrilase-abhängigen Indol-3-acetonitril-Weg (IAN) nachgewiesen werden. (Kobayashi *et al.*, 1993; Howden *et al.*, 2009b). Die Bedeutung dieses Syntheseweges für die Bakterien ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Diskutiert wird, dass erhöhte Konzentrationen von IAA zu Veränderungen der

Pflanzenphysiologie und in letzter Konsequenz zu einem verbesserten Nährstoffangebot für das Bakterium führen.

Auch in Säugetieren konnten Nitrilase Homologe vom Typ *Nit1* nachgewiesen werden. Lange Zeit war die Funktion dieser Homologe bei Säugetieren völlig unklar. Eine Wende leitete erst die Entdeckung der NitFhit Fusionsproteine in *Caenorhabditis elegans* ein (Pekarsky *et al.*, 1998). Dabei handelt es sich um Fusionsproteine, die aus einer C-terminalen Fhit-Domäne („fragile histidine triad“) und einer N-terminalen Nitrilase-Domäne mit Homologie zu bakteriellen und pflanzlichen Nitrilasen, bestehen. Mit der Entschlüsselung ihres Signaltransduktionsweges konnte in Säugetieren eine Tumorsupprimierende Wirkung nachgewiesen werden (Sun *et al.*, 2009).

1.2. Superfamilie der Nitrilasen

Nitrilasen werden nach ihrer Substratspezifität grob in drei Gruppen eingeteilt (Kobayashi und Shimizu, 1994). Dabei wird zwischen Nitrilasen, die aromatische, aliphatische und Arylacetonitrile als Substrate umsetzen, unterschieden.

Durch die Zunahme an Sequenzinformationen und Weiterentwicklungen im Bereich der computerunterstützten Datenbankanalyse entdeckten Bork und Koonin (1994) signifikante Sequenzhomologien zwischen Nitrilasen, Cyanid-Hydratasen, aliphatischen Amidasen, β -Alanin-Synthasen und einigen anderen Enzymen mit unbekannter Funktion. Diese Enzyme fassten sie zur großen Gruppe der CN-Hydrolasen zusammen. Dieses Klassifizierungssystem wurde von Pace und Brenner (2001) verfeinert und der aktualisierten Datenlage angepasst. Sie fassten alle Mitglieder der CN-Hydrolasen unter dem Begriff „nitrilase superfamily“ zusammen. Aufgrund von Struktur-basierten Sequenzanalysen konnten sie die Mitglieder der „nitrilase superfamily“ 13 unterschiedlichen Gruppen zuordnen. Unter diesen Gruppen weist lediglich eine Gruppe, die „Nitrilase-Gruppe“ typische Nitrilaseeigenschaften auf, also die Fähigkeit zur Umsetzung von Nitrilen zu Carbonsäuren. Der größte Anteil (acht Gruppen) weist Amidaseeigenschaften auf. Bemerkenswert ist auch das Auftreten von Fusionsproteinen in 7 der 13 Gruppen. Dabei ist die Nitrilase-Domäne mit mindestens einer zusätzlichen Domäne fusioniert. Über die physiologische Bedeutung dieser Fusionsproteine ist bisher nur wenig bekannt.

1.3. Aufbau und Reaktionsmechanismus

In Ermangelung von Nitrilase-Kristallstrukturen musste zur Aufklärung der Nitrilasestruktur auf Homologe zurückgegriffen werden. Beide bisher untersuchten

Proteine, das *C. elegans* NitFhit-Fusionsprotein (Pace *et al.*, 2000) und die N-carbamoyl-D-Aminosäure-Hydrolase aus *Agrobacterium radiobacter* (Wang *et al.*, 2001), wiesen dabei eine neuartige α - β - β - α Struktur des Monomers auf. Dabei sind zwei α -Helices außen angeordnet, die die innen liegenden zwei Lagen mit jeweils sechs β -Faltblättern zusammenhalten. Die Monomere aggregieren dabei zur typischen $\alpha\beta\beta\alpha$ - $\alpha\beta\beta\alpha$ Sandwichstruktur der Dimere. Weitere Untersuchungen an Vertretern aus der „nitrilase superfamily“, die eine entfernte Verwandtschaft zu Nitrilasen aufwiesen, konnten belegen, dass die $\alpha\beta\beta\alpha$ - $\alpha\beta\beta\alpha$ Struktur ein charakteristisches Merkmal dieser Enzymfamilie darstellt.

In Abbildung 2 ist die schematische Struktur der Nit-Domäne des NitFhit-Fusionsproteins dargestellt (Brenner, 2002). Gut zu erkennen ist die charakteristische $\alpha\beta\beta\alpha$ Struktur der vier Monomere, die zusammen die Nit-Domäne ausbilden. Das mit NS13 bezeichnete β -Faltblatt stellt die Fusionsstelle mit der Fhit-Domäne dar.

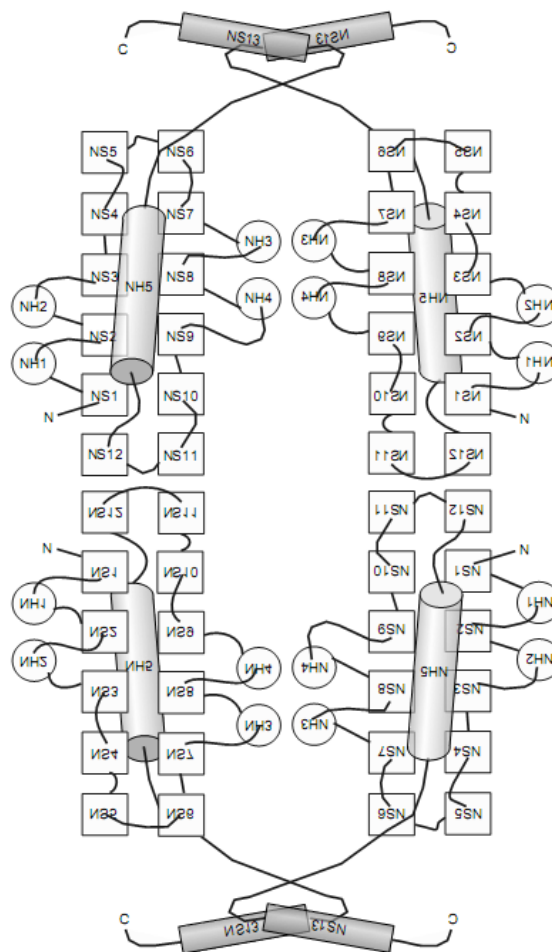


Abbildung 2: Schematische Struktur der tetrameren Nit-Domäne des NitFhit Fusionsproteins (Brenner, 2002). β -Faltblätter sind mit NS1–NS13 bezeichnet. α -Helices sind mit NH1 – NH5 bezeichnet. NS13 ist ein konservierter Bereich in der Gruppe 10 der „nitrilase superfamily“ und ist dort mit einer Fhit-Domäne fusioniert.

Oligomerisierung ist aber nicht nur auf die NitFhit-Fusionsproteine beschränkt, sondern ist auch bei den bisher untersuchten mikrobiellen Nitrilasen ein häufig beobachtetes Strukturmerkmal. Von wenigen Ausnahmen abgesehen, wie z.B. der Nitrilase aus *Pyrococcus abyssi* (Mueller *et al.*, 2006) und *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* (Stalker *et al.*, 1988a), sind die Dimere bei einem Großteil der bisher untersuchten mikrobiellen Nitrilasen inaktiv (Thuku *et al.*, 2009). Erst durch die Zusammenlagerung von 4–22 identischen Untereinheiten entsteht das aktive Enzym. Dabei lagern sich immer Dimere zu geradzahligen Vielfachen zusammen. Die Größe der Untereinheiten bewegt sich dabei, abhängig vom Enzym, im Bereich zwischen 30 und 45 kDa (O'Reilly und Turner, 2003). Über die tatsächliche Quartärstruktur der Nitrilasen ist bisher wenig bekannt. Für die rekombinante und aufgereinigte Nitrilase aus *Rhodococcus rhodochrous* J1 konnte in vitro die Ausbildung einer linksgängigen Spiralstruktur nachgewiesen werden (Thuku *et al.*, 2007).

Über die funktionelle Bedeutung der Oligomerisierung gibt es noch keine gesicherten Erkenntnisse. Jandhyala *et al.* (2005) beobachteten eine Zunahme der Aktivität in Abhängigkeit vom Oligomerisierungsgrad bei der Cyanid-Dihydratase aus *Bacillus pumilus* C1. Dass eine Vergrößerung des Komplexes mit einer Erhöhung der Enzymaktivität einhergeht ist ein häufig beschriebenes Phänomen der Nitrilasen aus *Rhodococcus* (Harper, 1977; Harper, 1985; Stevenson *et al.*, 1992). Weiterhin wäre es denkbar, dass die Bildung höherer Komplexe, wie für die Nitrilasen aus *Sorghum bicolor* nachgewiesen, zu einer Veränderung des Substratspektrums führen (Jenrich *et al.*, 2007). *S. bicolor* besitzt drei Isoformen von Nitrilasen, die einzeln inaktiv sind. Erst die Aggregation zu heteromeren Komplexen führt zur Bildung eines funktionellen Enzyms, dessen Substratspezifität je nach Zusammensetzung variiert.

Alle bisher untersuchten Mitglieder der „nitrilase superfamily“ besitzen drei hochkonservierte Aminosäuren (Cystein, Lysin und Glutamat) (Wang *et al.*, 2001; Brenner, 2002; Andrade *et al.*, 2007). Da diese bei den bisher zur Verfügung stehenden Kristallstrukturen eine große räumliche Nähe aufweisen, wurde angenommen, dass sie im gefalteten Enzym eine katalytische Triade bilden. Ein hypothetischer Reaktionsmechanismus beginnt mit der Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem Cysteinrest der katalytischen Triade und dem Substrat (Nakai *et al.*, 2000). Durch die Addition von Wasser wird das Produkt unter Freisetzung von Ammoniak gebildet und vom Enzym losgelöst. Die Wasseradditionen erfolgen dabei vermutlich über ein negativ geladenes Intermediat mit tetraedrischer Geometrie. Die zwei anderen Aminosäuren der katalytischen Triade sind vermutlich an Protonen-Transferreaktionen (Glutamat) oder der Stabilisierung des tetraedrischen Übergangszustandes (Lysin) beteiligt (Abbildung 3).

Vom tetraedrischen Übergangszustand kann die Reaktion in Richtung der korrespondierenden Carbonsäure gehen (Abbildung 3 A), wenn der entstehende Thioester, nach Abspaltung von Ammoniak, nukleophil durch Wasser angegriffen wird. Unterbleibt der nukleophile Angriff durch ein Wassermolekül, dann zerbricht der tetraedrische Übergangszustand und das Amid wird entlassen (Abbildung 3 B). Osswald *et al.* (2002) konnten für pflanzliche Nitrilasen nachweisen, dass das Substrat einen wesentlichen Einfluss auf das Bildungsverhältnis von Carbonsäure zu Amid hat. Das Verhältnis wird zum Amid hin verschoben, wenn das Substrat elektronenabstoßende Substituenten enthielt.

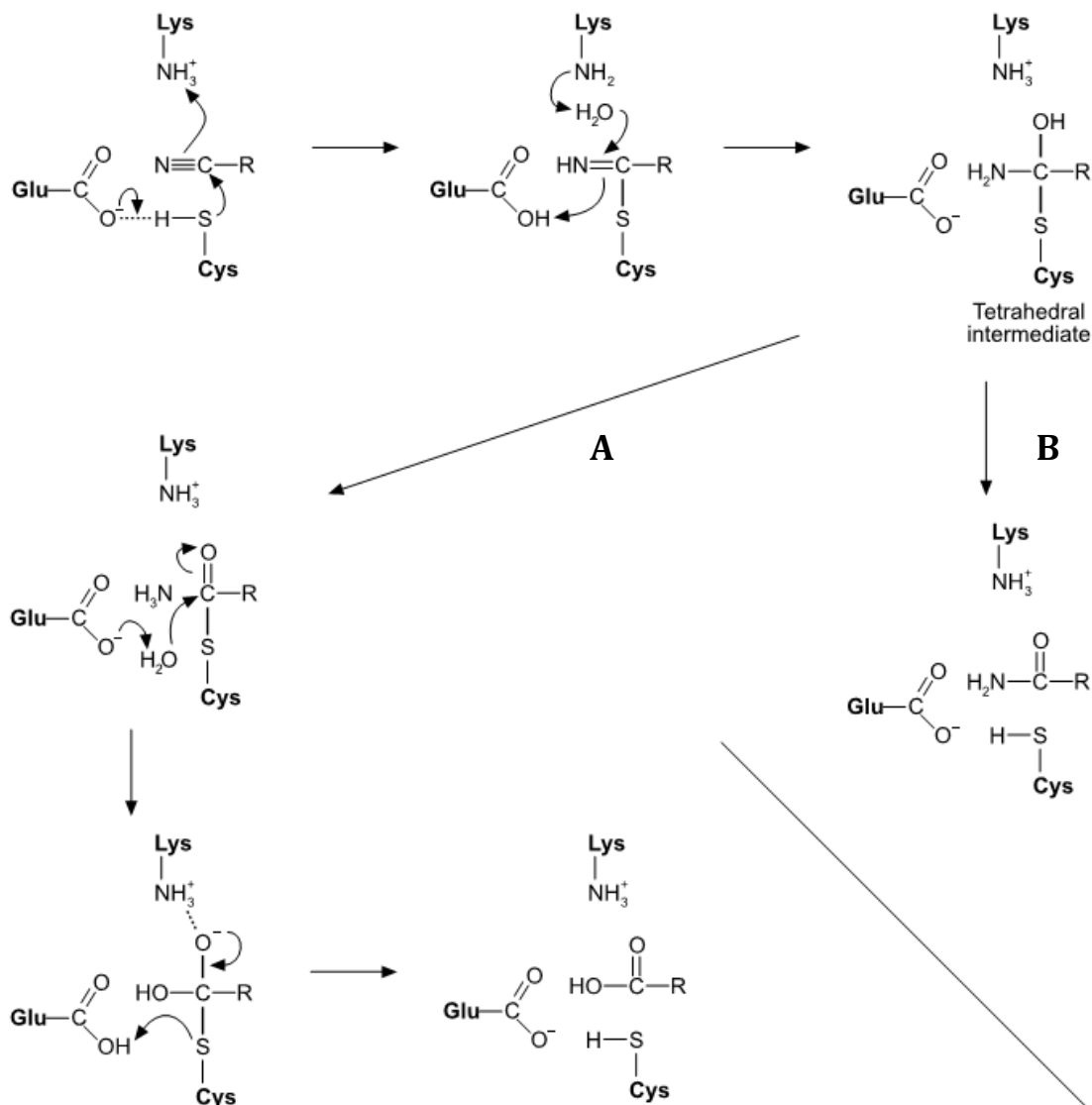


Abbildung 3: Hypothetischer Nitrilase-Reaktionsmechanismus (verändert nach Piotrowski (2008)). Die drei konservierten Aminosäuren der katalytischen Triade sind fettgedruckt dargestellt. Nach der Bildung des tetraedrischen Übergangszustandes kann die Reaktion entweder in Richtung der korrespondierenden Carbonsäure (A) oder bis zum Amid (B) ablaufen.

1.4. Anwendungen und Eigenschaften von Nitrilasen in der Biotechnologie

1.4.1. Herbizidresistenz und Detoxifikation

Obwohl die Nitrilasen schon 1964 von Thimann und Mahadevian entdeckt wurden, dauerte es gut 20 Jahre bis sich die ersten kommerziellen Anwendungen abzeichneten (Martínková und Mylerová, 2003). Einen großen Anteil daran hatte die erste heterologe Expression einer mikrobiellen Nitrilase aus *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* durch McBride *et al.* (1986). Diese Nitrilase zeigte eine ausgeprägte Aktivität gegenüber dem Herbizid Bromoxynil, sowie dessen Derivaten Chloroxynil und Ioxynil. Dabei werden die Herbizide, die wegen ihrer Hemmung der Photosynthese zur Bekämpfung von Unkraut bei Getreide und Mais eingesetzt werden (Freyssinet *et al.*, 1996), Nitrilase-vermittelt in die korrespondierenden Carbonsäuren überführt, die eine geringere Toxizität aufweisen (Abbildung 4).

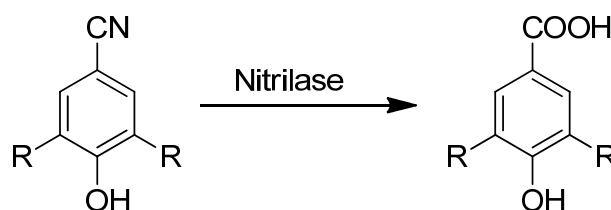


Abbildung 4: Reaktionsschema der Nitrilase aus *K. pneumoniae*. Bromoxynil (R= Br), Chloroxynil (R= Cl), Ioxynil (R= I).

Untersuchungen zeigten, dass das Nitrilase-Gen ursprünglich auf einem 82 kb großen Plasmid in *K. pneumoniae* vorlag. Durch Transformation dieses Plasmids in *E. coli* gelang die heterologe Expression. Die transformierten Zellen verloren jedoch, aufgrund von enzymatischer Degradation des Plasmids, innerhalb kurzer Zeit ihre Aktivität gegenüber Bromoxynil (Stalker und McBride, 1987). Erst die Identifizierung und Überführung des Nitrilase-kodierenden Gens (bxn) in einen Expressionsvektor führte zu einer stabilen und hohen Expression von Nitrilase-Protein in *E. coli*. Die weitere Charakterisierung der Nitrilase zeigte, dass, Nitrilase-untypisch, bereits das Dimer die volle katalytische Aktivität aufwies. Dabei setzt sich die Nitrilase aus zwei 37 kDa großen Homomeren zusammen (Stalker *et al.*, 1988a).

Da die Industrie und Landwirtschaft eine stetig steigende Masse an Cyanid- bzw. Nitril-haltigen Abfällen produziert, wäre der Einsatz von Nitrilasen zur Detoxifikation von Abwässern von großem Nutzen (Gupta *et al.*, 2010). Bis heute wurde jedoch noch kein biotechnologisches Verfahren auf Grundlage eines Nitrilase-Biokatalysators etabliert. Es existieren lediglich Untersuchungen zur Reinigung Herbizid-haltiger

Abwässer mit *Agrobacterium radiobacter* (Müller und Gabriel, 1999), sowie die Entgiftung Acrylnitril-haltiger Industrieabwässer durch ein Gemisch unterschiedlicher Bakterienarten mit Nitril-Hydratase-, Amidase- und Nitrilaseaktivität (Wyatt und Knowles, 1995). Die Etablierung von Detoxifikationsprozessen auf Grundlage von enzymatisch katalysierten Reaktionen wird häufig durch die komplexe Zusammensetzung der Abwässer und die geringe Stabilität der Biokatalysatoren erschwert.

Kommerziell durchgesetzt hat sich die Verwendung des Nitrilasegens *bxn* (kodiert für die Nitrilase aus *K. pneumoniae*) zur Erzeugung transgener Nutzpflanzen (Stalker *et al.*, 1988c). Dabei wurde das Nitrilasegen mithilfe von *Agrobacterium tumefaciens* in Tabakpflanzen zur Erzeugung einer Bromoxynil-Resistenz eingebracht. Im Folgenden wurde das *bxn* Gen auch in Baumwolle (May *et al.*, 2003), Raps (Freyssinet *et al.*, 1992), Tomate (Stalker *et al.*, 1988b) und Kartoffel (Eberlein *et al.*, 1998) eingeschleust. Das Potential dieser Methode für die Landwirtschaft zeigt sich vor allem in der dominierenden Position gentechnisch veränderter Baumwolle. Im Jahr 2002 betrug der Anteil gentechnisch veränderter Baumwolle 77 % an der gesamten Anbaufläche für Baumwolle in den USA (May *et al.*, 2003).

1.4.2. Enantioselektive Synthese

Obwohl bis heute ca. 137 Nitrilasen im Hinblick auf ihre Eignung zur Umsetzung industriell wichtiger Nitrile charakterisiert wurden (Robertson *et al.*, 2004), sind bisher nur zwei Anwendungen im industriellen Maßstab etabliert worden (Polaina und MacCabe, 2007). Dazu zählt die enantioselektive Synthese von R-Mandelsäure aus racemischem Mandelsäurenitril durch ein Nitrilase-katalysiertes Verfahren das sowohl in der BASF (Deutschland), als auch bei Mitsubishi Rayon (Japan) eingesetzt wird. Mit einer Produktion von mehreren tausend Tonnen pro Jahr ist dies eine der derzeit mengenmäßig bedeutendsten industriellen Anwendungen von Nitrilasen in der Biokatalyse (Buchholz *et al.*, 2005). R-Mandelsäure ist dabei ein wichtiges chirales Intermediat in der Synthese von semisynthetischen Penicillinen (Furlenmeier *et al.*, 1974) und Cephalosporinen (Terreni *et al.*, 2001), sowie für Chemotherapeutika (Surivet und Vatéle, 1998; Surivet und Vatéle, 1999). Desweiteren wird Mandelsäure als Reagenz in der fraktionierten Kristallisation von Enantiomeren verwendet (Kinbara *et al.*, 1996).

Eine Aktivität gegenüber Mandelsäurenitril wurde zum ersten Mal für die Nitrilase aus *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* ATCC 8750 beschrieben (Yamamoto *et al.*, 1991). Dabei zeigte die Nitrilase eine ausgeprägte Enantioselektivität für das R-Mandelsäurenitril (Abbildung 5). Durch enzymatische Katalyse konnte

R-Mandelsäure mit einem Enantiomerenüberschuss von fast 100 % produziert werden, wobei keinerlei Amid als Nebenprodukt detektierbar war.

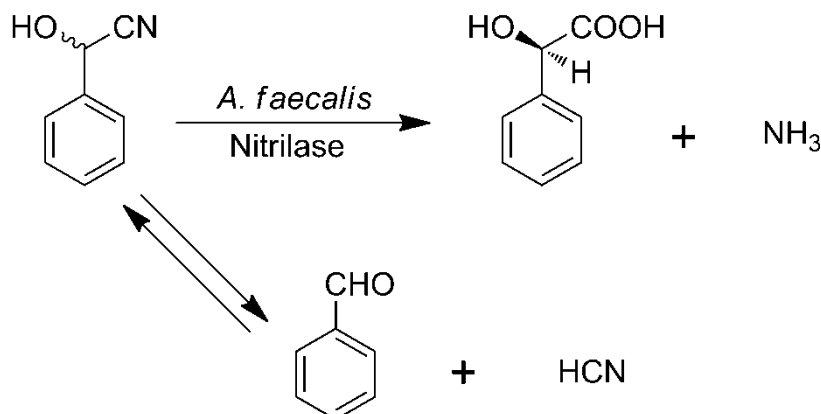


Abbildung 5: Reaktionsschema der Nitrilase aus *A. faecalis*.

In der weiteren Charakterisierung zeigte die Nitrilase Aktivität gegenüber einem breiten Substratspektrum mit einer Vorliebe gegenüber Arylacetonitrilen. Das funktionelle Enzym besitzt einen multihomomeren Aufbau, bestehend aus 14 Untereinheiten mit einer Größe von 32 kDa pro Untereinheit (Yamamoto *et al.*, 1992; Thuku *et al.*, 2009).

1.4.3. Regioselektive Synthese

Das zweite industriell bedeutende Verfahren ist die Herstellung von 1,5-Dimethyl-2-Piperidin-2-on (1,5-DMPD) (Cooling *et al.*, 2001). 1,5-DMPD findet als Industriereiniger für elektronische Bauteile Verwendung und wird unter dem Handelsnamen Xolvone von DuPont (USA) vertrieben (Hann *et al.*, 2002).

In diesem Prozess katalysiert die Nitrilase aus *Acidovorax facilis* 72W regioselektiv die Umsetzung der Vorstufe 4-Cyanovaleriansäure (4-CPA) aus 2-Methylglutarsäuredinitril (MGN) (Abbildung 6).

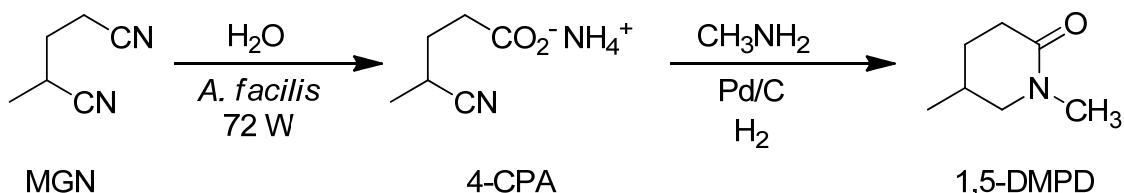


Abbildung 6: Chemoenzymatische Synthese von 1,5-DMPD.

Die regioselektive Hydrolyse von Di- oder Trinitrilen ist neben der Enantioselektivität ein weiterer Vorteil der enzymatischen Katalyse mit Nitrilasen. Denn die spezifische

Hydrolyse nur einer von mehreren chemisch identischen CN-Gruppen ist mit klassischen chemischen Katalysatoren nicht ohne weiteres möglich.

Nitrilase-katalysierte Reaktionen mit Potenzial für die industrielle Anwendung

Eine große Anzahl weiterer wertvoller Verbindungen mit hohem Anwendungspotenzial für die Industrie konnten durch chemoenzymatische Synthese mit Nitrilase-Biokatalysatoren hergestellt werden. Tabelle 1 zeigt einen kleinen Überblick über Verbindungen, die mittels chemoenzymatischer Reaktion entweder energiesparender (Hydroxyessigsäure), umweltfreundlicher (Lactone) oder enantioselektiver (R-2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-2-carbonsäure) produzierbar sind im Vergleich zur chemischen Synthese.

Tabelle 1: Industrielle Produkte die durch chemoenzymatischer Synthese mittels Nitrilasen zugänglich sind.

Produkt	Verwendungszweck	Referenz
Hydroxyessigsäure	Kosmetika, Industriereiniger	(Panova <i>et al.</i> , 2007)
R-2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-2-carbonsäure	Intermediat für Pharmazeutika	(Benz <i>et al.</i> , 2007)
β -Hydroxycarbonsäuren	Intermediate für Pharmazeutika	(Ankati <i>et al.</i> , 2009)
Lactone	Aromen, Insekten-Pheromone	(Pollock <i>et al.</i> , 2007)

Den genannten Vorteilen der Nitrilasen, nämlich deren Fähigkeit zur enantio- und regioselektiven Synthese von Carbonsäuren unter milden Bedingungen stehen jedoch auch einige Nachteile gegenüber. So tolerieren Nitrilasen häufig nur einen geringen pH- und Temperaturbereich. Ein weiteres Hindernis, das einer breiteren Anwendung von Nitrilasen in der industriellen Biokatalyse im Weg steht, ist häufig die geringe Stabilität der freien Enzyme in Lösung (Martínková und Křen, 2010). Da die Kosten der Enzyme häufig den limitierenden Faktor darstellen, kann durch eine Immobilisierung und der damit einhergehenden gesteigerten Stabilität und Wiederverwendbarkeit die Wirtschaftlichkeit einer (chemo-)enzymatischen Synthese beträchtlich erhöht werden.

1.5. Immobilisierung

Der wirtschaftliche Erfolg eines biotechnologisch erzeugten Produktes hängt häufig von der Möglichkeit zur günstigen großtechnischen Herstellung ab. Dabei kommt der Verfügbarkeit, Stabilität und Wiederverwendbarkeit der eingesetzten Enzyme eine Schlüsselstellung zu. Als effiziente Methode stellte sich die Immobilisierung von Enzymen heraus. Durch Immobilisierung werden Katalysatoren in eine unlösliche

Form gebracht. Dies ermöglicht eine effiziente und ökonomische Abtrennung des Katalysators aus dem Reaktionsmedium und erleichtert die anschließende Wiederverwendbarkeit. Angewandt auf Biokatalysatoren bietet es zudem noch den Vorteil, dass eine Immobilisierung häufig mit einer erhöhten Stabilität der Enzymaktivität einhergeht. Dies trifft vor allem auf oligomere Enzyme wie den Nitrilasen zu, da der erste Schritt der Inaktivierung häufig mit einer Dissoziation der Untereinheiten einhergeht (Fernandez-Lafuente, 2009).

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen drei Immobilisierungstechniken (Sheldon, 2007):

- 1) Einschluss eines Katalysators in ein organisches Polymer (z.B. Alginat oder Carrageen) („Entrapment“)
- 2) Quervernetzung von Enzymaggregaten oder -kristallen durch ein bifunktionales Reagenz (z.B. Glutaraldehyd), zur Erzeugung trägerfreier Nanopartikel („cross-linking“) und
- 3) Immobilisierung auf einem festen Träger (z.B. Polymerkügelchen oder Siliziumkügelchen mit großer spezifischer Oberfläche).

Einen neuen Ansatz zur Immobilisierung stellt die Präsentation von funktionellen Enzymen auf der Oberfläche von Bakterien und Hefen dar (Samuelson *et al.*, 2002). Aufgrund der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten in der Mikrobiologie, Biotechnologie und Immunotherapie kommt Oberflächenexpressionssystemen eine ständig steigende Bedeutung zu (Wernérus und Stähl, 2004). Gerade in der Biokatalyse können Oberflächenexpressionssysteme viele ihrer Vorteile ausspielen. So vereinen sie die Vorteile einer chemisch unveränderten Immobilisierung auf einem festen Träger (Zelle), ohne Diffusionsbarrieren mit dem Vorteil der Ganzzell-Biokatalysatoren zur Selbstreplikation. Bisher wurde schon eine Vielzahl unterschiedlicher Enzyme, wie z.B.: Lipasen (Lee *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2010), Organophosphat-Hydrolasen (Li *et al.*, 2008), Esterasen (Schultheiss *et al.*, 2002; Talker-Huiber *et al.*, 2003), Dehydrogenasen (Jose und von Schwichow, 2004) und α -Amylasen (Narita *et al.*, 2006) um nur einige zu nennen, erfolgreich auf der Oberfläche von Bakterien und Hefen präsentiert. Die Verwendung einer mittels Autodisplay oberflächenpräsentierten Nitrilase in der Biokatalyse ist jedoch bisher noch nicht beschrieben worden.

2. Das Autodisplay-System

Das Autodisplay-System beruht auf dem Autotransportermechanismus Gram-negativer Bakterien (Jose und Meyer, 2007). Die Bezeichnung Autotransporter

spiegelt die Tatsache wieder, dass das Autotransporter-Protein bereits alle notwendigen Strukturelemente für eine Translokation auf die Oberfläche von *E. coli* besitzt. Ein typisches Autotransporter-Protein kann in vier Domänen unterteilt werden (Abbildung 7 A). Am N-Terminus besitzt es ein „Signalpeptid“ (SP) das die Translokation des Fusionsproteins über die innere Membran steuert. Das Signalpeptid dient dabei als Erkennungssequenz des Sec-Apparates und wird, nach erfolgtem Transport in den periplasmatischen Raum, abgespalten (Abbildung 7 B). Auf das Signalpeptid folgen eine Passagierdomäne, welche die eigentliche physiologische Funktion des Autotransporterproteins vermittelt und eine Verbindungsdomäne („Linker“), die für die vollständige Präsentation des Passagiers auf der Zelloberfläche verantwortlich ist.

Den C-Terminus des Proteins bildet eine Domäne (β -Domäne), die für die Translokation des Passagiers über die äußere bakterielle Membran verantwortlich ist. Nach Übertritt des Vorläuferproteins in den periplasmatischen Raum und Abspaltung des Signalpeptids, bildet der C-Terminus eine fassartige Tertiärstruktur aus amphipatischen β -Faltblättern aus, kurz β -barrel genannt, die sich in die äußere Membran einlagert. Für die Translokation über die äußere Membran postulierten Pohlner *et al* (1987) ein Modell, welches in Abbildung 7 B schematisch dargestellt ist. Demnach wird zunächst der Linker in das Porin-ähnliche β -barrel inkorporiert und bildet eine haarnadelartige Struktur aus, welche den Passagier in ungefaltetem Zustand an die Zelloberfläche transportiert (Klauser *et al.*, 1992; Klauser *et al.*, 1993; Jose *et al.*, 1996). Nach der Translokation ist lediglich die Passagierdomäne oberflächenständig und bleibt durch das β -barrel in der Außenmembran verankert. In Abhängigkeit vom Vorhandensein einer Erkennungssequenz im Protein für Außenmembranproteasen (z.B. OmpT) von *E. coli* ist auch eine Sekretion des Passagiers in das extrazelluläre Medium möglich.

Auf Basis dieses Sekretionsmechanismus wurde ein artifizielles System, das „Autodisplay-System“, zur Expression rekombinanter Peptide und Proteine auf der Zelloberfläche von *E. coli*, entwickelt (Maurer *et al.*, 1999). Dafür wird der für den natürlichen Passagier kodierende DNA-Abschnitt entfernt und gegen einen offenen Leserahmen eines anderen Peptids oder Proteins ausgetauscht. Dieser artifizielle Passagier wird dann über den Autotransportermechanismus in den Extrazellularraum transloziert.

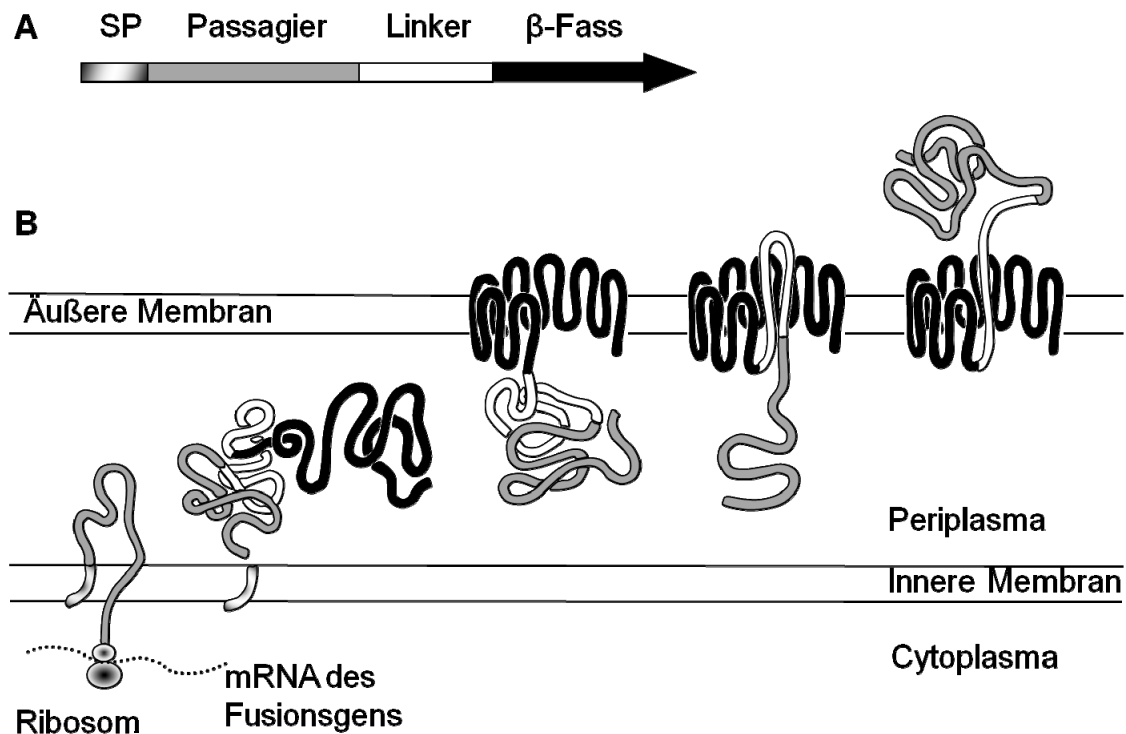


Abbildung 7: Primärstruktur eines Autotransporter-Fusionsproteins (A) und Modell des Autotransporter-Sekretionsmechanismus in *E. coli* (B).

Das Autodisplay-System wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Jose erfolgreich zu einem leistungsfähigen Werkzeug zur Beantwortung von analytischen, biotechnologischen und pharmazeutischen Fragestellungen weiterentwickelt. Dabei setzt sich das optimierte Fusionsprotein aus einem Signalpeptid aus Cholera toxin B (CtxB aus *Vibrio cholerae*) und der β -Domäne aus dem Protein AIDA-I („adhesin involved in diffuse adherence“), einem Adhärenzfaktor aus dem enteropathogenen *E. coli* 2787 (EPEC) (Benz und Schmidt, 1989), zusammen.

Das Autodisplay-System konnte bisher bei der funktionellen Expression einer Vielzahl unterschiedlicher Passagiere seine Leistungsfähigkeit unter Beweis stellen. Dazu zählen Peptide (Jose *et al.*, 2005), die zur Durchführung von Bindungsstudien oder zum Screening von Peptidinhibitoren verwendet werden können (Betscheider, 2008). Das Autodisplay funktioneller Enzyme (z.B. Esterase *EstA*) (Schultheiss *et al.*, 2002) zur Erzeugung von Ganzzell-Biokatalysatoren stellt einen neuen interessanten Ansatz zur Immobilisierung von Proteinen in der Biotechnologie dar. Die Bakterienzelle kann dabei als fester Träger angesehen werden, auf dem das Enzym selbsttätig immobilisiert vorliegt. Dabei bietet das Autodisplay-System den Vorteil, dass sich die funktionelle Expression von Proteinen nicht nur auf Monomere beschränkt. Durch die funktionelle Oberflächenexpression von bovinem Adrenodoxin (Adx) konnte zum ersten Mal der Nachweis erbracht werden, dass eine passagiervermittelte Aggregation von monomeren Autodisplay-Passagieren zum

funktionellen Homodimer möglich ist (Jose *et al.*, 2002). Durch die funktionelle Expression der homodimeren Sorbitoldehydrogenase (SDH) konnte ein Ganzzell-Biokatalysator zur Produktion von Zuckern und Alkoholen erzeugt werden, die durch klassische Synthese nicht zugänglich sind (Jose und von Schwichow, 2004). Autodisplay erleichtert auch den Zugang zu Enzymen für analytische Zwecke, ohne die Notwendigkeit aufwendiger Proteinisolierungen oder Aufreinigungen aus „inclusion bodies“. Dadurch konnte zum ersten Mal eine funktionelle Hyaluronidase in *E. coli* rekombinant exprimiert werden (Kaessler *et al.*, 2010). Auch die Zusammenlagerung zweier heteromerer Autodisplay-Passagiere zu einem funktionellen Antikörperfragment (Blasshofer, 2008), sowie die funktionelle Expression einer heteromeren Kinase (CK2) konnten durch Verwendung des Autodisplay-Systems realisiert werden (Gratz, 2010).

Bisher wurde noch keine Nitrilase auf der Zelloberfläche von *E. coli* präsentiert. Auch die funktionelle Präsentation eines multihomomeren Enzyms mit bis zu 14 Untereinheiten, wie es für die Nitrilase aus *A. faecalis* beschrieben wurde, konnte noch nicht gezeigt werden.

3. Ziele der Arbeit

Mit der Autodisplay Technologie steht ein leistungsfähiges System zur funktionellen Oberflächenpräsentation heterologer Enzyme in *E. coli* zur Verfügung. Dabei kann das Enzym als auf der Bakterienzelle immobilisiert vorliegend angesehen werden. Durch die funktionelle Expression der Nitrilasen aus *Saccharomyces cerevisiae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* und *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* ATCC 8750 sollte das biokatalytische Potential des Autodisplay-Systems zur Umsetzung von Nitrilen zu den korrespondierenden Carbonsäuren untersucht werden. Nach Überprüfung der Enzymaktivität sollten die Biokatalysatoren im Hinblick auf die Produktausbeute optimiert, sowie biochemisch charakterisiert werden. Abschließend sollte einer der erzeugten Ganzzell-Biokatalysatoren zur Umsetzung von Nitrilen zu Carbonsäuren im Fermenter verwendet werden.

IV. Material und Methoden

1. Material

1.1. Geräte

Tabelle 2: In dieser Arbeit eingesetzte Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Autoklav	3850 ELV	Systec, Wettenberg
Brutschrank	P10825028	Memmert, Schwalbach
Elektroporationsküvetten	1 mm Küvetten	PeqLab, Erlangen
Elektroporator	2510	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage	2001 MP2	Sartorius, Göttingen
Gefriertruhe (-70 °C)	HAT2086	Hettich, Tuttlingen
Geldokumentation	Gel Jet Imager	Intas, Göttingen
Gelkammer (Agarose)	Electrophoresis Sub System 150	Labnet, Edison, NJ, USA
Gelkammer (SDS-PAGE)	Mini Protean IV	Bio-Rad, München
Heizblock	Accublock Digital Dry Bath	Labnet, Edison, NJ, USA
Heizrührgerät	RCT IKAMAG	IKA, Staufen
HPLC (achirale Trennungen)	Alliance 2695	Waters, Milford, MA, USA
HPLC (chirale Trennungen)	LaChrom Elite	VWR-Hitachi, Darmstadt
Inkubationsschüttler	Minitron	Infors, Einsbach
Kühl-/Gefrierkombination (4 °C/-20 °C)	Fris88f	Thermo Fisher, Dreieich
Kühlzentrifuge	Universal 32R	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge	Sorvall RC-5C Plus	Thermo Fisher, Dreieich
Mikrowellengerät	MW 1000	Alaska, Mannheim
Netzteil	Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
pH-Meter/Einstabmesskette	pH-Meter766 Calimatic	Knick, Berlin
Photometer	Genesys 6	Thermo Fisher, Dreieich
Pipetten Pipetman	P2, P20, P200, P1000	Gilson, Limburg-Offheim
Reinstwasseranlage	MilliQ Biocel	Millipore, Eschborn
Rotoren (Sorvall)	SS-34, SLA-1500	Thermo Fisher, Dreieich
Rotoren (Tischzentrifuge)	1612, 1617	Hettich, Tuttlingen
Rotationsverdampfer	Rotavapor R, KRvr 65/45	Büchi, Essen
Spülmaschine	Compact-Desinfektor G7783CD	Miele, Gütersloh
Schüttelinkubator	VorTemp 56	Labnet, Edison, NJ, USA
Schüttelinkubator	PHMT	Grant, Cambridge, UK

Gerät	Bezeichnung	Firma
Thermocycler	Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Primus 25 advanced	PeqLab, Erlangen
Tischzentrifuge	MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge, kühlbar	Mikro200R	Hettich, Tuttlingen
Trockenschrank	ET6130	Heraeus, Hanau
Vakuumpumpe	MZ 2C	vacuubrand, Wertheim
Vortex Schüttler	Vortex Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Wasserbad	Haake D1-L	Thermo Fisher, Dreieich

1.2. Software

Tabelle 3: In dieser Arbeit eingesetzte Software

Bezeichnung	Bezugsquelle
VectorNTI 10.0	Invitrogen, Karlsruhe
Prism 5	Graphpad, La Jolla, CA, USA
Origin Pro 7.5	OriginLabs, MA, USA
Millenium ³²	Waters, Milford, MA, USA
EZChrom Elite	VWR-Hitachi, Darmstadt

1.3. Chemikalien und Materialien

Tabelle 4: In dieser Arbeit eingesetzte Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle
1-Anilinacetonitril	Acros
3-Brom-4-hydroxybenzonitril	Alfa Aesar
3-Brom-4-hydroxybenzoesäure	Alfa Aesar
3,5-Dibrom-4-hydroxybenzoesäure	Acros
3,5-Dichlor-4-hydroxybenzoesäure	Alfa Aesar
3,5-Diiod-4-hydroxybenzoesäure	Alfa Aesar
3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzonitril	Molekula
3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure	Acros
3-Fluor-4-hydroxybenzonitril	Syntho Chemicals
3-Fluor-4-hydroxybenzoesäure	Alfa Aesar
2-Mercaptoethanol	Roth
4-Methoxybenzonitril	Molekula
4-Methoxybenzoesäure	Acros
3-Phenylpropionitril	Acros

Bezeichnung	Bezugsquelle
3-Phenylpropionsäure	Acros
Agar-Agar	Roth
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth
Albumin Fraktion V, BSA	Roth
Alu-Caps mit Septum (Butylgummi/PTFE)	WICOM
Ammoniumchlorid	Grüssing
Ammoniumperoxodisulfat	Merck
Ampicillin-Natrium	Roth
Aprotinin	Roth
APS	Merck, Darmstadt
Benzonitril	Fluka
Benzoessäure	Acros
Bromoxynil	Acros
Bromphenolblau	Acros
n-Butyronitril	Fluka
iso-Butyronitril	Sigma-Aldrich
Chiralplate® (DC-Platten)	Macherey-Nagel
Chloroxynil	Alfa-Aesar
Coomassie Brilliant Blue	Serva
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Acros
Dinatrium-ethylendiamintetraessigsäure-dihydrat (Na ₂ EDTA * 2 H ₂ O)	Applichem
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DNA-Größenmarker Generuler 1 kB	Fermentas
Eisessig	Fluka
Ethanol p.a.	Riedel-de Haën
Ethidiumbromid-Lösung 1 %	Roth
Ethylacetat technisch	ZCL
Fetal Calf Serum (FCS)	BioWest
Glucose (wasserfrei)	Fisher Scientific
Glycerol p.a. wasserfrei	Roth
Glycerol reinst 86%	Roth
Glycin p.a.	Roth
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Applichem
Ioxynil	Acros
Isopropanol p.a.	Fluka
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid	Fermentas
Kaliumacetat	J.T. Baker

Bezeichnung	Bezugsquelle
Kaliumchlorid	Acros
Kaliumhydroxid	Sigma
Magnesiumchlorid	VWR Prolabo
R,S-Mandelsäure	Merck
R-Mandelsäure	Aldrich
Mandelsäureamid	Aldrich
Mandelsäurenitril	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat	J.T. Baker
Natriumdodecylsulfat	Serva
Natriumhydrogensulfat	Sigma
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumphenolat	Sigma-Aldrich
n-Laurylsarcosinat-Na	Sigma
Page Ruler Unstained Protein Ladder	Fermentas
Phenylacetoneitril	Fluka
Phenylelessigsäure	Fluka
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Rotiphorese Gel 30 37,5:1	Roth
Salzsäure konz.	Merck
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm, PES-Membran)	VWR
Stärke	Merck
Succinonitril	Acros
TEMED	Roth
Trifluoressigsäure	Fisher Scientific
Tris	Sigma-Aldrich
Triton X	Serva
Trypton/Pepton aus Casein	Roth
n-Valeronitril	Acros
iso-Valeronitril	Acros
Vials (1,5 mL, Braunglas)	VWR

1.4. Reagenziensätze („kits“)

Tabelle 5: In dieser Arbeit eingesetzte Reagenziensätze („kits“)

Reagenziensatz	Bezugsquelle
PCR-Mastermix S	PeqLab, Erlangen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit (pCR2.1)	Invitrogen, Karlsruhe

1.5. Enzyme

Tabelle 6: In dieser Arbeit eingesetzte Enzyme

Bezeichnung	Bezugsquelle
XhoI	NEB, Frankfurt a.M.
KpnI	NEB, Frankfurt a.M.
Lysozym aus Hühnereweiß	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Fluka,
EcoRI	NEB, Frankfurt a.M.
HindIII	NEB, Frankfurt a.M.
RNase	Sigma-Aldrich
T4 DNA Ligase	NEB

1.6. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (München) synthetisiert.

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Funktion	Sequenz
M13forward	Sequenzierung	5'-GTAAAACGACGGCCAGTG
M13reverse	Sequenzierung	5'-GGAAACAGCTATGACCATG
Pr182	Amplifikation des NitSc-ORF (upstream)	5'- ACTCGAGGCGAAACACATTGTTGC
Pr183	Amplifikation des NitSc-ORF (downstream)	5'- GGGGTACCAATAGGCCTAGCATCCAC
Pr177	Amplifikation des NitKp-ORF (upstream)	5'- CCGCTCGAGGACACCACTTTCAAAGCAGC
Pr185	Amplifikation des NitKp-ORF (downstream)	5'- AAGGTACCGCATGCTGCTCTCGGGTCC
Pr179	Amplifikation des NitAf-ORF (upstream)	5'- CCGCTCGAGCAGACAAGAAAAATCGTCC
Pr180	Amplifikation des NitAf-ORF (downstream)	5'- GGGGTACCGGACGGTTCTTGCACC

1.7. Bakterienstämme

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Genomische Determinanten	Referenz
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	B, F ⁻ , dcm, ompT, lon, hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻), gal, λ(DE3)	(Studier und Moffatt, 1986)
<i>E. coli</i> UT5600(DE3)	F ⁻ , ara-14, leuB6, secA6, lacY1, proC14, tsx-67, Δ(ompT-fepC)266, entA403, trpE38, rfbD1, rpsL109(Str ^r), xyl-5, mtl-1, thi-1, λ(DE3)	(Jose und Handel, 2003)
<i>E. coli</i> JK321(DE3)	ΔompT, proC, leu-6, trpE38, entA, zih12::Tn10, dsbA::kan λ(DE3) lysogen	(Maurer <i>et al.</i> , 1997)
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ , φ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK ⁻ mK ⁺), phoA, supE44, λ ⁻ , thi-1, gyrA96, relA1	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> KRX	[F ⁺ , traD36, ΔompP, proA+B+, lacIq, Δ(lacZ)M15] ΔompT, endA1, recA1, gyrA96, (Nal ^r), thi-1, hsdR17 (rK ⁻ , mK ⁺), e14 ⁻ (McrA ⁻), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), Δ(rhaBAD)::T7 RNA polymerase	Promega, Mannheim
<i>E. coli</i> One Shot TOP10	F ⁻ , mcrA, D(mrr – hsd, RMS – mcrBC) Φ80 lacZ, DM15, DlacX74, recA1, deoR, araD139, D(ara-leu), 7697 galU, galK, rpsL, (Str ^R) endA1 nup6	Invitrogen, Karlsruhe

1.8. Plasmide

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Bezeichnung	Determinante	Referenz
pCD001 (pET-S. cer)	bla, T7 Promotor, (pET-System), AT-Fusionsgen mit Nitrilase (<i>S. cerevisiae</i>)-ORF als Passagier, lacI, ColE1 origin	Diese Arbeit
pCD002 (pET-KOZ)	bla, T7 Promotor, (pET-System), AT-Fusionsgen mit Nitrilase (<i>K. pneumoniae</i>)-ORF als Passagier, lacI, ColE1 origin	Diese Arbeit
pCD003 (pET-A. faec)	bla, T7 Promotor, (pET-System), AT-Fusionsgen mit Nitrilase (<i>A. faecalis</i>)-ORF als Passagier, lacI, ColE1 origin	Diese Arbeit
pEK004	bla, T7 Promotor, (pET-System), AT-Fusionsgen mit Prenyltransferase (<i>A. fumigatus</i>)-ORF als Passagier, lacI, ColE1 origin	AK Jose
pET-Adx	bla, T7 Promotor, (pET-System), AT-Fusionsgen mit bovinem Adrenodoxin-ORF als Passagier, lacI, ColE1 origin	AK Jose
pBluescriptII KS (-)	bla, T7 Promotor,	Stratagene

1.9. Nährmedien

Die Nährmedien wurden im Anschluss an ihre Herstellung bei 121 °C und einem Druck von 1,1 kg/cm² für 20 min im Autoklav sterilisiert. Nicht autoklavierbare Zusätze wie Glucose und Antibiotika wurden sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße), bevor sie den abgekühlten Medien zugegeben wurden.

1.9.1. LB-Medium

10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl,
16 g/L Agar (nur bei Festmedien).

1.9.2. 2xYT-Medium

16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl.

1.9.3. SOC-Medium

20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 0,5 g/L NaCl, 2,5 g/L KCl,
20 mM D-Glucose (sterilfiltriert), 10 mM MgCl₂ (autoklaviert)

1.9.4. PPM-Medium

15 g/L Proteose Pepton, 5 g/L NaCl, 1 g/L Zulkowsky Stärke, 1 g/L KH₂PO₄
0,8 g/L K₂HPO₄, 20 % (v/v) Glycerol

1.10. Lösungen und Puffer

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen und Puffer mit Reinstwasser angesetzt.

1.10.1. Lösungen für die Agaroseelektrophorese

0,8 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer (Lösen durch Aufkochen)

TAE-Puffer (50x, pH 8,0):

2 M Tris, 0,1 M Essigsäure, 50 mM EDTA (pH 8,0)

DNA-Probenpuffer (10x):

0,42 % (w/v) Bromphenolblau, 50 % (v/v) Glycerol, 10 mM EDTA (pH 8,0)

DNA-Färbebad:

1 mg Ethidiumbromid in 1 L 1x TAE-Puffer

1.10.2. Lösungen für die SDS-PAGE

Trenngel-Puffer (4x):

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4 % (w/v) SDS, 0,4 % (v/v) TEMED

Sammelgel-Puffer (4x):

1,25 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4 % (w/v) SDS, 0,4 % (w/v) TEMED

Polyacrylamidtrenngel (12,5 %):

41,6 % (v/v) Rotiphorese Acrylamid Gel 30, 25 % (v/v) Trenngel-Puffer (4x),
0,1 % (w/v) APS

Polyacrylamidtrenngel (10 %):

33 % (v/v) Rotiphorese Acrylamid Gel 30, 25 % (v/v) Sammelgel-Puffer (4x)
0,1 % (w/v) APS

Tris-Glycin Elektrodenpuffer (5x):

125 mM Tris, 1,25 M Glycin, 0,5 % (w/v) SDS

Protein-Probenpuffer (2x):

100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4 % (w/v) SDS, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau,
45 % (v/v) Methanol

Coomassie-Brilliant Blue Färbelösung:

2,5 g/L Coomassie Brilliant Blue R250, 10 % (v/v) Essigsäure,
45 % (v/v) Methanol

1.10.3. Lösungen für die Isolierung von Proteinen der äußeren Bakterienmembran

Tris-HCl Puffer	0,2 M	Tris-HCl (pH 8,0)
Saccharoselösung	1,0 M	D-Saccharose
EDTA-Lösung	10,0 mM	Na ₂ EDTA
Lysozym	10,0 mg/mL	Lysozym
PMSF	100,0 mM	PMSF in 2-Propanol
Aprotinin	10,0 mg/mL	Aprotinin in 10 mM HEPES (pH 8,0)
N-Laurylsarcosin	1,0 mg/mL	N-Laurylsarcosin in PBS
DNase I	1,0 mg/mL	DNase I

Proteinase K 0,5 mg/mL Protein

Extraktionspuffer:

50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM MgCl₂, 2 % (v/v) Triton X-100

PBS:

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄

1.10.4. Lösungen für die Plasmidisolierung nach Birnboim und Doly

Lösung 1: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM Na₂EDTA; 100 µg/mL RNase

Lösung 2: 0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS

Lösung 3: 2,55 M Kaliumacetat (pH 4,8 mit Eisessig eingestellt)

1.10.5. Lösungen für die Analytik mittels Dünnschicht-Chromatographie

Substrat-Stammlösung:

Wenn nicht anders angegeben wurde eine 0,5 M Stammlösung des jeweiligen Substrates in Methanol, verwendet.

Fließmittel:

Dichlormethan/Methanol (90:10; v/v)

1.10.6. Lösungen für die Analytik mittels HPLC

Substrat-Stammlösung:

Wenn nicht anders angegeben wurde eine 0,5 M Stammlösung des jeweiligen Substrates in Methanol, verwendet.

Fließmittel für die achirale Trennung der Umsetzungen von Mandelsäurenitril und Phenylacetonitril:

Wasser/Methanol/H₃PO₄ 85 % (60:40:0,1; v/v/v)

Fließmittel für die chirale Trennung der Umsetzung von Mandelsäurenitril:

n-Heptan/2-Propanol/TFA (95:5:0,1; v/v/v)

Fließmittel für die Trennung der Umsetzung von Prunasin:

Wasser/Methanol/TFA (90:10:0,1; v/v/v)

Fließmittel für die Trennung der Umsetzungen von Bromoxynil, Chloroxynil, Ioxynil, 3-Brom-4-hydroxybenzonitril, 4-Methoxybenzonitril, 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzonitril:

Wasser/Methanol/Eisessig/Acetonitril (48:32:0,4:20; v/v/v)

Fließmittel für die Trennung der Umsetzung von 3-Fluor-4-hydroxybenzonitril:

Wasser/Methanol/Eisessig (59,5:40:0,5; v/v/v)

2. Methoden

Sofern nicht anders angegeben, basieren alle molekularbiologischen Methoden auf Vorschriften von Sambrook *et al.* (2001).

2.1. Arbeiten mit *E. coli*

2.1.1. Kultivierung auf Agarplatten

Zur Kultivierung auf LB-Platten wurde von einer Platten- oder Stichkultur mit einer sterilisierten Impföse ein Verdünnungsausstrich angefertigt oder steril eine Kugel der Dauerkultur aus der Stammhaltung auf die Platte gebracht und geschwenkt. Die Platten enthielten bei Stämmen ohne Plasmid kein Antibiotikum. Stämme, welche die bla-Resistenzdeterminante exprimierten wurden auf Platten mit 50 µg/mL Ampicillin kultiviert. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

2.1.2. Kultivierung im Schüttelkolben

Übernackulturen wurden in 20 mL LB-Medium angesetzt und bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Zum Beimpfen wurde entweder eine Kolonie einer Plattenkultur, 1 Kugel einer Dauerkultur aus der Stammsammlung oder 20 µL einer Glycerolkultur verwendet. Enthielten die Stämme Plasmide, die als Selektionsmarker die bla-Resistenzdeterminante enthielten, so wurden 100 µg/mL Ampicillin zugesetzt. Hauptkulturen wurden mit 1/100 ihres Volumens mit der Übernackkultur inokuliert. Alle Kulturen wurden mit 10 mM Mercaptoethanol und bei Vorhandensein der bla-Resistenzdeterminante mit Antibiotika versetzt und bei 37 °C und 200 rpm kultiviert.

2.1.3. Kultivierung im Fermenter

Die Kultivierung im Fermenter wurde im Rahmen einer Auftragsfermentation im „Sächsischen Institut für Angewandte Biotechnologie e.V.“ (SIAB) in Leipzig durchgeführt.

Zur Erzeugung einer Vorkultur wurden 100 mL LB-Medium (100 µg/mL Ampicillin) mit einer halben Impföse einer *E. coli* BL21(DE3) pCD003 Agarkultur beimpft. Nach 16 h Inkubation bei 30 °C und 150 rpm wurde die komplette Vorkultur in einen Fermenter (Biostat MD, Fa. B. Braun Biotech International) überführt. Das Fermentationsmedium (1,6-3,0 L Arbeitsvolumen) bestand aus LB-Medium und 100 µg/mL Ampicillin.

Eingesetztes Arbeitsvolumen der jeweiligen Fermenter:

Fermenter	Maximales Füllvolumen des Reaktors (bis Deckelrand)	Tatsächlich genutztes Arbeitsvolumen während der Versuche
1	3,0 L	1,6 L
2	3,0 L	1,6 L
3	3,0 L	1,6 L
4	3,0 L	1,6 L
5	7,0 L	3,0 L
6	7,0 L	3,0 L
7	7,0 L	3,0 L
8	2,5 L	2 L
9	2,5 L	2 L
10	2,5 L	2 L

Mercaptoethanol (10 mM), IPTG (0,1-1,0 mM) und Glucose wurden nach dem jeweiligen Kultivierungsprotokoll zugefügt:

Fermenter	IPTG [mM]	Mercaptoethanol [mM]	Zugabe Mercaptoethanol	Glucose [g/L]
1	1	10	zu Beginn	0
2	0,1	10	zeitgleich mit IPTG	1 x 5
3	0,1	10	zu Beginn	1 x 5

Fermenter	IPTG [mM]	Mercaptoethanol [mM]	Zugabe Mercaptoethanol	Glucose [g/L]
4	0,13	10	zeitgleich mit IPTG	10*
5	0,13	10	zu Beginn	10*
6	1	10	zu Beginn	5*
7	0	10	zu Beginn	5*
8	0,1	10	zu Beginn	1 x 5
9	0,1	10	zu Beginn	1 x 5
10	0,1	10	zu Beginn	1 x 5

*Kultivierung mit Glucose-Nachführung

Der Kultur des Fermenters 7 wurde eine Spurenelementlösung (1 mL/L) folgender Zusammensetzung zu Beginn der Kultivierung zugeführt:

Bezeichnung	Konzentration [g/L]
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{ H}_2\text{O}$	0,002
$\text{CoSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,00075
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,0025
H_3BO_3	0,0005
$\text{MnSO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$	0,024
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,003
NiSO_4	0,0025
ZnSO_4	0,015
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,1125
Thiamin-HCl	0,075
3,4-Dihydroxybenzoat	0,015

Die Kulturen wurden bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Falls nicht anders angegeben wurde die Proteinexpression durch Zugabe einer definierten Menge von IPTG zum Medium bei Erreichen einer $\text{OD}_{600} = 5$ induziert. Während der Kultivierung wurde eine konstante Belüftung von 2 vvm beibehalten, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleisten zu können. Der pH-Wert wurde während der Kultivierung durch Zugabe von NaOH (10 %; w/v) oder H_3PO_4 (10 %; v/v) konstant auf pH 7 gehalten. Zur Verringerung der Schaumbildung wurde eine Silikon-Antischaumemulsion (Roth, Karlsruhe) (1:5 mit Reinstwasser verdünnt) nach Bedarf zugeführt.

Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben aus den Fermentern entnommen. Den Proben wurde als Frostschutzmittel 85 % Glycerin (10 %; v/v) zugesetzt und auf Trockeneis versandt.

2.1.4. Stammhaltung

Plattenkulturen wurden wie unter 2.1.1 beschrieben beimpft und bis zu 2 Wochen bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Zur Lagerung für mehr als zwei Wochen wurden die Zellen in Flüssigkultur wie unter 2.1.1 kultiviert, 1 mL der Suspension zentrifugiert und in 1 mL 86 %igem Glycerol resuspendiert. Die Kulturen wurden bei -20 °C im Gefrierschrank bis zu zwölf Monaten gelagert. Zur Dauerkultur wurde eine LB-Platte mit Bakterien beimpft und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die komplette Kultur wurde mit einem sterilen Wattestäbchen aufgenommen und in 2 mL PPM-Medium resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden gleichmäßig auf zwei sterile, mit Glaskügelchen gefüllte Kryoröhrchen verteilt und in einem Ethanol-Trockeneisbad auf -70 °C schockgefroren. Die Röhrchen wurden zur dauerhaften Lagerung bei -70 °C in der Gefriertruhe aufbewahrt.

2.1.5. Herstellung elektrokompenter Zellen

Eine Flüssigkultur von frisch aus der Stammsammlung entnommenen Zellen wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Mit 1 % (v/v) dieser Vorkultur wurden 200 mL 2x YT-Medium beimpft und bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 kultiviert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension bei 4 °C und 2500 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Die Zellen wurden zunächst zweimal mit eiskaltem, sterilem Reinstwasser und dann zweimal mit eiskaltem 10 % Glycerol gewaschen (je 1.000 x g, 4 °C, 15 min). Das Sediment wurde in 1 mL 10 %igem (v/v) Glycerol resuspendiert, in Aliquots von 50 µL schockgefroren (Ethanol/Trockeneisbad) und bei -70 °C gelagert.

2.1.6. Transformation von elektrokompenten Zellen

Ein 50 µL Aliquot elektrokompenter *E. coli* Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit 1 µL-10 µL Plasmid-DNA oder Ligationsansatz versetzt und in eine eiskalte Elektroporationsküvette (Schichtdicke: 1 mm) überführt. Der Ansatz wurde im Elektroporator 22510 (Eppendorf, Hamburg) für 5 ms einer Spannung von 1.800 V ausgesetzt. Die Zellsuspension wurde unmittelbar mit 1 mL auf 37 °C vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und in ein steriles 2 mL Mikroreaktionsgefäß überführt. Der

Transformationsansatz wurde für 1 h bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden verschiedene Volumina der Zellsuspension (5 µL-500 µL] auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Enthielten die verwendeten Plasmide die bla-Resistenzdeterminante wurden die Transformanden auf Agarplatten mit 50 µg/mL Ampicillin als Selektionsmarker ausgestrichen. Die beimpften Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank bebrütet.

2.1.7. Expression der Autotransporter Fusionsgene in *E. coli*

Die Hauptkultur mit LB-Medium, 10 mM Mercaptoethanol und dem passenden Selektionsantibiotikum wurde mit 1/100 des Volumens einer Übernachtskultur inokuliert. Diese Hauptkultur wurde bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5-0,6 oder 0,9-1,1 bebrütet. Falls nicht anders angegeben wurde die Expression eines unter der Kontrolle des T7-Promotor stehenden Gens durch Zugabe von IPTG (1 mM) und Inkubation für 1 h bei 30 °C induziert. Die Expression eines unter der Kontrolle des *rhaP*_{BAD}-Promotors stehenden Gens wurde durch Zugabe von Rhamnose (0,001-0,1 %; w/v) und Inkubation für 1 h bei 30 °C induziert. Danach wurde die Kultur für 15 min auf Eis gelagert und die Zellsuspension bei 3.850 x g (4 °C, 5 min) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment im jeweiligen 50 mM Reaktionspuffer (Na-Phosphat-, Tris-HCl- oder Carbonat-Puffer) aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (3.850 x g, 4 °C, 5 min) wurde das Sediment noch ein weiteres Mal mit dem jeweiligen Reaktionspuffer gewaschen. Falls nicht anders angegeben wurde die Zellsuspension im letzten Schritt auf eine OD₅₇₈ von 10 eingestellt. Die Zellen wurden wenn nicht anders angegeben am gleichen Tag weiterverwendet.

2.1.8. Umsetzung im Mikroreaktionsgefäß

Für Aktivitätsuntersuchungen wurden Bakterienzellen verwendet, die wie unter 2.1.3 oder 2.1.7 beschrieben hergestellt worden waren. Die auf eine definierte Zelldichte (typischerweise OD₅₇₈ = 10 in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5) eingestellte Zellsuspension wurde zu 1 mL in 2 mL Mikroreaktionsgefäßen aliquotiert. Die Umsetzung wurde gestartet durch Zugabe des jeweiligen Substrates (falls nicht anders angegeben 10 mM) und Inkubation bei der jeweiligen Temperatur (falls nicht anders angegeben 37 °C) bei 800 rpm in einem Inkubationsschüttler. Die Stammlösung des jeweiligen Substrates betrug typischerweise 0,5 M in Methanol gelöst. Nach einer definierten Zeit (typischerweise 24 h) wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation (15.000 x g) für 5 min entfernt. Zur vollständigen Abtrennung der Bakterienzellen wurde der Überstand mit einem Spritzenvorsatzfilter

sterilfiltriert (0,2 µm Porenweite, Polyethersulfon-Membran). Zur Analyse mittels HPLC wurde der Überstand in Braunglasgefäße überführt.

2.1.9. Umsetzung im Fermenter

Für Aktivitätsuntersuchungen wurden Zellen verwendet, die wie unter 2.1.3 beschrieben hergestellt worden waren. Die im Fermenter kultivierten Zellen wurden zum Ende der Fermentation durch Zentrifugation (5.500 x *g*, 10 min, 10 °C) geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde im gleichen Volumen 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in einen sterilen Fermenter überführt und die Reaktion durch Zugabe von 10 mM Mandelsäurenitril (Stammlösung 0,5 M in Methanol) gestartet. Während der Umsetzung wurde auf eine Belüftung des Fermenters verzichtet, um zu verhindern, dass entstehende Blausäure ausgetrieben wird. Die Zellsuspension wurde bei 150 rpm und 45 °C für 24 h inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben aus dem Fermenter entnommen, die Zellen durch Zentrifugation entfernt und der zellfreie Überstand auf Trockeneis versandt.

2.2. Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.1. Plasmidisolierung

Für analytische Anwendungen wurde Plasmid-DNA aus *E. coli* mit der Methode der alkalischen Lyse ohne Phenol/Chloroform-Extraktion gewonnen (Birnboim und Doly, 1979). Für präparative Anwendungen wurde Plasmid-DNA mit Hilfe des „QIAprep Miniprep Kits“ (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.2. Polymerasekettenreaktion

Die Nitrilase-Gene wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) vervielfältigt. Als Matrize zur Amplifikation der Nitrilase aus *S. cerevisiae* (NitSc) wurde das Plasmid RZPDo838B05107-pDEST15 verwendet. Für die Amplifikation des Nitrilase-Gens aus *K. pneumoniae* (NitKp) wurde pBrx11 als Matrize verwendet und zur Amplifikation des Nitrilase-Gens aus *A. faecalis* (NitAf) wurde genomische DNA aus *A. faecalis* verwendet. Als Primer dienten zu den Enden des jeweiligen Leserahmens partiell komplementäre Oligonukleotide. Diese wurden so konstruiert, dass die entstehenden dsDNA-Abschnitte flankierende Erkennungs-

sequenzen für Restriktionsschnittstellen enthielten (5'-XhoI/3'-KpnI), über die das Fragment in einen passenden Vektor ligiert werden konnte. Da Restriktionsenzyme am äußeren Ende eines dsDNA-Abschnitts nur mit geringer Effizienz hydrolysieren, wurden je nach Enzym weitere Nukleotide zusätzlich angefügt.

Die PCR wurde jeweils mit dem „PCR-Master Mix S“ (PeqLab, Erlangen) in einem Gesamtvolumen von 20 µL mit folgender Zusammensetzung durchgeführt:

PCR-Master-Mix S	10 µL
„forward primer“ (10 µM)	1 µL
„reverse primer“ (10 µM)	1 µL
Plasmid-DNA (Matrize)	0,5 µL (ca. 100 ng)
Reinstwasser	7,5 µL

PCR-Programme zur Amplifikation von NitAf, NitKp und NitSc:

	NitSc	NitKp	NitAf
1) Initiale Denaturierung	95 °C, 5 min	95 °C, 5 min	95 °C, 5 min
2) Denaturierung	94 °C, 30 s	94 °C, 30 s	94 °C, 30 s
3) Annealing der Primer	58 °C, 60 s	60 °C, 60 s	64 °C, 60 s
4) Elongation	72 °C, 60 s	72 °C, 60 s	72 °C, 60 s
5) Terminale Elongation	72 °C, 5 min	72 °C, 5 min	72 °C, 5 min

Die Sequenz der Schritte 2-4 wurde pro PCR 30 x wiederholt.

2.2.3. Enzymatische Spaltung von DNA-Fragmenten

Für die hydrolytische Spaltung von DNA-Molekülen wurden Restriktionsendonukleasen des Herstellers NEB (Frankfurt a.M.) verwendet. Ein typischer Ansatz enthielt dabei neben DNA noch 5-20 units Restriktionsenzym, den passenden 10x Reaktionspuffer (NEB, Frankfurt a.M.) und Reinstwasser. Der Ansatz wurde entweder 2-3 h oder über Nacht bei der vom Hersteller vorgegebenen Enzym-spezifischen Temperatur (meist 37 °C) inkubiert.

2.2.4. Agarosegelelektrophorese

Die Lösung mit den aufzutrennenden DNA-Fragmenten wurde mit 10x Probenpuffer versetzt, um ihre spezifische Dichte zu erhöhen und damit die Beladung der Agarosegeltaschen zu erleichtern. Standardmäßig wurden Agarosekonzentrationen

von 0,8 % verwendet. Zur Trennung wurde normalerweise eine Spannung von 120 V verwendet, die Laufstrecke variierte mit der Größe der aufzutrennenden Fragmente.

2.2.5. Färbung von Agarose-Gelen

Die Agarose-Gele wurden 20 min mit Ethidiumbromid (1 mg in 1 L TAE-Puffer) gefärbt. Danach wurde das Gel kurz unter fließendem Wasser abgespült. Die Fluoreszenz des Ethidiumbromids und somit die DNA-Banden konnten durch Anregung mit UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation erfolgte mittels CCD-Kamera.

2.2.6. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Um DNA-Banden aus einem Agarose-Gel zu isolieren, wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen, Hilden) extrahiert und mit 20 µL Reinstwasser eluiert. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers.

2.2.7. Ligation

DNA-Fragmente mit kompatiblen, überhängenden Enden wurden durch T4-DNA-Ligase enzymatisch verknüpft. Die zu verknüpfenden DNA-Fragmente wurden mit 1 µL T4-DNA-Ligase (NEB, Frankfurt a.M.) und Reinstwasser zu einem Gesamtvolumen von 12 µL aufgefüllt, wobei das Verhältnis zwischen Insert und Vektorrückgrat bei 5:1 lag. Die Ligation wurde im Thermocycler bei 16 °C durchgeführt. Nach 16 h wurde die Inkubation durch Hitzedenaturierung des Ligase-Enzyms (10 min, 65 °C) gestoppt. Vor der Transformation mit kompetenten *E. coli*-Zellen wurde der Ligationsansatz durch Dialyse entsalzt. Dazu wurde ein Viertel einer Membran (MF Membranfilter VSWP02500, Porenweite: 0,025 µm) auf Reinstwasser gelegt und der Ligationsansatz auf die Membran pipettiert. Nach 30 min wurde die Lösung in ein Mikroreaktionsgefäß überführt.

2.2.8. DNA Sequenzanalyse

Die Analyse von DNA-Sequenzen erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode und wurde vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt. Zur Sequenzierung wurden entweder M13-Standardprimer oder eigene Primer verwendet.

2.3. Arbeiten mit Proteinen

2.3.1. Außenmembranproteinpräparation

Zur Kontrolle der Expression neu konstruierter Autotransporter-Fusionsgene wurde untersucht, ob das entsprechende Fusionsprotein in der Fraktion der Außenmembranproteine identifiziert werden konnte. Zur Außenmembranproteinisolierung wurde ein modifiziertes Protokoll nach Hantke (1981) durchgeführt. Der zu untersuchende *E. coli* Stamm wurde wie unter Abschnitt 2.1.7 beschrieben, vorbereitet. Pro Ansatz wurde das Sediment einer 50 mL Hauptkultur verwendet. Zum Nachweis der Oberflächenständigkeit der Passagierdomäne des Autotransporter-Fusionsproteins wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben vorbehandelt.

Das Sediment wurde zweimal mit 0,2 M Tris-HCl-Puffer (pH 8) gewaschen und anschließend in 1,5 mL des gleichen Puffers resuspendiert. Durch Zugabe von 100 µL Saccharose (1 M), 100 µL EDTA (10 mM), 100 µL Lysozym (10 mg/mL) und 3,2 mL Reinstwasser wurde die Zellwand hydrolysiert. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur kam es zur Ausbildung von Sphäroblasten. Durch Zugabe von 5 mL Extraktionspuffer wurde diese aufgeschlossen. Die Zugabe von 50 µL PMSF (100 mM) und 10 µL Aprotinin (10 mg/mL) wurden eventuell vorhandene Proteasen inhibiert. Aufgrund der Hydrolyse freigesetzte DNA wurde durch Zugabe von 100 µL DNase I (1 mg/mL) degradiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 25 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 2.400 x *g* (5 min, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde in ein frische Gefäß überführt und bei 38.500 x *g* (10 min, 4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde in 10 mL Reinstwasser resuspendiert und erneut bei 38.500 x *g* (10 min, 4 °C) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 mL Reinstwasser aufgenommen, in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und bei 15.000 x *g* sedimentiert (10 min, 4 °C). Das Volumen des entstandenen Pellets wurde visuell abgeschätzt und im gleichen Volumen Reinstwasser resuspendiert. Die anderthalbfache Menge reduzierbarem 2x Probenpuffer wurde zugefügt und die Proteinlösung für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.3.2. Proteasesensitivitätstest

Zum Nachweis der Oberflächenständigkeit der Passagierdomäne von Autotransporter-Fusionsproteinen hat sich in der Vergangenheit die Bestimmung der Proteasesensitivität bewährt. Die Passagierdomäne des Autotransporter-Fusionsproteins ist nur dann für die extrazellulär zugegebenen Proteasen zugänglich,

wenn es eine Orientierung zum Extrazellularraum hin besitzt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Protease Proteinase K kann intakte Bakterienmembran nicht überwinden. Als Marker für die Integrität der Bakterienmembran dient das Außenmembranprotein OmpA. Die C-terminale Domäne von OmpA liegt natürlicherweise im Periplasma und ist bei Verlust der Membranintegrität einem proteolytischen Abbau durch die zugesetzten Proteasen unterworfen. Nur wenn diese Domäne nicht von der eingesetzten Protease angegriffen wird und die Intensität der OmpA Proteinbande erhalten bleibt, ist die Integrität der Außenmembran gewährleistet.

Der zu untersuchende *E. coli* Stamm wurde behandelt wie im Abschnitt 2.1.7 beschrieben. Das Zellsediment einer 50 mL Hauptkultur wurde einmal mit 5 mL Tris-HCl (pH 8) gewaschen und in 1 mL dieses Puffers resuspendiert. Nach Zugabe von typischerweise 12,5 µL einer 0,5 %igen Proteinase K Lösung wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mL Tris-HCl + 10 % FCS gestoppt. Danach wurden die Zellen noch zweimal im gleichen Volumen des FCS-haltigen Puffers gewaschen. Im Anschluss daran fand die differentielle Zellfraktionierung statt (Abschnitt 2.3.1).

2.3.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinisolaten nach ihrem Molekulargewicht wurde die Methode der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese mit dem Puffersystem nach Laemmli (1970) angewendet. Dazu wurden typischerweise 10 %ige Gele (8 cm Höhe und 0,75 mm Dicke) gegossen, die aus einem ca. 1 cm hohen Sammelgel und einem ca. 7 cm hohen Trenngel bestanden (Mini Protean IV System, Bio-Rad, München). Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 100 V gestartet. Nach Durchlauf des Sammelgels wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die durch das Bromphenolblau sichtbare Laufront das Trenngel verlassen hatte. Zur Größenbestimmung wurde ein Proteingrößenstandard verwendet („PAGE Ruler unstained“, Fermentas, St. Leon-Rot). Im Anschluss wurde das SDS-Gel 15 min in einer Coomassie-Brilliant Blue-Lösung entfärbt und anschließende mehrere Stunden in Essigsäure (10 %; v/v) soweit entfärbt, bis die gefärbten Proteinbanden sichtbar wurden.

2.4. Analytik

2.4.1. Achirale HPLC-Analytik

Alle achiralen HPLC-Analysen wurden mit einem „Alliance 2695 Separations Module“, HPLC-Gerät der Firma Waters (Milford, MA, USA) durchgeführt. Das Gerät war bestückt mit einem Waters 996 PDA Detektor (Waters, Milford, MA, USA). Zur Auswertung wurde die Software Millenium³² (Waters, Milford, MA, USA) verwendet.

Umsetzung von Mandelsäurenitril, Phenylacetonitril, Prunasin, Benzonitril, 1-Anilinoacetonitril und 3-Phenylpropionitril

Die Detektion einer Nitrilaseaktivität gegenüber Mandelsäurenitril, Benzonitril, 1-Anilinoacetonitri, Phenylpropionitril und Phenylacetonitril erfolgte mit dem HPLC-Verfahren nach Kaul *et al.* (2007):

Parameter	Einstellung
Detektionswellenlänge	210 nm
Säule	Hypersil ODS 10 cm, 5 µm
Fluss	1 mL/min, Raumtemperatur
Fließmittel	Wasser:Methanol:H ₃ PO ₄ 85 % (89,9:10:0,1; v/v/v), isokratisch

Zur Analyse wurden Umsetzungen verwendet, die wie im Abschnitt 2.1.8 oder 2.1.9 beschrieben hergestellt wurden. Die Injektion wurde mit dem integrierten Autosampler vorgenommen (20 µL Probenlösung pro Analyse).

Zur Detektion der Umsetzung von Prunasin wurde die Methode von Sendker und Nahrstedt (2009) angewandt:

Parameter	Einstellung
Detektionswellenlänge	210 nm
Säule	Hypersil ODS (10 cm, 5 µm) (Thermo-Fisher)
Fluss	1 mL/min, Raumtemperatur
Fließmittel	Wasser:Methanol:TFA (89,9:10:0,1; v/v/v), isokratisch

Die Konzentrationen an produzierten Umsetzungsprodukten wurden mittels Kalibriergeraden kalkuliert. Zu diesem Zweck wurden Verdünnungsreihen mit der jeweiligen Reinsubstanz in Wasser gelöst erstellt. Die ermittelten Peakflächen der

Reinsubstanzen wurden mit den Peakflächen der Umsetzungsprodukte ins Verhältnis gesetzt.

Umsetzung von Bromoxynil, Chloroxynil, Ioxynil, 3-Fluor-4-hydroxybenzonitril, 3-Brom-4-hydroxybenzonitril, Anisonitril, 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzonitril

Die Detektion einer Nitrilaseaktivität gegenüber Bromoxynil, Chloroxynil, Ioxynil, 3-Brom-4-hydroxybenzonitril, Anisonitril, 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzonitril erfolgte mit dem HPLC-Verfahren von Gabriel *et al.* (1996):

Parameter	Einstellung
Detektionswellenlänge	210 nm (3-Brom-4-hydroxybenzonitril, Anisonitril, 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzonitril, 3-Fluor-4-hydroxybenzonitril) 215 nm (Bromoxynil, Chloroxynil) 235 nm (Ioxynil)
Säule	Hypersil ODS 10 cm, 5 µm
Fluss	1 ml/min
Fließmittel	Methanol:Wasser:Acetonitril:Essigsäure (32:47,5:20:0,5; v/v/v/v), isokratisch

Zur Detektion der Umsetzung von 3-Fluor-4-hydroxybenzonitril wurde auf eine Zugabe von Acetonitril zur mobilen Phase verzichtet, um eine Trennung gewährleisten zu können:

Parameter	Einstellung
Detektionswellenlänge	210 nm
Säule	Hypersil ODS 10 cm, 5 µm
Fluss	1 ml/min
Fließmittel	Methanol:Wasser:Essigsäure (40:59,5:0,5; v/v/v/v), isokratisch

Zur Analyse wurden Umsetzungen verwendet, die wie im Abschnitt 2.1.8 oder 2.1.9 beschrieben hergestellt wurde. Die Injektion wurde mit dem integrierten Autosampler vorgenommen (20 µL Probenlösung pro Analyse).

Die Konzentrationen an produzierten Umsetzungsprodukten wurden mittels Kalibriergeraden kalkuliert. Zu diesem Zweck wurden Verdünnungsreihen mit der jeweiligen Reinsubstanz in Wasser gelöst erstellt. Die ermittelten Peakflächen der

Reinsubstanzen wurden mit den Peakflächen der Umsetzungsprodukte ins Verhältnis gesetzt.

2.4.2. Mandelsäureextraktion und Kristallisation

Die Aufreinigung enzymatisch produzierter Mandelsäure aus wässrigem Medium wurde mittels Ethylacetat-Extraktion durchgeführt. Dafür wurde Mandelsäure verwendet, die wie im Abschnitt 2.1.8 oder 2.1.9 beschrieben hergestellt wurde. Die Bakterienzellen der Umsetzungen wurden durch Zentrifugation (5 min, 5000 x *g*) entfernt. Der zellfreie Überstand wurde mit 1 M NaOH auf pH 11 eingestellt und dreimal mit dem halben Volumen der wässrigen Phase mit Ethylacetat ausgeschüttelt (jeweils 15 min). Dies diente der Entfernung von nicht umgesetztem Mandelsäurenitril. Durch Zentrifugation wurde eine schnelle und vollständige Phasentrennung erreicht (2 min, 5000 x *g*). Die organische Phase wurde mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Nach drei Ausschüttelungen wurde die wässrige Phase zur Extraktion der Mandelsäure mit 1 M HCl auf pH 3 eingestellt. Somit lag die Mandelsäure undissoziiert vor und konnte in die organische Phase überführt werden. Die wässrige Phase wurde dreimal analog wie oben beschrieben mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Fraktionen der „sauen“ Ethylacetat-ausschüttelungen wurden vereinigt und das Ethylacetat abgedampft. Der kristalline Rückstand wurde in 1/10 des ursprünglichen Volumens der wässrigen Phase in Methanol gelöst.

Der kristalline Rückstand der Ethylacetat-Extraktion wurde im Falle der „Produktion von R-Mandelsäure im mg-Maßstab“ (Kapitel V Abschnitt 4.1) zusätzlich durch Umkristallisation aufgereinigt. Dazu wurde der kristalline Rückstand in einer ausreichenden Menge siedendem Benzol gelöst. Nach Erkalten auf Raumtemperatur wurde die Lösung zur vollständigen Ausfällung der Mandelsäure für 24 h bei 4 °C gelagert. Durch Filtration konnte der feine, weiß-gelbliche Niederschlag von der Lösung abgetrennt werden.

2.4.3. Chirale DC-Analytik

Eine erste qualitative Abschätzung der Enantiomerenreinheit der enzymatisch produzierten Mandelsäure wurde mittels chiraler Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Es wurde Mandelsäure verwendet, die wie im Abschnitt 2.1.8 beschrieben enzymatisch durch Umsetzung von Mandelsäurenitril erzeugt und wie im Abschnitt 2.4.2 beschrieben extrahiert wurde. Das Trennprinzip der verwendeten Chiralplate®-DC-Platten (Macherey-Nagel, Düren) beruht dabei auf der Liganden-Austauschchromatographie (Günther, 1988). Als Referenzen wurden racemische

Mandelsäure und R-Mandelsäure (3-6 µL einer 0,125 M Stammlösung in Methanol) zusätzlich zu 4 µL der enzymatisch produzierten und aufgereinigten Mandelsäure auf die Chiralplate®-DC-Platten aufgetragen.

Die Chiralplate®-DC-Platten wurden unmittelbar vor Verwendung für 10 min bei 100 °C aktiviert. Zur Trennung der Enantiomere wurde eine Mischung aus Dichlormethan und Methanol (45:5; v/v) als mobile Phase verwendet (Günther, 1988). Nach ca. 25 min Laufzeit wurde die DC-Platte bei Raumtemperatur getrocknet und mit einer 0,04 % (w/v) ethanolischen Bromphenolblau-Lösung besprüht (Bieniek, 1982). Nach 5 minütiger Entwicklungszeit bei Raumtemperatur konnte Mandelsäure als gelber Fleck auf blauem Hintergrund detektiert werden.

2.4.4. Chirale HPLC-Analytik

Die quantitative Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses der enzymatisch produzierten Mandelsäure wurde mittels chiralem HPLC-Verfahren durchgeführt (Kaul *et al.*, 2004). Zur Analyse wurde Mandelsäure verwendet, die wie im Abschnitt 2.1.8 oder 2.1.9 beschrieben hergestellt wurde und wie im Abschnitt 2.4.2 beschrieben extrahiert wurde. Als HPLC-Gerät zur chiralen Analyse wurde eine LaChrome Elite von der Firma VWR-Hitachi (Darmstadt) verwendet. Bestückt war die HPLC mit einem L-2400 UV-Detektor und einer L-2100 Pumpe. Die Injektion wurde manuell durchgeführt (20 µL Probenlösung pro Analyse). Zur Auswertung wurde die Software EZChrom Elite des gleichen Herstellers verwendet.

Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur auf einer analytischen Reprosil Chiral OM Säule (150x4,6 mm, 5 µm) der Firma CS-Chromatographie Service (Langenwehe). Als Fließmittel wurden n-Hexan/2-Propanol/TFA (95:5:0,1; v/v/v) unter isokratischen Bedingungen verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 mL/min und die Detektion der Peaks erfolgte bei 210 nm. Die Berechnung des Enantiomerenüberschusses (ee %) erfolgte nach folgender Gleichung:

$$ee [\%] = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} * 100$$

Zur Trennung racemischer Mandelsäure in die Enantiomere verwendete Bedingungen nach Kaul *et al.* (2004):

Parameter	Einstellung
Detektionswellenlänge	210 nm
Säule	Reprosil Chiral-OM 150x4,6 mm, 5 µm

Fluss	1 mL/min
Fließmittel	Hexan/2-Propanol/TFA (95:5:0,1; v/v/v)

2.4.5. Kolorimetrische Bestimmung von Ammoniak

Bei einer Nitrilasereaktion entsteht neben der korrespondierenden Carbonsäure noch äquimolar Ammoniak. Dieses stöchiometrische Verhältnis kann zur indirekten Bestimmung der Nitrilaseaktivität durch Bestimmung der Ammoniak-Konzentration ausgenutzt werden. Eine häufig eingesetzte Methode zur Bestimmung von Ammoniak ist die Indophenol/Hypochlorit-Methode nach Fawcett und Scott (1960). Bei diesem Verfahren reagiert Ammoniak mit Phenolat zu einem blauen Indophenol-Produkt das photometrisch bei A_{620} bestimmt werden kann (Bolleter *et al.*, 1961). Chaney und Marbach (1962) optimierten die Reaktion im Hinblick auf die Anwendbarkeit und Haltbarkeit der Lösungen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Zusammensetzung der Lösungen zur Bestimmung von Ammoniak nach der Indophenol/Hypochlorit-Methode, modifiziert nach Chaney und Marbach (1962).

Lösung I	[g/L]	Lösung II	[g/L]
Na-Phenolat	10	NaOH	5
Na-Nitroprussid	0,05	Na-Hypochlorit	0,42

Zur Bestimmung der Ammoniak-Konzentration wurden Umsetzungen verwendet, die wie unter Abschnitt 2.1.8 beschrieben durchgeführt wurden. Nach Ende der Umsetzung wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation (5 min, 5.000 x *g*) entfernt. 100 μ L des zellfreien Überstandes wurden mit 500 μ L Lösung I und 500 μ L Lösung II inkubiert. Nach 30 minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur konnte das entstandene Farbprodukt photometrisch bei A_{620} vermessen werden.

V. Experimente und Ergebnisse

Im Verlaufe dieser Arbeit soll die Eignung des Autodisplay-Systems zur funktionellen Oberflächenexpression von Nitrilasen und die Verwendung der dadurch gewonnenen Ganzzell-Biokatalysatoren untersucht werden. Als Untersuchungsobjekt wurde eine Nitrilase aus *Saccharomyces cerevisiae* (NitSc), eine dimere Nitrilase aus *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* (NitKp) und eine multihomomere Nitrilase aus *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* (NitAf) für diese Arbeit verwendet.

1. Autodisplay einer Nitrilase aus *Saccharomyces cerevisiae* in *E. coli*

Das Protein „Putative nitrilase-like protein NIT1“, im folgenden Verlauf NitSc genannt, wird von dem Gen Nit1 im Chromosom IX von *Saccharomyces cerevisiae* kodiert und wird aufgrund von Sequenzvergleichen der Enzymklasse der Nitrilasen (EC 3.5.5.1) zugerechnet. Über die Struktur und physiologische Rolle dieses Proteins gibt es keinerlei Erkenntnisse.

1.1. Konstruktion eines Plasmids zum Autodisplay

Zur Oberflächenexpression des Proteins NitSc musste zunächst ein Plasmid konstruiert werden, welches für ein Vorläuferprotein bestehend aus Signalpeptid, dem Passagier NitSc, einer Linker-Region und dem β -barrel kodiert (Abbildung 8). Das vollständige Autodisplay-Fusionsprotein wurde NitSc-AT genannt.

Das Gen Nit1 aus *S. cerevisiae* wurde durch Polymerasekettenreaktion (PCR) aus dem Plasmid RZPDo838B05107-pDEST15 unter Verwendung der Primer CD001 und CD002 amplifiziert. Durch die Primer wurden dem PCR-Produkt zwei Restriktionsendonuklease-Schnittstellen (XhoI am 5'-Ende und KpnI am 3'-Ende) angefügt, um eine Ligation mit definierten Enden zu gewährleisten. Die Größe des PCR-Produktes wurde mittels Agarosegelelektrophorese untersucht (Abbildung 9 A). Ein Fragment von 604 bp ließ auf das gewünschte Fragment schließen. Ein Doppelverdau des Amplifikats mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und KpnI führte zu DNA-Fragmenten mit definierten Enden. Diese DNA-Fragmente wurden in den mit XhoI/KpnI verdauten Vektor pBluescript KS (-) ligiert und das so entstandene Plasmid in *E. coli* DH5 α Zellen transformiert. Plasmid tragende Klone wurden mittels Blau/Weiß-Screening ermittelt. Eine anschließende Sequenzanalyse ergab eine vollständige Übereinstimmung des Amplifikats mit der Sequenz für Nit1 (GenBank Accession Number: AY558236).

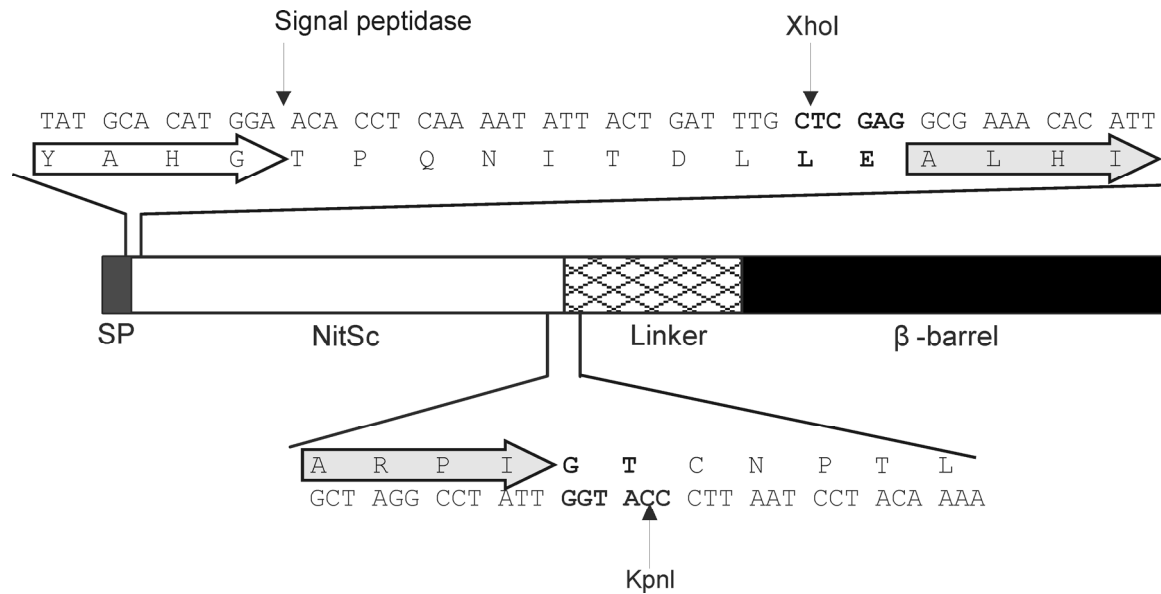


Abbildung 8: Struktur des Autotransporter-Fusionsproteins NitSc-AT mit der Nitrilase aus *S. cerevisiae* (NitSc) als Passagier. Die Umgebung der Passagierinsertionsstelle ist als Sequenz angegeben. Die beiden eingefügten Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen XhoI und KpnI wurden fett dargestellt. Das Ende der Signalpeptid-Domäne ist durch einen weiß hinterlegten Pfeil gekennzeichnet. Anfang und Ende der Passagier-Domäne sind durch einen grau hinterlegten Pfeil markiert. SP= Signalpeptid.

Aus einem Klon wurde die Plasmid-DNA aufgereinigt. Das Nit1-Gen wurde durch Doppelverdau mit XhoI und KpnI aus dem Vektor herausgeschnitten und nach Agarose-Gelelektrophorese aus dem Gel extrahiert. Mit pET-Adx04 stand ein Plasmid zur Verfügung, dass sich bereits in der Vergangenheit bei der Oberflächenexpression bewährt hatte und alle für das Autodisplay notwendigen Strukturelemente besaß.

Bei diesem Plasmid, das auf dem pET-System der Fa. Novagen basiert, wird die Expression des Zielgens durch einen T7lac-Promotor kontrolliert (Studier und Moffatt, 1986). Somit kann die Transkription des Zielgens erst in Anwesenheit von T7-RNA-Polymerase erfolgen. Das Gen für die T7-RNA-Polymerase liegt chromosomal kodiert vor und wird von einem lacUV5-Promotor kontrolliert. Dessen Expression lässt sich durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) zur Bakterienkultur induzieren. Die exprimierte T7-RNA-Polymerase führt dann zu einer Expression des Zielgens. Das Plasmid pET-Adx04 wurde ebenfalls mit XhoI/KpnI geschnitten, um den für Adx kodierenden Passagierenteil zu entfernen. Das Vektorrückgrat und das für Nit1 kodierende Genfragment wurden durch Ligation verknüpft. Das neu entstandene Plasmid, im Folgenden pCD001 genannt, wurde durch Elektroporation in *E. coli* UT5600(DE3) und *E. coli* BL21(DE3) Zellen transformiert. Eine Karte des Plasmids ist im Anhang abgebildet.

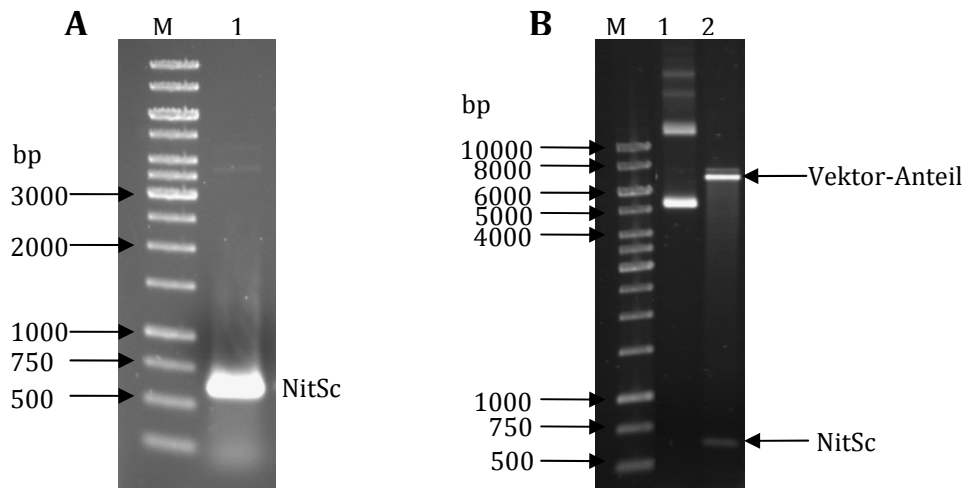


Abbildung 9: Gelelektrophoresetrennung des PCR-Produktes des amplifizierten Nitrilasegens Nit1 (A Spur 1) und XhoI/KpnI- Restriktionsverdau des Plasmids pCD001 (B) auf dem das Fusionsprotein NitSc-AT kodiert vorliegt. A= Das Nitrilasegen lag auf dem Plasmid RZPD0838B05107-pDEST15 kodiert vor. Bei der Amplifikation wurden Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XhoI und KpnI eingefügt. B= Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen XhoI/KpnI in den verdauten Vektor pET-Adx04 ligiert. Spur 1= vor Zugabe von Restriktionsendonukleasen, Spur 2= nach Zugabe von Restriktionsendonukleasen. (M= Größenstandard).

Nach Kultivierung der Zellen wurden die Plasmide erneut isoliert und zwecks Überprüfung der korrekten Basenlänge sowohl des Inserts, als auch des Vektor-Rückgrats einem Restriktionsendonuklease-Doppelveidau mit XhoI und KpnI unterworfen (Abbildung 9 B). Die resultierenden DNA-Fragmente von ca. 600 bp für das Insert und ca. 7000 bp für den Vektor zeigten eine erfolgreiche Insertion des Nit1-Gens in die Passagierdomäne des Autotransporters.

1.2. Expression und Oberflächenständigkeit der Nitrilase

Die Zellen *E. coli* UT5600(DE3) pCD001 und *E. coli* BL21(DE3) pCD001 wurden unter reduzierenden Bedingungen kultiviert, um eine Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinen im Periplasma zu verhindern. Durch vorangegangene Experimente konnte gezeigt werden, dass eine im Periplasma stattfindende Faltung des Passagiers negative Auswirkungen auf die Translokationseffizienz haben kann (Jose *et al.*, 1996). Eine Konzentration von 10 mM Mercaptoethanol erwies sich dabei als ausreichend, um eine Ausbildung von Disulfidbrücken effektiv zu unterbinden (Jose *et al.*, 2001).

Bei Erreichen einer OD_{578} von 0,5 wurde die Kultur in drei Teile aufgeteilt. In zwei Teilen wurden durch Zugabe von 1 mM IPTG die Proteinbiosynthese induziert, der restliche Teil blieb unbehandelt (Kontrolle). Alle drei Kulturen wurden bei 30 °C für eine weitere Stunde bei 200 rpm inkubiert. Danach wurden die Zellen durch

Zentrifugation geerntet und eine Isolierung der Außenmembranproteinfraktion modifiziert nach dem Protokoll von Hantke (1981) durchgeführt. Die Außenmembranproteinisolate wurden mittels SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt. Durch Inkubation der SDS-Gele mit Coomassie-Lösung wurden die Proteine angefärbt (Abbildung 10). In Spur 1 der Abbildung 10 A ist die Trennung der Außenmembranproteine der Zellen dargestellt, in denen die Proteinbiosynthese nicht induziert wurde. Im Vergleich dazu erscheint in Spur 2 nach Inkubation mit IPTG eine zusätzliche prominente Bande (mit Pfeil gekennzeichnet) mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 70 kDa. Dies stimmt gut mit dem berechneten Molekulargewicht von 70,96 kDa für das Fusionsprotein NitSc-AT, bestehend aus Passagier, Linker und β -barrel überein. Somit konnte die Integration des Fusionsproteins NitSc-AT in die Außenmembran von *E. coli* UT5600(DE3) pCD001 nachgewiesen werden.

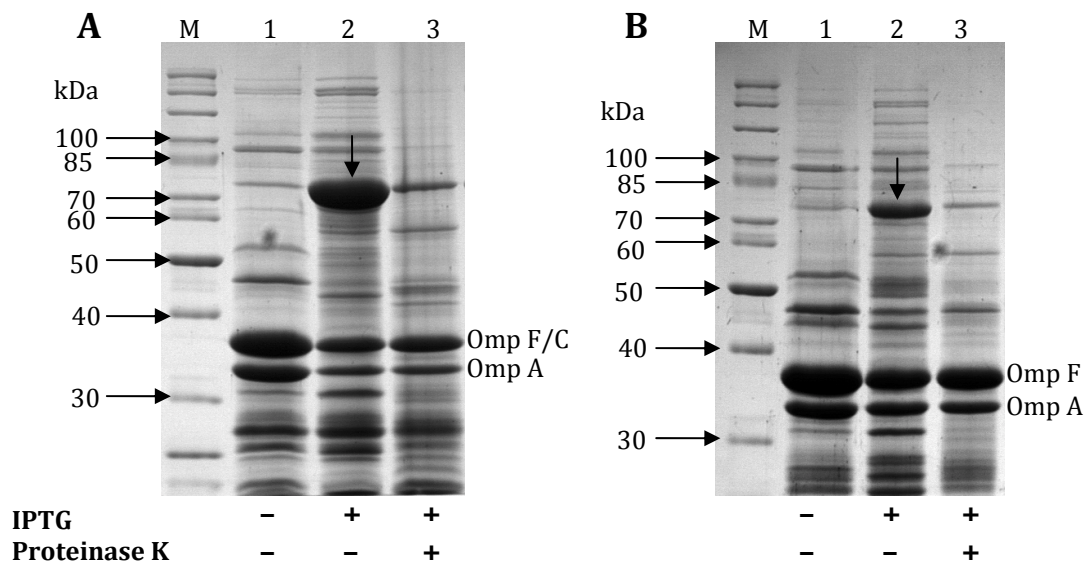


Abbildung 10: Expression und Oberflächenständigkeit von NitSc-AT in *E. coli* UT5600(DE3) pCD001 (A) und in *E. coli* BL21(DE3) pCD001 (B). Die Außenmembranproteine wurden mittels differentieller Zellfraktionierung isoliert, durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant Blue gefärbt. IPTG: Nach Erreichen einer OD_{578} von 0,5 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Proteinase K: Behandlung der Zellen mit Proteinase K vor der differentiellen Zellfraktionierung. (M= Proteingrößenstandard).

Dies ist jedoch noch kein Beleg für die Orientierung des Passagiers in den Extrazellularraum (= Oberflächenständigkeit), da die Passagierdomäne auch in das Periplasma gerichtet sein könnte. Um dies zu überprüfen wurde mit einem Teil der Kultur ein Protease-Zugänglichkeitstest durchgeführt. Bei diesem Verfahren zur Überprüfung der Oberflächenständigkeit von Proteinen werden intakte Zellen mit Proteasen (z.B. Trypsin oder Proteinase K) inkubiert (Schenkman *et al.*, 1984; Klauser *et al.*, 1992). Da Proteasen intakte äußere Membran nicht überwinden können, sind

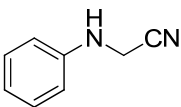
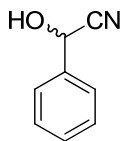
nur die Proteine für Proteasen zugänglich, die in den Extrazellularraum hinausragen (Jung *et al.*, 1998). Als Indikator für die Integrität der äußeren Membran eignet sich OmpA. OmpA besitzt eine C-terminale Domäne, welche die membranständige N-terminale Domäne mit der Peptidoglykanschicht der Bakterienzellwand verbindet. Wird die äußere Membran von *E. coli* für Proteinase K durchlässig, so wird die C-terminale Domäne bei einer Proteinase K-Behandlung proteolytisch angegriffen und die Bande für OmpA bei 35 kDa verschwindet. Spur 3 der Abbildung 10 A zeigt die Trennung der Außenmembranproteinfraktion nach Inkubation mit Proteinase K. Die Bande des Fusionsproteins NitSc-AT ist fast vollständig verschwunden. Da OmpA auch nach Proteinase K-Behandlung detektierbar ist, konnte von einer intakten äußeren Membran ausgegangen werden. Dieses Experiment belegt die Oberflächenständigkeit des Fusionsproteins NitSc-AT auf der Oberfläche von *E. coli* UT5600(DE3) pCD001.

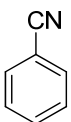
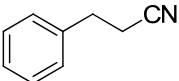
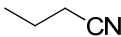
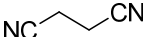
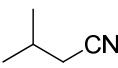
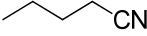
Die Oberflächenständigkeit für *E. coli* BL21(DE3) pCD001 wurde analog nachgewiesen. Eine Auftrennung der Außenmembranproteinisolate durch SDS-PAGE (Abbildung 10 B Spur 2) zeigte eine NitSc-AT Proteinbande, die nach Proteinase K-Behandlung vollständig verschwand (Abbildung 10 B Spur 3). Somit ist auch für den Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCD001 die Oberflächenständigkeit von NitSc-AT belegt.

1.3. Enzymaktivität der oberflächenexprimierten Nitrilase aus *Saccharomyces cerevisiae*

Da in vorangegangenen Experimenten hohe Enzymaktivitäten mit dem Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) erzielt werden konnten, wurden die folgenden Umsetzungsversuche für das Fusionsprotein NitSc-AT mit dem Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Da aus der Literatur keinerlei Substrate für das freie Enzym NitSc bekannt waren, wurden aliphatische, arylaliphatische und aromatische Nitrile auf eine Akzeptanz als Substrat durch das Fusionsproteins NitKp-AT hin untersucht. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die verwendeten Substrate.

Tabelle 11: Substrate zur Enzymaktivitätsbestimmung des Fusionsproteins NitSc-AT in *E. coli* BL21(DE3) pCD001.

Substratname	Strukturformel	Substratname	Strukturformel
1-Anilinoacetonitril		Mandelsäurenitril	

Substratname	Strukturformel	Substratname	Strukturformel
Benzonitril		3-Phenylpropionitril	
n-Butyronitril		Succinonitril	
Iso-Butyronitril		Iso-Valeronitril	
		n-Valeronitril	

1.3.1. HPLC-Analyse

Die Umsetzungen der aromatischen und arylaliphatischen Substrate (1-Anilinoacetonitril, Benzonitril, Mandelsäurenitril und 3-Phenylpropionitril) konnten direkt mittels HPLC analysiert werden, da sie, wie auch die erwarteten Reaktionsprodukte, eine Absorption bei Wellenlängen größer 200 nm aufweisen und somit einer Detektion mittels UV/VIS-Detektor zugänglich sind. Erste Experimente zur Etablierung einer HPLC Trennmethode wurden mit Mandelsäurenitril durchgeführt. Die Bedingungen nach Kaul *et al* (2007) erwiesen sich aber nicht nur für die Detektion der Umsetzung von Mandelsäurenitril als ausreichend, sondern auch für alle anderen Substrate mit einem Phenylrest.

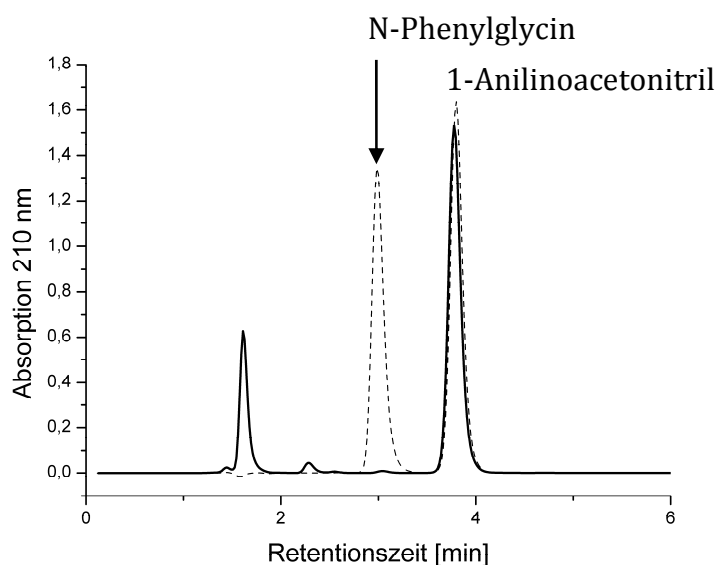


Abbildung 11: Chromatogramm der Umsetzung von 1-Anilinoacetonitril durch den NitSc-AT tragenden Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCD001. Fließmittel: Methanol:Wasser:H₃PO₄ 85 % (89,9:10:0,1; v/v/v), Trennsäule: Hypersil ODS (10 cm, Ø 5 µm), Fluss: 1 mL/min. Der Reaktionsansatz enthielt eine Zellsuspension der OD₅₇₈ = 10. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM 1-Anilinoacetonitril als Substrat gestartet. (—). Nach 72 h bei 37 °C wurde die Reaktion gestoppt und der zellfreie Überstand mittels HPLC analysiert; Referenz (10 mM 1-Anilinoacetonitril und 10 mM N-Phenylglycin) (----).

Um die Eignung der HPLC-Methode zur Auftrennung der Substrate und der entstehenden Produkte zu testen, wurden zuerst die Referenzsubstanzen mittels HPLC analysiert. Abbildung 11 (gestrichelte Linie) zeigt beispielhaft das resultierende Chromatogramm der Trennung des Substrates 1-Anilinoacetonitril, das unter den gewählten Bedingungen nach 3,8 min eluiert und des erwarteten Umsetzungsproduktes der Nitrilasereaktion, N-Phenylglycin, das aufgrund seiner höheren Polarität schon nach 3 min eluiert. Die durchgehende Linie in Abbildung 11 stellt das Chromatogramm der 72 h Umsetzung von 1-Anilinoacetonitril durch *E. coli* BL21(DE3) pCD001 dar. Im Bereich von 1,4-2,4 min sind Verbindungen zu sehen, die auf Verunreinigungen, aufgrund der Verwendung von intakten Zellen im Testverfahren, zurückzuführen sind. Die Untersuchung dieser Peaks durch GC/MS-Analyse ergab, dass es sich dabei um ein Substanzgemisch vorwiegend niedermolekularer Verbindungen handelt (ohne Abbildung).

Offenbar waren die gewählten Testbedingungen für das oberflächenexprimierte Fusionsprotein NitSc-AT nicht optimal, oder die Enzymaktivität zu gering für eine detektierbare Umsetzung, da keinerlei Substanzpeak für Phenylglycin bei der erwarteten Retentionszeit von 3 min detektierbar ist. Für keines der untersuchten aromatischen oder aromatisch-substituierten Substrate konnte durch HPLC-Analyse eine Enzymaktivität nachgewiesen werden.

1.3.2. Spektroskopische Methoden

Da eine mögliche Umsetzung der verwendeten aliphatischen Substrate nicht direkt mittels HPLC detektiert werden konnte, wurde ein indirektes kolorimetrisches Verfahren angewandt. Bei der Umsetzung eines Nitrils durch eine Nitrilase in die korrespondierende Carbonsäure entsteht äquimolar Ammoniak (Kobayashi und Shimizu, 1994). Dieser Ammoniak kann als indirekter Nachweis zur Bestimmung der Enzymaktivität herangezogen werden (Martínková *et al.*, 2008). Ein häufig angewandtes Verfahren zur Quantifizierung von Ammoniak ist die Indophenol/Hypochlorit-Methode von Fawcett und Scott (1960). Chaney und Marbach (1962) optimierten die Zusammensetzung der Reagenzlösungen im Hinblick auf die Anwendbarkeit und Haltbarkeit der Lösungen. Bei dieser modifizierten Methode werden zum zellfreien Überstand Natriumphenolat, Nitroprussid-Natrium und Natriumhypochlorit zugegeben. Da nur Ammoniak zum farbigen Produkt reagieren kann, wurde durch Zugabe von NaOH ein basischer pH-Wert eingestellt, um eine quantitative Überführung von Ammonium zu Ammoniak zu gewährleisten. Nach Inkubation der Proben für 30 min bei Raumtemperatur entsteht ein blaues

Indophenol-Ion das kolorimetrisch durch Messung der Absorption bei 620 nm quantifiziert werden kann und direkt proportional zur NH_3 -Konzentration ist.

Um den linearen Zusammenhang zwischen der Absorption des Farbstoffes und der Ammoniak-Konzentration zu belegen, wurde eine Kalibriergerade erstellt. Die Kalibriergerade für die quantitative Bestimmung von NH_3 wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Ammoniumchlorid in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 erstellt (Abbildung 12). Ein linearer Absorptionsanstieg konnte im gemessenen Konzentrationsbereich von 0 bis 12,5 mM NH_3 durch Anlegen einer Ausgleichsgerade und der Bestimmung des Regressionskoeffizienten mit 0,99 bestimmt werden. Dieser lineare Zusammenhang bestätigt die Verwendbarkeit des Testverfahrens in diesem Bereich für die quantitative Messung. Damit selbst bei vollständiger Umsetzung der Substrate die entstehende Menge Ammoniak innerhalb des linearen Bereiches liegt, wurden für die Enzymaktivitätstests Substratkonzentrationen von 10 mM verwendet.

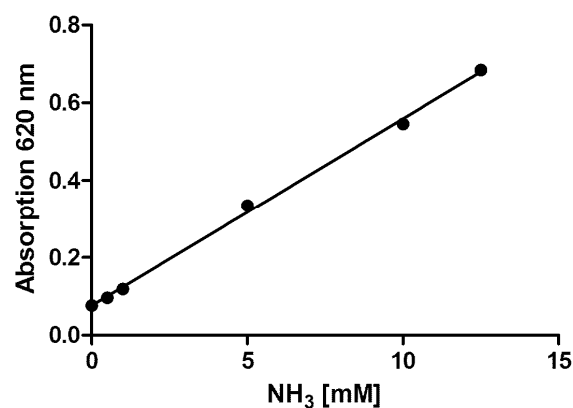


Abbildung 12: Kalibriergerade von Ammoniumchlorid zur indirekten Bestimmung der Nitrilaseaktivität des NitSc-AT tragenden Stamms *E. coli* BL21(DE3) pCD001. Zusammenhang zwischen der Absorptionsänderung A_{620} und der Konzentration an Ammoniak in der Probe. Gemessen wurde die Absorptionsänderung im Bereich von 0 bis 12,5 mM NH_3 . ($R^2 = 0,9979$)

Zur Bestimmung von Störeinflüssen, die sich aus der Verwendung intakter Zellen für das Testsystem ergeben können, wurden Vorversuche mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) und mit *E. coli* BL21(DE3) pCD001 Zellen ohne Substrat als Duplikat-Experimente durchgeführt. Jeder Reaktionsansatz enthielt die Zellen in einer OD_{578} von 10 in einem 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 resuspendiert. Der Reaktionsansatz wurde für 24 h im Thermoschüttler bei 800 rpm und 37 °C inkubiert. Die Umsetzung wurde durch Zentrifugation der Zellen gestoppt. Der zellfreie Überstand wurde dann mit den Reagenzien vermischt und die Farbentwicklung durch Inkubation bei Raumtemperatur gestartet. Nach Erreichen der maximale Farbintensität nach 30 min wurden die Proben photometrisch vermessen.

Tatsächlich zeigte sowohl der Reaktionsansatz mit *E. coli* BL21(DE3), als auch der mit *E. coli* BL21(DE3) pCD001 Zellen nach 30 minütiger Entwicklungszeit eine Blaufärbung. Die Intensität des entstandenen Farbstoffes entsprach einer NH_3 -Konzentration von 4,5 mM für den *E. coli* BL21(DE3) Reaktionsansatz (schwarze Balken) und 3,11 mM für den *E. coli* BL21(DE3) pCD001 Reaktionsansatz (weiße Balken) (Abbildung 13). Eine einfache Erklärung für die Entstehung des farbigen Reaktionsproduktes könnte in einer Reaktion mit im Überstand verbleibenden Stoffwechselprodukten der Zellen (z.B. Aminosäuren) zurückzuführen sein. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine hohe Konzentration an Aminosäuren zu einer falsch positiven Reaktion führen kann (Russel, 1944; Wearne, 1963). Auch wenn ein Einfluss des zur Kultivierung verwendeten LB-Mediums nicht ausgeschlossen werden konnte, ist dies doch eher unwahrscheinlich, da die Zellen vor Verwendung mehrfach mit Phosphatpuffer gewaschen wurden. Phosphatpuffer selbst bzw. die Substrate als Störquelle konnten ausgeschlossen werden, da bei einer 24 kein farbiges Produkt

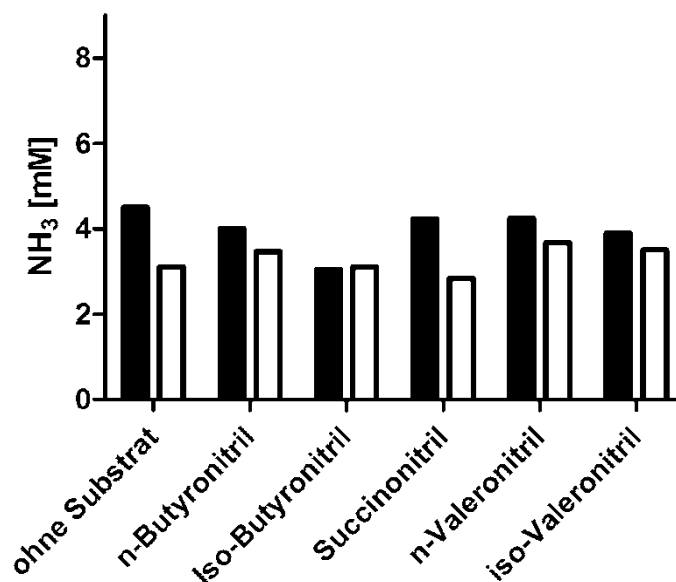


Abbildung 13: Indirekter Nachweis der Nitrilaseaktivität des NitSc-AT tragenden Stamms *E. coli* BL21(DE3) pCD001 durch kolorimetrische Bestimmung der Ammoniak-Konzentration. *E. coli* BL21(DE3) (Kontrolle) ■, *E. coli* BL21(DE3) pCD001 (NitSc-AT) □. Jeder Reaktionsansatz enthielt die Zellen in einer $\text{OD}_{578} = 10$, resuspendiert in einem Na-Phosphat-Puffer pH 7,5 und das jeweilige Substrat in einer Konzentration von 10 mM. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 Bestimmungen.

Zur Testung der Enzymaktivität von *E. coli* BL21(DE3) pCD001 wurden jedem Reaktionsansatz 10 mM Substrat zugefügt und für 24 h bei 37 °C und 800 rpm inkubiert. Als Kontrolle wurden zusätzlich Reaktionsansätze mit *E. coli* BL21(DE3) Zellen analog behandelt und mit 10 mM Substrat versetzt. Nach Auswertung der gemessenen Absorptionen konnte für keines der verwendeten Substrate eine signifikant erhöhte Ammoniak-Konzentration für *E. coli* BL21(DE3) pCD001 gegenüber den Kontrollzellen beobachtet werden (Abbildung 13). Bereits die

Kontrollzellen *E. coli* BL21(DE3) wiesen eine stärkere Farbstoffentwicklung auf, als die *E. coli* BL21(DE3) pCD001 Zellen. Weder mit *E. coli* BL21(DE3) pCD001 noch mit *E. coli* BL21(DE3) konnte für eines der untersuchten Substrate eine stark erhöhte Ammoniak-Konzentration nachgewiesen werden. Die Intensität der Farbentwicklung blieb auf dem Niveau der Reaktionsansätze, die ohne Substrat inkubiert wurden. Daraus kann geschlossen werden, dass in keinem der untersuchten Reaktionsansätze eine Nitrilaseaktivität nachgewiesen wurde.

Die geringe Sensitivität des Testverfahrens machte eine Überprüfung des Tests im Hinblick auf die Eignung zum Nachweis einer Nitrilaseaktivität unumgänglich. Zu diesem Zweck wurden *E. coli* BL21(DE3) pCD003 Zellen verwendet, die das Fusionsprotein NitAf-AT exprimieren und für die im Rahmen dieser Arbeit eine Aktivität gegenüber 3-Phenylpropionitril nachgewiesen werden konnte. Als Kontrollen wurden der Wirtsstamm *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* BL21(DE3) pCD001 ebenfalls mit 3-Phenylpropionitril für 24 h inkubiert. Wie aus Abbildung 14 ersichtlich wird konnten für die NitAf-AT tragenden Zellen eine Ammoniak-Konzentration von 7,65 mM nachgewiesen werden. Dieser Wert ist um den Faktor 4 größer als der für die Kontrollzellen ermittelte Wert. Somit konnte mit dem Testverfahren ein signifikanter Unterschied zwischen Nitrilase-aktiven und -inaktiven Zellen ermittelt werden.

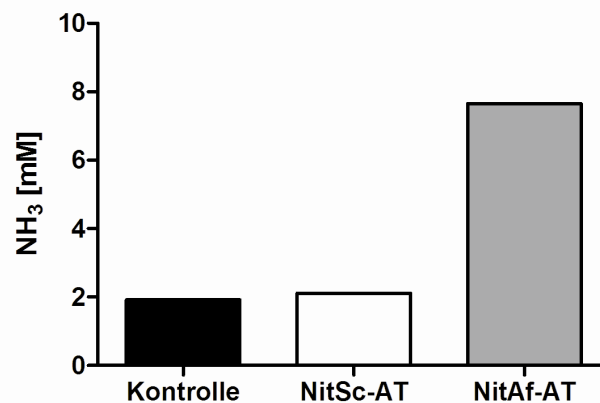


Abbildung 14: Vergleich der Nitrilaseaktivität des NitSc-AT tragenden Stammes *E. coli* BL21(DE3) pCD001 mit dem NitAf-AT tragenden Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCD003 durch kolorimetrische Bestimmung der Ammoniak-Konzentration. Kontrolle= *E. coli* BL21(DE3) ■, NitSc-AT= *E. coli* BL21(DE3) pCD001 □, NitAf-AT= *E. coli* BL21(DE3) pCD003 ■. Jeder Reaktionsansatz enthielt die Zellen in einer OD₅₇₈ = 10, resuspendiert in einem Na-Phosphat-Puffer pH 7,5 und das Substrat Phenylacetonnitril in einer Konzentration von 10 mM. Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen.

2. Autodisplay einer Nitrilase aus *Klebsiella pneumoniae* in *E. coli*

McBride *et al.* (1986) entdeckten die Fähigkeit von *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* Bromoxynil in die korrespondierende Carbonsäure durch eine Nitrilase vermittelte Reaktion umzusetzen. Untersuchungen ergaben, dass die Nitrilase auf einem, in *K. pneumoniae* natürlich vorkommenden, 82 kb Plasmid kodiert vorlag (Stalker und McBride, 1987). Der Transfer dieses Plasmids in *E. coli* führte zu rekombinanter Expression der Nitrilase. Aber bereits nach wenigen Tagen verloren die Transformanten aufgrund der enzymatischen Degradation des Plasmids die Eigenschaft Bromoxynil umzusetzen. Durch Klonierung des Nitrilase-kodierenden Gens (bxn) in ein pUC9-Derivat, im folgenden pBrx11 genannt, konnte eine stabile Expression in *E. coli* gewährleistet werden (Stalker, 1989). Untersuchungen der rekombinant in *E. coli* exprimierten Nitrilase ergaben, dass sich die aktive Form aus zwei identischen Untereinheiten zusammensetzt und eine hohe Substratspezifität für Bromoxynil-Derivate mit zwei Halogenen in meta-Position besteht (Stalker *et al.*, 1988a).

2.1. Konstruktion eines Plasmids zum Autodisplay

Das Plasmid pBrx11 wurde von der Fa. LGC Standards (London, UK) bezogen (ATCC Nummer: 67441). Bei pBrx11 handelt es sich um ein pUC9-Derivat, in das das bxn Gen durch EcoRI und HindIII Verdau und nachfolgender Ligation inseriert wurde. Das Plasmid lag in *E. coli* MM294 vor und wurde als gefriergetrocknete Kultur erhalten. Nach Kultivierung der gefriergetrockneten Zellen gemäß Protokoll des Herstellers wurde eine Plasmidisolierung durchgeführt. Da keinerlei Erfahrung mit dem Vektor pUC9 vorhanden war, sollte das Gen bxn in den Vektor pBluescriptII KS (-) inseriert werden. Das gewonnene Plasmidisolat wurde dafür einem Doppelverdau mit EcoRI und HindIII unterzogen. Das resultierende Fragment wurde in den ebenfalls EcoRI und HindIII verdauten Vektor pBluescriptII KS (-) ligiert und in *E. coli* DH5α Zellen transformiert. Über Blau/Weiß-Screening wurden Plasmid tragende Transformanten identifiziert und die erfolgreiche Transformation durch erneute Plasmidisolierung und Restriktionsanalyse nachgewiesen. Eine Analyse der Nitrilase-Sequenz sollte über eventuelle Mutationen Aufschluss geben. Die Sequenzanalyse wurde mit den Standardprimern M13 forward und reverse durchgeführt. Ein Vergleich mit der von Stalker *et al.* (1988a) bei GenBank (Accession-Nr.: J03196) hinterlegten Sequenz des Gens bxn ergab 5 Sequenzunterschiede (Abbildung 15). Die hinterlegte Sequenz J03196 stammt jedoch aus dem Plasmid pBrx9, einem Vorläuferplasmid des in dieser Arbeit verwendeten Plasmids pBrx11.

Die Sequenzunterschiede in Position 261/262, 528/529 und 319 (durch Pfeile markiert) führen zu einem Austausch von Cystein, Arginin und Glutaminsäure in der Ursprungssequenz zu Arginin, Glycin und Glutamin in der vorliegenden Sequenz (Abbildung 15). Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Sequenzunterschiede in Position 261/262 und 528/529 auf eine fehlerhafte Hinterlegung der Ursprungssequenz zurückzuführen sind. Bei den Sequenzunterschieden in Position 261/262 handelte es lediglich um eine Änderung der Nukleotidabfolge. So ändert sich die Abfolge der Nukleotide von CT in der Ursprungssequenz zu TC in der vorliegenden Sequenz. In der Position 528/529 veränderte sich ebenfalls die Abfolge von CG zu GC. Eine solche Mutation innerhalb einer 979 bp langen Sequenz ist eher unwahrscheinlich. Der Sequenzunterschied in Position 319 führt zu einem Austausch von Arginin in der Originalsequenz zu Glycin in der NitKp-AT Sequenz. Ein Sequenzvergleich mit den verwandten Nitrilasen (Sequenzidentität > 40 %) aus *Rhodococcus rhodochrous* (GenBank Accession-Nr.: ABO46008) und *Acidovorax facilis* (GenBank Accession-Nr.: ABD98457) konnte zeigen, dass die untersuchten Sequenzen an der betreffenden Position ebenfalls ein Glycin aufwiesen. Diese Beobachtung würde ebenfalls für eine fehlerhaft hinterlegte NitKp Sequenz sprechen. Weiterhin zeigte die durchgeführte Sequenzanalyse, dass nicht die komplette Nukleinsäuresequenz des Gens bxn wie für pBrx9 hinterlegt auf pBrx11 vorlag. Am 3'-Ende fehlten 78 bp. Diese Verkürzung kann auf Klonierungsschritte zur Konstruktion des Plasmids pBrx11 zurückgeführt werden. Dieses Plasmid enthält lediglich ein 0,949 kb großes Fragment des Gens bxn, während das Nitrilase Gen bxn einen offenen Leserahmen von 1,047 kb aufweist.

Anhand der vorliegenden Sequenzinformationen wurden die Primer EK005 und CD003 für die Amplifikation des Gens bxn konstruiert. Durch die Primer EK005 und CD003 wurden dem PCR-Produkt zwei Restriktionsendonuklease-Schnittstellen (XhoI am 5'-Ende und KpnI am 3'-Ende) angefügt, um eine Ligation mit definierten Enden zu gewährleisten (Abbildung 15).

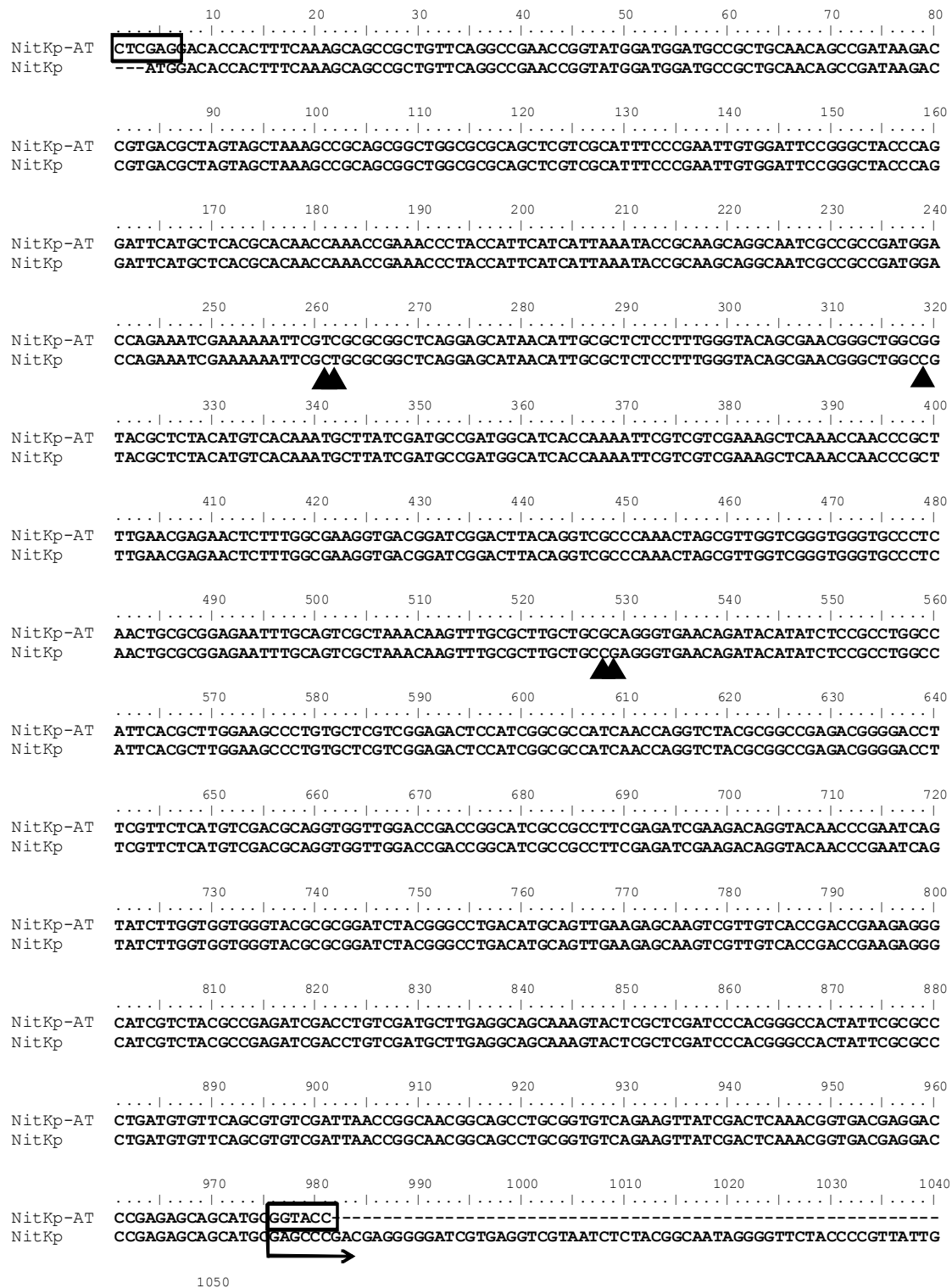


Abbildung 15: Vergleich der Nukleinsäuresequenz der Passagierdomäne des Fusionsproteins NitKp-AT mit der von Stalker *et al.* (1988a) in GenBank hinterlegten NitKp Sequenz. Die Sequenzen wurden mit dem Programm ClustalX2 (Larkin *et al.*, 2007) verglichen. Sequenzunterschiede sind durch Pfeile gekennzeichnet. Zur Klonierung angefügte Restriktionsendonukleaseschnittstellen sind durch Kästen gekennzeichnet. Der Beginn der Sequenzverkürzung ist durch einen abgewinkelten Pfeil markiert.

Das PCR-Produkt wurde mittels Agarosegelelektrophorese auf seine Größe hin untersucht (Abbildung 16 A). Ein Fragment von ca. 1000 bp ließ auf eine erfolgreiche

PCR-Reaktion schließen. Mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kit for sequencing (Invitrogen, Groningen, Niederlande) wurde das PCR-Produkt in den pCR4-TOPO Vektor inseriert. Das entstandene Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und KpnI verdaut. Das modifizierte bxn-Fragment wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt. In den ebenfalls mit XhoI und KpnI doppelverdauten Vektor pET-Adx04 wurde das PCR-Produkt ligiert. Das neu entstandene Plasmid, im folgenden pCD002 genannt, wurde durch Elektroporation in *E. coli* UT5600(DE3) und *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Eine Karte des Plasmids ist im Anhang abgebildet.

Nach Kultivierung der Zellen wurden die Plasmide erneut isoliert und zwecks Überprüfung der korrekten Basenlänge sowohl des Inserts, als auch des Vektor-Rückgrats einem Restriktionsendonuklease-Doppelverdau mit XhoI/KpnI unterworfen (Abbildung 16 B). Die erzeugten DNA-Fragmente von ca. 1000 bp für das Insert und ca. 7000 bp für den Vektor ließen auf eine erfolgreiche Insertion des Gens bxn in die Passagierdomäne des Autotransporters schließen.

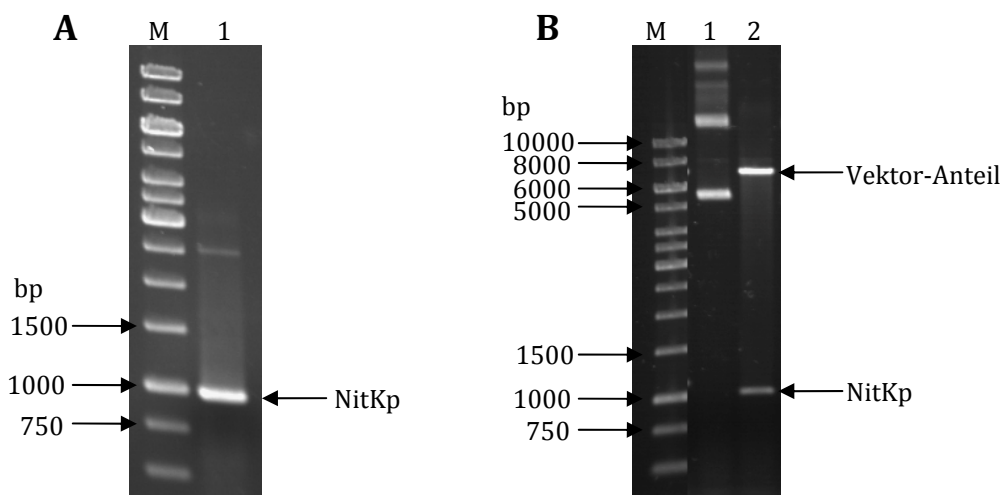


Abbildung 16: Gelelektrophoresetrennung des PCR-Produktes des amplifizierten Nitrilasegens NitKp (A Spur 1) und XhoI/KpnI-Restriktionsverdau des Plasmids pCD002 (B) auf dem das Fusionsprotein NitKp-AT kodiert vorliegt. A= Als Matrice für die PCR-Reaktion wurde das Plasmid pBrx11 verwendet, auf dem NitKp kodiert vorlag. Bei der Amplifikation wurden Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XhoI und KpnI eingefügt. B= Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen XhoI/KpnI in den verdauten Vektor pET-Adx04 ligiert. Spur 1= vor Zugabe von Restriktionsendonukleasen, Spur 2= nach Zugabe von Restriktionsendonukleasen. (M= Größenstandard).

2.2. Expression und Oberflächenständigkeit der Nitrilase

In Abbildung 17 ist die schematische Struktur des Fusionsproteins NitKp-AT dargestellt, das auf dem Plasmid pCD002 kodiert vorliegt.

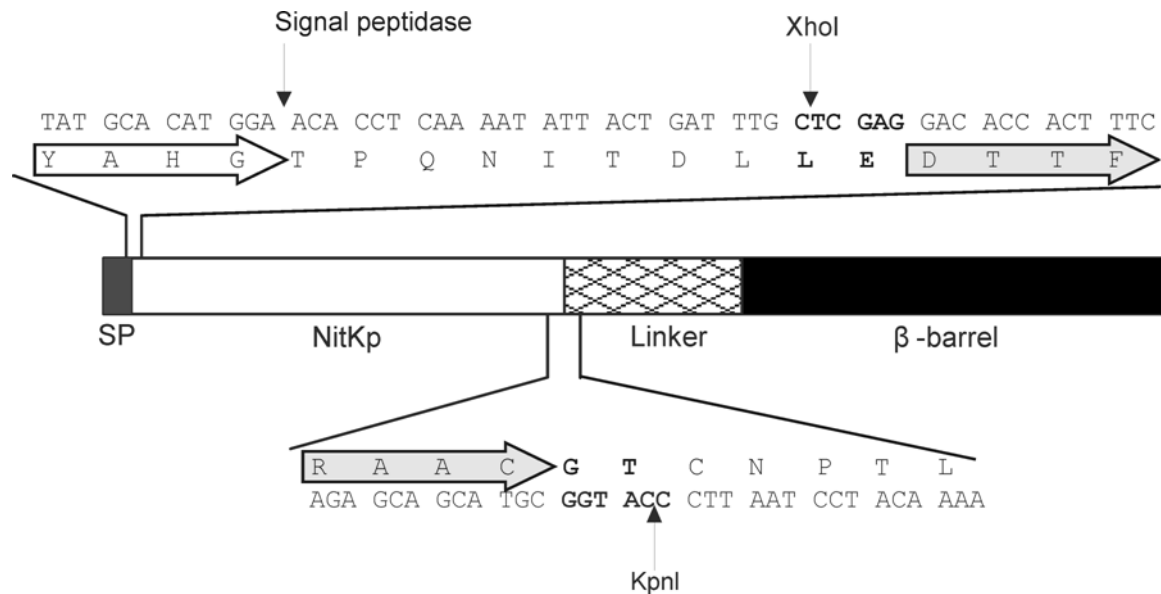


Abbildung 17: Struktur des Autotransporter-Fusionsproteins (NitKp-AT) mit der Nitrilase aus *K. pneumoniae* (NitKp) als Passagier. Die Umgebung der Passagierinsertionsstelle ist als Sequenz angegeben. Die beiden eingefügten Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen XhoI und KpnI wurden fett dargestellt. Das Ende der Signalpeptid-Domäne ist durch einen weiß hinterlegten Pfeil gekennzeichnet. Anfang und Ende der Passagier-Domäne sind durch einen grau hinterlegten Pfeil markiert. SP= Signalpeptid

Die Oberflächenständigkeit des Fusionsproteins NitKp-AT wurde analog NitSc-AT nachgewiesen. Dazu wurden zunächst *E. coli* UT5600(DE3) und *E. coli* BL21(DE3) Zellen mit dem Plasmid pCD002 transformiert. Nach Kontrolle der Aufnahme des korrekten Plasmids und Expression des Fusionsproteins NitKp-AT wurde auch hier eine differentielle Zellfraktionierung mit und ohne vorherigen Protease-zugänglichkeitstest mit Proteinase K durchgeführt. In Abbildung 18 A Spur 3 ist die Trennung der Außenmembranproteine der nicht induzierten Probe für *E. coli* UT5600(DE3) pCD002 dargestellt. Nach Inkubation mit IPTG entsteht eine deutlich sichtbare Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 85 kDa (Abbildung 18 A Spur 2). Dies stimmt gut mit dem berechneten Molekulargewicht von 84,4 kDa für NitKp-AT überein. Nach einer Proteinase K-Behandlung der NitKp-AT tragenden Zellen war die Proteinbande fast vollständig verschwunden (Abbildung 18 A Spur 1). Die Ergebnisse der differentiellen Zellfraktionierung für *E. coli* BL21(DE3) pCD002 sind in Abbildung 18 B dargestellt. Bei diesen Zellen konnte ebenfalls nach Zugabe von IPTG eine Proteinbande für NitKp-AT nachgewiesen werden (Abbildung 18 B Spur 2). Nach Proteinase K-Behandlung trat auch hier eine starke Abnahme der Proteinbande von NitKp-AT auf (Abbildung 18 B Spur 3), die durch Erhöhung der zugesetzten Proteinase K-Konzentration fast vollständig verschwand (Abbildung 18 B Spur 4). Somit konnte sowohl für die *E. coli* UT5600(DE3) pCD002 Zellen, als auch für die *E. coli* BL21(DE3) pCD002 Zellen die Oberflächenständigkeit des Fusionsproteins NitKp-AT nachgewiesen werden.

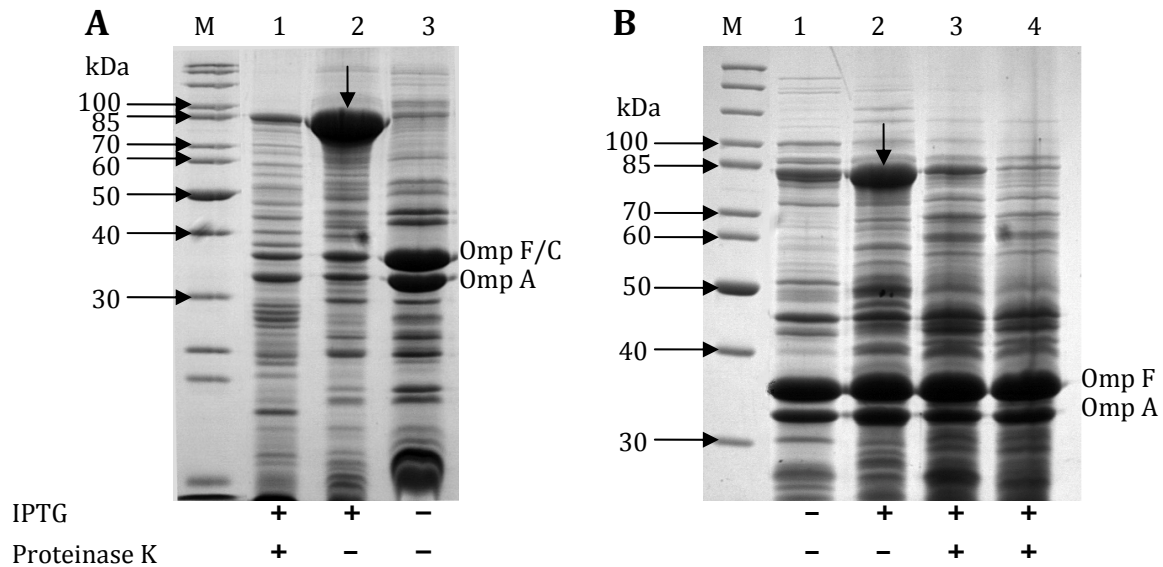
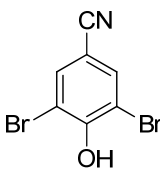
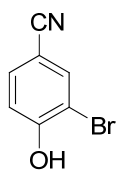
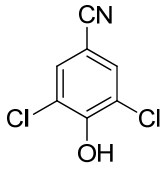
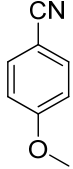
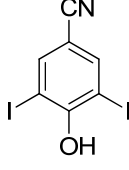
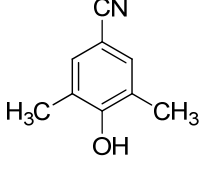
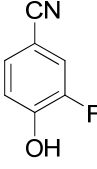


Abbildung 18: Expression und Oberflächenständigkeit des Fusionsproteins NitKp-AT in *E. coli* UT5600(DE3) pCD002 (A) und in *E. coli* BL21(DE3) pCD002 (B). A= Außenmembranproteine wurden mittels differentieller Zellfraktionierung isoliert, durch SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Spur 3 zeigt Außenmembranproteine des Stamms *E. coli* UT5600(DE3) pCD002. In Spur 2 sind Außenmembranproteine von *E. coli* UT5600(DE3) pCD002 abgebildet nach Induktion der Proteinexpression. Spur 1 zeigt eine Probe dieses Stamms, die vor der differentiellen Zellfraktionierung mit Proteinase K behandelt wurde. B= Außenmembranproteine wurden mittels differentieller Zellfraktionierung isoliert, durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Spur 1 zeigt Außenmembranproteine des Stamms *E. coli* BL21(DE3) pCD002. In Spur 2 sind Außenmembranproteine von *E. coli* BL21(DE3) pCD002 nach Induktion der Proteinexpression abgebildet. Spur 3 zeigt eine Probe dieses Stamms, die vor der differentiellen Zellfraktionierung mit 12,5 µL einer 0,5 % Proteinase K-Lösung behandelt wurden. Spur 4 zeigt Proben dieses Stamms, die vor der differentiellen Zellfraktionierung mit 25 µL einer 0,5 % Proteinase K-Lösung behandelt wurden. (M= Proteingrößenstandard).

2.3. Enzymaktivität der oberflächenexprimierten Nitrilase aus *Klebsiella pneumoniae*

Die Untersuchungen zur Enzymaktivität NitKp-AT präsentierender Zellen wurden mit *E. coli* BL21(DE3) pCD002 durchgeführt. Tabelle 12 gibt einen Überblick über die zum Nachweis der Enzymaktivität verwendeten Substrate. Da aus der Literatur bekannt war, dass die Nitrilase NitKp eine hohe Substratspezifität für in meta-Position halogenierte aromatische Nitrile besitzt, sollte untersucht werden, ob die Oberflächenexpression einen Einfluss auf die Substratspezifität hat. Für Bromoxynil, Chloroxynil, Ioxynil und 3-Brom-4-hydroxybenzonitril lagen Literaturdaten zur Umsetzung von NitKp vor (Stalker *et al.*, 1988a). Die restlichen Substanzen wurden untersucht, um die bisherigen Erkenntnisse zur Substratspezifität erweitern zu können.

Tabelle 12: Verwendete Substrate für den Nachweis der Enzymaktivität des NitKp-AT tragenden Stamms *E. coli* BL21(DE3) pCD002.

Substrat	Struktur	Substrat	Struktur
Bromoxynil		3-Brom-4-hydroxybenzonitril	
Chloroxynil		Anisonitril	
Ioxynil		3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzonitril	
3-Fluor-4-hydroxybenzonitril			

Die Umsetzung der Substrate in die jeweils korrespondierenden Carbonsäuren durch den NitKp-AT tragenden Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCD002 wurde durch HPLC-Analyse untersucht. Die Methode von Gabriel *et al.* (1996) reichte aus, um eine Trennung aller Substrate und ihrer korrespondierenden Carbonsäuren zu gewährleisten. Nur für das Substrat 3-Fluor-4-hydroxybenzonitril wurde auf die Zugabe von Acetonitril zur mobilen Phase verzichtet, um eine Trennung gewährleisten zu können.

Zum Nachweis der Enzymaktivität von NitKp-AT wurde *E. coli* BL21(DE3) pCD002 kultiviert und die Proteinexpression von NitKp-AT mit IPTG induziert. Die Zellen wurden in 50 mM Phosphatpuffer pH 8 resuspendiert und auf eine OD₅₇₈ von 10 eingestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mM des jeweiligen Substrates gestartet. 3-Brom-4-hydroxybenzonitril wurde aufgrund der geringen Löslichkeit in Phosphatpuffer nur in einer Konzentration von 2 mM dem Reaktionsansatz zugesetzt. Jeder Reaktionsansatz wurde für 72 h bei 35 °C und 800 rpm inkubiert.

Für jedes Substrat wurde zuerst die chemische Stabilität überprüft, um zu vermeiden, dass schon innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 72 h eine Degradation auftritt. Dafür wurde das jeweilige Substrat im Reaktionspuffer gelöst und bei 35 °C

und 800 rpm inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Reaktionsansatz mittels HPLC analysiert. Für keines der getesteten Substrate konnte innerhalb von 72 h eine Zersetzung detektiert werden. Zum Nachweis, dass eine eventuell stattfindende Umsetzung des Nitrils zur korrespondierenden Carbonsäure tatsächlich auf die Nitrilasereaktion und nicht auf eine unspezifische enzymatische Reaktion zurückzuführen ist, wurden alle getesteten Substrate mit einem Kontrollstamm inkubiert. Als Kontrollstamm diente der Ganzzell-Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pEK004. *E. coli* BL21(DE3) pEK004 trägt ein Autotransporterkonstrukt, das sich nur durch seine Passagierdomäne, die für eine Prenyltransferase kodiert, von *E. coli* BL21(DE3) pCD002 unterscheidet. Aufgrund der großen Ähnlichkeit wurde dieser Stamm als Kontrolle für alle getesteten Substrate eingesetzt. Zu diesem Zweck wurde *E. coli* BL21(DE3) pEK004 kultiviert und die Proteinexpression induziert. Anschließend wurde ein Aktivitätstest analog wie für *E. coli* BL21(DE3) pCD002 durchgeführt. Der zellfreie Überstand wurde nach 72 h Inkubation direkt mittels HPLC analysiert. Wie erwartet zeigte der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pEK004 mit keinem der untersuchten Substrate eine Nitrilaseaktivität.

In Abbildung 19 stellt die gestrichelte Linie die Trennung der Referenzsubstanzen dar. Bromoxynil (3,5-Dibrom-4-hydroxybenzonitril) eluierte unter den genannten Bedingungen nach 8,2 min und die korrespondierende Carbonsäure 3,5-Dibrom-4-hydroxybenzoesäure nach 5,8 min. Die durchgezogene Linie zeigt die Umsetzung von 5 mM Bromoxynil durch *E. coli* BL21(DE3) pCD002 nach 72 h Inkubation (—). Die Retentionszeit der Referenzsubstanz 3,5-Dibrom-4-hydroxybenzoesäure stimmt genau mit der Retentionszeit des entstandenen Produktpeaks überein. Die Überprüfung des UV-Spektrums des Produktpeaks zeigte zwei Absorptionsmaxima bei 216,6 und 253,2 nm. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen UV-Maxima für 3,5-Dibrom-4-hydroxybenzoesäure von 217 nm und 254 nm (Buchberger *et al.*, 1984). Somit konnte für den Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCD002 eine Nitrilaseaktivität nachgewiesen werden. Die Quantifizierung des Produktpeaks mittels Kalibriergerade ergab eine Konzentration von 0,9 mM 3,5-Dibrom-4-hydroxybenzoesäure. Bei 3,2 min erscheint ein Peak im Chromatogramm, bei dem es sich um eine Verunreinigung der verwendeten Referenzsubstanzen handelt, da dieser auch in einer frisch hergestellten Lösung zu finden ist. Bei den Peaks, die nach 1,5 min eluieren handelt es sich, wie schon für die Trennung der NitSc-AT-Substrate beschrieben, höchstwahrscheinlich um Stoffwechselprodukte der eingesetzten Zellen.

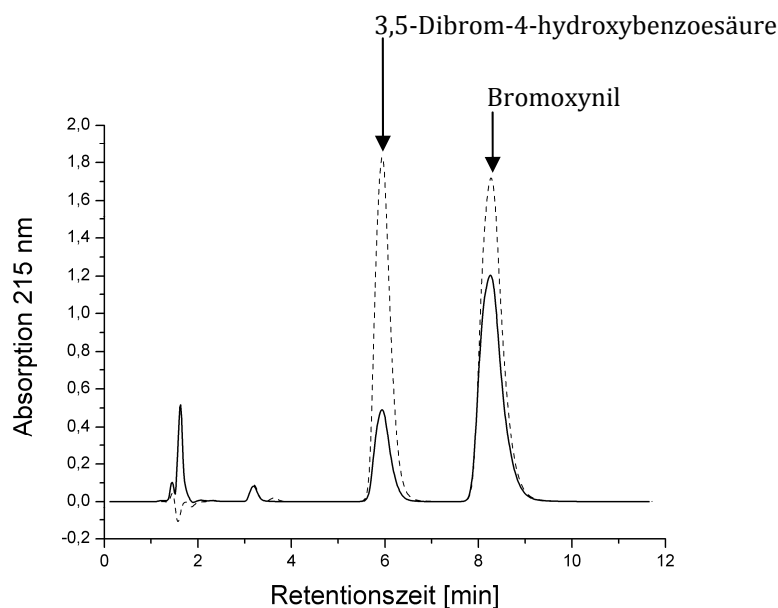


Abbildung 19: Chromatogramm einer Umsetzung von Bromoxynil durch den NitKp-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pCD002.

Fließmittel: Methanol:Wasser:Acetonitril:Essigsäure (32:47,5:20:0,5; v/v/v/v), Trennsäule: Hypersil ODS (10 cm, Ø 5 µm), Fluss: 1 mL/min. Der Reaktionsansatz enthielt den Ganzzell-Biokatalysator in einer $OD_{578} = 10$. Die Umsetzung wurde durch Zugabe von 5 mM Bromoxynil als Substrat gestartet (—). Die Inkubationsdauer betrug 72 h bei 35 °C; Referenz (5 mM Bromoxynil und 5 mM 3,5-Dibrom-4-hydroxybenzonitril) (---).

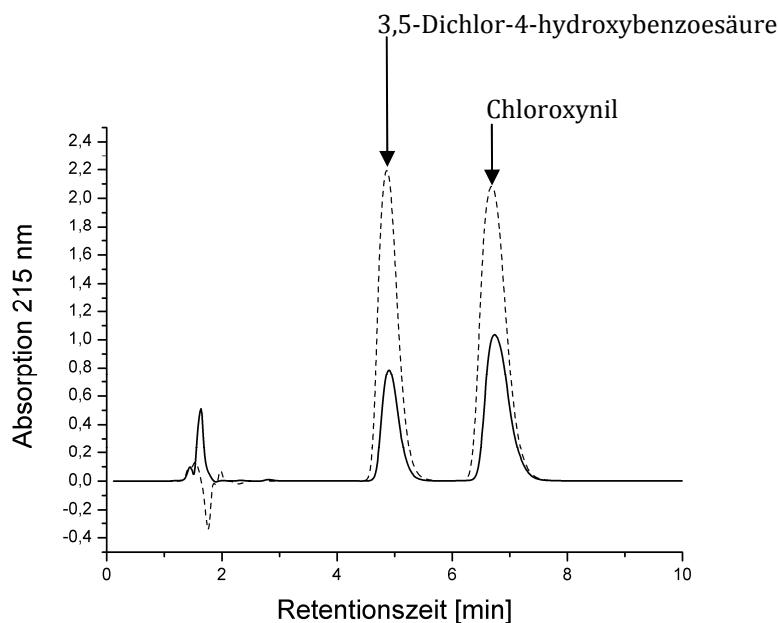


Abbildung 20: Chromatogramm einer Umsetzung von Chloroxynil durch den NitKp-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pCD002.

Fließmittel: Methanol:Wasser:Acetonitril:Essigsäure (32:47,5:20:0,5; v/v/v/v), Trennsäule: Hypersil ODS (10 cm, Ø 5 µm), Fluss: 1 mL/min. Der Reaktionsansatz enthielt den Ganzzell-Biokatalysator in einer $OD_{578} = 10$. Die Umsetzung wurde durch Zugabe von 5 mM Chloroxynil als Substrat gestartet (—). Die Inkubationsdauer betrug 72 h bei 35 °C. Referenz (5 mM Chloroxynil und 5 mM 3,5-Dichlor-4-hydroxybenzonitril) (---).

Chloroxynil (3,5-Dichlor-4-hydroxybenzonitril) eluierte unter den gewählten Bedingungen nach 6,7 min und die korrespondierende Carbonsäure 3,5-Dichlor-4-hydroxybenzoesäure nach 4,9 min (Abbildung 20) (---). Auch hier zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Retentionszeit von 3,5-Dichlor-4-hydroxybenzoesäure mit dem entstandenen Produktpeak (—). Die Auswertung der Umsetzung von Chloroxynil erbrachte eine Produktkonzentration von 1,6 mM. Somit war die Reaktionsgeschwindigkeit von NitKp-AT für Chloroxynil um den Faktor zwei größer als für Bromoxynil.

Ioxynil (3,5-Diiod-4-hydroxybenzonitril) eluierte unter den genannten Bedingungen nach 10,45 min, die korrespondierende Carbonsäure 3,5-Diiod-4-hydroxybenzoesäure schon nach 7 min (Abbildung 21). Auch hier konnte eine genaue Übereinstimmung der Retentionszeiten von 3,5-Diiod-4-hydroxybenzoesäure und dem nach 72 stündiger Umsetzung entstandenen Produktpeak gezeigt werden. Die Auswertung der Umsetzung von Ioxynil ergab eine Produktkonzentration von 0,13 mM 3,5-Diiod-4-hydroxybenzoesäure.

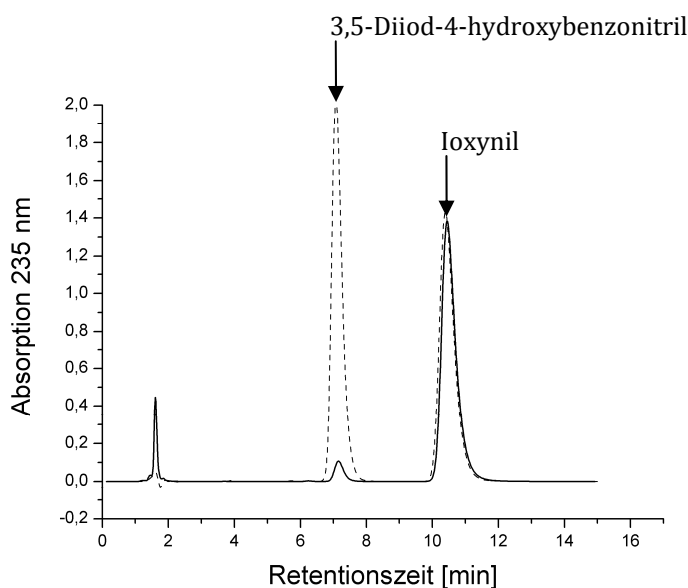


Abbildung 21: Chromatogramm einer Umsetzung von Ioxynil durch den NitKp-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pCD002.

Fließmittel: Methanol:Wasser:Acetonitril:Essigsäure (32:47,5:20:0,5; v/v/v/v), Trennsäule: Hypersil ODS (10 cm, Ø 5 µm), Fluss: 1 mL/min. Der Reaktionsansatz enthielt den Ganzzell-Biokatalysator in einer $OD_{578} = 10$. Die Umsetzung wurde durch Zugabe von 5 mM Ioxynil als Substrat gestartet (—). Die Inkubationsdauer betrug 72 h bei 35 °C. Referenz (5 mM Ioxynil und 5 mM 3,5-Diiod-4-hydroxybenzoesäure) (---).

Das Substrat 3-Brom-4-hydroxybenzonitril wurde dem Reaktionsansatz lediglich in einer Konzentration von 2 mM zugesetzt. Aufgrund der geringen Löslichkeit dieser Substanz in Wasser und Methanol musste als Lösungsvermittler zur Erstellung einer

0,2 M Stammlösung Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet werden. Nach 72 h Umsetzung wurde der zellfreie Überstand direkt mittels HPLC analysiert. Bei der HPLC-Analyse erscheint sowohl im Chromatogramm der Referenzsubstanzen (---), als auch im Chromatogramm der Reaktionsprodukte (—) bei einer Retentionszeit von 1,6 min der prominente Peak des DMSO (Abbildung 22). Das Substrat 3-Brom-4-hydroxybenzonitril eluierte unter den verwendeten Bedingungen nach 5,2 min, das erwartete Produkt 3-Brom-4-hydroxybenzoesäure schon nach 3,4 min. Die HPLC-Analyse der 72 h Umsetzung ergab ebenfalls einen Produktpeak mit einer Retentionszeit von 3,4 min, der sich mit dem Peak von 3-Brom-4-hydroxybenzoesäure genau überlagert. Die Auswertung mittels Kalibriergerade ergab eine Produktkonzentration von 0,09 mM.

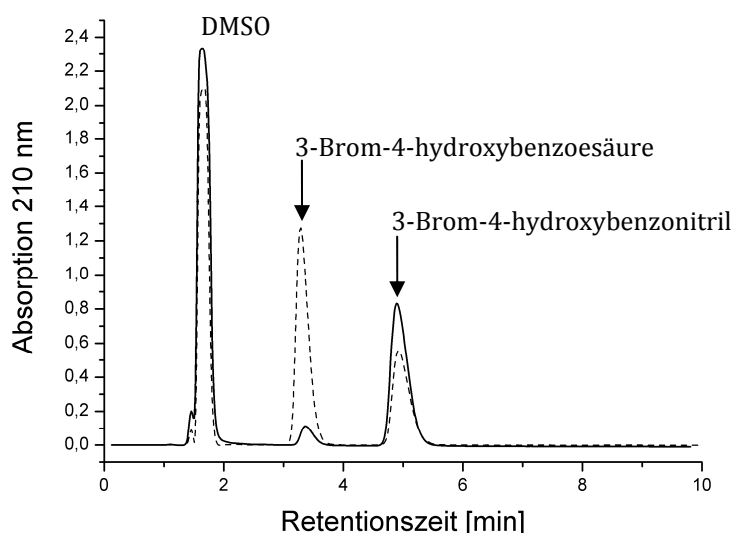


Abbildung 22: Chromatogramm einer Umsetzung von 3-Brom-4-hydroxybenzonitril durch den NitKp-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pCD002. Fließmittel: Methanol:Wasser:Acetonitril:Essigsäure (32:47,5:20:0,5; v/v/v/v), Trennsäule: Hypersil ODS (10 cm, Ø 5 µm), Fluss: 1 mL/min. Der Reaktionsansatz enthielt den Ganzzell-Biokatalysator in einer OD₅₇₈= 10. Die Umsetzung wurde durch Zugabe von 2 mM 3-Brom-4-hydroxybenzonitril als Substrat gestartet (—). Die Inkubationsdauer betrug 72 h bei 35 °C. Referenz (2,5 mM 3-Brom-4-hydroxybenzoesäure, und 2 mM 3-Brom-4-hydroxybenzonitril) (---). DMSO= Als Lösungsvermittler wurde Dimethylsulfoxid verwendet.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Nitrilase NitKp bevorzugt halogenierte 4-Hydroxybenzonitrile umsetzt (Stalker *et al.*, 1988a). Dies wurde jedoch nur mit Chlor, Brom und Iod als Halogenatom untersucht. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob auch fluorierte Verbindungen umgesetzt werden können. Zu diesem Zweck wurde 3-Fluor-4-hydroxybenzonitril als Substrat verwendet. Unter den verwendeten Bedingungen eluierte 3-Fluor-4-hydroxybenzonitril nach 3 min und das erwartete Produkt der Nitrilasereaktion, die 3-Fluor-4-hydroxybenzoesäure nach 2,29 min (Abbildung 23) (---). Die HPLC-Analyse einer 72 h Umsetzung von 5 mM 3-Fluor-4-

hydroxybenzonitril (—) ergab einen Produktpeak bei 2,29 min. Dies stimmt genau mit der Retentionszeit des erwarteten Produktes 3-Fluor-4-hydroxybenzoesäure überein. Die Auswertung mittels Kalibriergerade ergab eine Produktkonzentration von 0,34 mM. Somit konnte der Nachweis erbracht werden, dass NitKp-AT in der Lage ist auch mit Fluor substituierte Verbindungen zur korrespondierenden Carbonsäure umzusetzen. Da das zweifach-halogenierte Bromoxynil mit einer höheren Reaktionsgeschwindigkeit umgesetzt wird, als das einfach-halogenierte 3-Brom-4-hydroxybenzonitril, ist es sehr wahrscheinlich, dass eine zweifach fluoriierte Verbindung (z.B. 3,5-Difluor-4-hydroxybenzonitril) ebenfalls schneller umgesetzt werden würde als 3-Fluor-4-hydroxybenzoesäure. Da 3,5-Difluor-4-hydroxybenzonitril nicht verfügbar war, musste auf eine Testung verzichtet werden.

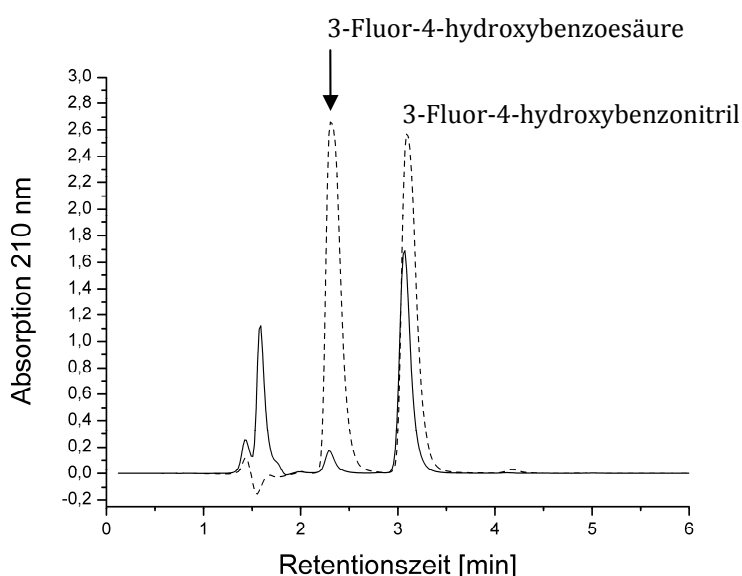


Abbildung 23: Chromatogramm einer Umsetzung von 3-Fluor-4-hydroxybenzonitril durch den NitKp-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pCD002. Fließmittel: Methanol:Wasser:Essigsäure (32:59,5:0,5; v/v/v), Trennsäule: Hypersil ODS (10 cm, Ø 5 µm), Fluss: 1 mL/min. Der Reaktionsansatz enthielt den Ganzzell-Biokatalysator in einer OD₅₇₈ = 10. Die Umsetzung wurde durch Zugabe von 5 mM 3-Fluor-4-hydroxybenzonitril als Substrat gestartet (—). Die Inkubationsdauer betrug 72 h bei 35 °C. Referenz (5 mM 3-Fluor-4-hydroxybenzoesäure und 5 mM 3-Fluor-4-hydroxybenzonitril) (---).

Mit dem Substrat 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzonitril sollte untersucht werden, ob NitKp-AT auch in der Lage ist unhalogenierte Substrate umzusetzen. Unter den getesteten Bedingungen eluierten die Referenzsubstanzen 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzonitril und das erwartete Reaktionsprodukt 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure jeweils nach 5,7 und 3,25 min (Abbildung 24) (---). Die Auswertung des 72 h Aktivitätsassays mittels HPLC zeigte einen Produktpeak bei der erwarteten Retentionszeit von 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure (—). Die

quantitative Bestimmung der Produktkonzentration mittels Kalibriergerade ergab einen Gehalt von 0,1 mM 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure.

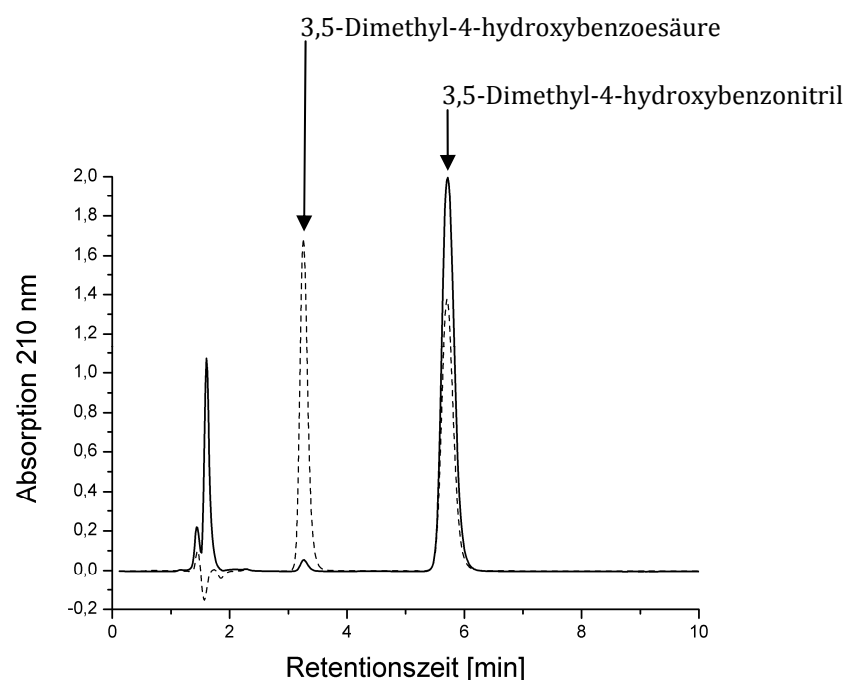


Abbildung 24: Chromatogramm einer Umsetzung von 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzonitril durch den NitKp-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pCD002. Fließmittel: Methanol:Wasser:Acetonitril:Essigsäure (32:47,5:20:0,5; v/v/v/v), Trennsäule: Hypersil ODS (10 cm, Ø 5 µm), Fluss: 1 mL/min. Der Reaktionsansatz enthielt den Ganzzell-Biokatalysator in einer OD₅₇₈= 10. Die Umsetzung wurde durch Zugabe von 5 mM 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzonitril als Substrat gestartet (—). Die Inkubationsdauer betrug 72 h bei 35 °C. Referenz (5 mM 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure und 4 mM 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzonitril) (---).

Für das Substrat Anisonitril (4-Methoxybenzonitril) konnte unter den verwendeten Bedingungen keine Umsetzung zur korrespondierenden Carbonsäure 4-Methoxybenzoesäure detektiert werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Inkubation der Nitrilase NitKp mit dem strukturell ähnlichen Substrat 4-Hydroxybenzonitril nur zu einer sehr geringen Umsetzung führte (Stalker *et al.*, 1988a). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Anwesenheit einer Hydroxygruppe in para-Position zur CN-Gruppe essentiell für die Akzeptanz einer Verbindung als Substrat ist.

Tabelle 13 gibt einen Überblick über die mit dem jeweiligen Substrat erreichte Volumenaktivität für den NitKp-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pCD002.

Tabelle 13: Volumenaktivität des NitKp-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD002.

Substrat	Volumenaktivität [mU/mL]
Bromoxynil	0,2
Chloroxynil	0,375
Ioxynil	0,03
3-Fluor-4-hydroxybenzonitril	0,078
3-Brom-4-hydroxybenzonitril	0,02
Anisonitril	Nicht detektierbar
3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzonitril	0,023

2.4. Biochemische Charakterisierung des Ganzzell-Biokatalysators

2.4.1. pH-Optimum

Die Produktion von 3,5-Dibrom-4-hydroxybenzoesäure in Abhängigkeit vom pH-Wert wurde für das Fusionsprotein NitKp-AT bestimmt (Abbildung 25).

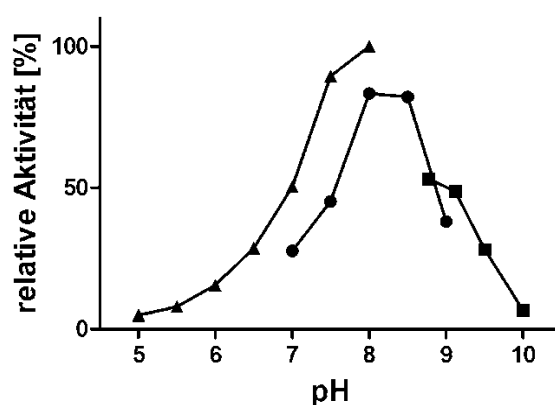


Abbildung 25: pH-Optimum des NitKp-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD002. Der Reaktionsansatz enthielt jeweils einen 50 mM Puffer mit einem definierten pH-Wert. Als Substrat wurde Bromoxynil (5 mM) verwendet. Der Reaktionsansatz wurde bei 35 °C für 72 h inkubiert. Der pH-Wert, bei dem die höchste Aktivität nachgewiesen werden konnte wurde gleich 100 % gesetzt. pH-Bereich von 5-8= Phosphatpuffer (▲), pH-Bereich von 7-9= Tris-HCl Puffer (●), pH Bereich 8,77-10: Carbonat-Puffer (■).

Die Experimente wurden mit *E. coli* BL21(DE3) pCD002 durchgeführt. Jeder Reaktionsansatz enthielt den Ganzzell-Biokatalysator in einer OD₅₇₈ von 10, resuspendiert in unterschiedlichen Puffern mit definierten pH-Werten. Die Umsetzung wurde durch Zugabe von 5 mM Bromoxynil und Inkubation des Reaktionsansatzes für 72 h bei 35 °C und 800 rpm gestartet. Die Auswertung ergab

ein Maximum der Umsetzung im Phosphatpuffer bei pH 8. Die Produktivität im Tris-HCl-Puffer war bei pH 8 um 17 % geringer war. Die Enzymaktivität in Tris-HCl-Puffer und im Carbonatpuffer lag bei jedem gemessenen pH-Wert unter dem im Phosphatpuffer ermittelten Wert. Dies deckt sich nicht mit dem aus der Literatur bekannten pH-Optimum von pH 9,2 in einem Carbonatpuffer für NitKp (Stalker *et al.*, 1988a). Es wäre denkbar, dass die Umsatzungsrate in Phosphatpuffer mit einem pH-Wert über 8 noch weiter gesteigert werden könnte. Eine Umsetzung in Phosphatpuffer bei einem pH > 8 war aufgrund der stark eingeschränkten Pufferwirkung nicht sinnvoll. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Experimente in einem 50 mM Phosphatpuffer bei pH 8 durchgeführt.

2.4.2. Temperaturoptimum

Die Temperaturabhängigkeit der Produktion von 3,5-Dibrom-4-hydroxybenzoesäure wurde für den NitKp-AT tragenden Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCD002 mit 5 mM Bromoxynil als Substrat bestimmt. Jeder Reaktionsansatz enthielt den Ganzzell-Biokatalysator in einer OD₅₇₈ von 10 in 50 mM Phosphatpuffer pH 8. Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, bestand im Bereich von 30 °C bis 45 °C ein linearer Zusammenhang zwischen der erzeugten Produktmenge und der Temperatur (Korrelationskoeffizient 0,962). Bei 50 °C sank die Produktion von 3,5-Dibrom-4-hydroxybenzoesäure auf 71 % ab. Somit konnte für das Fusionsproteins NitKp-AT ein erhöhtes Temperaturoptimum im Vergleich zu dem freien Enzym NitKp gezeigt werden, für das ein Temperaturoptimum von 35 °C berichtet wird (Stalker *et al.*, 1988a).

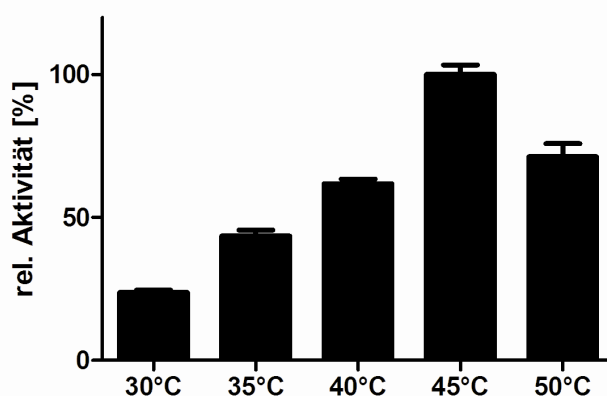


Abbildung 26: Temperaturoptimum des NitKp-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD002. Die Reaktionsansätze enthielten den Biokatalysator in einer OD₅₇₈ von 10. Als Substrat wurde Bromoxynil (5 mM) verwendet. Die Reaktionsansätze wurden für 72 h bei definierten Temperaturen inkubiert. Die Temperatur, bei der die höchste Produktivität gemessen wurde, wurde gleich 100 % gesetzt. (n=3; gezeigt sind MW±SD)

3. Klonierung und Oberflächenexpression einer Nitrilase aus *Alcaligenes faecalis* zum Autodisplay in *E. coli*

3.1. Klonierung des Gens für eine Nitrilase aus *Alcaligenes faecalis*

Die genomische DNA von *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* ATCC 8750 wurde als Matrize für die PCR-Reaktion zur Amplifizierung des Nitrilase-Gens verwendet. Das genetische Material wurde von der Firma LGC Standards (London, UK) erworben (ATCC Nummer: 8750D). Durch die PCR-Reaktion mit den Primern EK007 und EK008 wurden dem Amplikon Restriktionsendonuklease-Schnittstellen (5'-Ende XhoI und 3'-Ende KpnI) angehängt, um eine Ligation mit definierten Enden zu gewährleisten. Die Untersuchung des gewonnenen DNA-Fragments durch Agarose-Gelelektrophorese ergab ein Fragment von ca. 1100 bp (Abbildung 27 A). Dies ließ auf eine erfolgreiche Vervielfältigung des Nitrilase-Gens schließen. Das DNA-Fragment wurde mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kit for sequencing (Invitrogen, Groningen, Niederlande) in den pCR4-TOPO Vektor inseriert. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und KpnI verdaut, mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend aufgereinigt. Um dieses Fragment in den Vektor pET-Adx04 einzubringen, wurde dieser ebenfalls mit XhoI und KpnI geschnitten. Dadurch wurde die in pET-Adx04 enthaltene Passagiersequenz entfernt und es wurden kompatible Enden für die zuvor präparierten Fragmente geschaffen. Nach Trennung und Aufreinigung des Vektorrückgrates wurde dieses mit dem für NitAf kodierenden DNA-Fragment ligiert. Das neu entstandene Plasmid, im folgenden pCD003 genannt, wurde durch Elektroporation in *E. coli* UT5600(DE3) und *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Eine Karte des Plasmids ist im Anhang abgebildet.

Zusätzlich wurde noch eine Transformation in den DsbA-negativen Stamm *E. coli* JK321(DE3) vorgenommen. Durch das Ausschalten der periplasmatischen Disulfidoxidoreduktase DsbA soll in diesem Stamm die Ausbildung störender Disulfidbrücken im Periplasma und somit eine negative Beeinträchtigung der Translokationseffizienz verhindert werden (Jose *et al.*, 1996).

Nach Kultivierung der Zellen wurden die Plasmide erneut isoliert und zwecks Überprüfung der korrekten Größe sowohl des Inserts, als auch des Vektoranteils einem Restriktionsendonuklease-Doppelverdau mit XhoI/KpnI unterworfen. Zwei entstehende DNA-Fragmente mit ca. 7000 bp und 1100 bp ließen auf eine erfolgreiche Insertion des Amplikons in den Vektor schließen (Abbildung 27 B).

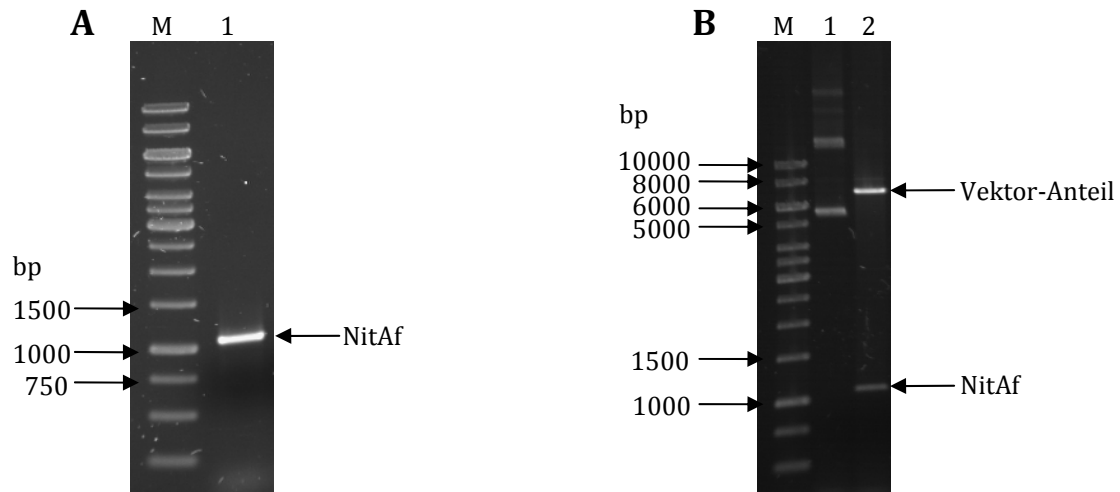


Abbildung 27: Gelelektrophoresetrennung des PCR-Produktes des amplifizierten Nitrilasegens NitAf (A Spur 1) und XhoI/KpnI-Restriktionsverdau des Plasmids pCD003 (B) auf dem das Fusionsprotein NitAf-AT kodiert vorliegt. A= Als Matrize für die Amplifikation des Nitrilasegens wurde genomische DNA von *A. faecalis* verwendet. Bei der Amplifikation wurden Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XhoI und KpnI eingefügt. **B=** Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen XhoI/KpnI in den verdauten Vektor pET-Adx04 ligiert. Spur 1= vor Inkubation mit Restriktionsendonukleasen, Spur 2= nach Inkubation mit Restriktionsendonukleasen. (M= Größenstandard)

Eine anschließende Sequenzanalyse ergab eine vollständige Übereinstimmung des Amplifikats mit der Sequenz der Nitrilase aus *A. faecalis* JM3 (GenBank-Nr. D13419) (Kobayashi *et al.*, 1993). Ein direkter Vergleich mit der DNA-Sequenz der Nitrilase aus *A. faecalis* ATCC 8750 (NitAf) war nicht möglich, da diese nicht in einer Datenbank hinterlegt worden war. Es war jedoch bekannt dass die Nitrilasen aus *A. faecalis* ATCC 8750 und *A. faecalis* JM3 eine identische DNA-Sequenz besitzen (Kiziak *et al.*, 2007). Somit konnte über den Umweg des Vergleichs mit der Nitrilase aus *A. faecalis* JM3 die erfolgreiche Klonierung des Nitrilase-Gens aus *A. faecalis* ATCC 8750 bestätigt werden.

3.2. Expression von NitAf-AT unter der Kontrolle eines IPTG induzierbaren Promotors

Durch die Konstruktion von pCD003 wurde ein neues Fusionsgen geschaffen, das für das Fusionsprotein NitAf-AT kodierte. Der schematische Aufbau von NitAf-AT ist in Abbildung 28 dargestellt.

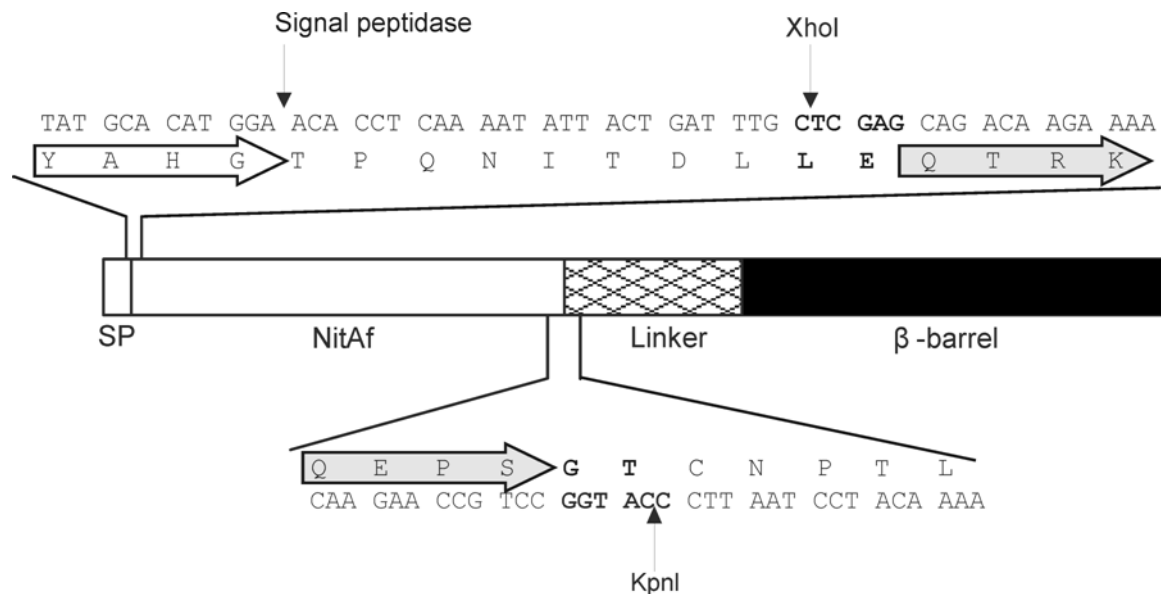


Abbildung 28: Struktur des Autotransporter-Fusionsproteins (NitAf-AT) mit der Nitrilase aus *A. faecalis* (NitAf) als Passagier. Die Umgebung der Passagierinsertionsstelle ist als Sequenz angegeben. Die beiden eingefügten Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *KpnI* wurden fett dargestellt. Das Ende der Signalpeptid-Domäne ist durch einen weiß hinterlegten Pfeil gekennzeichnet. Anfang und Ende der Passagier-Domäne sind durch einen grau hinterlegten Pfeil markiert. SP= Signalpeptid

Zur Überprüfung der Membranständigkeit von NitAf-AT in den Stämmen *E. coli* UT5600(DE3) pCD003, *E. coli* BL21(DE3) pCD003 und *E. coli* JK321(DE3) pCD003 wurden die Zellen kultiviert und die Proteinexpression von NitAf-AT durch IPTG induziert. Als Vergleich dienten Kulturen in denen die Proteinexpression nicht induziert worden war. Die Proteine der äußeren Zellmembran wurden durch differentielle Zellfraktionierung isoliert und nach Auftrennung durch SDS-PAGE isoliert (Abbildung 29). Das Erscheinen einer zusätzlichen Proteinbande in den IPTG behandelten Proben mit einem Molekulargewicht zwischen 85 kDa und 100 kDa stimmt gut mit dem berechneten Molekulargewicht für NitAf-AT von 88,3 kDa überein (Abbildung 29 Spur 2, 4 und 6). Somit konnte in allen getesteten Stämmen die Membranständigkeit des Fusionsproteins NitAf-AT nachgewiesen werden.

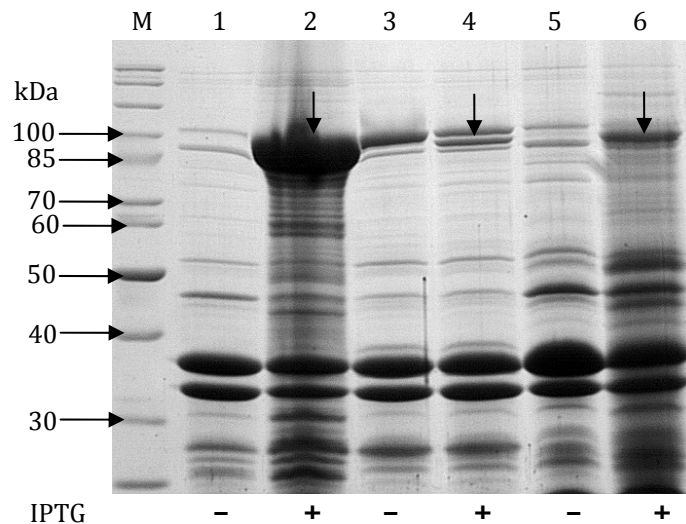


Abbildung 29: Membranständigkeit des Fusionsproteins NitAf-AT in verschiedenen *E. coli* Stämmen. Die Außenmembranproteine wurden mittels differentieller Zellfraktionierung isoliert, durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Spur 1+2: *E. coli* UT5600(DE3) pCD003, Spur 3+4: *E. coli* JK321(DE3) pCD003, Spur 5+6: *E. coli* BL21(DE3) pCD003. Die Proteinbanden des Fusionsproteins NitAf-AT sind mit Pfeilen markiert. IPTG: Nach Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,5 wurde die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Proteinbande des Fusionsproteins NitAf-AT ist jeweils mit einem Pfeil markiert. (M= Proteingrößenstandard).

3.3. Expression von NitAf-AT unter der Kontrolle eines Rhamnose induzierbaren Promotors in *E. coli* KRX

Da es Hinweise darauf gab, dass sich die Expressionsstärke im verwendeten Vektor-System durch die Zugabe von IPTG nur bedingt steuern ließ, sollte ein alternatives Expressionssystem untersucht werden. Bei *E. coli* KRX (Promega, USA) handelt es sich um einen Stamm, der den Vorteil einer hohen Transformationseffizienz eines Klonierungsstammes mit dem Vorteil einer hohen Proteinausbeute eines Expressionsstammes kombinieren soll (Hartnett *et al.*, 2006). Hierbei steht das für die T7-RNA-Polymerase kodierende Gen unter der Kontrolle des Rhamnose induzierbaren *rhaP_{BAD}*-Promotors. Dadurch soll eine unerwünschte Basalexpression („leakiness“) im nichtinduzierten System stärker zurückgedrängt werden, als dies durch die Verwendung eines *lac*-Promotors möglich wäre.

Nach Transformation des Plasmids pCD003 in den Stamm *E. coli* KRX wurden die Zellen kultiviert. Bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,5 wurde die Induktion der Proteinbiosynthese durch Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Rhamnose zum Medium gestartet. Nach einstündiger Inkubation bei 30 °C und 200 rpm wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Die Proteine der äußeren Zellmembran wurden durch differentielle Zellfraktionierung isoliert und nach Auftrennung durch SDS-PAGE analysiert. Mit der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 0,1 %

(w/v) Rhamnose bis zu einer Verdünnung von 0,01 % blieb die Expressionsstärke konstant (ohne Abbildung). Erst bei höheren Verdünnungen (0,01-0,001 %; w/v) der Rhamnosekonzentration konnte eine Abnahme der Expressionsstärke und somit eine Regulierbarkeit beobachtet werden (Abbildung 30).

Mit diesem System konnte zwar eine Regulierbarkeit der Expression erzielt werden, es trat dennoch eine geringe „leakiness“, also eine unerwünschte Basalexpression von NitAf-AT auf (Abbildung 30 Spur 1). Da die Verwendung des KRX-Systems somit keinen Vorteil aufwies wurden alle weiteren Untersuchungen mit dem pET-System durchgeführt und deshalb die Expression von NitAf-AT mit IPTG induziert.

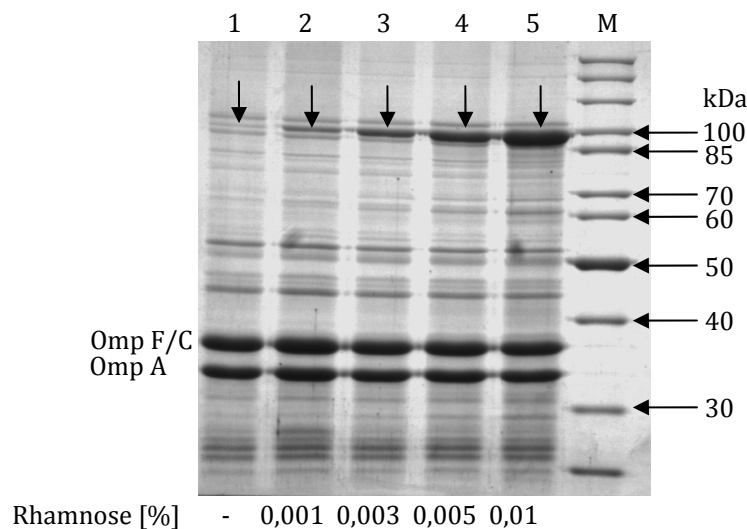


Abbildung 30: Membranständigkeit des Fusionsproteins NitAf-AT in *E. coli* KRX nach Induktion mit unterschiedlichen Rhamnosekonzentrationen. Die Außenmembranproteine wurden mittels differentieller Zellfraktionierung isoliert, durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Rhamnose: Nach Erreichen einer OD_{578} von 0,5 wurde dem Medium Rhamnose in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt und für 1 h bei 30°C inkubiert. Die Proteinbanden des Fusionsproteins NitAf-AT sind mit Pfeilen markiert. (M= Proteingrößenstandard).

3.4. Oberflächenständigkeit der Nitrilase

Die bisherigen Untersuchungen hatten lediglich die Außenmembranständigkeit des Fusionsproteins NitAf-AT in den untersuchten Expressionsstämmen nachgewiesen. Dies war jedoch noch kein Beleg für die Oberflächenständigkeit. Aus diesem Grund wurde für die Stämme *E. coli* UT5600(DE3) pCD003 und *E. coli* BL21(DE3) pCD003 die Oberflächenständigkeit des Fusionsproteins NitAf-AT mit Hilfe eines Proteasezugänglichkeitstests untersucht.

Zu diesem Zweck wurden die Stämme kultiviert und die Expression des Fusionsproteins NitAf-AT durch IPTG induziert. Die Proteine der äußeren

Zellmembran wurden vor und nach einer Ganzzell-Proteinase K-Behandlung durch differentielle Zellfraktionierung isoliert und nach Auftrennung durch SDS-PAGE analysiert (Abbildung 31). Sowohl bei *E. coli* UT5600(DE3) pCD003 (Abbildung 31 A Spur 3) als auch bei *E. coli* BL21(DE3) pCD003 (Abbildung 31 B Spur 4) konnte eine deutliche Abnahme der Intensität der Proteinbande von NitAf-AT im Vergleich zur jeweils nicht Proteinase K-behandelten Probe beobachtet werden. Durch eine Erhöhung der Proteinase-K Konzentration konnte die Intensität der NitAf-AT Proteinbande für *E. coli* UT5600(DE3) pCD003 noch weiter verringert werden (Abbildung 31 A Spur 4). Auch nach der Protease-Behandlung war OmpA in allen Proteinisolaten detektierbar, was die Integrität der äußeren Membran bestätigt. Somit konnte die Oberflächenständigkeit von NitAf-AT in beiden Stämmen nachgewiesen werden.

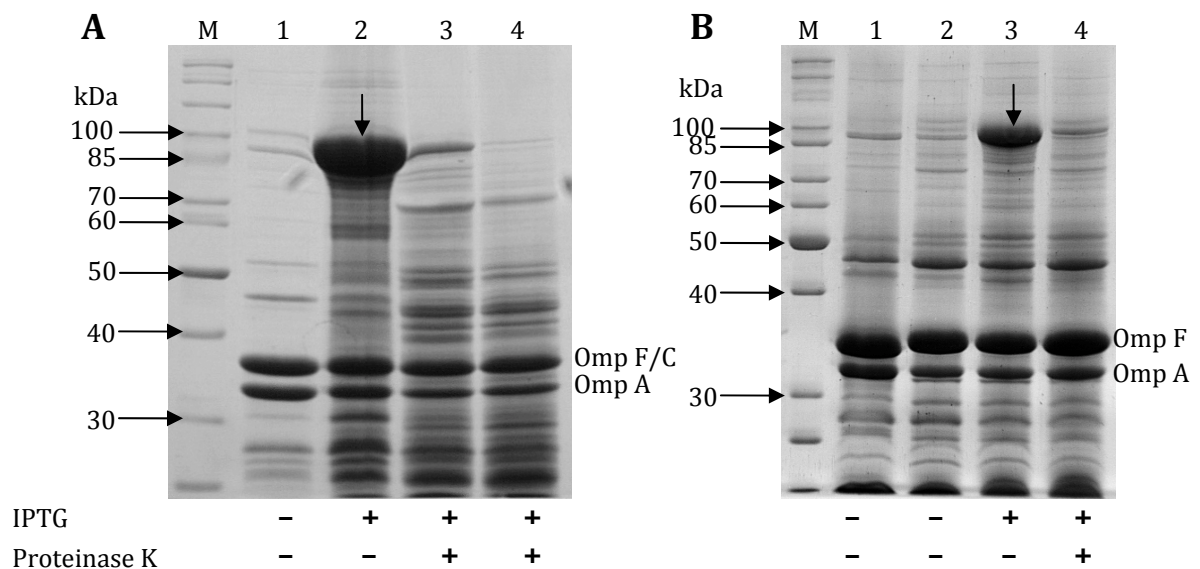


Abbildung 31: Expression und Oberflächenständigkeit der Nitrilase NitAf in *E. coli* UT5600(DE3) pCD003 (A) und in *E. coli* BL21(DE3) pCD003 (B). Die Außenmembranproteine wurden mittels differentieller Zellfraktionierung isoliert, durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. **A=** Spur 1 zeigt Außenmembranproteine des Stammes *E. coli* UT5600(DE3) pCD003. In Spur 2 sind Außenmembranproteine dieses Stamms nach Induktion der Proteinbiosynthese abgebildet. Spur 3 zeigt eine Probe dieses Stamms, die vor der differentiellen Zellfraktionierung mit 12,5 µL einer 0,5 % Proteinase K-Lösung behandelt wurde. Spur 4 zeigt eine Probe dieses Stamms, die vor der differentiellen Zellfraktionierung mit 25 µL einer 0,5 % Proteinase K-Lösung behandelt wurde. **B=** Spur 1 zeigt Außenmembranproteine von *E. coli* BL21(DE3). In Spur 2 sind Außenmembranproteine von *E. coli* BL21(DE3) pCD003 abgebildet. In Spur 3 sind Außenmembranproteine dieses Stamms nach Induktion der Proteinbiosynthese abgebildet. Spur 4 zeigt eine Probe dieses Stamms, die vor der differentiellen Zellfraktionierung mit Proteinase K behandelt wurde. (M= Proteingrößenstandard).

3.5. Enzymaktivität der oberflächenexprimierten Nitrilase aus *Alcaligenes faecalis*

Erste Untersuchungen zur Enzymaktivität NitAf-AT tragender Expressionsstämme wurden mit *E. coli* BL21(DE3) pCD003 durchgeführt. Mandelsäurenitril wurde als Substrat verwendet, da für NitAf bekannt war, dass sie die Umsetzung von racemischem Mandelsäurenitril zur korrespondierenden Carbonsäure R-Mandelsäure katalysiert (Yamamoto *et al.*, 1991). Dabei reagiert die Nitrilase enantioselektiv nur mit R-Mandelsäurenitril. Da das verwendete Racemat zu 50 % aus R- und S-Mandelsäurenitril besteht, würde die Reaktion nach Umsetzung des R-Mandelsäurenitril-Anteils zum Erliegen kommen. Da Mandelsäurenitril aber in einem Gleichgewicht mit Benzaldehyd und der freien Blausäure steht, bei dessen Rückreaktion wieder racemisches Mandelsäurenitril entsteht, kann auf diesem Weg das komplette Substrat umgesetzt werden (Abbildung 5).

Zum Nachweis der Enzymaktivität NitAf-AT präsentierender Stämme wurde das HPLC-Verfahren nach Kaul *et al.* (2007) verwendet. Um den linearen Zusammenhang zwischen der Absorption und der Mandelsäurekonzentration zu ermitteln, wurde eine Kalibriergerade erstellt. Die Kalibriergerade für die quantitative Bestimmung wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Mandelsäure in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 erstellt (Abbildung 32). Ein linearer Absorptionsanstieg konnte im gemessenen Konzentrationsbereich von 0 bis 10 mM Mandelsäure durch Anlegen einer Ausgleichsgerade und der Bestimmung des Regressionskoeffizienten mit 1,00 bestimmt werden. Dieser lineare Zusammenhang bestätigte die Verwendbarkeit des Testverfahrens in diesem Bereich für die quantitative Messung.

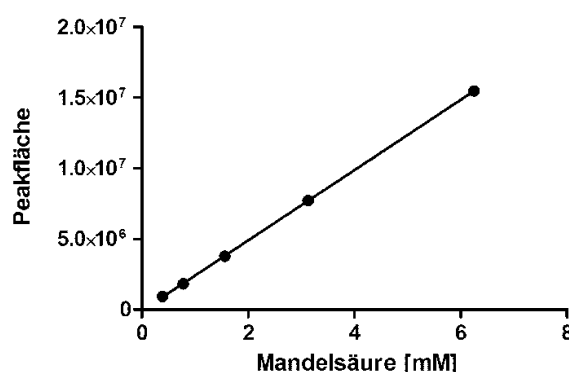


Abbildung 32: Kalibriergerade von Mandelsäure zur Bestimmung der Konzentration der biokatalytisch produzierten Mandelsäure durch *E. coli* BL21(DE3) pCD003. Fließmittel: Wasser:Methanol:H₃PO₄ (89,9:10:0,1; v/v/v), Trennsäule: Hypersil ODS (10 cm; 5 µm Porendurchmesser). Proben mit Mandelsäure in sechs unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 0,3125 mM und 10 mM wurden chromatographisch getrennt und bei einer Wellenlänge von 210 nm vermessen. Die Fläche des Produktsignals wurde als Funktion gegen die Mandelsäurekonzentration dargestellt. ($R^2 = 1,0$).

Zum Nachweis einer Enzymaktivität wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCD003 bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 kultiviert und die Expression von NitAf-AT mit IPTG induziert. Nach 48 h wurde der Aktivitätsassay durch Zentrifugation der Zellen und Sterilfiltration des Überstandes gestoppt. Der Überstand wurde direkt mittels HPLC analysiert. Abbildung 33 B zeigt die Trennung der Referenzsubstanzen Mandelsäure (1), Mandelsäurenitril (2) und Benzaldehyd (3). Die Analyse der 48 h Umsetzung zeigt einen Produktpeak bei der erwarteten Retentionszeit für Mandelsäure von 2,7 min, der sich genau mit dem Peak der Referenzsubstanz überlagert (Abbildung 33 A). Die Fläche des Produktpeaks entsprach einer Konzentration von 1,7 mM Mandelsäure. Auch konnte der Peak mit einer Retentionszeit von 7,7 min als Benzaldehyd identifiziert werden. Mandelsäurenitril eluierte unter den gewählten Bedingungen nach 4,5 min.

Als Kontrolle diente der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pEK004, der sich von *E. coli* BL21(DE3) pCD003 lediglich durch die Passagierdomäne des Autotransporter-konstruktes unterscheidet, die für die Prenyltransferase FgaPT2 kodiert. Unter analogen Bedingungen konnte für diesen Stamm keine Umsetzung von Mandelsäurenitril zu Mandelsäure detektiert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Mandelsäureproduktion des Stamms *E. coli* BL21(DE3) pCD003 auf die Expression des Fusionsproteins NitAf-AT zurückzuführen ist.

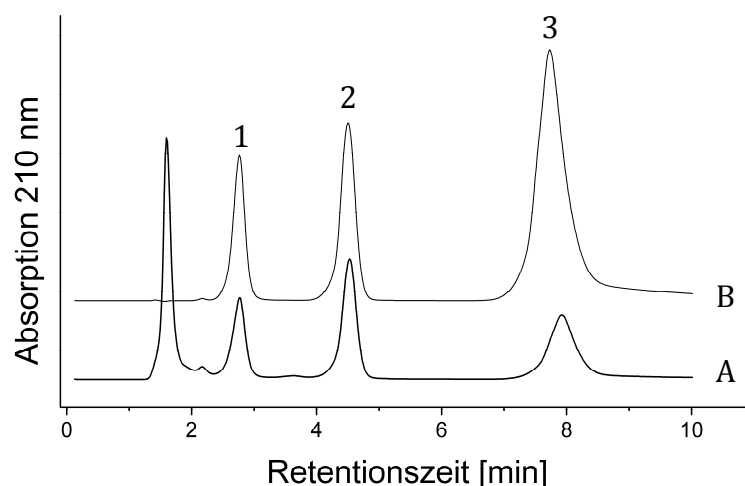


Abbildung 33: Chromatogramm einer 24 h Umsetzung des NitAf-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pCD003. Fließmittel: Wasser:Methanol:H₃PO₄ (89,9:10:0,1; v/v/v), Trennsäule: Hypersil ODS (10 cm; 5 µm Porendurchmesser). **A:** 24 h Umsetzung der Nitrilase aus *A. faecalis* auf *E. coli* BL21(DE3) bei 37°C inkubiert mit 10 mM Mandelsäurenitril als Substrat. **B:** Referenz (Referenzsubstanzen in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 gelöst), 1: 3 mM Mandelsäure; 2: 5 mM Mandelsäurenitril; 3: 5 mM Benzaldehyd.

3.6. Vergleich der Mandelsäureproduktion in *E. coli* BL21(DE3), JK321(DE3), KRX und UT5600(DE3)

Nachdem für den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) pCD003 erfolgreich eine Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte, sollten auch die anderen erzeugten Expressionsstämme auf ihre Enzymaktivität hin untersucht werden. Dafür wurden die Stämme kultiviert und nach Erreichen einer OD_{578} von 1 wurde die Proteinbiosynthese durch 1 mM IPTG für eine Stunde bei 30 °C und 200 rpm induziert. Bei *E. coli* KRX pCD003 wurde die Proteinbiosynthese durch Zugabe von 0,1 % Rhamnose (w/v) zum Medium für eine Stunde bei 30 °C und 200 rpm gestartet. Danach wurde ein Aktivitätsassay im Mikroreaktionsgefäß durchgeführt. Nach 24 h wurde der Aktivitätsassay durch Zentrifugation der Zellen und Sterilfiltration des Überstandes gestoppt. Der Überstand wurde direkt mittels HPLC analysiert. Zur besseren Vergleichbarkeit der Enzymaktivität wurden die relativen Aktivitäten in % angegeben, wobei die höchste Mandelsäureproduktion gleich 100 % gesetzt wurde (Abbildung 34). Für jeden der getesteten Expressionsstämme konnte eine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Dabei produzierte *E. coli* BL21(DE3) pCD003 innerhalb des getesteten Zeitraumes 2,5 mM Mandelsäure, das war der höchste ermittelte (100 %). *E. coli* KRX pCD003 produzierte im gleichen Zeitraum 0,56 mM (22,4 %), *E. coli* JK321(DE3) 0,51 mM (20,4 %) und *E. coli* UT5600(DE3) pCD003 lediglich 0,18 mM (7,3 %) Mandelsäure. Aufgrund der ermittelten niedrigen Umsetzungsraten der Expressionsstämme *E. coli* UT5600(DE3), *E. coli* JK321(DE3) und *E. coli* KRX wurden weitere Umsetzungsversuche ausschließlich mit dem Ganzzell-Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pCD003 durchgeführt.

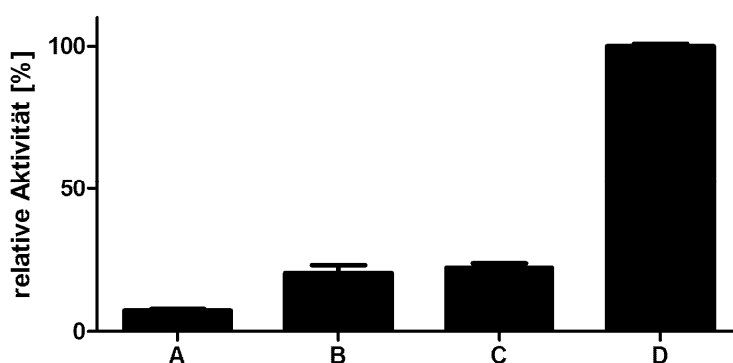


Abbildung 34: relative Aktivität verschiedener das Fusionsprotein NitAf-AT exprimierender *E. coli*-Stämme. Angegeben sind die relativen Aktivitäten bezogen auf die höchste Mandelsäureproduktion, die gleich 100 % gesetzt wurde. Der Reaktionsansatz enthielt den Biokatalysator in einer Konzentration von $OD_{578} = 10$. Als Substrat wurde jeweils 10 mM Mandelsäurenitril verwendet. Die Umsetzung wurde nach 24 h durch Zentrifugation des Biokatalysators beendet. **A=** *E. coli* UT5600(DE3) pCD003; **B=** *E. coli* JK321(DE3) pCD003; **C=** *E. coli* KRX pCD003; **D=** *E. coli* BL21(DE3) pCD003. (n=3; gezeigt sind MW $\pm$ SD)

3.7. Nachweis der Enantiomerenreinheit der produzierten Mandelsäure mittels chiraler Dünnschicht-Chromatographie

Aus der Literatur ist bekannt, dass NitAf R-Mandelsäure mit einem Enantiomerenüberschuss (ee) von mehr als 99 % produziert (Yamamoto *et al.*, 1992). Die mit dem Ganzzell-Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pCD003 produzierte Mandelsäure sollte ebenfalls auf ihre Enantiomerenreinheit untersucht werden.

Erste Versuche zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit wurden mittels chiraler Dünnschichtchromatographie (DC) durchgeführt. Die Trennung der R- und S-Enantiomere der Mandelsäure erfolgte mit Hilfe von Chiralplate® DC-Platten (Macherey-Nagel, Germany). Das Trennprinzip beruht dabei auf der Liganden-Austauschchromatographie (Günther, 1988). Die biokatalytisch produzierte Mandelsäure wurde zur Aufkonzentration und Aufreinigung aus dem wässrigen Medium durch Ethylacetat-Ausschüttelung extrahiert. Dazu wurde der zellfreie Überstand zuerst mit NaOH alkalisiert und mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Dies diente der Entfernung von nicht umgesetztem Mandelsäurenitril. Zur Extraktion der Mandelsäure wurde der Überstand mit HCl angesäuert und wiederum mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach Vereinigung der „sauren“ Ethylacetatfraktionen wurde das Ethylacetat abgedampft. Der kristalline Rückstand wurde in Methanol gelöst und auf die Chiralplate® DC-Platte aufgebracht (Günther, 1988). Als Referenzsubstanzen wurden zusätzlich noch racemische Mandelsäure und R-Mandelsäure untersucht. Nach ca. 25 min Laufzeit wurde die DC-Platte bei Raumtemperatur getrocknet und durch Besprühen mit ethanolischer Bromphenolblau-Lösung entwickelt (Bieniek, 1982). Mandelsäure konnte nach einer 5-minütigen Entwicklungszeit bei Raumtemperatur als gelber Fleck auf blauem Hintergrund detektiert werden (Abbildung 35). In Spur 1 und 2 wurden unterschiedliche Konzentrationen von racemischer Mandelsäure aufgetragen. Es ist eine Auftrennung des Racemats in die R- und S-Enantiomere erkennbar. In Spur 3 wurde als zusätzliche Referenz R-Mandelsäure aufgetragen. Dieser erscheint nach Entwicklung als einzelner Fleck. Die in Spur 4 aufgetragene biokatalytisch erzeugte Mandelsäure zeigte ebenfalls nur einen Fleck und hatte den gleichen R_f-Wert wie R-Mandelsäure in Spur 3. Es konnte keine S-Mandelsäure detektiert werden. Somit konnte ein erster Nachweis auf die Enantiomerenreinheit der biokatalytisch produzierten Mandelsäure erbracht werden.

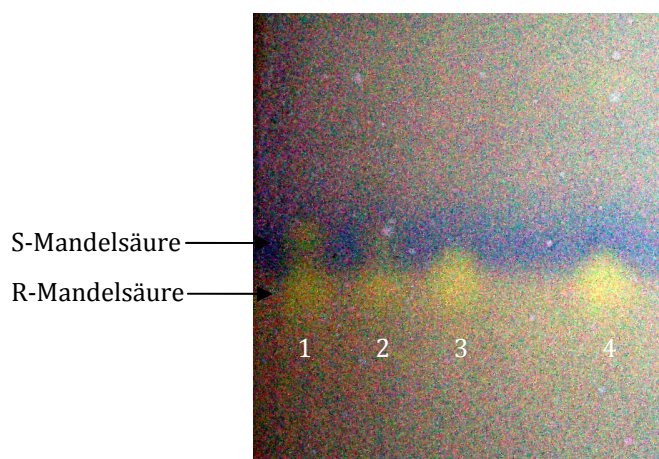


Abbildung 35: Chirale DC-Analyse von biokatalytisch produzierter Mandelsäure durch den NitAf-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pCD003. Spur 1: Referenz (6 μ l einer 0,5 M R, S- Mandelsäure-Lsg.), Spur 2: Referenz (4 μ l einer 0,5 M R, S-Mandelsäure-Lsg.) Spur 3: Referenz (6 μ l einer 0,5 M R-Mandelsäure-Lsg.), Spur 4: 3 μ l Ethylacetat-Extrakt einer Umsetzung der des Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003. Der Reaktionsansatz enthielt 10 mM Mandelsäurenitril als Substrat. Die Umsetzung wurde nach 24 h beendet und die Mandelsäure mittels Ethylacetat aufgereinigt. Die Detektion von Mandelsäure erfolgte durch Besprühen mit ethanolischer Bromphenolblau-Lösung. Zur besseren Darstellung wurde der Kontrast der Abbildung erhöht.

3.8. Nachweis der Enantiomerenreinheit der produzierten R-Mandelsäure mittels chiraler HPLC

Die genaue Quantifizierung der Enantiomerenreinheit der biokatalytisch produzierten Mandelsäure wurde mittels HPLC-Analyse durchgeführt (Kaul *et al.*, 2004) (Tabelle 14). Abbildung 36 zeigt das Chromatogramm der Auftrennung der als Referenz verwendeten racemischen Mandelsäure in die S- und R-Enantiomere (---). Unter den getesteten Bedingungen eluierte S-Mandelsäure nach 12,8 min und R-Mandelsäure nach 15,5 min.

Tabelle 14: Zur Trennung racemischer Mandelsäure in die Enantiomere verwendete Bedingungen nach Kaul *et al.* (2004).

Parameter	Einstellung
Detektionswellenlänge	210 nm
Säule	Reprosil Chiral-OM 150x4,6 mm, 5 μ m
Fluss	1 ml/min
Fließmittel	Hexan:Isopropanol:Trifluoressigsäure (89,9:10:0,1)

Die Aufkonzentration und Aufreinigung der biokatalytisch erzeugten Mandelsäure wurde analog wie für die DC-Analyse durchgeführt. Der kristalline Rückstand der Ethylacetat-Extraktion wurde in Methanol gelöst und direkt mittels HPLC analysiert.

Das Chromatogramm in Abbildung 36 zeigt die Enantiomerenreinheit von Mandelsäure, die bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C biokatalytisch erzeugt wurde. Der prominente Peak mit einer Retentionszeit von 15,5 min im Chromatogramm der Umsetzung (durchgehende Linie) überlagert sich genau mit dem Peak von R-Mandelsäure. Ein deutlich kleinerer Peak ist bei einer Retentionszeit von 13,5 min zu erkennen, bei dem es sich um S-Mandelsäure handelt. Ein Vergleich der Peakflächen erbrachte für S-Mandelsäure eine Konzentration von 0,4 %. Somit konnte nachgewiesen werden, dass der Ganzzellbiokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pCD003 in der Lage ist R-Mandelsäure mit einem Enantiomerenüberschuss von mehr als 99 % zu produzieren.

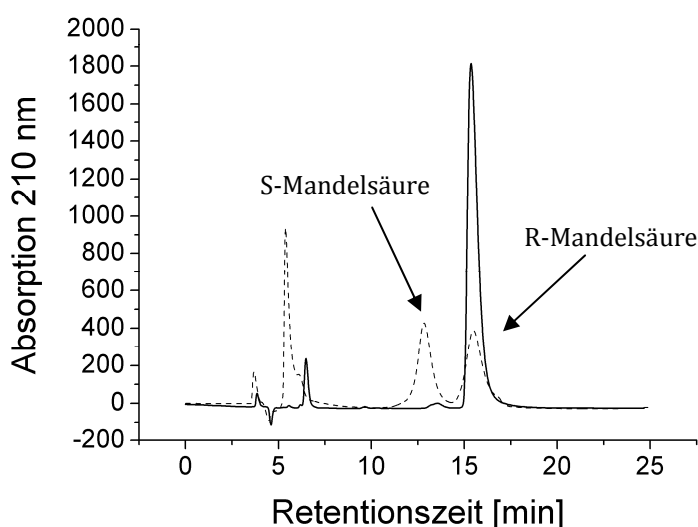


Abbildung 36: Chirale HPLC-Analyse einer biokatalytischen Umsetzung von Mandelsäurenitril durch den NitAf-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pCD003. Fließmittel: Hexan:Isopropanol:TFA (89,9:10:0,1; v/v/v), Trennsäule: Reprosil Chiral-OM (15 cm, Ø 5 µm), Fluss: 1 mL/min. Ethylacetat-Extrakt einer Umsetzung der Nitrilase NitAf in *E. coli* BL21(DE3) (—). Der Reaktionsansatz enthielt den Biokatalysator in einer Konzentration von OD₅₇₈ = 10 und 10 mM Mandelsäurenitril als Substrat. Nach 120 h bei 37 °C und 800 rpm wurde die Umsetzung durch Zentrifugation des Biokatalysators beendet. Die produzierte Mandelsäure wurde mittels Ethylacetat-Extraktion aufgereinigt und in Methanol gelöst. Referenz (10 mM racemische Mandelsäure)(---).

3.9. Einfluss der Umsetzungstemperatur auf die Enantiomerenreinheit der R-Mandelsäure

Für das freie Enzym NitAf wurde eine temperaturabhängige Enantioselektivität berichtet (Kaul *et al.*, 2006). Dabei nimmt die Enantiomerenreinheit der erzeugten R-Mandelsäure mit steigender Temperatur ab. Deshalb wurde die Enantiomerenreinheit der biokatalytisch erzeugten Mandelsäure ebenfalls bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen überprüft. Zu diesem Zweck wurden NitAf-AT präsentierende *E. coli* BL21(DE3) pCD003 Zellen einem Aktivitätstest

unterzogen. Dabei wurden die Umsetzungen jeweils bei einer Reaktionstemperatur von 30, 42 oder 45 °C durchgeführt. Nach Ablauf von 24 h wurden die Zellen durch Zentrifugation entfernt. Die Mandelsäure wurde durch Ethylacetatausschüttelung, analog der Aufreinigung für die DC-Analytik, aus dem zellfreien Überstand extrahiert und in Methanol gelöst. Die Lösungen wurden direkt mittels HPLC analysiert (Abbildung 37). In keiner der untersuchten Umsetzungen konnte S-Mandelsäure detektiert werden. Im Vergleich zu Abbildung 36, erscheint bei den hier untersuchten Umsetzungen kein Peak mit einer Retentionszeit von 6,5 min, bei dem es sich höchstwahrscheinlich um ein Sekretionsprodukt der Bakterienzellen handelt. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die in Abbildung 36 untersuchte Probe deutlich konzentrierter war, als die in Abbildung 37 untersuchten Proben. Möglicherweise führte auch die geringere Konzentration der hier untersuchten Proben dazu, dass der S-Mandelsäureanteil unterhalb der Nachweisgrenze lag.

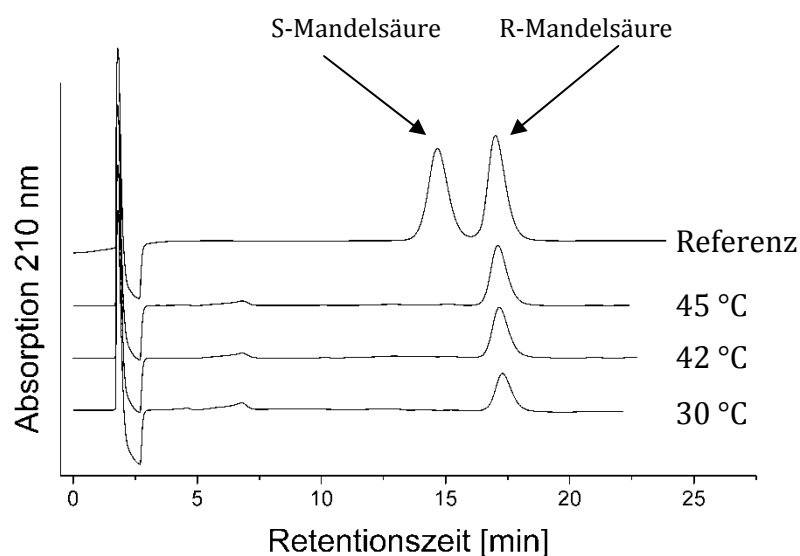


Abbildung 37: Einfluss der Umsetzungstemperatur auf die Enantiomerenreinheit der produzierten R-Mandelsäure. Fließmittel: Hexan:Isopropanol:TFA (89,9:10:0,1; v/v/v), Trennsäule: Reprosil Chiral-OM (15 cm, Ø 5 µm), Fluss: 1 mL/min. Ethylacetat-Extrakte von 24 h Umsetzungen des NitAf-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003 bei 30 °C, 42 °C und 45 °C. Als Substrat wurden jeweils 10 mM Mandelsäurenitril verwendet. Referenz= Auftrennung von racemischer Mandelsäure in die R- und S-Enantiomere.

3.10. Umsetzung von Phenylacetonitril

Da aus der Literatur bekannt war, dass NitAf die Reaktion von Phenylacetonitril zu Phenylelessigsäure schneller katalysiert (Abbildung 38), als die von Mandelsäurenitril zu Mandelsäure (Yamamoto *et al.*, 1992), sollte untersucht werden, ob das Fusionsprotein NitAf-AT die gleiche Charakteristik aufweist.

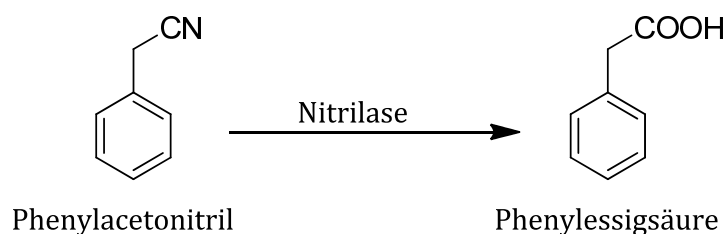


Abbildung 38: Umsetzung von Phenylacetonitril zu Phenylelessigsäure durch die Nitrilase aus *A. faecalis*.

E. coli BL21(DE3) pCD003 Zellen wurde kultiviert und die Expression von NitAf-AT durch IPTG induziert. Danach wurde ein Aktivitätsassay im Mikroreaktionsmaßstab mit 10 mM Phenylacetonitril als Substrat durchgeführt. Nach jeweils 1, 3, 5 oder 16 h wurde die Reaktion durch Sedimentation des Ganzzell-Biokatalysators und Sterilfiltration des zellfreien Überstandes gestoppt.

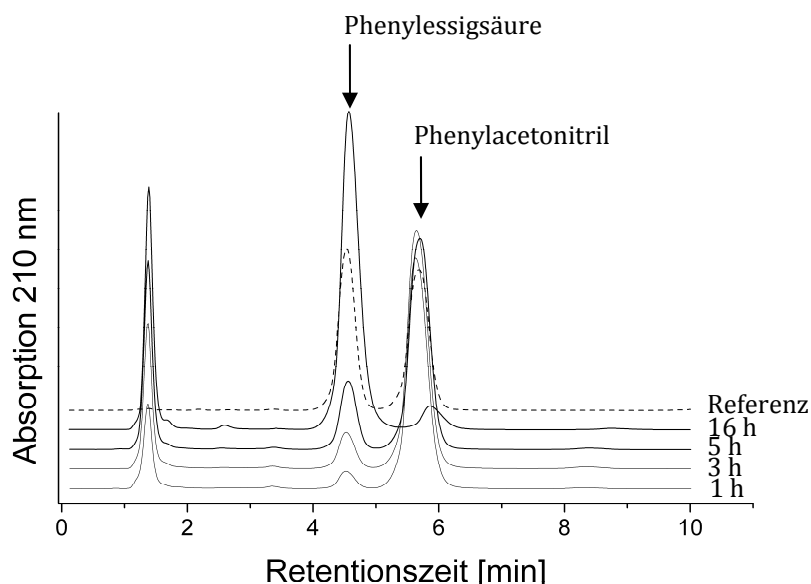


Abbildung 39: Zeitlicher Verlauf der Umsetzung von Phenylacetonitril zu Phenylelessigsäure durch den NitAf-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pCD003. Fließmittel: Wasser:Methanol:H₃PO₄ (89,9:10:0,1; v/v/v), Trennsäule: Hypersil ODS (10 cm; 5 µm Porendurchmesser). Jeder Reaktionsansatz enthielt den Ganzzell-Biokatalysator in einer OD₅₇₈ von 10. Die Umsetzung wurde durch Zugabe von 10 mM Phenylacetonitril und Inkubation bei 37 °C gestartet. Nach einer definierten Zeitspanne wurde die Reaktion durch Zentrifugation der Zellen und Sterilfiltration des zellfreien Überstandes gestoppt. Das Filtrat wurde direkt mittels HPLC analysiert. Referenz= 5 mM Phenylacetonitril und 5 mM Phenylelessigsäure.

Das Filtrat wurde direkt mittels HPLC analysiert. Die Trennung der Referenzsubstanzen ergab einen Peak bei 5,6 min für das Substrat Phenylacetonitril und bei 4,5 min für das erwartete Reaktionsprodukt Phenylelessigsäure (Abbildung 39). Die Analyse der einstündigen Umsetzung (Abbildung 39) ergab einen Produktpeak bei der erwarteten Retentionszeit von 4,5 min, die Auswertung mittels Kalibriergerade erbrachte eine Phenylelessigsäureproduktion von 0,47 mM. Die Auswertung der drei (Abbildung 39) und fünf Stunden Umsetzung (Abbildung 39) ergaben jeweils 0,99 und 1,83 mM Phenylelessigsäure. Nach 16 h wurden 9,3 mM (93 %) des eingesetzten Substrates zu Phenylelessigsäure umgesetzt (Abbildung 39). Im Vergleich dazu wurden unter ansonsten gleichen Bedingungen lediglich 2,6 mM (26 %) Mandelsäurenitril innerhalb von 24 h zu Mandelsäure umgesetzt. Somit katalysierte das oberflächenpräsentierte Fusionsprotein NitAf-AT die Umsetzung von Phenylacetonitril mehr als 5 mal schneller, als die Umsetzung von Mandelsäurenitril.

3.11. Umsetzung von Prunasin

Eine Umsetzung von cyanogenen Glykosiden durch eine Nitrilase würde einen neuen Zugang zu glykosylierten Carbonsäuren eröffnen. Prunasin (D-Mandelsäurenitril- β -D-glucosid) (Abbildung 40) ist ein cyanogenes Glykosid, das endogen in Pflanzen gebildet wird (Conn, 1979). Da es sich dabei um ein einfach glykosyliertes Mandelsäurenitril handelt, stellt es ein potentielles Substrat von NitAf-AT dar.

Alle für die folgenden Umsetzungen verwendeten Substanzen, aufgereinigt aus *Olinia ventosa* (L.) CUF., wurden freundlicherweise von Hr. Dr. Sendker (Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster) zur Verfügung gestellt. Die neben Prunasin zur Etablierung der HPLC-Methode verwendete Referenzsubstanz Prunasinsäure (D-Mandelsäure- β -D-glucosid), das erwartete Produkt der Umsetzung von Prunasin durch NitAf-AT, lag als Gemisch zusammen mit seinem Epimer Sambunigrinsäure (L-Mandelsäure- β -D-glucosid) vor. Das ebenfalls aus *O. ventosa* aufgereinigte Prunasinamid wurde auch chromatographisch untersucht, da bei einigen Nitrilase-Reaktionen das Amid als Nebenprodukt entstehen kann (Banerjee *et al.*, 2002).

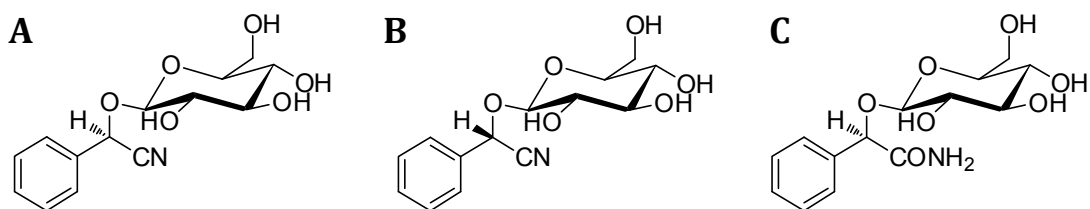


Abbildung 40: Strukturformel von Prunasin (A), Sambunigrin (B) und Prunasinamid (C).

Als Methode der Wahl zur Detektion der Umsetzung von Prunasin wurde das von Sendker und Nahrstedt (2009) entwickelte HPLC-Verfahren verwendet (Tabelle 15). Mit dieser Methode war es möglich das Substrat Prunasin von den ebenfalls getesteten möglichen Umsetzungsprodukten zu trennen.

Tabelle 15: Parameter der HPLC-Methode zur Trennung von Prunasin und der korrespondierenden Carbonsäure nach Sendker und Nahrstedt (2009).

Parameter	Einstellung
Detektionswellenlänge	210 nm
Säule	Hypersil ODS 10 cm, 5 μ m
Fluss	1 ml/min
Fließmittel	Methanol:Wasser:TFA (10:89,9:0,1), isokratisch

Prunasin eluierte nach 15,1 min (Abbildung 41 A). Für die Prunasin- und Sambunigrinsäure konnte eine Retentionszeit von jeweils 7,5 min und 9,3 min detektiert werden (Abbildung 41 B). Prunasinamid eluierte bereits nach 3,7 min (Abbildung 41 C).

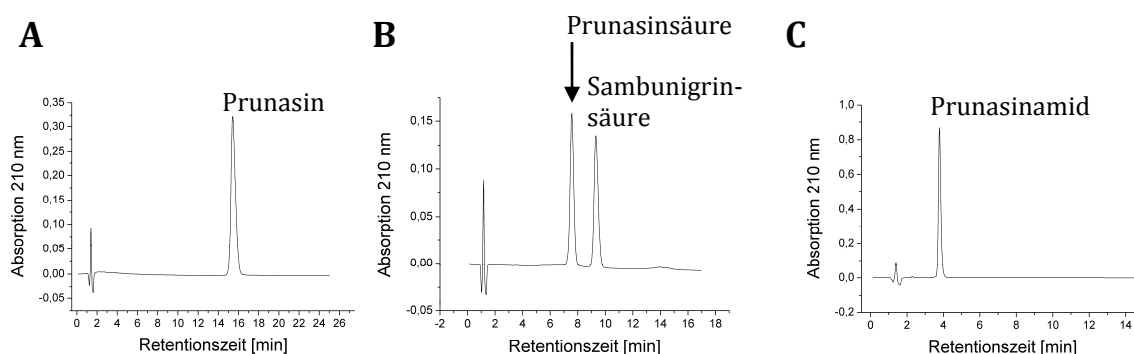


Abbildung 41: HPLC-Trennung von Prunasin (A), von Prunasinsäure und Sambunigrinsäure (B) und Prunasinamid (C) in Phosphatpuffer gelöst. Fließmittel: Methanol:Wasser:TFA (10:89,9:0,1; v/v/v), Trennsäule: Hypersil ODS (10 cm, $\varnothing$ 5 μ m), Fluss: 1 mL/min. Die verwendeten Referenzen (Prunasin 2,5 mM, Prunasinamid 5 mM) wurden in 50 mM Phosphatpuffer pH 7 gelöst und direkt mittels HPLC analysiert. Die Konzentration von Prunasin- und Sambunigrinsäure konnte nicht bestimmt werden, da die genaue Zusammensetzung des Epimerengemisches nicht bekannt war.

Da die Umsetzungsdauer 48 h betragen sollte, wurde zuerst die Stabilität von Prunasin unter den verwendeten Bedingungen untersucht. Dafür wurden 2,5 mM Prunasin in 50 mM Phosphatpuffer pH 7 gelöst und für 48 h bei 37 °C und 800 rpm inkubiert. Das erhaltene Chromatogramm (Abbildung 42) zeigt zwei nicht aufgelöste Peaks bei einer Retentionszeit von 15,1 und 16 min, wobei der prominentere Peak bei 15,1 min mit der Retentionszeit von Prunasin übereinstimmt. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass innerhalb des Beobachtungszeitraumes eine geringe Zersetzung des Prunasins stattfand. Untersuchungen an Amygdalin (R-Mandelsäurenitril- β -gentiobiosid), einem Disaccharid des Mandelsäurenitrils, zeigten, dass bei 60 °C

bereits bei einem pH von 7 eine deutliche Isomerisierung stattfindet. Dabei stellte sich ein Gleichgewicht von ca. 43 % R- zu ca. 57 % S-Form ein (Nahrstedt, 1975). Da der zugrundeliegende Reaktionsmechanismus bei allen Homologen der Benzaldehydcyanhydringlykoside gleich ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass Prunasin ebenfalls zu Sambunigrin epimerisiert. Die Stabilität von Prunasin könnte zwar durch Erniedrigung des pH-Bereiches erhöht werden, dies würde aber gleichzeitig zu einer verringerten Enzymaktivität führen, da das pH-Optimum des Fusionsproteins NitAf-AT im neutralen bis leicht basischen Bereich liegt (vgl. Abbildung 47). Aus diesem Grund wurden auch die weiteren Untersuchungen im 50 mM Phosphatpuffer pH 7 durchgeführt.

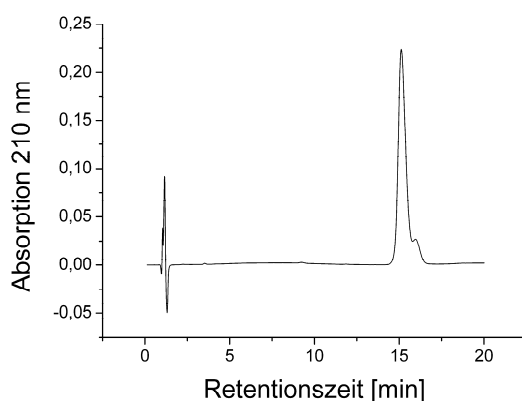


Abbildung 42. HPLC-Trennung von Prunasin nach 48 h Inkubation bei 37 °C in Phosphatpuffer. Fließmittel: Methanol:Wasser:TFA (10:89,9:0,1; v/v/v), Trennsäule: Hypersil ODS (10 cm, Ø 5 µm), Fluss: 1 mL/min.

Die Versuche zur Umsetzung von Prunasin zur korrespondierenden Carbonsäure wurden mit dem Ganzzell-Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pCD003 durchgeführt. Die Zellen wurden kultiviert und die Proteinexpression mit IPTG induziert. Im Anschluss wurde ein Aktivitätsassay im Mikroreaktionsmaßstab mit 2,5 mM Prunasin als Substrat gestartet. Nach 48 h bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zentrifugation der Zellen und Sterilfiltration des zellfreien Überstandes gestoppt. Das Filtrat wurde direkt mittels HPLC analysiert.

Das resultierende Chromatogramm zeigt zwei neue Produktpeaks mit einer Retentionszeit von 7 min und 11,8 min, wobei das Substrat Prunasin fast vollständig umgesetzt wurde (Abbildung 43 B). Da das erwartete Reaktionsprodukt der Umsetzung, Prunasinsäure jedoch eine Retentionszeit von 7,5 min aufweist, konnte es als Produkt ausgeschlossen werden. Umsetzungen von Prunasin mit dem Wirtstamm *E. coli* BL21(DE3) führten ebenfalls zur Bildung des Produktes mit einer Retentionszeit von 11,8 min, jedoch nicht zur Bildung des Produktes mit einer Retentionszeit von 7 min (Abbildung 43 A). Eine mögliche Erklärung könnte in der

Annahme einer enzymatischen Abspaltung des Glucoserests von Prunasin liegen. Das dabei entstehende Mandelsäurenitril könnte dann durch das Fusionsprotein NitAf-AT, nicht jedoch durch den Wirtstamm *E. coli* BL21(DE3), in Mandelsäure umgesetzt werden. Um diese Theorie zu überprüfen wurde dem bereits analysierten Reaktionsansatz 1 mM Mandelsäure und 1 mM Mandelsäurenitril zugesetzt (Abbildung 43 C). Die erneute Analyse des Reaktionsansatzes mittels HPLC führte nach Zugabe von Mandelsäure zu einer Peakflächenzunahme des Produktpeaks mit einer Retentionszeit von 7 min. Die Zugabe von Mandelsäurenitril führte nicht zu einer Peakflächenzunahme eines bereits vorhandenen Peaks, sondern zum Auftreten eines neuen Peaks mit einer Retentionszeit von 18 min. Das mit Mandelsäurenitril im chemischen Gleichgewicht stehende Benzaldehyd war ebenfalls nicht nachweisbar (ohne Abbildung). Durch Abspaltung von Prunasin eventuell freigesetzte Glucose besitzt keine Absorption bei Wellenlängen über 200 nm und konnte deshalb nicht mittels HPLC detektiert werden. Somit konnte zumindest Mandelsäure als Produkt einer Umsetzung von Prunasin durch NitAf-AT identifiziert werden. Aufgrund der geringen Menge an verfügbarem Prunasin war eine weitergehende Untersuchung zum mechanistischen Ablauf der Prunasinumsetzung nicht möglich.

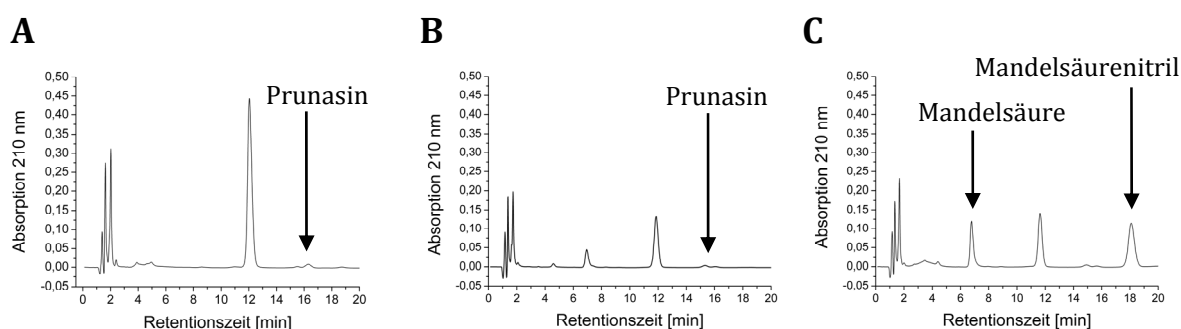


Abbildung 43: HPLC-Trennung der 48 h Umsetzung von Prunasin durch den Wirtstamm *E. coli* BL21(DE3) (A), den Ganzzell-Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pCD003 (B) und der gleiche Reaktionsansatz nach Zugabe von 1 mM Mandelsäure und Mandelsäurenitril (C). Fließmittel: Methanol:Wasser:TFA (10:89,9:0,1; v/v/v), Trennsäule: Hypersil ODS (10 cm, Ø 5 µm), Fluss: 1 mL/min. A= Die Umsetzung mit dem Wirtstamm *E. coli* BL21(DE3) erfolgte mit 10 mM Prunasin als Substrat für 120 h bei 37 °C. B= Die Umsetzung mit dem Ganzzell-Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pCD003 erfolgte mit 2,5 mM Prunasin als Substrat für 48 h bei 37 °C. C= Wiederholte Analyse des Reaktionsansatzes (B) nach Zugabe von jeweils 1 mM Mandelsäure und -nitril.

3.12. Optimierung der Kulturbedingungen

3.12.1. Bestimmung der optimalen Substratkonzentration

Mandelsäurenitril zerfällt spontan zu einem gewissen Prozentsatz in Benzaldehyd und Blausäure. Nach Yamamoto *et al.* (1992) wird NitAf durch das entstehende Benzaldehyd inhibiert, wenn eine Mandelsäurenitrilkonzentration > 10 mM

verwendet wird. Zum Nachweis ob das oberflächenexprimierte Fusionsprotein NitAf-AT ebenfalls diese Charakteristik aufweist, wurden Aktivitätsbestimmungen im Mikroreaktionsmaßstab mit unterschiedlichen Konzentrationen an Mandelsäurenitril durchgeführt. Anschließend wurde die Mandelsäureproduktion mittels HPLC analysiert. Die Zellen waren zuvor kultiviert und die Expression von NitAf-AT durch IPTG induziert worden. Die Analyse der Umsetzung mittels HPLC ergab ein Maximum von 2,3 mM an produzierter Mandelsäure bei Verwendung einer Substratkonzentration von 10 mM (Abbildung 44). Eine Erhöhung der Substratkonzentration hin zu 15 und 20 mM führte zu einer Verringerung der Mandelsäureproduktion auf 1,79 mM bzw. 1,47 mM. Abschließend kann gesagt werden, dass das Fusionsprotein NitAf-AT die gleiche Charakteristik aufweist, wie NitAf. Die folgenden Experimente wurden deshalb mit einer Substratkonzentration von 10 mM Mandelsäurenitril durchgeführt.

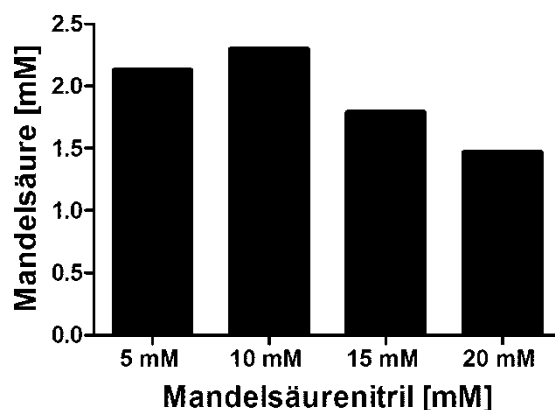


Abbildung 44: Mandelsäureproduktion des Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003 in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Jeder Reaktionsansatz enthielt den Biokatalysator in einer OD₅₇₈ von 10 und wurde bei 37 °C für 24 h inkubiert. Als Substrat wurde Mandelsäurenitril verwendet. (n=1)

3.12.2. Bestimmung der optimalen Induktionszeit von IPTG

Es sollte untersucht werden, ob eine Änderung der Temperatur während der Induktion der Proteinbiosynthese mit IPTG sowie die Dauer dieser Induktion einen Einfluss auf die Enzymaktivität ausüben. Zu diesem Zweck wurden *E. coli* BL21(DE3) pCD003 Zellen kultiviert und die Kultur vor Induktion der Proteinbiosynthese aufgeteilt. In einem Teil der Kultur wurde die Expression von NitAf-AT 1 h, im anderen Teil 20 h lang durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Zur Bestimmung des Einflusses der Temperatur wurde die Induktion der Proteinbiosynthese wahlweise bei 30 °C oder bei 37 °C durchgeführt. Danach wurden die Zellen einem Aktivitätstest im Mikroreaktionsmaßstab unterzogen. Nach 24 h wurde die Umsetzung durch Entfernung der Zellen mittels Zentrifugation und Sterilfiltration gestoppt. Der

zellfreie Überstand wurde direkt mittels HPLC analysiert. Die Auswertung ergab ein Maximum der Mandelsäureproduktion bei Verwendung der folgenden Bedingungen: eine Stunde Inkubation mit 1 mM IPTG bei 30 °C (Abbildung 45). Eine Erhöhung der Induktionsdauer auf 20 h erbrachte bei keiner der beiden getesteten Induktionstemperaturen einen Vorteil. Aus diesem Grund wurden für die nachfolgenden Experimente die bisherigen Bedingungen beibehalten.

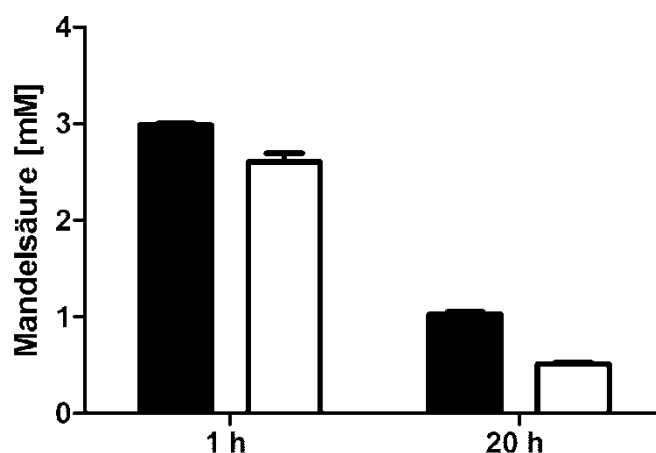


Abbildung 45: Einfluss der Induktionszeit und der Induktionstemperatur auf die Mandelsäureproduktion des Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003. Die Hauptkultur wurde nach Erreichen einer $OD_{578} = 1$ mit 1 mM IPTG versetzt und für 1 h oder 20 h bei einer definierten Temperatur inkubiert. Anschließend wurden eine 24 h Umsetzung mit 10 mM Mandelsäurenitril als Substrat durchgeführt. Temperatur während der IPTG-Inkubation: ■ = 30°C, □ = 37°C. (n=3; gezeigt sind MW±SD)

3.12.3. Einfluss des Induktionszeitpunktes auf die Mandelsäureproduktion

Im Rahmen der Methodenoptimierung wurde der Einfluss der Induktion der Proteinbiosynthese bei unterschiedlichen Zelldichten auf die Mandelsäureproduktion untersucht. *E. coli* BL21(DE3) pCD003 Zellen wurden dafür entweder bis zu einer OD_{578} von 0,5 oder 1 kultiviert und die Expression von NitAf-AT induziert. Im Anschluss wurden die Zellen einem Aktivitätstest im Mikroreaktionsgefäß unterzogen. Der Beobachtungszeitraum betrug 120 h. In definierten Zeitabständen (alle 24 h) wurden Proben entnommen und die Mandelsäurekonzentration mittels HPLC analysiert. Die Auswertung ergab eine geringere Mandelsäureproduktion für die Kulturen, deren Proteinbiosynthese bei einer OD_{578} von 0,5 induziert wurde (Abbildung 46 A). Nach 72 h Inkubation wurden lediglich 2,3 mM Mandelsäure produziert. Eine längere Inkubation bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes von 120 h erbrachte nur noch eine geringe Zunahme der Mandelsäureproduktion auf maximal 2,5 mM.

Im Gegensatz dazu findet nach einer Induktion bei einer OD_{578} von 1 über den kompletten Beobachtungszeitraum eine hohe Mandelsäureproduktion statt (Abbildung 46 B). Am Ende des Beobachtungszeitraumes von 120 h zeigten die zu einem späteren Zeitpunkt induzierten Proben eine Produktion von 6,6 mM Mandelsäure. Somit führte die IPTG-Zugabe bei einer OD_{578} von 1 zu einer um den Faktor 2,6 erhöhten Mandelsäureproduktion gegenüber der Induktion bei einer OD_{578} von 0,5.

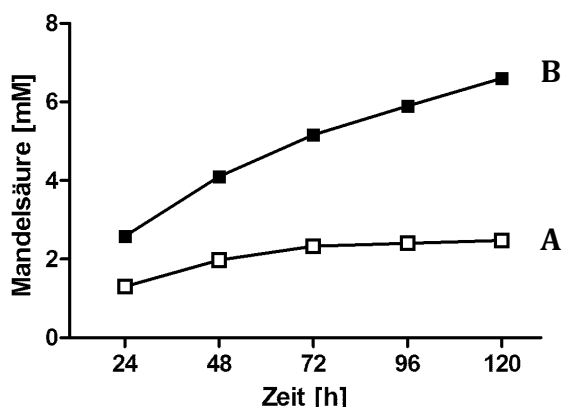


Abbildung 46: Einfluss der Zelldichte zum Zeitpunkt der IPTG-Induktion auf die Mandelsäureproduktion des NitAf-AT tragenden Stamms *E. coli* BL21(DE3) pCD003. Induktion der Proteinbiosynthese durch Zugabe von 1 mM IPTG nach Erreichen einer OD_{578} von 0,5 ($\square$) und einer OD_{578} von 1 ($\blacksquare$). (n=3; gezeigt sind MW $\pm$ SD)

3.13. Biochemische Charakterisierung des Ganzzell-Biokatalysators

3.13.1. pH-Optimum

Die Mandelsäureproduktion des Fusionsproteins NitAf-AT in Abhängigkeit vom pH-Wert wurde untersucht (Abbildung 47). Die Versuche wurden mit *E. coli* BL21(DE3) pCD003 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden kultiviert und die Proteinexpression von NitAf-AT durch IPTG-Zugabe induziert. Die Zellen wurden im jeweiligen Puffer mit einem definierten pH-Wert resuspendiert. Mit diesen Zellen wurde ein Aktivitätstest durchgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Enzymaktivität wurden die relativen Aktivitäten in % angegeben, wobei die höchste Mandelsäureproduktion gleich 100 % gesetzt wurde. Die Auswertung ergab ein Maximum der Mandelsäureproduktion im Phosphatpuffer bei pH 7,5. Eine Erhöhung des pH-Wertes auf pH 8 führte zu einem Abfall der Mandelsäureproduktion um 16 % bezogen auf die höchste Mandelsäureproduktion. Die Mandelsäureproduktion in Tris-HCl-Puffer und im Acetatpuffer lag immer unter dem im Phosphatpuffer ermittelten

Wert. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Yamamoto *et al.* (1992) bestimmten pH-Optimum von pH 7,5 für NitAf überein. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Enzymaktivitätsbestimmungen in einem 50 mM Phosphatpuffer bei pH 7,5 durchgeführt.

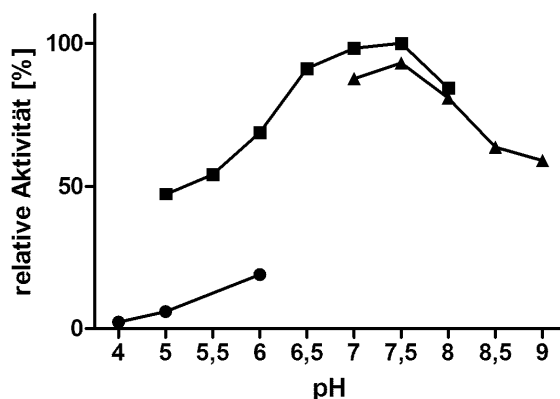


Abbildung 47: pH-Optimum des Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003. Der Reaktionsansatz bestand aus dem Biokatalysator in einer OD₅₇₈ von 10 resuspendiert in einem 50 mM Puffer mit einem definierten pH-Wert. Als Substrat wurde Mandelsäurenitril mit einer Endkonzentration von 10 mM verwendet. Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C für 24 h inkubiert. Der Puffer in dem die höchste Mandelsäureproduktion gemessen werden konnte, wurde gleich 100 % gesetzt. pH-Bereich von 4-6= Acetat-Puffer, pH-Bereich von 5-8= Phosphat-Puffer, pH-Bereich von 7-9= Tris-HCl Puffer. (n=3; gezeigt sind MW±SD). Die ermittelten Standardabweichungen sind zu gering, um sichtbar zu sein.

3.13.2. Temperaturoptimum

Die Ermittlung des Temperaturoptimums von NitAf-AT wurde mit *E. coli* BL21(DE3) pCD003 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden kultiviert und die Proteinexpression von NitAf-AT mit IPTG induziert. Im Anschluss wurde ein Aktivitätsassay im Mikroreaktionsgefäß durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden dafür entweder bei 30, 37, 42, 45, 50 oder 60 °C für 24 h inkubiert. Danach wurde die Mandelsäurekonzentration in den jeweiligen Reaktionsansätzen mittels HPLC bestimmt. Im Bereich von 30 °C bis 50 °C konnte eine Zunahme der Mandelsäureproduktion beobachtet werden (Abbildung 48). Das Optimum bei 45 °C wurde mit 2,6 mM produzierter Mandelsäure bestimmt. Bei 50 °C betrug die Mandelsäureproduktion noch 2,57 mM, dies entspricht noch 98 % des Optimums. Erst bei einer Reaktionstemperatur von 60 °C fiel die Mandelsäureproduktion auf 1,13 mM (43 %) stark ab. Dieses Ergebnis deckt sich nur teilweise mit Literaturwerten für NitAf. So wurde zwar ebenfalls ein Temperaturoptimum von 45 °C bestimmt, jedoch verringerte sich die Mandelsäureproduktion bei einer Umsetzungstemperatur von 50 °C um ca. 30 % gegenüber 45 °C (Yamamoto *et al.*, 1992).

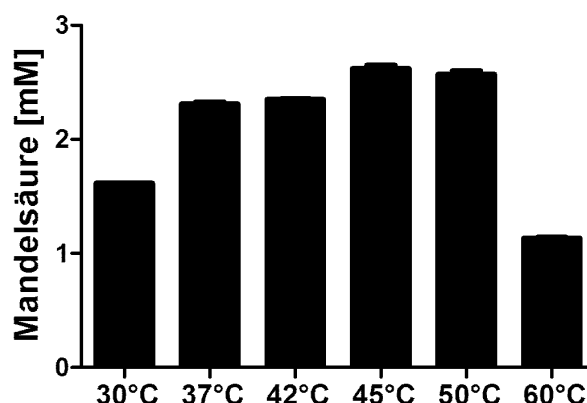


Abbildung 48: Temperaturoptimum des Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003. Im Reaktionsansatz lag der Biokatalysator in einer OD₅₇₈ von 10 vor. Als Substrat wurde 10 mM Mandelsäurenitril verwendet. Die Umsetzung wurde nach 24 h durch Zentrifugation des Ganzzell-Biokatalysators gestoppt und der Überstand mittels HPLC analysiert. (n=3; gezeigt sind MW±SD)

3.13.3. Einfluss der Lagerung auf die Mandelsäureproduktion

Zur Bestimmung der Lagerstabilität des Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003 wurden Reaktionsansätze bei 6 °C, -18 °C und bei -70 °C gelagert. Den bei -18 und bei -70 °C gelagerten Reaktionsansätzen wurde Glycerin (10 % (v/v)) als Frostschutzmittel zugefügt. Zur Bestimmung des Einflusses der Lagerung auf die Mandelsäureproduktion wurden in definierten Zeitabständen Reaktionsansätze entnommen. Die Zellen der gelagerten Reaktionsansätze wurden durch Zentrifugation geerntet und vor Start der Aktivitätsassays in frischem Phosphatpuffer pH 7,5 resuspendiert. Nach 24 h bei 37 °C und 800 rpm wurde die Reaktion durch Zentrifugation und Sterilfiltration gestoppt. Der zellfreie Überstand wurde direkt mittels HPLC analysiert. Bei einer Lagerung der Reaktionsansätze bei 6 °C sank die Mandelsäureproduktion innerhalb der ersten 8 Tage auf 46 % des Anfangswertes stark ab. Im weiteren Verlauf verlangsamte sich die Abnahme, so dass nach 37 Tagen Lagerung noch 34 % der ursprünglichen Mandelsäureproduktion vorlagen (Abbildung 49 A). Im Vergleich dazu führte die Lagerung bei -18 °C (Abbildung 49 B) erwartungsgemäß zu einer geringeren Abnahme der Mandelsäureproduktion innerhalb des Beobachtungszeitraumes. Die im Laufe des Beobachtungszeitraumes von 35 Tagen gemessenen Mandelsäureproduktionen der bei -18 °C gelagerten Proben unterschieden sich nicht signifikant (ungepaarter Student's *t*-Test, Werte mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen) von der Mandelsäureproduktion der Probe nach 24 h Lagerung. Somit eignet sich die Lagerung bei -18 °C zur Erhaltung der Enzymaktivität über einen Zeitraum von 35 Tagen.

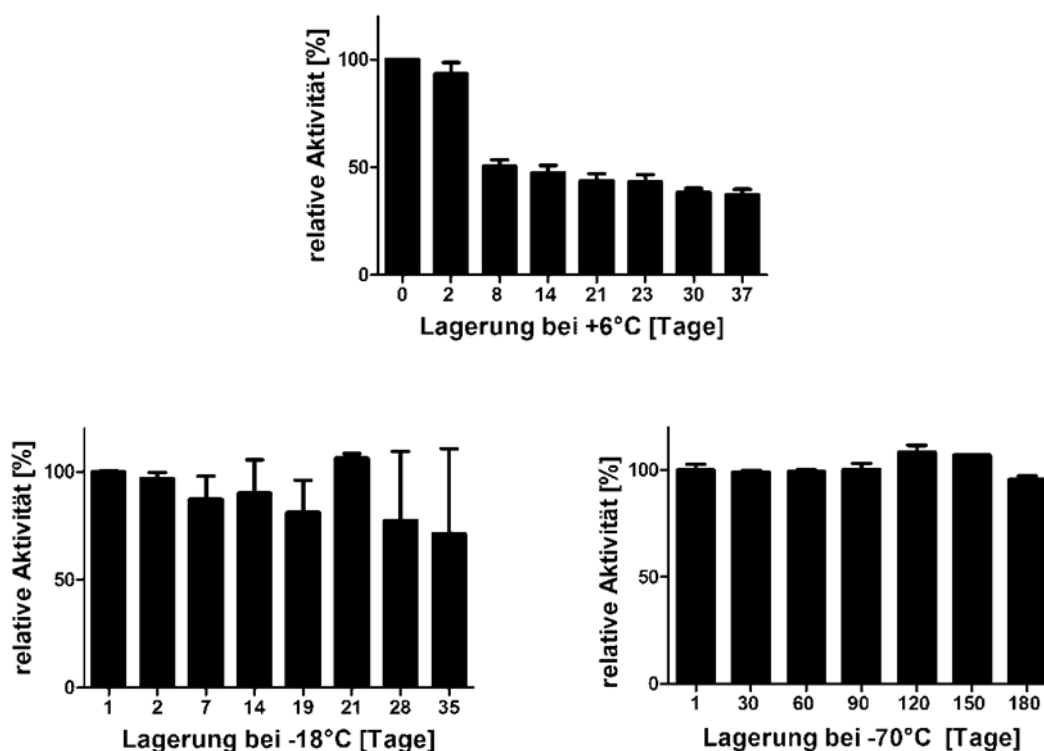


Abbildung 49: Einfluss unterschiedlicher Lagerungstemperaturen auf die Mandelsäureproduktion des Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003. Lagerung bei +6°C: Der Ganzzell-Biokatalysator wurde in einer definierten Konzentration (OD_{578} von 10) in einem 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 resuspendiert und in Aliquots von 1 ml aufgeteilt und bei +6°C gelagert. In definierten Zeitabständen wurden Proben entnommen und durch Zugabe von 10 mM Mandelsäurenitril als Substrat eine Umsetzung für 24 h gestartet. Lagerung bei -18°C und -70°C: Diese Proben enthielten 10 % Glycerin als Frostschutzmittel. Nach Auftauen auf Eis wurde der Ganzzell-Biokatalysator durch Zentrifugation geerntet, der Überstand verworfen und frischer Puffer zugefügt und durch Zugabe von 10 mM Mandelsäurenitril als Substrat eine Umsetzung für 24 h gestartet. Die Mandelsäureproduktion des jeweils ersten untersuchten Reaktionsansatzes wurde gleich 100 % gesetzt und die nachfolgenden Reaktionsansätze damit ins Verhältnis gestellt. (n=3; gezeigt sind $MW \pm SD$)

Die Analyse der Lagerung bei -70 °C (Abbildung 49 C) erbrachte eine hohe Stabilität der Enzymaktivität über den kompletten getesteten Zeitraum. Somit kann die Lagerung bei -70 °C als Methode der Wahl angesehen werden, wenn es auf eine Lagerung über einen langen Zeitraum ankommt.

3.13.4. Bestimmung von K_m und v_{max}

Die Bestimmung der K_m und v_{max} Werte für NitAf-AT wurden mit *E. coli* BL21(DE3) pCD003 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden kultiviert und die Proteinexpression durch IPTG-Zugabe induziert. Danach wurden die sedimentierten Zellen in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 resuspendiert und auf eine OD_{578} von 1,5 oder 3 eingestellt. Den jeweiligen Reaktionsansätzen wurde eine definierte Substratkonzentration (3 mM, 5 mM, 6 mM, 8 mM oder 10 mM Mandelsäurenitril) zugesetzt. Nach 24 h bei

37 °C und 800 rpm wurden die Zellen durch Zentrifugation und Sterilfiltration entfernt und der Überstand direkt mittels HPLC vermessen. Die Auswertung mittels nicht-linearer Regression (Software: GraphPad Prism v5.02) ergab einen K_m -Wert von 3,6 mM für die Zellsuspension mit einer $OD_{578} = 3$ und 2,75 mM für die Zellsuspension mit einer $OD_{578} = 1,5$ (Abbildung 50) (Tabelle 16). Eine mögliche Erklärung für die Abweichung des K_m -Wertes, der unabhängig von der Enzymkonzentration ist, könnte die Verwendung eines zu kleinen Substratkonzentrationsbereiches sein. Für die Bestimmung eines K_m -Wertes sollte der Konzentrationsbereich bis zum 10-fachen des erwarteten K_m -Wertes abgedeckt werden (Bisswanger, 2008). Da aber bei Erhöhung der Substratkonzentration über 10 mM eine Substrathemmung eintritt (Abbildung 44), war dies nicht möglich. Die bestimmten K_m -Werte lagen dennoch in der gleichen Größenordnung wie der für das freie Enzym NitAf berichtete Wert von 5,75 mM (Yamamoto *et al.*, 1992).

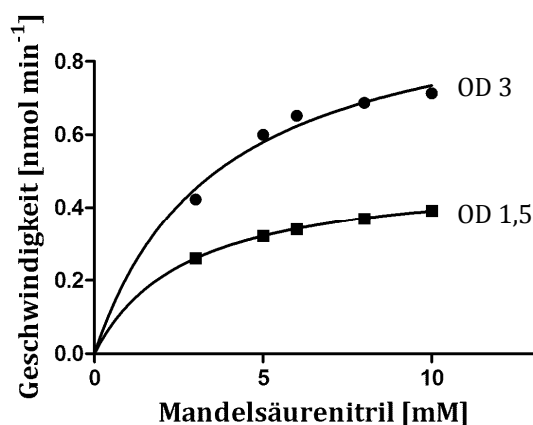


Abbildung 50: Bestimmung der Kinetik-Parameter K_m und v_{max} für *E. coli* BL21(DE3) pCD003. Die nicht-lineare Regression wurde mit der Software GraphPad Prism v5.02 durchgeführt. Der Ganzzell-Biokatalysator wurde dem Reaktionsansatz in einer definierten Konzentration zugesetzt und durch Zugabe von Mandelsäurenitril (3, 5, 6, 8 und 10 mM) als Substrat wurde eine Umsetzung für 24 h bei 37°C gestartet. Die zellfreien Überstände wurden direkt mittels HPLC vermessen.

Tabelle 16: Durch nicht-lineare Regression bestimmten Kinetik-Parameter

	$OD_{578} = 1,5$	$OD_{578} = 3$
V_{max} [nmol/min]	0,5	1
K_m [mM]	2,75	3,64
R^2	0,99	0,95

3.13.5. Zyklische Wiederverwendbarkeit

Ein wichtiger Parameter zur Charakterisierung eines Ganzzell-Biokatalysators ist die Bestimmung der Wiederverwendbarkeit. Sie ist vor allem hinsichtlich der Wirtschaftlichkeit und somit der Wettbewerbsfähigkeit von großer Bedeutung.

Die Analyse der Wiederverwendbarkeit wurde mit *E. coli* BL21(DE3) pCD003 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden kultiviert und die Proteinexpression mit IPTG induziert. Die Zellen wurden in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 oder in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7 resuspendiert. Durch Zugabe von 10 mM Mandelsäurenitril und Inkubation bei definierten Temperaturen (30, 37, 42 und 45 °C) wurde die Reaktion gestartet. Nach 24 h wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und der zellfreie Überstand per HPLC vermessen. Die sedimentierten Zellen wurden erneut in frischem Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 10 mM Mandelsäurenitril einer weiteren Umsetzung unterzogen. Insgesamt wurden 5 Reaktionszyklen zu je 24 h durchlaufen und nach jedem Zyklus die Mandelsäureproduktion bestimmt. Abbildung 51 A gibt einen Überblick über den Verlauf der Mandelsäureproduktion im jeweiligen Reaktionszyklus bei der jeweiligen Reaktionstemperatur bei Verwendung von Phosphatpuffer.

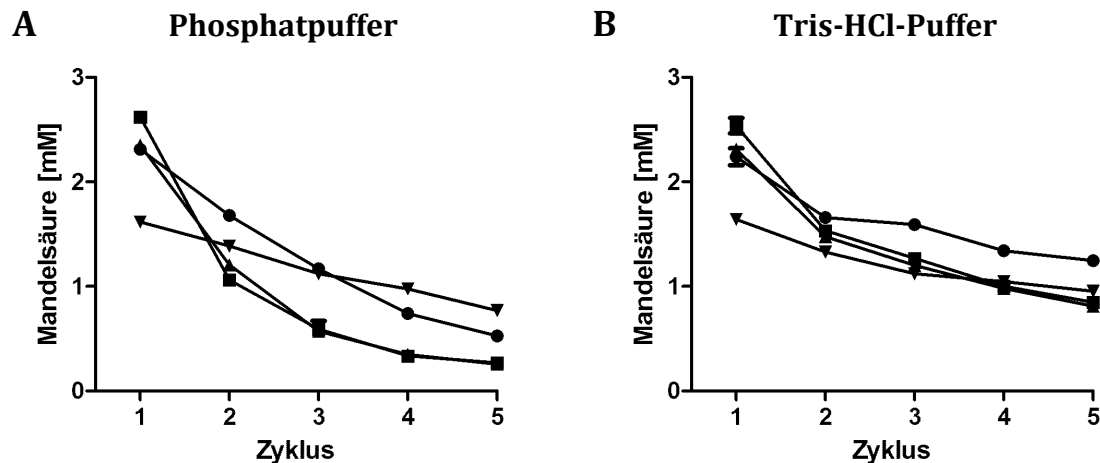


Abbildung 51: Einfluss der Temperatur auf die Wiederverwendbarkeit des Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003. Jedes Symbol repräsentiert die Mandelsäureproduktion während einer 24 h Umsetzung bei unterschiedlichen Temperaturen: 45 °C (■), 42 °C (▲), 37 °C (●), 30 °C (▼). Der Reaktionsansatz enthielt den Ganzzell-Biokatalysator in einer $OD_{578} = 10$ in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 (A) oder 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7 (B). Nach 24 h wurde der Ganzzell-Biokatalysator mittels Zentrifugation geerntet und die Reaktion durch Zugabe von 10 mM Mandelsäurenitril als Substrat erneut gestartet. ($n=3$; gezeigt sind $MW \pm SD$). Die Standardabweichungen sind zu gering, um sichtbar zu sein.

Die höchste Mandelsäureproduktion konnte im ersten Zyklus bei einer Umsetzungstemperatur von 45 °C mit 2,6 mM Mandelsäure erzielt werden. Im folgenden Zyklus fiel die Mandelsäureproduktion bei 45 °C auf 1 mM stark ab und

sank weiter bis auf 0,26 mM im 5. Zyklus. Die höchste Mandelsäureproduktion von Bakterienzellen in Tris-HCl Puffer resuspendiert konnte bei pH 7 und 45 °C erzielt werden (Abbildung 51 B). Mit 2,53 mM blieb diese jedoch geringfügig hinter der Mandelsäureproduktion im Phosphatpuffer zurück. Auffällig ist jedoch, dass die Mandelsäureproduktion im Phosphatpuffer im Verlauf der Zyklen stärker abnimmt, als im Tris-HCl-Puffer. Die höchste Restaktivität bezogen auf die Anfangsaktivität konnte mit 58 % (0,95 mM) für die Zellen bestimmt werden, die im Tris-HCl-Puffer bei 30 °C resuspendiert vorlagen.

4. Untersuchungen zur Produktion von R-Mandelsäure im Fermenter durch NitAf-AT tragende Zellen

4.1. Produktion von R-Mandelsäure im Milligramm-Maßstab

Zur ersten Abschätzung des biokatalytischen Potentials des Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003 zur Produktion von Mandelsäure im Fermentationsmaßstab wurde ein Liter einer auf eine $OD_{578} = 10$ eingestellten Zellsuspension zur Umsetzung von Mandelsäurenitril verwendet. Zuvor waren die Zellen kultiviert und die Proteinexpression durch IPTG induziert worden. Die Zellsuspension wurde in eine 1 L Duranflasche überführt und bei 37 °C im Brutschrank und 200 Umdrehungen auf dem Magnetrührer inkubiert. Die Umsetzung wurde durch Zugabe von Mandelsäurenitril in einer Endkonzentration von 10 mM gestartet. Nach 120 h wurden die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt und der zellfreie Überstand mittels HPLC analysiert. Die Auswertung ergab eine Produktion von 4,6 mM entsprechend 700 mg Mandelsäure pro Liter Zellsuspension. Die biokatalytisch erzeugte Mandelsäure wurde mittels Ethylacetat-Ausschüttelung extrahiert. Die extrahierte Mandelsäure wies nach Trocknung eine rötlich-braune Farbe auf. Eine einfache Erklärung dafür könnte eine Verunreinigung der Mandelsäure mit zellulären Sekretionsprodukten sein. Zur weiteren Aufreinigung der extrahierten Mandelsäure wurde diese einmal in Benzol umkristallisiert. Auf diese Weise konnten ca. 370 mg Mandelsäure gewonnen werden (Abbildung 52). Durch eine chirale HPLC-Analyse konnte der Enantiomerenüberschuss für das R-Enantiomer mit > 99 % bestimmt werden.



Abbildung 52: Mit dem Ganzzell-Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pCD003 produzierte R-Mandelsäure. 1 L einer Bakteriensuspension des Ganzzell-Biokatalysators mit einer OD_{578} von 10 wurde für 120 h bei 37°C inkubiert. Als Substrat wurde 10 mM Mandelsäurenitril verwendet. Die produzierte Mandelsäure wurde mittels Ethylacetat-Extraktion extrahiert und durch Umkristallisation aufgereinigt.

4.2. Vorversuche für die Kultivierung im Fermenter

Bisher wurden Schüttelkolbenkulturen des NitAf-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003 lediglich in Abwesenheit von Glucose kultiviert. Damit konnten Zelldichten von $OD_{578} = 1-2$ erreicht werden. Eine Kultivierung im Fermenter sollte die Bildung einer höheren Biomasse und somit eine höhere Ausbeute an enzymatisch aktivem Ganzzell-Biokatalysator ermöglichen. Die Erzeugung höherer Biomassen erfordert häufig die Zugabe einer leicht verwertbaren Kohlenstoffquelle, wie z.B. Glucose zur Kultur. Dass Glucose einen Einfluss auf die heterologe Proteinexpression ausüben kann, wurde für das pET-System, auf dem das Plasmid pCD003 beruht, berichtet (Grossman *et al.*, 1998). Bei diesem System steht das Zielgen unter der Kontrolle eines T7-Promotors. Das für die T7-RNA-Polymerase kodierende Gen steht unter der Kontrolle eines *lacUV5*-Promotors. Dieser Promotor kann durch IPTG aktiviert werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass er auch durch cAMP stimuliert wird, was zu einer unerwünschten Basalexpression führen kann. Eine Zugabe von 0,5–1 % Glucose zum Medium erniedrigt den cAMP-Spiegel und unterdrückt somit die Basalexpression (Grossman *et al.*, 1998). Es wäre deshalb denkbar, dass die Anwesenheit von Glucose im Fermenter die Proteinexpression und dadurch die Enzymaktivität des Ganzzell-Biokatalysators negativ beeinflussen kann. Erste Erkenntnisse über den Einfluss von Glucose auf die Enzymaktivität sollten durch Versuche an Schüttelkolbenkulturen von NitAf-AT tragenden *E. coli* BL21(DE3) pCD003 Zellen gewonnen werden. Dafür wurden zwei Kulturen in An- bzw. Abwesenheit von 1 % (w/v) Glucose im Medium kultiviert und die Proteinexpression durch IPTG induziert. Nach Sedimentation und Resuspension wurden die Zellen auf eine $OD_{578} = 10$ eingestellt. Zusätzlich wurde einem Teil der Reaktionsansätze 1 % (w/v) Glucose zugesetzt, während der andere Teil der Reaktionsansätze unbehandelt blieb. Die Reaktionsansätze wurden einem Aktivitätsassay unterzogen. Der zellfreie Überstand wurde sterilfiltriert und mittels HPLC analysiert. Die höchste Produktbildung mit 2,66 mM Mandelsäure wurde erzielt, wenn komplett auf eine Zugabe von Glucose zum Medium und Reaktionsansatz verzichtet wurde (Abbildung 53). Wurde dem LB-Medium der Hauptkultur (HK= Hauptkultur) Glucose zugesetzt, sank die Umsetzung auf 60 % (1,6 mM) gegenüber der maximalen Produktbildung ohne Glucose ab. Eine Zugabe von Glucose zum Reaktionsansatz (RA= Reaktionsansatz) resultierte in einer Abnahme der Produktbildung um 80,5 % (0,52 mM) bezogen auf die maximale Mandelsäureproduktion. Wurden sowohl der Hauptkultur, als auch dem Reaktionsansatz Glucose zugesetzt wurde die Produktbildung um 90 % (0,26 mM) verringert.

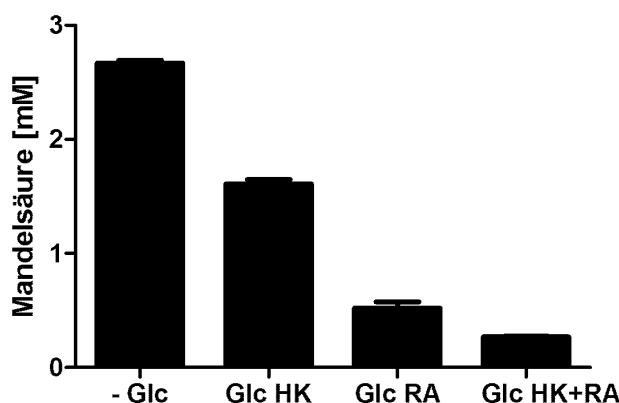


Abbildung 53: Einfluss von Glucose auf die Mandelsäureproduktion des NitAf-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003. Glc= Glucose, HK= Hauptkultur (5 [g/l] Glucose), RA= Reaktionsansatz (5 [g/l] Glucose). Als Substrat wurde jeweils 10 mM Mandelsäurenitril verwendet und die Reaktion wurde nach 24 h durch Zentrifugation des Ganzzell-Biokatalysators beendet. (n=3; gezeigt sind MW $\pm$ SD)

Anschließend wurde mittels SDS-PAGE untersucht, ob der Zusatz von Glucose zum LB-Medium einen Einfluss auf die Expression des Fusionsproteins NitAf-AT hat. Zu diesem Zweck wurden NitAf-AT tragende *E. coli* BL21(DE3) pCD003 Zellen, die in An- und Abwesenheit von Glucose kultiviert wurden, einer differentiellen Zellfraktionierung unterzogen. Abbildung 54 zeigt die Auftrennung der erhaltenen Außenmembranproteinisolate mittels SDS-PAGE. In Spur 2 erscheint nach Induktion der NitAf-AT Expression im glucosefreien Medium die Proteinbande von NitAf-AT mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 90 kDa. Spur 3 zeigt die Trennung des Proteinisolates, das nach Induktion mit IPTG in glucosehaltigem Medium aus der Kultur präpariert wurde. Die Proteinbande des Fusionsproteins NitAf-AT ist deutlich schwächer geworden, was auf eine verringerte Enzymkonzentration in der Außenmembran von *E. coli* schließen lässt. Im Vergleich zur Abbildung 29 Spur 6 und Abbildung 31 B Spur 3 weist die in Abbildung 54 Spur 2 nach Induktion der Proteinexpression mit IPTG aufgetrennte Probe eine deutlich geringere Expressionsstärke des Fusionsproteins NitAf-AT auf. Dies kann höchstwahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, dass die Proteinexpression der in Abbildung 54 Spur 2 aufgetrennten Probe erst bei einer OD₅₇₈= 1 induziert wurde. Eine weitere Erklärung könnte der Umstand sein, dass die verwendete Impfkultur mehr als 6 Monate bei -18 °C in einer 50 % Glycerol-Lösung gelagert worden war. Dies kann negative Auswirkungen auf die Plasmidstabilität haben, was sich letztlich auch auf die Expressionsstärke auswirkt (Novagen, pET-System Manual, 11 th edition).

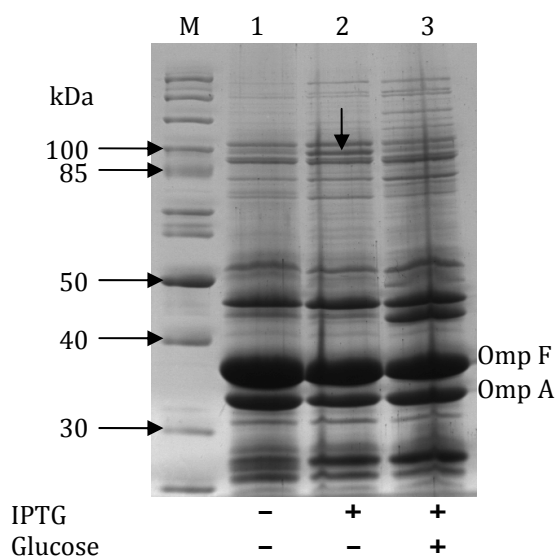


Abbildung 54: Einfluss von Glucose auf die Enzymkonzentration des Fusionsproteins NitAf-AT in Präparationen der Außenmembran von *E. coli* BL21(DE) pCD003. IPTG: Nach Erreichen einer OD_{578} von 1 wurde die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Glucose: Dem Medium wurde Glucose in einer Konzentration von 10 g/L zugesetzt. Die Proteinbande der gesuchten Nitrilase ist mit Pfeilen markiert. (M= Proteingrößenstandard).

4.3. Kultivierung im Fermenter

Das biokatalytische Potential des NitAf-AT tragenden Stamms *E. coli* BL21(DE3) pCD003 zur Umsetzung von Mandelsäurenitril zu R-Mandelsäure sollte im Fermenter untersucht werden. Um dieses Ziel zu erreichen wurde in einem ersten Schritt die Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) pCD003 im Hinblick auf eine möglichst hohe Zelldichte und Enzymaktivität im Fermenter optimiert. Dafür wurden verschiedene Parameter, die einen Einfluss auf die Kultivierung ausüben können, variiert (Tabelle 17).

Tabelle 17: Übersicht über die in den jeweiligen Fermentern angewandten Bedingungen

	IPTG [mM]	Mercaptoethanol [mM]	Zugabe Mercaptoethanol	Glucose [g/L]
Fermenter 1	1	10	zu Beginn	0
Fermenter 2	0,1	10	zeitgleich mit IPTG [#]	1 x 5
Fermenter 3	0,1	10	zu Beginn	1 x 5
Fermenter 4	0,13	10	zeitgleich mit IPTG [#]	10*
Fermenter 5	0,13	10	zu Beginn	10*

Fermenter 6	1	10	zu Beginn	5*
Fermenter 7	0	10	zu Beginn	5*

*Kultivierung mit Glucose-Nachführung

#IPTG wurde bei Erreichen einer $OD_{578} = 5$ zugegeben.

Alle Kultivierungen im Fermenter wurden im Rahmen einer Auftragsfermentation im „Sächsischen Institut für Angewandte Biotechnologie e.V.“ (SIAB) in Leipzig durchgeführt. Die Analytik zur Bestimmung der Mandelsäureproduktion wurde selbst durchgeführt.

Vorkultur und Probenentnahme

Zur Vorkultur wurden 150 mL LB-Medium (100 mg/L Ampicillin) mit einer Impföse von *E. coli* BL21(DE3) pCD003 angeimpft und für 12 h bei 30 °C und 150 rpm inkubiert. Die komplette Vorkultur wurde in den jeweiligen Fermenter überführt und die Fermentation nach dem jeweiligen Protokoll durchgeführt (Tabelle 17). Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben in Form von 50 mL Zellsuspension aus dem Fermenter entnommen. Die entnommenen Zellsuspensionen wurden mit 10 % (v/v) Glycerin als Frostschutz versetzt, und auf Trockeneis versendet. Die weitere Analytik fand im Institut der Pharmazeutischen und Medizinischen Chemie, Abteilung Bioanalytik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf statt. Mit den zu definierten Zeitpunkten entnommenen Proben wurde jeweils ein Aktivitätsassay zur Bestimmung der produzierten Mandelsäure durchgeführt. Die bestimmten Werte wurden zur Berechnung der Raum-Zeit-Ausbeute herangezogen. Die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) beschreibt die Bildung des Produkts Mandelsäure pro Reaktorvolumen und Zeit.

Fermenter 1

Im Fermenter 1 sollte untersucht werden, ob das „Up-scaling“ von einer 100 mL Kultur im Schüttelkolben auf eine 2 L Kultur im Fermenter einen Einfluss auf die Enzymaktivität ausübt. Um die im Fermenter erzielten Ergebnisse mit früheren Experimenten vergleichen zu können, orientierte sich das im Fermenter 1 angewandte Kultivierungsprotokoll am Protokoll zur Anzucht von Schüttelkolbenkulturen. Aus diesem Grund wurde im Fermenter 1 auf eine Glucose-Zugabe verzichtet. Mercaptoethanol lag bereits zu Beginn der Fermentation vor und IPTG wurde in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Es ist bekannt, dass IPTG in einer Konzentration von 1 mM zu einer Abnahme des Biomassewachstums führen kann (Fass *et al.*, 1991). Um einen möglichen negativen Einfluss von IPTG zu minimieren sollte im Gegensatz zur Anzucht von Schüttelkolbenkulturen die

Proteinbiosynthese nicht bei Erreichen einer OD_{578} von 1, sondern erst nach Erreichen der maximalen OD induziert werden.

Unter den gewählten Bedingungen war in diesem Fermenter eine maximale OD_{600} = 4,4 erzielbar (Abbildung 55 A). Die zu definierten Zeitpunkten entnommenen Zellen wurden auf eine OD_{578} = 10 eingestellt und einem Aktivitätsassay unterzogen. Die nach 6 h Kultivierung aus dem Fermenter entnommenen Zellen wiesen mit einer Mandelsäureproduktion von 5,6 mM die höchste erzielte Mandelsäureproduktion auf (Abbildung 55 B). Im Vergleich zu Schüttelkolbenkulturen bedeutete dies bei gleicher Zellzahl eine Erhöhung der Mandelsäureproduktion um den Faktor 2. Zu diesem Zeitpunkt war die Proteinbiosynthese noch nicht durch Zugabe von IPTG induziert worden. Dies bedeutet, dass die nachgewiesene Mandelsäureproduktion auf die für das pET-System bekannte Basalexpression zurückzuführen ist. Das Phänomen der Basal-Expression wurde für das verwendete Expressionssystem schon mehrfach beschrieben (Dubendorff und Studier, 1991; Grossman *et al.*, 1998). Die zu späteren Zeitpunkten, nach Zugabe von IPTG, entnommenen Proben führten zu einer kontinuierlichen Abnahme der Mandelsäureproduktion bis zum Minimum von 4,4 mM am Ende des Beobachtungszeitraumes.

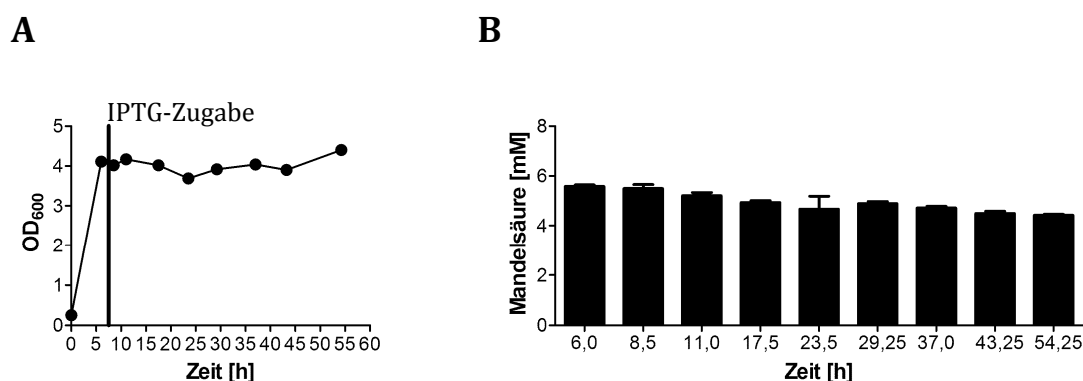


Abbildung 55: Wachstumskurve des NitAf-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003 im Fermenter 1 (A), Mandelsäureproduktion einer Zellsuspension der OD_{578} = 10 (B). (A): Entwicklung der OD_{600} im Verlauf der Fermentation (●), (B): Jede Säule im Diagramm stellt die Mandelsäureproduktion einer zu einem definierten Zeitpunkt aus dem Fermenter entnommenen Probe dar. Die entnommenen Bakterienzellsuspensionen wurden auf eine OD_{578} = 10 eingestellt und einem Aktivitätsassay mit 10 mM Mandelsäurenitril als Substrat unterzogen. Die Mandelsäureproduktion wurde nach 24 h bestimmt. (n=3; gezeigt sind MW±SD)

Fermenter 2 und 3

Das Experiment im Fermenter 1 hatte gezeigt, dass eine maximale OD_{600} = 4,4 erzielbar ist, wenn dem Medium keine leicht verfügbare Kohlenstoffquelle, wie z.B. Glucose zugefügt wird. Zur weiteren Steigerung der erzielbaren Biomasse sollte deshalb den folgenden Fermentern Glucose zugefügt werden. Da Vorversuche mit

Schüttelkolbenkulturen aufgezeigt hatten, dass Glucose einen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität ausüben kann, sollte in den Fermentern 2 und 3 zuerst die Kultivierung mit einer niedrigen Glucose-Konzentration untersucht werden. Deshalb wurde in diesen Fermentern Glucose nur einmalig zu Beginn in einer Konzentration von 5 g/L dem Medium zugefügt. In beiden Fermentern wurde die Proteinexpression von NitAf-AT durch Zugabe von 0,1 mM IPTG bei Erreichen einer $OD_{600} = 5$ induziert. Der einzige Parameter, in dem sich die Kultivierungsprotokolle der Fermenter voneinander unterschieden, war der Zeitpunkt der Mercaptoethanol-Zugabe zum Medium. Im Fermenter 2 wurde Mercaptoethanol erst mit Beginn der Proteinexpression zusammen mit IPTG dem Medium zugegeben, während in Fermenter 3 Mercaptoethanol bereits zu Beginn vorlag.

Nach 14,3 h wurde das Maximum der Zelldichte mit einer OD_{600} von 8,14 im Fermenter 2 erreicht (Abbildung 56 A). Zum gleichen Zeitpunkt konnte auch im Fermenter 3 die maximale OD_{600} mit 6,98 bestimmt werden (Abbildung 56 B). Somit führte die einmalige Zugabe von 5 g/L Glucose zu einer Verdopplung der erzielbaren Zelldichte im Vergleich zur Kultivierung ohne Glucose-Zugabe im Fermenter 1 (Abbildung 55 A). Eine weitere Fortführung der Kultivierung führte zu keiner weiteren Steigerung der Zelldichte, weshalb die Fermentationen nach jeweils 18,4 h beendet wurden.

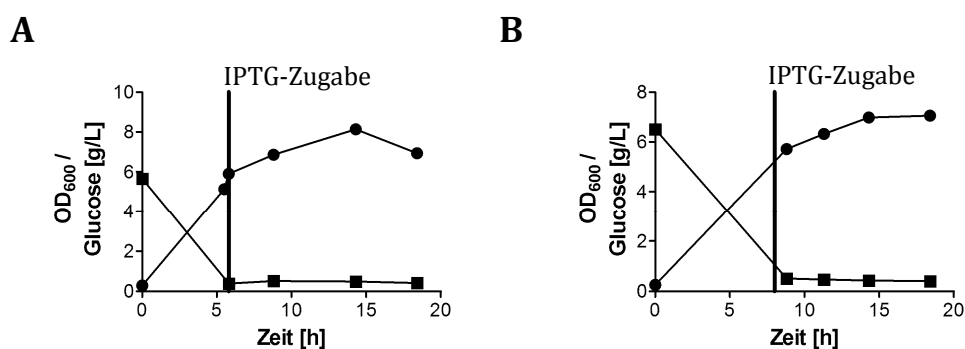


Abbildung 56: Wachstumskurve des NitAf-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003 und Konzentrationsverlauf der Glucose im Fermenter 2 (A) und Fermenter 3 (B). Entwicklung der OD_{600} im Verlauf der Fermentation (●), Glucose-Konzentration [g/L] (■).

Die zu definierten Zeitpunkten aus den Fermentern entnommenen Zellen wurden auf eine $OD_{578} = 10$ eingestellt und Aktivitätsassays durchgeführt. Im Fermenter 2 konnte eine maximale Produktion von 3 mM Mandelsäure für die Zellen ermittelt werden, die nach 5,8 h aus dem Fermenter entnommen worden waren (Abbildung 57 A). Zu diesem Zeitpunkt war dem Medium noch kein IPTG zugefügt und somit noch keine Expression von NitAf-AT induziert worden. Das lässt den Schluss zu, dass die gemessene Enzymaktivität ausschließlich auf eine Basal-Expression von NitAf-AT

zurückzuführen ist. Für Fermenter 3 konnte die maximale Mandelsäureproduktion mit 6,8 mM für die nach 8,8 h aus dem Fermenter entnommenen Zellen bestimmt werden (Abbildung 57 B). Zu diesem Zeitpunkt war die Proteinexpression von NitAf-AT bereits induziert worden. Zellen die länger kultiviert wurden wiesen in beiden Fermentern eine verringerte Mandelsäureproduktion auf. Die Verwendung einer Konzentration von 5 g/L Glucose einmalig zu Beginn der Kultivierung führte nicht zu einer Verringerung der Mandelsäureproduktion, nimmt man den ohne Glucose kultivierten Fermenter 1 als Vergleichsgröße. Im Vergleich zur maximal erzielbaren Mandelsäureproduktion mit Schüttelkolbenkulturen führt die Kultivierung im Fermenter unter den Bedingungen von Fermenter 3 zu einer 2,7-fachen Steigerung der Mandelsäureproduktion.

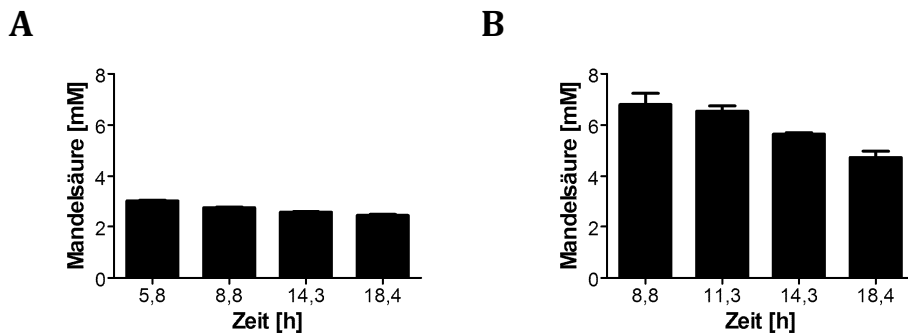


Abbildung 57: Mandelsäureproduktion der zu definierten Zeitpunkten aus dem Fermenter 2 (A) und Fermenter 3 (B) entnommenen NitAf-AT tragenden *E. coli* BL21(DE3) pCD003 Zellen. Jede Säule im Diagramm stellt die Mandelsäureproduktion einer zu einem definierten Zeitpunkt aus dem Fermenter entnommenen Probe dar. Die entnommenen Bakterienzellsuspensionen wurden auf eine $OD_{578} = 10$ eingestellt und einem Aktivitätsassay mit 10 mM Mandelsäurenitril als Substrat unterzogen. Die Mandelsäureproduktion wurde nach 24 h bestimmt. (n=3; gezeigt sind MW $\pm$ SD).

Ein Vergleich der beiden Fermenter 2 und 3 wird dadurch erschwert, dass die Proteinexpression in beiden Fermentern zu unterschiedlichen Zeitpunkten induziert wurde. So weisen z.B. die beiden nach 8,8 h Kultivierung aus den Fermentern 2 und 3 entnommenen Kulturen eine unterschiedlich lange Inkubationszeit mit IPTG auf. Aus diesem Grund sind keine allgemeingültigen Aussagen möglich, sondern nur Tendenzen feststellbar. Vergleicht man die Mandelsäureproduktion der Zellen die nach einer Kultivierung von 8,8 h aus den Fermentern 2 und 3 entnommen worden waren, so scheint die Zugabe von Mercaptoethanol bereits zu Beginn der Kultivierung zu einer Erhöhung der Mandelsäureproduktion um das 2,5-fache zu führen und somit einen positiven Einfluss auf die Mandelsäureproduktion auszuüben. Ein Vergleich des Fermenters 1 mit Fermenter 2 erhärtet diese These. So führte im Fermenter 1 die Zugabe von Mercaptoethanol bereits zu Beginn der Kultivierung ebenfalls zu einer höheren Mandelsäureproduktion, als die Zugabe von Mercaptoethanol erst mit Beginn der Proteinbiosynthese in Fermenter 2 (Abbildung 58). Dieser Effekt war

unabhängig davon, ob eine 0,1 mM (Fermenter 3) oder eine 1 mM (Fermenter 1) IPTG-Konzentration verwendet wurde.

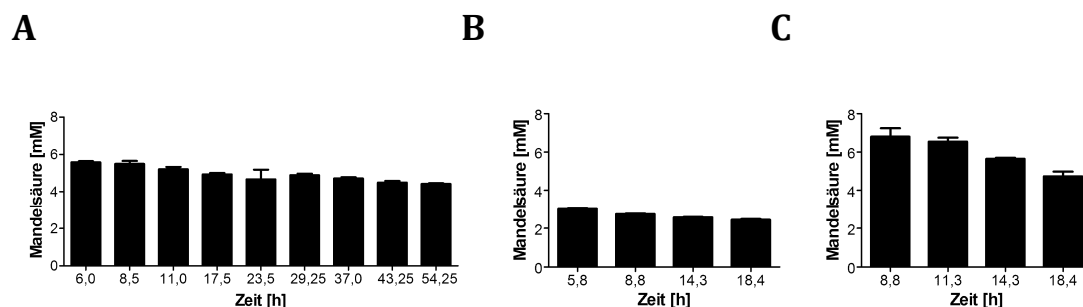


Abbildung 58: Mandelsäureproduktion der zu definierten Zeitpunkten aus dem Fermenter 1 (A), Fermenter 2 (B) und Fermenter 3 (C) entnommenen NitAf-AT tragenden *E. coli* BL21(DE3) pCD003 Zellen. Jede Säule im Diagramm stellt die Mandelsäureproduktion einer zu einem definierten Zeitpunkt aus dem Fermenter entnommenen Probe dar. Die entnommenen Bakterienzellsuspensionen wurden auf eine $OD_{578} = 10$ eingestellt und einem Aktivitätsassay mit 10 mM Mandelsäurenitril als Substrat unterzogen. Die Mandelsäureproduktion wurde nach 24 h bestimmt. ($n=3$; gezeigt sind $MW \pm SD$).

Fermenter 4, 5 und 6

Die vorangegangenen Fermentationen hatten gezeigt, dass eine Kultivierung in Anwesenheit von Glucose zu einer Zunahme der erzielbaren Biomasse führt. Dabei wirkte sich die einmalige Zugabe von 5 g/L Glucose zum Medium nicht negativ auf die Enzymaktivität aus. In den folgenden Experimenten sollte versucht werden durch eine Erhöhung der Glucose-Konzentration eine weitere Steigerung der Biomasse zu erzielen. Zu diesem Zweck sollte in den Fermentern 4 und 5 die Glucose-Konzentration konstant auf 10 g/L und im Fermenter 6 konstant auf 5 g/L durch Nachführung von Glucose gehalten werden. Vorversuche mit Schüttelkolbenkulturen hatten gezeigt, dass Glucose einen negativen Einfluss auf die Mandelsäureproduktion ausüben kann. Aus diesem Grund sollte nach Erzielung der maximalen Zelldichte die Zugabe von Glucose eingestellt und die Kultivierung nach weiteren 10 h beendet werden. Damit sollte ein möglicher Einfluss der Glucose auf die nachfolgenden Aktivitätsassays minimiert werden. Da die Ausstattung im „SIAB“ eine kontinuierliche und automatische Anpassung der Glucose-Konzentration nicht zuließ, wurde versucht die Glucose-Konzentration manuell auf einem konstanten Niveau zu halten.

Unter den gewählten Bedingungen war es möglich eine maximale $OD_{600} = 13,44$ im Fermenter 5 (Abbildung 59 B) zu erzielen. Die in den anderen Fermentern erreichte Zelldichte lag mit $OD_{600} = 10,6$ (Fermenter 4) (Abbildung 59 A) und $OD_{600} = 11,8$ (Fermenter 6) (Abbildung 59 C) in der gleichen Größenordnung. Durch die zeitweilige Erhöhung der Glucose-Konzentration auf bis zu 17 g/L im Fermenter 4 oder 20 g/L im Fermenter 5 konnte die erzielte Zelldichte nicht weiter gesteigert

werden. Somit war es mit den getesteten Bedingungen möglich eine maximale Trockenzellmasse von ca. 6,8 g/L zu erzeugen. Da für die Kultivierung von *E. coli* Zelldichten von mehr als 100 g/L beschrieben worden sind (Lee, 1996), scheint es wahrscheinlich, dass ein noch unbekannter Faktor das Zellwachstum limitiert.

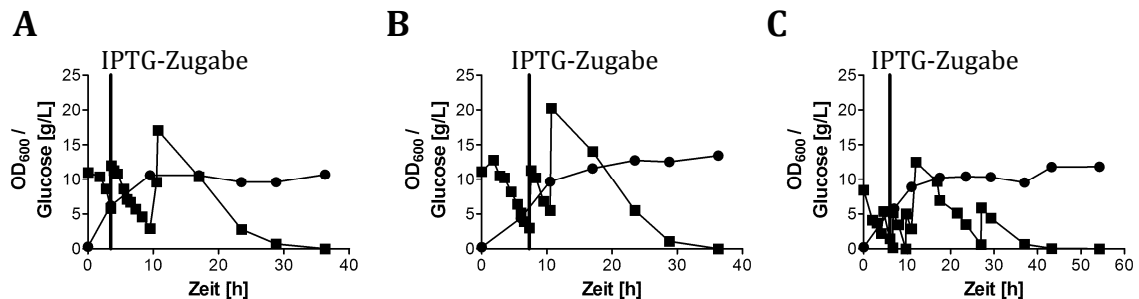


Abbildung 59: Wachstumskurve des Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003 und Konzentrationsverlauf der Glucose im Fermenter 4 (A), Fermenter 5 (B) und Fermenter 6 (C)
Entwicklung der OD₆₀₀ im Verlauf der Fermentation (●), Glucose-Konzentration [g/L] (■),

Die zu definierten Zeitpunkten aus den Fermentern entnommenen Zellen wurden auf eine OD₅₇₈ = 10 eingestellt und Aktivitätsassays durchgeführt. Dabei konnte mit den aus den jeweiligen Fermentern entnommenen Zellkulturen eine maximale Mandelsäureproduktion von 1,1 mM (Fermenter 4), 1,4 mM (Fermenter 5) und 1,5 mM (Fermenter 6) (Abbildung 60 A-C) erreicht werden. Die ermittelten Mandelsäureproduktionen der Fermenter bestätigen die Ergebnisse der Vorversuche in Bezug auf die inhibierende Wirkung von Glucose im Medium auf die Mandelsäureproduktion. Im Vergleich mit den Fermentern 1, 2 und 3, in denen nicht oder nur zu Beginn der Kultivierung Glucose zugefügt wurde, weisen die Fermenter 4, 5 und 6 eine deutlich verringerte Mandelsäureproduktion auf. Trotz Variation unterschiedlicher Kultivierungsparameter, wie die zur Proteinexpression verwendete IPTG-Konzentration (0,13 mM in den Fermentern 4 und 5 und 1 mM im Fermenter 6) und die zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgte Mercaptoethanol-Zugabe (Fermenter 4 zusammen mit IPTG, in den Fermentern 5 und 6 bereits zu Beginn der Kultivierung) blieb die maximal erreichbare Mandelsäureproduktion in allen drei Fermentern auf vergleichbarem Niveau.

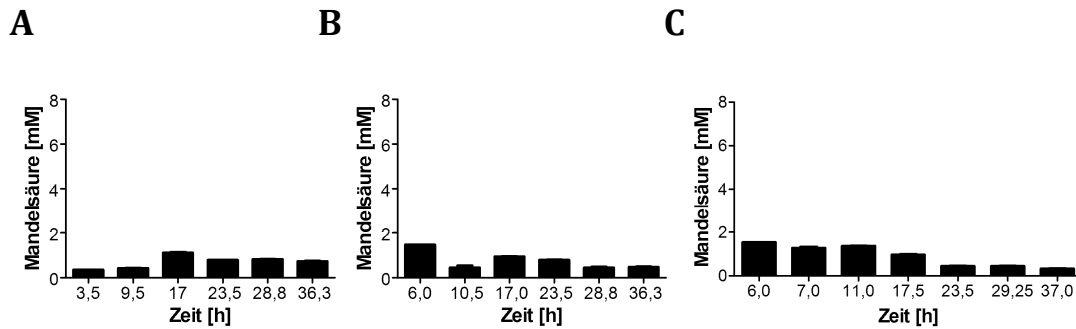


Abbildung 60: Mandelsäureproduktion der zu definierten Zeitpunkten aus dem Fermenter 4 (A), Fermenter 5 (B) und Fermenter 6 (C) entnommenen NitAf-AT tragenden *E. coli* BL21(DE3) pCD003 Zellen. Jede Säule im Diagramm stellt die Mandelsäureproduktion einer zu einem definierten Zeitpunkt aus dem Fermenter entnommenen Probe dar. Die entnommenen Bakterienzellsuspensionen wurden auf eine $OD_{578} = 10$ eingestellt und einem Aktivitätsassay mit 10 mM Mandelsäurenitril als Substrat unterzogen. Die Mandelsäureproduktion wurde nach 24 h bestimmt. ($n=3$; gezeigt sind $MW \pm SD$)

Fermenter 7

Die bisherigen Fermentationsprotokolle hatten lediglich zu einer maximalen $OD_{600} = 13,44$ geführt, dies entsprach einer Trockenzellmasse von ca. 6,8 g/L Fermentationslösung. Aus der Literatur sind für *E. coli* Zellen Trockenzellmassen weit über 100 g/L bekannt (Tripathi *et al.*, 2009). Dies legt das Vorhandensein eines wachstumslimitierenden Faktors nahe. Als mögliche Ursache erschien eine Unterversorgung an Spurenelementen wahrscheinlich. Um dieser Unterversorgung vorzubeugen wurde im Fermenter 7 zu Beginn der Kultivierung eine Spurenelementlösung zugesetzt.

Da die bisherigen Ergebnisse der Fermentationen nur einen geringen Einfluss der IPTG-Konzentration auf die Enzymaktivität vermuten ließen, wurde im Fermenter 7 komplett auf eine Zugabe verzichtet. Mercaptoethanol lag bereits zu Beginn der Fermentation vor und Glucose wurde in einer Konzentration von 5 g/L unter Nachführung zugesetzt.

Bis zu einer OD_{600} von 10,33 nach 11,75 h stieg die Zelldichte stark an (Abbildung 61 A). Trotz Supplementation von Spurenelementen konnte lediglich eine maximale Zelldichte von $OD_{600} = 10,65$ erreicht werden. Da eine Verlängerung der Inkubationsdauer nicht zu einer weiteren Biomassezunahme führte, wurde die Fermentation nach 17,25 h abgebrochen. Somit blieb die mit Supplementation von Spurenelementen erzielte Zelldichte hinter der des Fermenters 5 zurück. Dies lässt den Schluss zu, dass entweder keine Unterversorgung mit Spurenelementen vorgelegen hatte oder dass die gewählte Zusammensetzung nicht geeignet war.

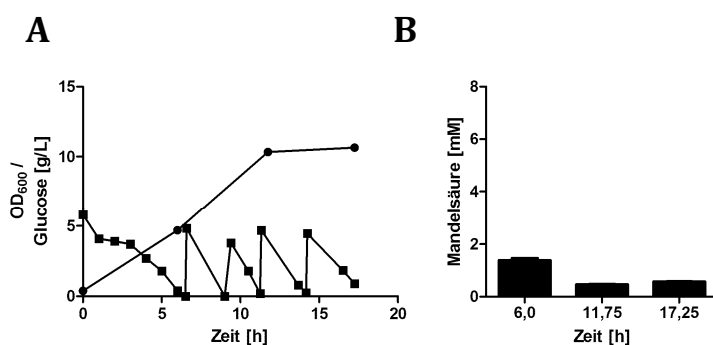


Abbildung 61: Wachstumskurve des NitAf-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003 und Konzentrationsverlauf der Glucose im Fermenter 7 (A), Mandelsäureproduktion einer normierten Zellsuspension (B). A= Entwicklung der OD₆₀₀ im Verlauf der Fermentation (●), Glucose-Konzentration [g/L] (■), B= Jede Säule im Diagramm stellt die Mandelsäureproduktion einer zu einem definierten Zeitpunkt aus dem Fermenter entnommenen Probe dar. Die entnommenen Bakterienzellsuspensionen wurden auf eine OD₅₇₈= 10 eingestellt und einem Aktivitätsassay mit 10 mM Mandelsäurenitril als Substrat unterzogen. Die Mandelsäureproduktion wurde nach 24 h bestimmt. (n=3; gezeigt sind MW±SD).

Mit den zu definierten Zeitpunkten entnommenen Proben wurde jeweils ein Aktivitätsassay durchgeführt. Die maximale Mandelsäureproduktion von 1,39 mM für eine auf OD₅₇₈ = 10 eingestellte Zellsuspension wurde für die nach 6 h entnommene Zellprobe gemessen (Abbildung 61 B). Die ermittelte maximale Mandelsäurekonzentration lag in dem Bereich der mit den Fermentern 4, 5 und 6 erzielten Mandelsäureproduktion. Somit scheint auch in diesem Fermenter die Mandelsäureproduktion durch Glucose verringert worden zu sein. Da auf eine Zugabe von IPTG während der Fermentation verzichtet wurde, muss die gemessene Aktivität auf die aus der Literatur bekannte Basalexpression zurückzuführen sein.

Raum-Zeit-Ausbeuten der jeweiligen Fermenter

Zur Beurteilung der Produktivität eines Fermenters wurde die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) bestimmt. Sie gibt eine Auskunft darüber, welche Mengen an Produkt innerhalb eines definierten Zeitraumes pro Volumen an Fermentationslösung produziert werden können. Im vorliegenden Fall wurde die Mandelsäureproduktion aller zu definierten Zeitpunkten aus dem jeweiligen Fermenter entnommenen Zellkulturen untersucht. Mit diesen Ergebnissen wurde dann die Menge an Mandelsäure in Gramm berechnet, die zu den jeweiligen Zeitpunkten der Kultivierung mit diesem Fermenter innerhalb von 24 h pro Liter Fermentationslösung erzeugt werden kann. Eine hohe RZA weist auf eine hohe Produktivität des jeweiligen Fermenters hin. Tabelle 18 zeigte eine Übersicht der Raum-Zeit-Ausbeuten an Mandelsäure der jeweiligen Fermenter in Abhängigkeit des Kultivierungsverlaufs.

Tabelle 18: Die berechneten Raum-Zeit-Ausbeuten der jeweiligen Fermenter

Fermenter	Zeitpunkt der Probenentnahme nach Beginn der Kultivierung [h]	RZA [g L ⁻¹ d ⁻¹]	Fermenter	Zeitpunkt der Probenentnahme nach Beginn der Kultivierung [h]	RZA [g L ⁻¹ d ⁻¹]
1	6,0	0,35	5	6,0	0,07
	8,5	0,32		10,5	0,06
	11,0	0,28		17,0	0,17
	17,5	0,28		23,5	0,15
	23,5	0,26		28,8	0,09
	29,25	0,29		36,3	0,09
	37,0	0,26	6	6,0	0,10
	43,25	0,25		7,0	0,10
	54,25	0,29		11,0	0,17
2	5,8	0,29		17,5	0,13
	8,8	0,28		23,5	0,06
	14,3	0,33		29,25	0,07
	18,4	0,24		37,0	0,04
3	8,8	0,59	7	43,25	0,06
	11,3	0,63		54,25	0,05
	14,3	0,56		6,0	0,10
	18,4	0,48		11,75	0,07
4	3,5	0,02		17,25	0,09
	9,5	0,06			
	17	0,17			
	23,5	0,12			
	28,8	0,12			
	36,3	0,11			

Die höchste RZA konnte für die Zellen bestimmt werden, die nach einer Kultivierungsdauer von 11,3 h mit den Bedingungen des Fermenters 3 erzeugt worden waren. Aus diesem Grund sollte das Kultivierungsprotokoll des Fermenters 3 zur Anzucht des Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003 in den folgenden Fermentationen verwendet werden.

4.4. Produktion von R-Mandelsäure im Fermenter

Nach der erfolgreichen Optimierung eines Kultivierungsprotokolls im Fermenter, sollten im nächsten Schritt mit diesem Protokoll kultivierte Zellen zur Umsetzung von Mandelsäurenitril zu R-Mandelsäure im Fermenter verwendet werden. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde sowohl die Kultivierung, als auch die anschließende Umsetzung in drei unabhängigen Fermentern (Fermenter 8, 9 und 10) unter identischen Bedingungen durchgeführt.

Der jeweilige Fermenter wurde mit 100 mL einer Vorkultur von *E. coli* BL21(DE3) pCD003 beimpft. Das zur Anzucht angewandte Arbeitsvolumen betrug jeweils 2 L. Dem als Medium verwendeten LB-Medium wurde Mercaptoethanol (10 mM) und Glucose (5 g/L) direkt zu Beginn der Fermentation zugefügt. Nach Erreichen einer $OD_{600} = 5$ wurde die Proteinbiosynthese durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. Nach 11 h wurde die Fermentation durch Zentrifugation der Zellen beendet. Zu diesem Zeitpunkt konnte im Fermenter 8 eine $OD_{600} = 5,91$ (Abbildung 62 A), im Fermenter 9 eine $OD_{600} = 5,78$ (Abbildung 62 B) und im Fermenter 10 eine $OD_{600} = 5,66$ (Abbildung 62 C) bestimmt werden. Damit lagen die in den Fermentern 8, 9 und 10 erzielten Zelldichten nahe an der $OD_{600} = 6,32$, die in der 1. Fermentationsstufe im Fermenter 3 realisiert werden konnte.

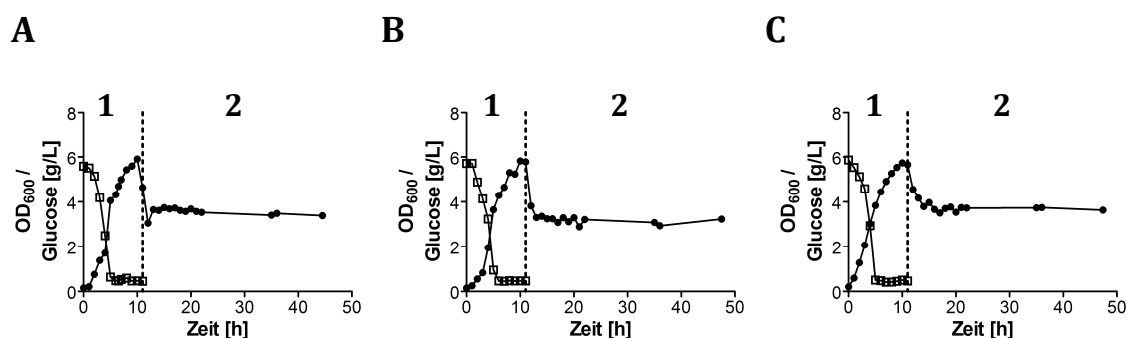


Abbildung 62: Wachstumskurve (●) des NitAf-AT tragenden Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003 während der Kultivierung (1) und während der Umsetzung (2), sowie Konzentrationsverlauf der Glucose (□) während der Kultivierung im Fermenter 8 (A), 9 (B) und 10 (C). Der Ganzzell-Biokatalysator wurde mit dem Protokoll aus dem Fermenter 2 kultiviert. Nach 11 h Fermentation (1) wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und in gleichem Volumen Na-Phosphat-Puffer pH 7,5 resuspendiert. Durch Zugabe von 10 mM Mandelsäurenitril wurde die Umsetzung für 24 h gestartet. Dargestellt sind Einfachbestimmungen.

Die mittels Zentrifugation geernteten Zellen wurden im gleichen Volumen 50 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,5 resuspendiert, auf 45 °C temperiert und wiederum in einen Fermenter überführt. Auffallend war hierbei der starke Abfall der Zelldichte von ca. $OD_{600} = 6$ zum Ende der Anzucht auf ca. $OD_{600} = 3,5$ nach Resuspension im Na-Phosphat-Puffer (Abbildung 62). Da die Zellen im gleichen Volumen Puffer

resuspendiert wurden, wie sie kultiviert wurden, wäre eine konstante Zelldichte zu erwarten gewesen. Eine einfache Erklärung für den hohen Verlust an Bakterienzellen könnte in einer unzureichenden Sedimentation der Zellen liegen.

Die Umsetzung im Fermentationsmaßstab wurde durch Zugabe von Mandelsäurenitril in einer Endkonzentration von 10 mM zum jeweiligen Fermenter und Inkubation bei 45 °C und 150 rpm für 24 h gestartet. Während der Umsetzung wurde auf eine Belüftung der Fermenter verzichtet, um entstehende Blausäure nicht auszutreiben. Zu definierten Zeitpunkten wurden zur Dokumentation der Umsetzung Proben entnommen. Dabei wurden die Zellen durch Sedimentation und Sterilfiltration entfernt und die zellfreien Überstände auf Trockeneis versandt. Die HPLC-Analytik wurde im Institut der Pharmazeutischen und Medizinischen Chemie, Abteilung Bioanalytik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Auswertung der Umsetzungen ergab für den Fermenter 8 (Abbildung 63 A) zum Ende des Beobachtungszeitraumes eine maximale Mandelsäureproduktion von 1,85 mM. Unter gleichen Bedingungen konnte für den Fermenter 9 (Abbildung 63 B) eine Mandelsäureproduktion von 2,03 mM und für Fermenter 10 (Abbildung 63 C) eine Mandelsäureproduktion von 2,3 mM nachgewiesen werden. Dies entsprach einer Raum-Zeit-Ausbeute für den Fermenter 8 von $0,28 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, für den Fermenter 9 von $0,3 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und für den Fermenter 10 von $0,35 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

Die Untersuchung der Enantiomerenüberschüsse (ee) ergab für die im Fermenter 8 produzierte R-Mandelsäure einen ee von 96,2 %, für den Fermenter 9 von 95,8 % und für den Fermenter 10 von 97,5 % R-Mandelsäure. Somit konnte in jedem Fermenter Mandelsäure mit einem hohen Enantiomerenüberschuss produziert werden.

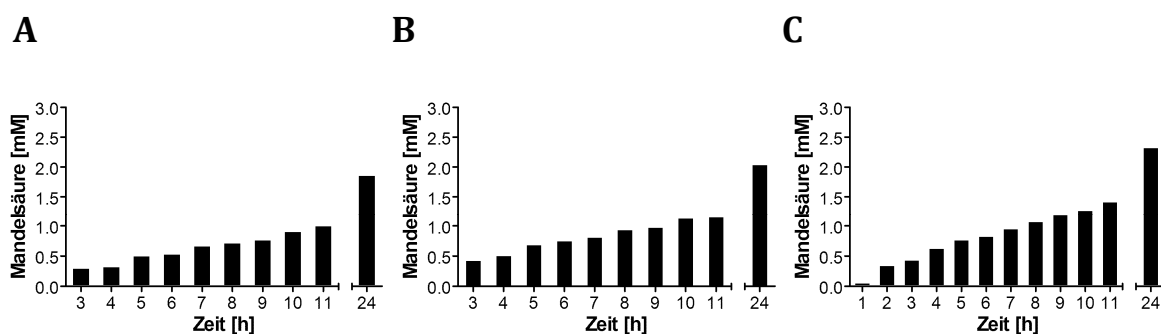


Abbildung 63: Zeitlicher Verlauf der Mandelsäureproduktion während der Umsetzung in den Fermentern 8 (A), 9 (B) und 10 (C). (n=1)

VI. Diskussion

Die in den letzten Jahren stark steigende Zahl an Publikationen, die sich mit Nitrilasen befassen, zeigt das große Interesse an dieser Enzymklasse (Martínková *et al.*, 2009). Dieses Interesse begründet sich auf ihrer Fähigkeit zur enantio- und regioselektiven Synthese von Carbonsäuren unter milden Bedingungen (Martínková und Křen, 2010). Damit bieten sich Nitrilasen als ökonomische Alternative zu klassischen chemischen Katalysatoren an. Trotz der genannten Vorteile wurden bisher lediglich zwei industrielle Verfahren realisiert, in denen Nitrilasen als Katalysatoren Verwendung finden (Polaina und MacCabe, 2007). Dies lässt sich darauf zurückführen, dass Nitrilasen häufig aufgrund geringer Aktivität, geringer Stabilität oder falschem Substratspektrum nicht oder nur eingeschränkt in einem industriellen Prozess verwendbar sind (Martínková und Křen, 2010). Bisher wurden Nitrilasen als aufgereinigte oder immobilisierte Enzyme, sowie als Ganzzell-Biokatalysatoren eingesetzt. In dieser Arbeit wurde ein neuer Ansatz verfolgt, um die CN-Hydrolaseaktivität von Nitrilasen zur Umsetzung von Nitrilen zu Carbonsäuren einfach zugänglich zu machen. Die untersuchten Nitrilasen sollten mittels Autodisplay auf der Zelloberfläche von *E. coli* präsentiert und auf ihre biokatalytische Aktivität hin untersucht werden. Diese Technologie vereint die Vorteile einer Immobilisierung mit den Vorteilen eines Ganzzell-Ansatzes. So steht das Enzym in direktem Kontakt mit seinem Substrat, ohne störende Diffusionsbarrieren. Eine kostenintensive Aufreinigung der Enzyme entfällt. Aufgrund der selbstreplikativen Eigenschaften der *E. coli* Zellen steht der Katalysator in fast unbegrenzter Kapazität zur Verfügung und kann bei Bedarf einfach aus dem Reaktionsansatz entfernt werden (Jose, 2006). Durch die erfolgreiche Oberflächenpräsentation einer großen Anzahl heterogener Passagiere wie z.B. Esterasen (Schultheiss *et al.*, 2002; Schultheiss *et al.*, 2008), Hyaluronidasen (Kaeßler, 2009), Kinasen (Gratz, 2010), β -Lactamasen (Lattemann *et al.*, 2000) und Sorbitoldehydrogenasen (Jose und von Schwichow, 2004) hat das Autodisplay-System seine Leistungsfähigkeit unter Beweis gestellt.

1. Enzymaktivität von Nitrilasen im Autodisplay-System

Die in diesem Rahmen untersuchten Nitrilasen aus *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* ATCC8750 (NitAf), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* (NitKp) und die putative Nitrilase aus *Saccharomyces cerevisiae* (NitSc) konnten erfolgreich mittels Autodisplay auf der Zelloberfläche von *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* UT5600(DE3) präsentiert werden. Die Enzyme können als auf der Oberfläche immobilisiert

vorliegend angesehen werden und stehen nun einem Einsatz als Ganzzell-Biokatalysator zur Verfügung.

Für die putative Nitrilase aus *S. cerevisiae* standen keinerlei Literaturdaten zur Substratspezifität zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde zum Nachweis einer Nitrilaseaktivität ein repräsentatives Spektrum an aromatischen, aliphatischen und arylaliphatischen Substanzen auf eine Akzeptanz als NitSc-AT Substrat hin untersucht. Weder mit dem verwendeten kolorimetrischen, noch mit dem HPLC-Verfahren war es möglich für den NitSc-AT tragenden Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCD001 eine Umsetzung mit einer der untersuchten Substanzen nachzuweisen. Eine einfache Erklärung dafür könnte darin bestehen, dass das freie Enzym NitSc und somit NitSc-AT über keinerlei Nitrilaseaktivität verfügt. Die Einordnung des Enzyms NitSc in die Enzymklasse der Nitrilasen erfolgte lediglich aufgrund von Sequenzhomologien, nicht aufgrund einer nachgewiesenen Nitrilasereaktion. Zwar ist die Zuordnung eines Enzyms aufgrund von sequenzspezifischen Merkmalen zur heterogen zusammengesetzten „nitrilase-superfamily“ möglich, nicht jedoch die genaue Einordnung in die Unterklassen dieser Superfamilie. Aus diesem Grund wurde diese Einordnung oft willkürlich und häufig fälschlicherweise getroffen (Pace und Brenner, 2001). Eine falsche Einordnung wird umso wahrscheinlicher, wenn man berücksichtigt, dass nur eine der 13 Unterklassen der „nitrilase superfamily“ über Nitrilaseeigenschaften verfügt. Der Großteil, 8 Klassen, verfügt über Amidaseeigenschaften (Pace und Brenner, 2001). Setzt man deshalb eine Amidaseaktivität voraus, so wäre das Produkt der Umsetzung eines Nitrils mit dem Enzym NitSc das korrespondierende Amid und nicht die Carbonsäure und Ammoniak wie bei einer Nitrilaseaktivität. Das verwendete kolorimetrische Verfahren basierte jedoch auf der Detektion, des bei einer Nitrilasereaktion freigesetzten Ammoniak, zum Nachweis einer enzymatischen Aktivität. Eine mögliche Umsetzung der aliphatischen Substrate zum korrespondierenden Amid, die mit diesem Verfahren untersucht wurden, wäre deshalb nicht nachweisbar gewesen.

Setzt man jedoch eine Nitrilaseaktivität des Enzyms NitSc-AT voraus, so ergeben sich weitere mögliche Ursachen für die nicht nachweisbare Aktivität. So könnten eine zu geringe Enzymkonzentration oder unpassende Substrate dafür verantwortlich sein. Obwohl keinerlei Literaturdaten zu den Eigenschaften von NitSc zur Etablierung eines Aktivitätstests zur Verfügung standen, sind falsche Reaktionsbedingungen als Ursache für die fehlende Enzymaktivität eher unwahrscheinlich. Denn die gewählte Reaktionstemperatur von 37 °C entspricht dem Optimum der meisten Nitrilasen, die eher mesophil sind. Auch die gewählten Pufferbedingungen mit einem pH Wert von 7,5 entsprechen dem Optimum der meisten Nitrilasen, die häufig im neutralen bis

leicht basischen aktiv sind (Cowan *et al.*, 1998). Wahrscheinlicher ist, dass unter den untersuchten acht Verbindungen keines der Substratspezifität von NitSc-AT entsprach.

Im Gegensatz dazu konnte sowohl für den NitKp-AT tragenden Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCD002, als auch für den NitAf-AT tragenden Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCD003 eine Nitrilaseaktivität nachgewiesen werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Nitrilasen von wenigen Ausnahmen abgesehen, als inaktive Dimere in Lösung vorliegen, wobei das funktionelle Enzym durch Zusammenlagerung von Dimeren zu geradzahligen Vielfachen gebildet wird (Nagasawa *et al.*, 2000; Thuku *et al.*, 2009). Es gibt nur wenige Ausnahmen von dieser Regel. So ist lediglich von der Nitrilase aus *Arthrobacter* sp. J1 (Bandyopadhyay *et al.*, 1986) und der Nitrilase aus *Rhodococcus rhodochromus* PA-34 bekannt (Bhalla *et al.*, 1992), dass sie bereits als Monomere aktiv sind. Und nur von der Nitrilase aus *Pyrococcus abyssi* (Mueller *et al.*, 2006), sowie der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Nitrilase NitKp (Stalker *et al.*, 1988a) ist bekannt, dass sie in ihrer aktiven Form als Dimere vorliegen. Die anderen bisher charakterisierten Nitrilasen stellen multihomomere Enzyme mit typischerweise 4-22 Untereinheiten dar (Thuku *et al.*, 2009). Die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Nitrilase NitAf ist ein aus bis zu 14 identischen Untereinheiten bestehendes multihomomeres Enzym (Yamamoto *et al.*, 1992). Da die Autodisplay-Fusionsproteine als Monomere exprimiert werden, lässt die nachgewiesene Enzymaktivität der beiden Ganzzell-Biokatalysatoren auf eine Zusammenlagerung der Monomere zum funktionellen Enzym auf der Zelloberfläche von *E. coli* schließen. Dies wäre aufgrund der Beweglichkeit der β -barrel-Domäne in der Außenmembran von *E. coli* (Müller *et al.*, 2005) prinzipiell möglich. Durch die funktionelle Oberflächenexpression von bovinem Adrenodoxin (Adx) (Jose *et al.*, 2002) und der homodimeren Sorbitoldehydrogenase (SDH) (Jose und von Schwichow, 2004) konnte die passagiervermittelte Aggregation zu Dimeren für das Autodisplay-System bereits nachgewiesen werden. Für die Proteinkinase CK2 konnten sogar Hinweise für die funktionelle Zusammenlagerung eines Hetero-Tetramers gefunden werden (Gratz, 2010). Zum gegenwärtigen Stand der Forschung kann jedoch keine Aussage über die tatsächliche Struktur der auf der Zelloberfläche vorliegenden Komplexe getroffen werden. Es wäre denkbar, dass die nachgewiesene Aktivität auf das Vorkommen von Enzymkomplexen mit unterschiedlichem Oligomerisierungsgrad zurückzuführen ist. Die Beobachtung von Goldlust und Bohak (1989) würde diese These bestärken. Sie konnten für die fungale Nitrilase aus *Fusarium oxysporum* nachweisen, dass Enzymaktivität nicht auf ein definiertes Oligomer beschränkt war, sondern dass alle untersuchten Komplexe, vom Tetramer bis hin zum 22-mer, eine Enzymaktivität

aufwiesen. Es sind daher noch weitere Untersuchungen notwendig, um die tatsächliche Struktur dieser Komplexe aufzuklären.

Untersuchungen zum Einfluss der Oberflächenpräsentation auf die Enantioselektivität eines Enzyms konnten nur für NitAf-AT durchgeführt werden. Für NitKp-AT waren keinerlei chirale Substrate bekannt. Yamamoto *et al.* (1992) wiesen nach, dass das freie Enzym NitAf racemisches Mandelsäurenitril enantioselektiv zu annähernd 100 % zu R-Mandelsäure umsetzt. Kaul *et al.* (2006) konnten darüber hinaus belegen, dass die Enantioselektivität des Enzyms NitAf temperaturabhängig ist. So sank der Enantiomerenüberschuss von 99 % bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C auf 96,5 % bei einer Reaktionstemperatur von 45 °C. Für NitAf-AT konnte bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C ebenfalls ein Enantiomerenüberschuss von mehr als 99 % bestimmt werden. Im Unterschied zu den Ergebnissen von Kaul *et al.* führten Umsetzungen im Mikroreaktionsmaßstab mit der oberflächenpräsentierten NitAf-AT weder bei Verwendung einer Reaktionstemperatur von 42 °C noch bei 45 °C zu einer unerwünschten Produktbildung von S-Mandelsäure.

Demgegenüber führte die Umsetzung von Mandelsäurenitril durch NitAf-AT im Fermenter bei einer Reaktionstemperatur von 45 °C zu einem S-Mandelsäureanteil von 1,75 %. Dies entspricht einem Enantiomerenüberschuss von 96,5 % für das R-Enantiomer, der somit genau mit dem von Kaul *et al.* (2006) ermittelten Enantiomerenüberschuss für das freie Enzym NitAf übereinstimmt. Eine einfache Erklärung für die unterschiedlichen Werte der ermittelten Enantiomerenüberschüsse für NitAf-AT könnte darin bestehen, dass die im Mikroreaktionsmaßstab erzeugte Menge an Mandelsäure zu gering war um eventuell produzierte S-Mandelsäure in der Größenordnung unter 2 % nachzuweisen. Ein Verlust des S-Mandelsäureanteils während der Probenvorbereitung kann ausgeschlossen werden, da bei einer Ethylacetat-Extraktion nicht zwischen den beiden Enantiomeren diskriminiert werden kann. Fasst man die bisherigen Ergebnisse zusammen, kann daraus geschlossen werden, dass die Oberflächenpräsentation von NitAf-AT keinen Einfluss auf die Enantioselektivität ausübt.

2. Einfluss der Oberflächenpräsentation auf die Substratspezifität

Die Bestimmung der Substratspezifität erfolgte für NitKp-AT mit den bereits für das freie Enzym NitKp bekannten Substraten Bromoxynil, Chloroxynil, Ioxynil und 3-Brom-4-hydroxybenzonitril (Stalker *et al.*, 1988a). Alle untersuchten Verbindungen wurden als Substrat akzeptiert. Fasst man die dabei gewonnenen Erkenntnisse

zusammen, ist eine Tendenz für die Substratspezifität des Fusionsproteins NitKp-AT erkennbar. So wurde das einfach in meta-Position halogenierte Substrat 3-Brom-4-hydroxybenzonitril 10 mal schlechter umgesetzt, als das zweifach-halogenierte Bromoxynil. Desweiteren zeigte NitKp-AT eine Vorliebe für Substrate mit stark elektronegativen Resten in meta-Position. Deshalb wurde Ioxynil schlechter umgesetzt als Bromoxynil, während Chloroxynil die höchste Umsetzung aufwies (Tabelle 13). Damit zeigte das oberflächenpräsentierte Enzym NitAf-AT die gleiche Substratspezifität wie das freie Enzym NitAf.

Der Umstand, dass bisher nur Brom-, Iod- und Chlor-halogenierte Substanzen als Substrate beschrieben wurden (Stalker *et al.*, 1988a), ließ die Frage aufkommen, ob auch fluoridierte Verbindungen durch NitKp-AT umgesetzt werden können. Da die Substanz 3,5-Difluor-4-hydroxybenzonitril nicht verfügbar war, wurde das einfach fluoridierte 3-Fluor-4-hydroxybenzonitril als Substrat eingesetzt. Tatsächlich konnte eine Umsetzung zu dem erwarteten Produkt 3-Fluor-4-hydroxybenzoesäure festgestellt werden. Dabei zeigte NitKp-AT unter gleichen Bedingungen eine mehr als drei Mal so hohe Umsetzung des Substrates 3-Fluor-4-hydroxybenzonitril im Vergleich zu 3-Brom-4-hydroxybenzonitril. Dies bestätigte die These, dass ein elektronegativerer Substituent in meta-Position einen positiven Einfluss auf die Umsetzung ausübt. Durch die erfolgreiche Umsetzung von 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzonitril konnte das Substratspektrum für NitKp-AT auch auf nichthalogenierte Verbindungen ausgeweitet werden. Ob die Akzeptanz fluoridierter Substrate auf die Oberflächenpräsentation zurückzuführen ist kann zum derzeitigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Handel (2003) stellte einen Unterschied der Substratspezifität zwischen oberflächenpräsentierter Sorbitoldehydrogenase und dem freien Enzym fest. So akzeptierte das mittels Autodisplay oberflächenpräsentierte Enzym im Gegensatz zum freien Enzym D-Xylose als Substrat. Als mögliche Erklärung diskutierte Handel eine Konformationsänderung des oberflächenpräsentierten Enzyms aufgrund der Bindung an den Membrananker, was zu einer Abnahme der Substratspezifität führte. Zur abschließenden Beantwortung dieser Frage wären weitergehende Untersuchungen mit dem aufgereinigten Enzym NitKp notwendig. Von den untersuchten Verbindungen wurde lediglich 4-Methoxybenzonitril nicht als Substrat akzeptiert.

Durch die Experimente dieser Arbeit konnte das für NitKp untersuchte Substratspektrum für NitKp-AT auch auf fluoridierte und nicht-halogenierte Verbindungen ausgeweitet werden. Durch die ausgeprägte Substratspezifität von NitKp-AT gegenüber Oxynil-Herbiziden (Bromoxynil, Chloroxynil und Ioxynil), wäre eine Verwendung des erzeugten Ganzzell-Biokatalysators zur Detoxifikation von

Herbizid-haltigen Abwässern oder Böden denkbar. Aufgrund des großflächigen Einsatzes von Oxynil-Herbiziden zur Kontrolle von Unkraut im Getreideanbau (USA: ca. 1800-2200 t pro Jahr) kann es zur Kontamination von Trinkwasser mit Oxynil-Herbiziden bzw. den jeweiligen Abbauprodukten wie z.B. Amiden kommen (Holtze *et al.*, 2008). Eine Umwandlung der Herbizide in die korrespondierenden Carbonsäuren und Ammoniak hätte den Vorteil einer verminderten Toxizität und Persistenz dieser Substanzen in der Natur (Veselá *et al.*, 2010). Oberflächenpräsentationssysteme haben schon mehrfach ihre prinzipielle Eignung zur mikrobiologischen Dekontamination bewiesen. Dabei wurde bisher vor allem die Degradation von Organophosphaten untersucht. Bei diesen Substanzen handelt es sich um neurotoxische Verbindungen, die als Pestizide eine breite Anwendung sowohl in der Landwirtschaft als auch im häuslichen Bereich finden (Chen und Georgiou, 2002). So konnten z.B. Richins *et al.* (1997) eine 7-fach höhere Umsetzung von Organophosphaten für eine oberflächenpräsentierte Organophosphat-Hydrolase bestimmen im Vergleich zu einem Ganzzell-Biokatalysator, der das Enzym intrazellulär exprimierte.

3. Biochemische Charakterisierung von NitAf-AT und NitKp-AT

3.1. Einfluss des pH auf die Aktivität der oberflächenpräsentierten Nitrilasen

Das freie Enzym NitKp weist ein Aktivitätsoptimum bei einem pH-Wert von 9,2 auf (Stalker *et al.*, 1988a). Die Verwendung eines pH-Wertes außerhalb des relativ kleinen pH-Bereiches von 8,5-9,5 führt zu einer starken Erniedrigung der Enzymaktivität auf unter 50 % im Vergleich zum pH-Optimum (Stalker *et al.*, 1988a). Diese Begrenzung auf einen kleinen pH-Bereich in dem das Enzym NitKp eine hohe Enzymaktivität besitzt, stellt eine Einschränkung der Verwendbarkeit dieses Enzyms in einem industriellen Prozess dar. Durch die Immobilisierung des Enzyms NitKp-AT mittels Autodisplay auf der Zelloberfläche von *E. coli* konnte der pH-Bereich, in dem das Enzym mehr als 50 % seiner maximalen Aktivität besitzt auf pH 7-9 ausgeweitet werden, was den Einsatz dieses Enzyms in der Biokatalyse vereinfacht.

Demgegenüber zeigte das oberflächenpräsentierte Enzym NitAf-AT im pH-Bereich von 5,5-9 die gleiche pH-Abhängigkeit der Mandelsäureproduktion wie das von Yamamoto *et al.* (1992) untersuchte freie Enzym NitAf. So zeigten beide Enzyme ein pH-Optimum bei 7,5 und eine Abnahme der relativen Aktivität auf ca. 45 % bei pH 5 und ca. 60 % bei pH 9. Wie Vergleiche mit der Literatur zeigen, scheint sich der pH

unterschiedlich auf die oberflächenpräsentierten Enzym auszuwirken. Während Ito *et al.* (2008) für eine auf *S. cerevisiae* oberflächenpräsentierte β -Glucosidase eine höhere pH-Stabilität im Sauren bei pH 2 im Vergleich zum sezernierten Enzym feststellen konnten, war für Harnpicharnchai *et al.* (2010) kein Unterschied zwischen der auf *Pichia pastoris* oberflächenpräsentierten Phytase und dem nativen Enzym bestimmbar. Die bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass keine allgemeingültigen Aussagen über den Einfluss des pH auf die Aktivität der oberflächenpräsentierten Enzyme getroffen werden können, sondern dass dies für jeden einzelnen Passagier empirisch bestimmt werden muss.

3.2. Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Aktivität der oberflächenpräsentierten Nitrilasen

Das freie Enzym NitKp besitzt ein Temperaturoptimum bei 35 °C (Stalker *et al.*, 1988a). Für NitKp-AT konnte jedoch mit 45 °C ein zu höheren Temperaturen hin verschobenes Aktivitätsoptimum bestimmt werden. Durch eine Umsetzung bei dieser Reaktionstemperatur konnte mit Bromoxynil als Substrat eine 2-fach höhere Produktbildung erzielt werden im Vergleich zu einer Umsetzung bei 35 °C.

Im Gegensatz dazu wies NitAf-AT mit 45 °C das gleiche Temperaturoptimum auf wie das freie Enzym NitAf (Yamamoto *et al.*, 1992), jedoch führte die Verwendung einer höheren Reaktionstemperatur zu einer deutlich geringeren Abnahme der Produktbildung im Vergleich zum freien Enzym. Während sich die Produktbildung von NitAf-AT bei 50 °C im Vergleich zu 45 °C lediglich um 2 % verringerte, sank die Produktbildung von NitAf um 30 %. Aus den bisherigen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Immobilisierung eines Enzyms mittels Autodisplay auf der Zelloberfläche von *E. coli* zu einer geringeren Temperatursensitivität der Produktbildung im Vergleich zum freien Enzym führt. Für eine auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* präsentierte β -Glucosidase aus *Aspergillus oryzae* konnte ebenfalls eine verringerte Temperatursensitivität der Produktbildung ermittelt werden (Ito *et al.*, 2008). Fasst man die bisherigen Ergebnisse zusammen, so führt die Oberflächenpräsentation eines Enzyms mittels Autodisplay zu einer Vergrößerung des Temperaturbereiches in dem das Enzym effektiv eingesetzt werden kann und erhöht somit die Verwendbarkeit dieses Enzyms in der Biokatalyse.

3.3. Einfluss der Oberflächenpräsentation auf den K_m -Wert

Aufgrund fehlender Diffusionsbarrieren wie z.B. Zellwänden zwischen Enzym und Substrat weisen freie Enzyme niedrigere K_m -Werte auf, als Enzyme die intrazellulär lokalisiert sind. Kim *et al.* (2006) konnten z.B. nach Aufschluss der Zellen für eine

rekombinant in *Pichia pastoris* exprimierte Epoxid-Hydrolase eine Verringerung des K_m -Wertes um mehrere Potenzen im Vergleich zu den intakten Zellen bestimmen. Durch die Oberflächenpräsentation eines Enzyms wird ebenfalls eine freie Diffusion des Substrates zum Enzym ohne störende Barrieren ermöglicht (Jung *et al.*, 2006). Übertragen auf das Autodisplay-System bedeutet dies, dass ein oberflächenpräsentiertes Enzym einen K_m -Wert in der gleichen Größenordnung aufweisen müsste wie das freie Enzym. Bei der Bestimmung des K_m -Wertes von NitAf-AT war es aufgrund der ausgeprägten Substratinhibition des verwendeten Substrates Mandelsäurenitril bei Konzentrationen über 10 mM nicht möglich den Konzentrationsbereich bis zur 10-fachen Konzentration des erwarteten K_m -Wertes abzudecken (Bisswanger, 2008). Dennoch lag der für NitAf-AT bestimmte K_m -Wert mit 2,75 mM bzw. 3,64 mM in der gleichen Größenordnung wie der von Yamamoto *et al.* (1992) für das freie Enzym bestimmte Wert von 5,75 mM. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die nachgewiesene Nitrilaseaktivität tatsächlich auf ein oberflächenpräsentiertes Enzym zurückzuführen ist, bei dem keinerlei Barrieren die Diffusion des Substrats zum Enzym behindern.

3.4. Lagerstabilität NitAf-AT tragender Zellen

Ein weiterer wichtiger Parameter zur Charakterisierung eines Ganzzell-Biokatalysators ist die Lagerstabilität. Zur Bestimmung dieses Parameters wurden Zellproben von *E. coli* BL21(DE3) pCD003 bei 6 °C, -18 °C und -70 °C gelagert und zu definierten Zeitpunkten einer Aktivitätsbestimmung unterzogen. Dabei scheint die Abnahme der Enzymaktivität von NitAf-AT bei einer Lagerung bei 6 °C einen zweiphasigen Verlauf zu nehmen. In der ersten Phase konnte ein starker Abfall der Enzymaktivität um 54 % innerhalb der ersten acht Tage beobachtet werden. Im weiteren Verlauf, bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nach 37 Tagen, nahm die Enzymaktivität lediglich um weitere 10 % ab.

Als mögliche Erklärung für dieses Phänomen wurde die Existenz zweier unterschiedlicher Populationen postuliert, die sich im Hinblick auf die Temperatursensitivität ihrer Nitrilaseaktivität unterschieden. Zur Isolierung der kälteunempfindlicheren Population wurden Zellen für 30 Tage in Phosphatpuffer bei 6 °C gelagert. Im Anschluss wurden mit dieser Kultur Agar-Platten beimpft. Von den entstandenen Kolonien wurden drei kultiviert und erneut einer Prüfung der Lagerstabilität unterzogen. Die so behandelten Kulturen zeigten die gleiche zweiphasige Abnahme der Nitrilaseaktivität, wie die ursprünglichen Kulturen. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass es sich um eine Population handelt.

Eine plausiblere Erklärung für die zweiphasige Abnahme der Nitrilaseaktivität könnte in der Annahme von unterschiedlich stabilen NitAf-AT-Komplexen auf der Zelloberfläche von *E. coli* liegen. Die Beobachtung von Goldlust und Bohak (1989) würde diese These stützen. Sie konnten für die fungale Nitrilase aus *Fusarium oxysporum* nachweisen, dass Enzymaktivität nicht auf ein definiertes Oligomer beschränkt war, sondern dass alle untersuchten Komplexe, vom Tetramer bis hin zum 22-mer, eine Enzymaktivität aufwiesen. Weiterhin wäre es denkbar, dass sich diese unterschiedlichen Enzymkomplexe hinsichtlich ihrer Stabilität unterscheiden. Für das Enzym „rabbit muscle triosephosphate isomerase“ (TIM) konnte gezeigt werden, dass eine Dimerisierung mit einer stark erhöhten chemischen Stabilität gegenüber dem Monomer einherging (Rietveld und Ferreira, 1998). Übertragen auf die hier gewonnenen Erkenntnisse würde dies bedeuten, dass in der ersten Phase der Lagerung, der schnelle Aktivitätsverlust auf die Inaktivierung der weniger stabilen Komplexe zurückzuführen ist, während in der zweiten Phase die erhöhte Stabilität der Enzyme mit einem höheren Oligomerisierungsgrad für die deutlich langsamer stattfindende Aktivitätsabnahme verantwortlich ist. Da aus der Literatur keinerlei Untersuchungen zu den Eigenschaften von Nitrilasekomplexen unterschiedlichen Oligomerisierungsgrades bekannt sind, bedarf es weiterer Untersuchungen um diese These zu überprüfen.

Unter den untersuchten Lagerungsbedingungen stellte eine Lagerung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ das Optimum dar. So blieb die Aktivität innerhalb des getesteten Zeitraums von 180 Tagen annähernd konstant. Somit steht mit der Lagerung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem 50 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,5 eine Lagerungsform zur Verfügung, die eine hohe Aktivität des Ganzzell-Biokatalysators über einen langen Zeitraum gewährleistet.

3.5. Wiederverwendbarkeit von NitAf-AT tragenden Zellen und Vergleich mit anderen Immobilisierungstechniken

Häufig beeinträchtigt eine zu geringe Stabilität der eingesetzten Enzyme die Wirtschaftlichkeit einer biokatalytischen Reaktion. Eine gängige Methode zur Erhöhung der Enzymstabilität und somit der Wiederverwendbarkeit stellt die Immobilisierung dar (Sheldon, 2007). Ein neuer Ansatz der Immobilisierung ist die Oberflächenpräsentation von Enzymen mittels Autodisplay. Dabei kann das Enzym als auf einem festen Träger (Zelle) immobilisiert vorliegend angesehen werden (Jose, 2006). Die Untersuchung der Wiederverwendbarkeit sollte Aufschluss darüber geben, ob die Oberflächenpräsentation mittels Autodisplay einen Vorteil gegenüber etablierten Verfahren bietet.

Nach 5 aufeinanderfolgenden Reaktionszyklen (120 h Gesamtdauer) konnte eine maximale Restaktivität von 58 % bezogen auf die unter diesen Bedingungen im 1. Reaktionszyklus erreichte Produktbildung erzielt werden. *A. faecalis* Zellen zeigten im Gegensatz dazu nach 120 h zyklischer Wiederverwendung keinerlei Umsetzung von Mandelsäurenitril mehr (Kaul *et al.*, 2006). Dies bedeutet, dass die Oberflächenpräsentation von NitAf-AT auf *E. coli* zu einer höheren Nitrilasestabilität führt als eine intrazelluläre Lokalisation der Nitrilase in *A. faecalis* Zellen. Ein Vergleich der Stabilitäten von NitAf-AT mit NitAf, das mittels „cross-linking“ immobilisiert vorlag (Kaul *et al.*, 2007), waren aufgrund ungenügender Datenlage nicht möglich. Die Verwendung der „cross-linking“-Methode zur Immobilisierung scheint gerade bei Nitrilasen mit einer teilweise deutlichen Reduktion der Enzymaktivität einherzugehen. So konnten Mateo *et al.* (2004) für die aufgereinigten Nitrilasen aus *Pseudomonas fluorescens* und der Nitrilase 1004 von BioCatalytics (Pasadena, CA) keinerlei Enzymaktivität nach der Quervernetzung mit Glutaraldehyd detektieren. Erst durch einen Wechsel des Vernetzungsreagenzes konnten sie 50 bzw. 60 % der ursprünglichen Aktivität wiedergewinnen. Als mögliche Erklärung für dieses Phänomen diskutieren die Autoren eine Reaktion zwischen Glutaraldehyd und den für die Katalyse essentiellen Aminosäuren des Enzyms.

Eine weitere häufig angewandte Immobilisierungsmethode stellt das „Entrapment“ dar. Almatawah und Cowan (1999) konnten z.B. durch Einschluss von *Bacillus pallidus* Zellen in ein Calcium-Alginat-Polymer die Temperaturstabilität der Nitrilase bei 60 °C im Vergleich zu den freien Zellen signifikant erhöhen. Trotz der Vorteile dieser Methode, die in einer schnellen und kostengünstigen Herstellung der immobilisierten Katalysatoren liegt, ist diese Immobilisierungstechnik nicht auf alle Enzyme anwendbar. Durch die Notwendigkeit, die Enzym- bzw. Zelllösung zu erhitzen, um ein vorzeitiges Gelieren der Polymerlösung zu verhindern, können gerade temperaturlabile Enzyme bereits durch den Herstellungsprozess stark in ihrer Aktivität eingeschränkt werden. Erschwerend kommt hinzu, dass eine Immobilisierung mittels „Entrapment“ häufig mit einer verringerten Reaktionsgeschwindigkeit einhergeht, da die erzeugte Polymerkapsel, die das Enzym umschließt, eine Diffusionsbarriere zwischen dem Enzym und dem Substrat darstellt (Brady und Jordaan, 2009).

Im Gegensatz dazu belegen die bisherigen Untersuchungen mit NitKp-AT und NitAf-AT tragenden Zellen, dass die Immobilisierung auf der Oberfläche von *E. coli* mittels Autodisplay im Vergleich zu anderen Immobilisierungstechniken nicht zu unerwünschten Veränderungen der Enzymeigenschaften führt. Die erhöhte Wiederverwendbarkeit des NitAf-AT tragenden Stamms *E. coli* BL21(DE3) pCD003

im Vergleich zu nicht-immobilisierten *A. faecalis* Zellen bestätigt die These, dass Autodisplay eine interessante Alternative zu etablierten Immobilisierungstechniken darstellt. Ein weiterer Vorteil der Immobilisierung mittels Autodisplay ist dessen Einfachheit. So müssen keinerlei weitere Aufreinigungen, Quervernetzungen oder Einkapselungen vorgenommen werden.

4. Kultivierung NitAf-AT tragender Zellen im Fermenter

Das Potential von Autodisplay-Ganzzell-Biokatalysatoren ist bisher noch nicht im Fermenter untersucht worden. Der erste Schritt zur Erschließung dieses Potentials liegt in der Identifizierung relevanter Faktoren, die einen Einfluss auf das Biomassewachstum eines solchen Biokatalysators ausüben. Aufgrund der nachgewiesenen Enzymaktivität und der Fähigkeit zur Produktion von R-Mandelsäure, einem wichtigen Intermediat für eine Vielzahl chemischer Reaktionen, wurde der Ganzzell-Biokatalysator *E. coli* BL21(DE3) pCD003 als Testobjekt verwendet.

4.1. Biomassewachstum

Da häufig eine Limitierung an leicht verfügbaren Kohlenstoffquellen, wie z.B. Glucose für eine geringe erzielbare Biomasse verantwortlich ist, wurde die Kultivierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Glucose-Konzentrationen untersucht. Die höchste OD₆₀₀ von 13,44 konnte durch Zugabe von 10 g/L Glucose im fed-batch-Verfahren, also unter Nachführung von Glucose, erzielt werden. Diese OD entspricht einer Trockenzellmasse von ca. 6,8 g/L Fermentationslösung. Damit liegt die erzielte Trockenzellmasse in der gleichen Größenordnung wie die von Banerjee *et al.* (2009) erzielte Trockenzellmasse von 9,5 g/L für eine rekombinant in *E. coli* BL21(DE3) exprimierte Nitrilase aus *Pseudomonas putida* in einem Fermenter mit 2x YT-Medium. Für Fermentationen mit *E. coli* sind jedoch Trockenzellmassen bis zu 170 g/L Fermentationslösung beschrieben worden (Lee, 1996). Auch das hier verwendete LB-Medium eignet sich grundsätzlich zur Hochzelldichtefermentation (Tripathi *et al.*, 2009). Deshalb erschien es wahrscheinlich, dass eine Mangelversorgung vorlag. Eine mögliche Unterversorgung mit Spurenelementen konnte als mögliche Ursache ausgeschlossen werden, da eine Supplementation nicht zu einer erhöhten Biomasseproduktion führte. In zukünftigen Fermentationen könnte die Verwendung eines definierten Mediums dabei helfen wachstumshemmende Faktoren zu identifizieren (Tripathi *et al.*, 2009).

4.2. Einflussfaktoren auf die Mandelsäureproduktion

4.2.1. Glucose

Vorversuche mit Schüttelkolbenkulturen von NitAf-AT tragenden *E. coli* BL21(DE3) pCD003 Zellen hatten Hinweise dafür geliefert, dass die Zugabe von Glucose einen negativen Einfluss auf die Mandelsäureproduktion ausüben kann. Auch im Fermenter kultivierte Zellen, bei denen durch Nachführung die Glucose-Konzentration in einem Bereich von 0,5-1 % (w/v) konstant gehalten wurde, zeigten eine signifikant verringerte Mandelsäureproduktion im Vergleich zu Kulturen, die nur einmalig zu Beginn der Kultivierung oder gar nicht mit Glucose inkubiert wurden. Durch SDS-PAGE konnte nachgewiesen werden, dass die Zugabe von Glucose zum Kulturmedium zu einer Verringerung der Enzymkonzentration von NitAf-AT in der Außenmembran von *E. coli* führte. Eine einfache Erklärung dafür könnte sein, dass Glucose zu einer verringerten Proteinexpression von NitAf-AT führt, was sich dann in einer verringerten Enzymaktivität niederschlägt.

Dass Glucose einen Einfluss auf die Proteinexpression ausüben kann ist für das pET-System, auf dem die in dieser Arbeit verwendeten Autodisplay-Plasmide beruhen, gut dokumentiert (Grossman *et al.*, 1998; Sørensen und Mortensen, 2005). Bei diesem System steht das Zielgen unter der Kontrolle eines T7lac Promotors. Somit kann das Zielgen nur in Anwesenheit von T7-RNA-Polymerase exprimiert werden. Da T7-RNA-Polymerase natürlicherweise nicht in *E. coli* vorkommt, wurde das für die T7-RNA-Polymerase kodierende Gen in das Genom von *E. coli* BL21(DE3) inseriert. Dieses Gen steht unter der Kontrolle eines lacUV5-Promotors, der durch Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), einem Lactose-Strukturanalogon, induziert werden kann (Studier *et al.*, 1990; Dubendorff und Studier, 1991). Der lac-Promotor besitzt zusätzlich noch eine Sensitivität für cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), einem „Hunger-Signal“ der Zelle, das gebildet wird wenn Glucose nicht mehr zur Verfügung steht. Aufgrund dieser Sensitivität des lac-Promotors führen hohe Spiegel an cAMP zu einer unerwünschten Produktion von T7-RNA-Polymerase und somit zur Expression des Zielenzyms. Diese sogenannte Basal-Expression, also eine Proteinexpression ohne Induktion, kann durch Zugabe von Glucose zum Medium unterdrückt werden. Dabei führt die Katabolit-Repression durch Glucose zu einer Erniedrigung des cAMP-Spiegels und somit zu einer Verringerung der Proteinexpression (Grossman *et al.*, 1998). Glucose kann sogar die Induktion mit IPTG reprimieren. De Bellis und Swartz (1990) konnten belegen, dass die Proteinexpression in Anwesenheit von 0,4 % Glucose trotz Anwesenheit von 0,4 mM IPTG reprimiert wurde. Ein reprimierender Effekt von Glucose auf die

Proteinexpression kann erst unterhalb einer Glucose-Konzentration von 0,1 % (w/v) ausgeschlossen werden (Donovan *et al.*, 1996). Dies würde erklären, weshalb die im Fermenter verwendete Konzentration von 0,5-1 % (w/v) Glucose zu einer Verringerung der Mandelsäureproduktion führte.

Weitere Untersuchungen mit *E. coli* BL21(DE3) pCD003 Zellen zeigten, dass die Zugabe von Glucose ausschließlich zum Reaktionsansatz zu einer Erniedrigung der Mandelsäureproduktion um 80 % führt. Da zu diesem Zeitpunkt die Proteinbiosynthese abgeschlossen sein sollte, lässt diese Beobachtung darauf schließen, dass die Glucose neben einer Reduktion der Proteinexpression noch einen inhibierenden Effekt auf die Nitrilaseaktivität ausübt. Yamamoto *et al.* (1991) konnten für die Anzucht des nativen Wirtsstamms *A. faecalis* in Glucose-haltigem Medium (1 %, w/v) und anschließender Aktivitätsbestimmung keine Abnahme der Nitrilase-Enzymaktivität feststellen. Im Gegensatz dazu ist für die sequenzidentische Nitrilase aus *Pseudomonas putida* (Banerjee *et al.*, 2006), sowie für die homologe Nitrilase aus *Rhodococcus rhodochrous* K22 (Kobayashi *et al.*, 1991) bekannt, dass Glucose im Kulturmedium die Aktivität der Ganzzell-Biokatalysatoren verringerte. Die Verwendung von Fructose und Glycerol in einer Konzentration von 10 g/L als Kohlenstoffquelle für *Pseudomonas putida* Zellen führte ebenfalls zu einer Erniedrigung der Nitrilaseaktivität (Banerjee *et al.*, 2006). Als mögliche Erklärung diskutieren die Autoren eine Katabolit-Repression und somit eine verringerte Proteinexpression ohne jedoch diesen Effekt näher untersucht zu haben. Eine Inhibierung der Nitrilaseaktivität durch Monosaccharide ist für rekombinante Nitrilasen in *E. coli* bisher noch nicht beschrieben worden. Jedoch könnten die bereits erläuterten Ergebnisse von Banerjee *et al.* (2006) für die *Pseudomonas putida* Nitrilase darauf hinweisen, dass Glucose eine bisher noch ungeklärte Rolle in der Regulation der Nitrilaseexpression oder -regulation spielt.

Ein anderer Erklärungsansatz für die verminderte Mandelsäureproduktion bei Anwesenheit von Glucose im Reaktionsansatz könnte darin bestehen, dass während der Umsetzung noch eine geringe Expression stattfindet. Dabei könnte der bei der Umsetzung von Mandelsäurenitril zu Mandelsäure äquimolar entstehende Ammoniak als Stickstoffquelle dienen. Diese Expression könnte durch Glucose ebenfalls, wie im Kulturmedium nachgewiesen, reprimiert werden. Nachfolgende Studien sind notwendig, um den genauen Mechanismus zu identifizieren, nach dem die Erniedrigung der Mandelsäureproduktion durch Glucose abläuft.

4.2.2. Einfluss der Induktion durch IPTG auf die Mandelsäureproduktion

Zellen, die im Fermenter kultiviert wurden und deren Proteinexpression mit IPTG induziert wurde, zeigten eine geringfügig niedrigere Mandelsäureproduktion als Zellen die nicht induziert wurden. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die für das pET-System bekannte und im Rahmen dieser Diskussion bereits erläuterte Basal-Expression für die gemessene Aktivität verantwortlich war. Zusätzlich scheint bereits die Basal-Expression ausreichend zu sein, um eine maximale Aktivität zu erzielen. Eine weitere Zunahme der Enzymkonzentration scheint keinen weiteren Einfluss mehr auf die Mandelsäureproduktion auszuüben.

Eine ähnliche Beobachtung machte Kaeßler (2009) mit den mittels Autodisplay oberflächenpräsentierten Hyaluronidasen hHyal-2 und hPH-20. So ermittelte er die höchste Aktivität mit einem nicht induzierbaren (= konstitutiven) Expressionssystem mit einer geringeren Expressionsrate und dem Wechsel zu einem Wirtsorganismus mit einer veränderten Lipopolysaccharid-Schicht. Die Verwendung eines induzierbaren Expressionssystems führte zu keiner nachweisbaren Aktivität. Kaeßler diskutierte als mögliche Erklärung für dieses Phänomen, dass eine hohe Konzentration an Autodisplay-Monomeren auf der Zelloberfläche zu einer sterischen Hinderung führt, die den Zugang der langkettigen Substrate zum katalytischen Zentrum blockiert. Im Falle von NitAf-AT ist es eher unwahrscheinlich, dass eine hohe Konzentration an NitAf-AT-Monomeren auf der Oberfläche zu einer Behinderung der Diffusion des kleinen Substratmoleküls Mandelsäurenitril zum katalytischen Zentrum führt. Wahrscheinlicher ist, dass die Zusammenlagerung der Monomere zum funktionellen multihomomeren Enzym durch sterische Hinderung erschwert oder verhindert wird. Erste Ergebnisse einer Aktivitätsbestimmung nach erfolgtem Proteaseverdau für den Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCD003 stützen diese These. Zwar konnte ein Großteil des Fusionsproteins proteolytisch verdaut werden, jedoch sank die Aktivität gerade einmal um ca. 30 %, gegenüber nicht Protease-behandelten *E. coli* BL21(DE3) pCD003 Zellen. Dies würde den Schluss zulassen, dass ein Großteil der oberflächenpräsentierten Enzyme inaktiv vorliegen. Bei den nach Proteaseverdau auf der Zelloberfläche verbleibenden Enzymen könnte es sich wie schon im Rahmen dieser Diskussion dargelegt um Komplexe mit einem höheren Oligomerisierungsgrad handeln, die eine höhere Stabilität besitzen und deshalb eine erhöhte Proteaseresistenz aufweisen.

Weitere Untersuchungen zum Einfluss der Enzymkonzentration auf die Produktbildung eines oberflächenpräsentierten Enzyms sind aus der Literatur nicht bekannt. In diesem Zusammenhang sind deshalb noch weitere Untersuchungen

notwendig, um die tatsächliche Struktur und Zusammensetzung von NitAf-AT Komplexen auf der Oberfläche von *E. coli* BL21(DE3) pCD003 aufzuklären.

4.2.3. Mercaptoethanol

Weitergehende Untersuchungen zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen im Fermenter identifizierten Mercaptoethanol als Faktor, der einen positiven Einfluss auf die Mandelsäureproduktion ausübte. Dabei führte eine Kultivierung mit 10 mM Mercaptoethanol zu einer 2,5-fach höheren Mandelsäureproduktion im Vergleich zu einer Kultur die ohne Mercaptoethanol kultiviert wurde. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass eine Ausbildung von Disulfidbrücken unter nicht-reduzierenden Bedingungen im Periplasma zu einer verringerten Translokationseffizienz führen kann (Jose *et al.*, 1996). Die Verwendung von 10 mM Mercaptoethanol ist ausreichend, um die Ausbildung von Disulfidbrücken wirksam zu unterbinden (Jose *et al.*, 2001). Da das Fusionsprotein NitAf-AT fünf Cysteine besitzt und möglicherweise Disulfidbrücken ausbildet, wäre ebenfalls eine Erhöhung der Translokationseffizienz unter reduzierenden Bedingungen als Erklärung für die höhere Umsetzung denkbar.

5. Biokatalytische Produktion von Mandelsäure im Fermenter

Nach der Optimierung der Kultivierungsbedingungen des Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003 im Fermenter sollte im nächsten Schritt auch die Umsetzung von Mandelsäurenitril zu R-Mandelsäure im Fermenter stattfinden.

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit wurde die Anzucht und die anschließende Umsetzung in drei voneinander unabhängigen Fermentationen im 2 L Maßstab durchgeführt. Dabei konnte eine durchschnittliche Raum-Zeit-Ausbeute von $0,31 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ Mandelsäure erreicht werden. Somit führte die Umsetzung im Fermenter zu einer doppelt so hohen Mandelsäureproduktion im Vergleich zu Kulturen, die im Schüttelkolben kultiviert und im 1 mL Maßstab umgesetzt wurden. Die produzierte Mandelsäure wies dabei einen Enantiomerenüberschuss von 96,5 % für das R-Enantiomer auf. Dieser ermittelte Enantiomerenüberschuss stimmte, wie im Rahmen dieser Diskussion bereits erläutert, gut mit den aus der Literatur bekannten Enantiomerenüberschüssen für das freie Enzym NitAf (Kaul *et al.*, 2006) sowie für die sequenzidentische Nitrilase aus *Pseudomonas putida* (Kaul *et al.*, 2004) überein.

In diesem Teil der Arbeit wurde damit zum ersten Mal erfolgreich die Anzucht eines Autodisplay-Ganzzell-Biokatalysators im Fermenter durchgeführt. Die Verwendung dieses Ganzzell-Biokatalysators zur Umsetzung von Mandelsäurenitril zu R-Mandelsäure führte dabei zu einer höheren Mandelsäureproduktion als vergleichbare Experimente mit Schüttelkolbenkulturen. Diese Ergebnisse belegen, dass die mittels Autodisplay oberflächenpräsentierten Enzyme über ausreichende Stabilität für den Einsatz im Fermenter verfügen. Somit ist der Grundstein zur Verwendung von Autodisplay-Ganzzell-Biokatalysatoren in der industriellen Biokatalyse gelegt.

5.1. Vergleich mit anderen Nitrilase Ganzzell-Biokatalysatoren

Ein Vergleich des Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003 mit anderen Ganzzell-Biokatalysatoren ist nur begrenzt möglich. So ist z.B. der Oligomerisierungsgrad der NitAf-AT Monomere nicht bestimmbar. Es lässt sich lediglich die Mandelsäureproduktion pro Zellmenge vergleichen. Der native Stamm *A. faecalis* subsp. *faecalis* ATCC 8750 führte dabei zu einer 22-fach höheren Umsetzung von Mandelsäurenitril als *E. coli* BL21(DE3) pCD003. Zhang *et al.* (2010) konnten durch rekombinante Expression der Nitrilase aus *A. faecalis* sp. ECU0401 im Cytoplasma von *E. coli* JM109 innerhalb von 17,5 h 520 mM Mandelsäure produzieren. Ein direkter Vergleich der beiden Ganzzell-Biokatalysatoren ist aufgrund der unterschiedlichen Reaktionsansätze nur schwer möglich. Legt man jedoch beiden Fermentationen die gleiche Zellmasse zugrunde, so kann für die rekombinante Expression in *E. coli* JM109 eine ca. 10-fach höhere Umsetzung gegenüber *E. coli* BL21(DE3) pCD003 berechnet werden. Eine mögliche Erklärung für die höhere Umsetzung der rekombinanten Nitrilase aus *A. faecalis* sp. ECU0401 könnte in ihrer fehlenden Substratinhibition liegen. Sie toleriert ohne Verringerung der Produktivität bis zu 200 mM Mandelsäurenitril. Dem gegenüber toleriert NitAf-AT lediglich 10 mM Mandelsäurenitril. Die geringere Umsetzung von Mandelsäurenitril durch *E. coli* BL21(DE3) pCD003 im Vergleich zu Ganzzell-Biokatalysatoren mit cytoplasmatischer Expression könnte zum Teil auf systembedingte Beschränkungen zurückzuführen sein. Während in klassischen Ganzzell-Biokatalysatoren mit intrazellulärer Lokalisation das rekombinante Protein bis zu 50 % des Gesamtproteingehaltes ausmachen kann (Makrides, 1996), bedingt die Präsentation auf der Zelloberfläche von *E. coli* eine stärkere Limitierung der Enzymkonzentration. Für das Autodisplay-System ist bisher lediglich eine Konzentration an Autotransporter-Fusionsproteinen bis zu 5 % des Gesamtproteingehaltes berichtet worden (Maurer *et al.*, 1997). Die mittels SDS-PAGE ermittelte Proteinkonzentration von NitAf-AT lässt auf eine Konzentration von unter 5 % des Gesamtproteingehaltes schließen.

Die durchgeführten Untersuchungen zur Anzucht und Umsetzung von *E. coli* BL21(DE3) pCD003 im Fermenter stellen erst den Beginn der Erschließung des biokatalytischen Potentials dieses Ganzzell-Biokatalysators dar. Berücksichtigt man jedoch, dass im Rahmen dieser Arbeit eine Steigerung der Mandelsäureproduktion um mehr als 400 % möglich war, so erscheint ein zukünftiger Einsatz des Ganzzell-Biokatalysators im industriellen Maßstab erreichbar zu sein.

6. Fazit

Diese Arbeit konnte das Spektrum der bisher verfügbaren Enzyme, die durch Autodisplay oberflächenexprimiert wurden, auf Nitrilasen ausweiten. Mit dem NitKp-AT tragenden Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCD002 steht ein Ganzzell-Biokatalysator zur potentiellen Detoxifikation von Oxylin-Herbizid belasteten Abwässern zur Verfügung. Durch die Expression von funktionellem NitAf-AT konnte zum ersten Mal eine Nitrilase auf der Oberfläche von *E. coli* präsentiert werden, die in vitro Multihomomere ausbildet. Mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) pCD003 steht ein Ganzzell-Biokatalysator zur Herstellung von R-Mandelsäure in hoher Enantiomerenreinheit zur Verfügung. Die Anzucht des Ganzzell-Biokatalysators *E. coli* BL21(DE3) pCD003 sowie die anschließende Umsetzung von Mandelsäurenitril zu R-Mandelsäure im Fermenter konnte darüber hinaus erstmals das biokatalytische Potential des Autodisplay-Systems belegen.

VII. Literatur

- Almatawah QA, Cowan DA (1999) Thermostable nitrilase catalysed production of nicotinic acid from 3- cyanopyridine. *Enzym Microb Technol* 25:718-724.
- Andrade J, Karmali A, Carrondo MA, Frazão C (2007) Structure of amidase from *Pseudomonas aeruginosa* showing a trapped acyl transfer reaction intermediate state. *J Biol Chem* 282:19598-19605.
- Ankati H, Zhu D, Yang Y, Biehl ER, Hua L (2009) Asymmetric synthesis of both antipodes of β -hydroxy nitriles and β -Hydroxy carboxylic acids via enzymatic reduction or sequential reduction/hydrolysis. *J Org Chem* 74:1658-1662.
- Bandyopadhyay AK, Nagasawa T, Asano Y (1986) Purification and characterization of benzonitrilase from *Arthrobacter* sp. strain J-1. *Appl Environ Microbiol* 51:302-306.
- Banerjee A, Dubey S, Kaul P, Barse B, Piotrowski M, Banerjee UC (2009) Enantioselective nitrilase from *Pseudomonas putida*: Cloning, heterologous expression, and bioreactor studies. *Mol Biotechnol* 41:35-41.
- Banerjee A, Kaul P, Banerjee UC (2006) Enhancing the catalytic potential of nitrilase from *Pseudomonas putida* for stereoselective nitrile hydrolysis. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:77-87.
- Banerjee A, Sharma R, Banerjee UC (2002) The nitrile-degrading enzymes: Current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:33-44.
- Benz I, Schmidt MA (1989) Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 57:1506-1511.
- Benz P, Muntwyler R, Wohlgemuth R (2007) Chemoenzymatic synthesis of chiral carboxylic acids via nitriles. *J Chem Technol Biotechnol* 82:1087-1098.
- Betscheider D (2008) Autodisplay von Peptidbibliotheken und Screening nach neuen Cathepsin G Inhibitoren mittels Durchflusszytometrie. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Bhalla TC, Miura A, Wakamoto A, Ohba Y, Furuhashi K (1992) Asymmetric hydrolysis of α -aminonitriles to optically active amino acids by a nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* PA-34. *Appl Microbiol Biotechnol* 37:184-190.
- Bieniek G (1982) TLC separation of hippuric, mandelic, and phenylglyoxylic acids from urine after mixed exposure to toluene and styrene. *Br J Ind Med* 39:187-190.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- Bisswanger H (2008) *Enzyme Kinetics. Principles and Methods*, 2nd Ed., Weinheim, Wiley-VCH.
- Blasshofer F (2008) Autodisplay funktioneller Antikörperfragmente in *Escherichia coli*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Bolleter WT, Bushman CJ, Tidwell PW (1961) Spectrophotometric determination of ammonia as indophenol. *Anal Chem* 33:592-594.
- Bork P, Koonin EV (1994) A new family of carbon-nitrogen hydrolases. *Protein Sci* 3:1344-1346.
- Bornscheuer UT, Bucholz K (2005) Highlights in biocatalysis - Historical landmarks and current trends. *Eng Life Sci* 5:309-323.
- Brady D, Jordaan J (2009) Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol Lett* 31:1639-1650.

- Brenner C (2002) Catalysis in the nitrilase superfamily. *Curr Opin Struct Biol* 12:775-782.
- Buchberger W, Malissa H, Winsauer K (1984) Trace analysis of ioxynil and bromoxynil using HPLC with electrochemical and UV detection. *Mikrochim Acta* 82:53-61.
- Buchholz K, Kasche V, Bornscheuer UT (2005) *Biocatalysts and Enzyme Technology*, 1. Ed., Weinheim, Wiley-VCH.
- Chaney AL, Marbach EP (1962) Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin Chem* 8:130-132.
- Chen W, Georgiou G (2002) Cell-surface display of heterologous proteins: From high-throughput screening to environmental applications. *Biotechnol Bioeng* 79:496-503.
- Choi JH, Keum KC, Lee SY (2006) Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem Eng Sci* 61:876-885.
- Churcher C, Bowman S, Badcock K, Bankier A, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Devlin K, Gentles S, Hamlin N, Harris D, Horsnell T, Hunt S, Jagels K, Jones M, Lye G, Moule S, Odell C, Pearson D, Rajandream M, Rice P, Rowley N, Skelton J, Smith V, Walsh S, Whitehead S, Barrell B (1997) The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome IX. *Nature* 387:84-87.
- Conn EE (1979) Biosynthesis of cyanogenic glycosides. *Naturwissenschaften* 66:28-34.
- Cooling FB, Fager SK, Fallon RD, Folsom PW, Gallagher FG, Gavagan JE, Hann EC, Herkes FE, Phillips RL, Sigmund A, Wagner LW, Wu W, DiCosimo R (2001) Chemoenzymatic production of 1,5-dimethyl-2-piperidone. *J Mol Catal B Enzym* 11:295-306.
- Cowan D, Cramp R, Graham RPD, Almatawah Q (1998) Biochemistry and biotechnology of mesophilic and thermophilic nitrile metabolizing enzymes. *Extremophiles* 2:207-216.
- De Bellis D, Schwartz I (1990) Regulated expression of foreign genes fused to lac: control by glucose levels in growth medium. *Nucleic Acids Res* 18:1311.
- Donovan RS, Robinson CW, Click BR (1996) Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *J Ind Microbiol* 16:145-154.
- Dubendorff JW, Studier FW (1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol* 219:45-59.
- Eberlein CV, Guttieri MJ, Steffen-Campbell J (1998) Bromoxynil resistance in transgenic potato clones expressing the bxn gene. *Weed Sci* 46:150-157.
- Fass R, Van de Walle M, Shiloach A, Joslyn A, Kaufman J, Shiloach J (1991) Use of high density cultures of *Escherichia coli* for high level production of recombinant *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Appl Microbiol Biotechnol* 36:65-69.
- Fawcett JK, Scott JE (1960) A rapid and precise method for the determination of urea. *J Clin Pathol* 13:156-159.
- Fernandez-Lafuente R (2009) Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzym Microb Technol* 45:405-418.
- Freyssinet G, Pelissier B, Freyssinet M, Delon R (1996) Crops resistant to oxynils: From the laboratory to the market. *Field Crops Res* 45:125-133.
- Freyssinet M, Kuzio S, Pelissier B, Oudeyer JC, Renard M, Bregeon M, Freyssinet G (1992) Introduction of resistance to bromoxynil into canola. *UCLA Symposium, J Biol Cell*.

- Furlenmeier A, Quitt P, Vogler K, Lanz P (1974) (R)-1-(2-Furoyloxy)-3-Methylbutyl-Penicillin Compounds. US Patent 3,957,758.
- Gabriel J, Věková J, Vosáhlo J (1996) High-performance liquid chromatographic study of the aromatic nitrile metabolism in soil bacteria. *J Chromatogr B Biomed Appl* 681:191-195.
- Gates BC (1992) *Catalytic Chemistry*, 2 nd Ed., New York, United States, John Wiley & Sons Inc.
- Goldlust A, Bohak Z (1989) Induction, purification, and characterization of the nitrilase of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Biotechnol Appl Biochem* 11:581-601.
- Gratz A (2010) Autodisplay der humanen Proteinkinase CK2 und Entwicklung eines Verfahrens zur Inhibitortestung. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Grossman TH, Kawasaki ES, Punreddy SR, Osburne MS (1998) Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene* 209:95-103.
- Günther K (1988) Thin-layer chromatographic enantiomeric resolution via ligand exchange. *J Chromatogr A* 448:11-30.
- Gupta N, Balomajumder C, Agarwal VK (2010) Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: A review. *J Hazard Mater* 176:1-13.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580.
- Handel S (2003) Entwicklung eines Ganzzell-Biokatalysator durch Autodisplay einer Sorbitol Dehydrogenase. Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Hann EC, Sigmund AE, Hennessey SM, Gavagan JE, Short DR, Ben-Bassat A, Chauhan S, Fallon RD, Payne MS, DiCosimo R (2002) Optimization of an immobilized-cell biocatalyst for production of 4-cyanopentanoic acid. *Organic Process Research and Development* 6:492-496.
- Hantke K (1981) Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet* 182:288-292.
- Harnpicharnchai P, Sornlake W, Tang K, Eurwilaichitr L, Tanapongpipat S (2010) Cell-surface phytase on *Pichia pastoris* cell wall offers great potential as a feed supplement. *FEMS Microbiol Lett* 302:8-14.
- Harper DB (1977) Microbial metabolism of aromatic nitriles. Enzymology of C-N cleavage by *Nocardia* Sp. (*Rhodochrous* group) N.C.I.B. 11216. *Biochem J* 165:309-319.
- Harper DB (1985) Characterization of a nitrilase from *Nocardia* sp. (*Rhodochrous* group) N.C.I.B. 11215, Using p-hydroxybenzonitrile as sole carbon source. *Int J Biochem* 17:677-683.
- Hartnett J, Jill MS, Gracyalny BS, Slater MR (2006) The single step (KRX) competent cells: efficient cloning and high protein yields. *Promega Notes* 94:27-30.
- Holtze MS, Sørensen SR, Sørensen J, Aamand J (2008) Microbial degradation of the benzonitrile herbicides dichlobenil, bromoxynil and ioxynil in soil and subsurface environments - Insights into degradation pathways, persistent metabolites and involved degrader organisms. *Environ Pollut* 154:155-168.
- Hook RH, Robinson WG (1964) Ricine Nitrilase. II. Purification and Properties. *J Biol Chem* 239:4263-4267.
- Howden AJM, Jill Harrison C, Preston GM (2009a) A conserved mechanism for nitrile metabolism in bacteria and plants. *Plant J* 57:243-253.

- Howden AJM, Preston GM (2009) Nitrilase enzymes and their role in plant-microbe interactions. *Microbial Biotechnology* 2:441-451.
- Howden AJM, Rico A, Mentlak T, Miguet L, Preston GM (2009b) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a hydrolyses indole-3-acetonitrile to the plant hormone indole-3-acetic acid. *Mol Plant Pathol* 10:857-865.
- Ito J, Sahara H, Kaya M, Hata Y, Shibasaki S, Kawata K, Ishida S, Ogino C, Fukuda H, Kondo A (2008) Characterization of yeast cell surface displayed *Aspergillus oryzae* β -glucosidase 1 high hydrolytic activity for soybean isoflavone. *J Mol Catal B: Enzym* 55:69-75.
- Jandhyala DM, Willson RC, Sewell BT, Benedik MJ (2005) Comparison of cyanide-degrading nitrilases. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:327-335.
- Jenrich R, Trompetter I, Bak S, Olsen CE, Møller BL, Piotrowski M (2007) Evolution of heteromeric nitrilase complexes in *Poaceae* with new functions in nitrile metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18848-18853.
- Jose J (2006) Autodisplay: Efficient bacterial surface display of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:607-614.
- Jose J, Bernhardt R, Hannemann F (2001) Functional display of active bovine adrenodoxin on the surface of *E. coli* by chemical incorporation of the [2Fe-2S] cluster. *ChemBioChem* 2:695-701.
- Jose J, Bernhardt R, Hannemann F (2002) Cellular surface display of dimeric Adx and whole cell P450-mediated steroid synthesis on *E. coli*. *J Biotechnol* 95:257-268.
- Jose J, Betscheider D, Zangen D (2005) Bacterial surface display library screening by target enzyme labeling: Identification of new human cathepsin G inhibitors. *Anal Biochem* 346:258-267.
- Jose J, Handel S (2003) Monitoring the cellular surface display of recombinant proteins by cysteine labeling and flow cytometry. *ChemBioChem* 4:396-405.
- Jose J, Kramer J, Klauser T, Pohlner J, Meyer TF (1996) Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the Iga beta autotransporter pathway. *Gene* 178:107-110.
- Jose J, Meyer TF (2007) The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:600-619.
- Jose J, von Schwichow S (2004) Autodisplay of active sorbitol dehydrogenase (SDH) yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars. *ChemBioChem* 5:491-499.
- Jung HC, Kwon SJ, Pan JG (2006) Display of a thermostable lipase on the surface of a solvent-resistant bacterium, *Pseudomonas putida* GM730, and its applications in whole-cell biocatalysis. *BMC Biotechnol* 6.
- Jung HC, Lebeault JM, Pan JG (1998) Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice- nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Nat Biotechnol* 16:576-580.
- Kaeßler A (2009) Autodisplay humaner Hyaluronidasen und Entwicklung von Verfahren zur Testung von Inhibitoren. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Kaessler A, Olgen S, Jose J (2010) Autodisplay of catalytically active human hyaluronidase hPH-20 and testing of enzyme inhibitors. *Europ J Pharm Sci*, in revision.
- Kaul P, Banerjee A, Banerjee UC (2006) Stereoselective nitrile hydrolysis by immobilized whole-cell biocatalyst. *Biomacromolecules* 7:1536-1541.

- Kaul P, Banerjee A, Mayilraj S, Banerjee UC (2004) Screening for enantioselective nitrilases: Kinetic resolution of racemic mandelonitrile to (R)-(-)-mandelic acid by new bacterial isolates. *Tetrahedron: Asymmetry* 15:207-211.
- Kaul P, Stolz A, Banerjee UC (2007) Cross-linked amorphous nitrilase aggregates for enantioselective nitrile hydrolysis. *Adv Synth Catal* 349:2167-2176.
- Kim HS, Lee SJ, Lee EY (2006) Development and characterization of recombinant whole-cell biocatalysts expressing epoxide hydrolase from *Rhodotorula glutinis* for enantioselective resolution of racemic epoxides. *J Mol Catal B: Enzym* 43:2-8.
- Kinbara K, Sakai K, Hashimoto Y, Nohira H, Saigo K (1996) Design of resolving reagents: p-substituted mandelic acids as resolving reagents for 1-arylalkylamines. *Tetrahedron: Asymmetry* 7:1539-1542.
- Kiziak C, Klein J, Stolz A (2007) Influence of different carboxy-terminal mutations on the substrate-, reaction- and enantiospecificity of the arylacetone nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191. *Protein Eng Des Sel* 20:385-396.
- Klauser T, Pohlner J, Meyer TF (1992) Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* IgA beta-mediated outer membrane transport. *EMBO J* 11:2327-2335.
- Klauser T, Pohlner J, Meyer TF (1993) The secretion pathway of IgA protease-type proteins in gram-negative bacteria. *BioEssays* 15:799-805.
- Kobayashi M, Izui H, Nagasawa T, Yamada H (1993) Nitrilase in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile: Cloning of the *Alcaligenes* gene and site-directed mutagenesis of cysteine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:247-251.
- Kobayashi M, Shimizu S (1994) Versatile nitrilases: Nitrile-hydrolysing enzymes. *FEMS Microbiol Lett* 120:217-224.
- Kobayashi M, Yanaka N, Nagasawa T, Yamada H (1991) Hyperinduction of an aliphatic nitrilase by *Rhodococcus rhodochrous* K22. *FEMS Microbiol Lett* 77:121-123.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.
- Lattemann CT, Maurer J, Gerland E, Meyer TF (2000) Autodisplay: Functional display of active β -lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. *J Bacteriol* 182:3726-3733.
- Lee SH, Choi JI, Park SJ, Lee SY, Park BC (2004) Display of bacterial lipase on the *Escherichia coli* cell surface by using FadL as an anchoring motif and use of the enzyme in enantioselective biocatalysis. *Appl Environ Microbiol* 70:5074-5080.
- Lee SY (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 14:98-105.
- Légras JL, Chuzel G, Arnaud A, Galzy P (1990) Natural nitriles and their metabolism. *World J Microbiol Biotechnol* 6:83-108.
- Li C, Zhu Y, Benz I, Schmidt MA, Chen W, Mulchandani A, Qiao C (2008) Presentation of functional organophosphorus hydrolase fusions on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter pathway. *Biotechnol Bioeng* 99:485-490.

- Mahadevan S, Thimann KV (1964) Nitrilase. II. Substrate specificity and possible mode of action. *Arch Biochem Biophys* 107:62-68.
- Makrides SC (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 60:512-538.
- Martínková L, Křen V (2010) Biotransformations with nitrilases. *Curr Opin Chem Biol* 14:130-137.
- Martínková L, Mylerová V (2003) Synthetic applications of nitrile-converting enzymes. *Curr Org Chem* 7:1279-1295.
- Martínková L, Uhnáková B, Pátek M, Nešvera J, Křen V (2009) Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environ Int* 35:162-177.
- Martínková L, Vejvoda V, Křen V (2008) Selection and screening for enzymes of nitrile metabolism. *J Biotechnol* 133:318-326.
- Mateo C, Palomo JM, Van Langen LM, Van Rantwijk F, Sheldon RA (2004) A New, Mild Cross-Linking Methodology to Prepare Cross-Linked Enzyme Aggregates. *Biotechnol Bioeng* 86:273-276.
- Maurer J, Jose J, Meyer TF (1997) Autodisplay: One-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:794-804.
- Maurer J, Jose J, Meyer TF (1999) Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *J Bacteriol* 181:7014-7020.
- May OL, Bourland FM, Nichols RL (2003) Challenges in testing transgenic and nontransgenic cotton cultivars. *Crop Sci* 43:1594-1601.
- McBride KE, Kenny JW, Stalker DM (1986) Metabolism of the herbicide bromoxynil by *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*. *Appl Environ Microbiol* 52:325-330.
- Mueller P, Egorova K, Vorgias CE, Boutou E, Trauthwein H, Verseck S, Antranikian G (2006) Cloning, overexpression, and characterization of a thermoactive nitrilase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Protein Expr Purif* 47:672-681.
- Müller D, Benz I, Tapadar D, Buddenborg C, Greune L, Schmidt MA (2005) Arrangement of the translocator of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence on the bacterial surface. *Infect Immun* 73:3851-3859.
- Müller D, Gabriel J (1999) Bacterial degradation of the herbicide bromoxynil by *Agrobacterium radiobacter* in biofilm. *Folia Microbiol* 44:377-379.
- Nagasawa T, Wieser M, Nakamura T, Iwahara H, Yoshida T, Gekko K (2000) Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1: Conversion into the active form by subunit association. *Eur J Biochem* 267:138-144.
- Nahrstedt A (1975) Die Isomerisierung von Amygdalin und Homologen. *Arch Pharm (Weinheim)* 308:903-910.
- Nakai T, Hasegawa T, Yamashita E, Yamamoto M, Kumasaka T, Ueki T, Nanba H, Ikenaka Y, Takahashi S, Sato M, Tsukihara T (2000) Crystal structure of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase with a novel catalytic framework common to emidohydrolases. *Structure* 8:729-739.
- Narita J, Okano K, Kitao T, Ishida S, Sewaki T, Sung MH, Fukuda H, Kondo A (2006) Display of α -amylase on the surface of *Lactobacillus casei* cells by use of the PgsA anchor protein, and production of lactic acid from starch. *Appl Environ Microbiol* 72:269-275.
- O'Brien MK, Vanasse B (2000) Asymmetric processes in the large-scale preparation of chiral drug candidates. *Curr Opin Drug Discov Devel* 3:793-806.

- O'Reilly C, Turner PD (2003) The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes - A comparative study. *J Appl Microbiol* 95:1161-1174.
- Osswald S, Wajant H, Effenberger F (2002) Characterization and synthetic applications of recombinant AtNIT1 from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* 269:680-687.
- Pace HC, Brenner C (2001) The nitrilase superfamily: Classification, structure and function. *Genome Biol* 2.
- Pace HC, Hodawadekar SC, Draganescu A, Huang J, Bieganski P, Pekarsky Y, Croce CM, Brenner C (2000) Crystal structure of the worm NitFhit Rosetta Stone protein reveals a Nit tetramer binding two Fhit dimers. *Curr Biol* 10:907-917.
- Panova A, Mersinger LJ, Liu Q, Foo T, Roe DC, Spillan WL, Sigmund AE, Ben-Bassat A, Winona Wagner L, O'Keefe DP, Wu S, Perrillo KL, Payne MS, Breske ST, Gallagher FG, Dicosimo R (2007) Chemoenzymatic synthesis of glycolic acid. *Adv Synth Catal* 349:1462-1474.
- Pekarsky Y, Campiglio M, Siprashvili Z, Druck T, Sedkov Y, Tillib S, Draganescu A, Wermuth P, Rothman JH, Huebner K, Buchberg AM, Mazo A, Brenner C, Croce CM (1998) Nitrilase and Fhit homologs are encoded as fusion proteins in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8744-8749.
- Piotrowski M (2008) Primary or secondary? Versatile nitrilases in plant metabolism. *Phytochemistry* 69:2655-2667.
- Podar M, Eads JR, Richardson TH (2005) Evolution of a microbial nitrilase gene family: A comparative and environmental genomics study. *BMC Evol Biol* 5.
- Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, Meyer TF (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* 325:458-462.
- Polaina J, MacCabe AP (2007) *Industrial Enzymes*, 1st Ed., Springer Netherlands.
- Pollmann S, Müller A, Piotrowski M, Weiler EW (2002) Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216:155-161.
- Pollock JA, Clark KM, Martynowicz BJ, Pridgeon MG, Rycenga MJ, Stolle KE, Taylor SK (2007) A mild biosynthesis of lactones via enantioselective hydrolysis of hydroxynitriles. *Tetrahedron: Asymmetry* 18:1888-1892.
- Richins RD, Kaneva I, Mulchandani A, Chen W (1997) Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Nat Biotechnol* 15:984-987.
- Rietveld AWM, Ferreira ST (1998) Kinetics and energetics of subunit dissociation/unfolding of TIM: The importance of oligomerization for conformational persistence and chemical stability of proteins. *Biochemistry* 37:933-937.
- Robertson DE, Chaplin JA, DeSantis G, Podar M, Madden M, Chi E, Richardson T, Milan A, Miller M, Weiner DP, Wong K, McQuaid J, Farwell B, Preston LA, Tan X, Snead MA, Keller M, Mathur E, Kretz PL, Burk MJ, Short JM (2004) Exploring Nitrilase Sequence Space for Enantioselective Catalysis. *Appl Environ Microbiol* 70:2429-2436.
- Robinson WG, Hook RH (1964) Ricinine Nitrilase. I. Reaction Product and Substrate Specificity. *J Biol Chem* 239:4257-4262.
- Russel JR (1944) The colorimetric estimation of small amounts of ammonia by the Phenol-hypochlorite reaction. *J Biol Chem* 156:457-461.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2001) Molecular Cloning. A laboratory manual, 3. Ed., Cold Spring Harbor Press.
- Samuelson P, Gunneriusson E, Nygren P-Å, Ståhl S (2002) Display of proteins on bacteria. *J Biotechnol* 96:129-154.
- Schenkman S, Tsugita A, Schwartz M, Rosenbusch JP (1984) Topology of phage λ receptor protein. Mapping targets of proteolytic cleavage in relation to binding sites for phage or monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 259:7570-7576.
- Schultheiss E, Paar C, Schwab H, Jose J (2002) Functional esterase surface display by the autotransporter pathway in *Escherichia coli*. *J Mol Catal B: Enzym* 18:89-97.
- Schultheiss E, Weiss S, Winterer E, Maas R, Heinzle E, Jose J (2008) Esterase autodisplay: Enzyme engineering and whole-cell activity determination in microplates with pH sensors. *Appl Environ Microbiol* 74:4782-4791.
- Selmar D, Lieberei R, Biehl B (1988) Mobilization and utilization of cyanogenic glycosides: the linustatin pathway. *Plant Physiol* 86:711-716.
- Sendker J, Nahrstedt A (2009) Generation of primary amide glucosides from cyanogenic glucosides. *Phytochemistry* 70:388-393.
- Sheldon RA (2007) Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv Synth Catal* 349:1289-1307.
- Sørensen HP, Mortensen KK (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 115:113-128.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31:425-448.
- Stalker DM (1989) Haloarylnitrile degrading gene, its use, and cells containing the gene. US Patent 4,810,648.
- Stalker DM, Malyj LD, McBride KE (1988a) Purification and properties of a nitrilase specific for the herbicide bromoxynil and corresponding nucleotide sequence analysis of the bxn gene. *J Biol Chem* 263:6310-6314.
- Stalker DM, McBride KE (1987) Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Klebsiella ozaenae* plasmid-borne gene encoding a nitrilase specific for the herbicide bromoxynil. *J Bacteriol* 169:955-960.
- Stalker DM, McBride KE, Malyj LD (1988b) Expression in plants of a bromoxynil-specific bacterial nitrilase that confers herbicide resistance., in: AL. F. E. (Ed.) *Current Communications in Molecular Biology. Genetic Improvement of Agricultural Important Crops.*, Cold Spring Harbor Laboratory), 37-40.
- Stalker DM, McBride KE, Malyj LD (1988c) Herbicide resistance in transgenic plants expressing a bacterial detoxification gene. *Science* 241:419-423.
- Stevenson DE, Feng R, Dumas F, Groleau D, Mihoc A, Storer AC (1992) Mechanistic and structural studies on *Rhodococcus* ATCC 39484 nitrilase. *Biotechnol Appl Biochem* 15:283-302.
- Straathof AJJ, Panke S, Schmid A (2002) The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol* 13:548-556.
- Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189:113-130.
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185:60-89.
- Sun J, Okumura H, Yearsley M, Frankel W, Fong LY, Druck T, Huebner K (2009) Nit1 and Fhit tumor suppressor activities are additive. *J Cell Biochem* 107:1097-1106.

- Surivet JP, Vatèle JM (1998) A short and efficient total synthesis of the cytotoxic (+)-goniodiol and (+)-9-deoxygoniopypyrone. *Tetrahedron Lett* 39:7299-7300.
- Surivet JP, Vatèle JM (1999) Total synthesis of antitumor Goniothalamus styryllactones. *Tetrahedron* 55:13011-13028.
- Talker-Huiber D, Jose J, Glieder A, Pressnig M, Stubenrauch G, Schwab H (2003) Esterase EstE from *Xanthomonas vesicatoria* (Xv_EstE) is an outer membrane protein capable of hydrolyzing long-chain polar esters. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:479-487.
- Terreni M, Pagani G, Ubiali D, Fernández-Lafuente R, Mateo C, Guisán JM (2001) Modulation of penicillin acylase properties via immobilization techniques: One-pot chemoenzymatic synthesis of Cephamandole from Cephalosporin C. *Bioorg Med Chem Lett* 11:2429-2432.
- Thimann KV, Mahadevan S (1958) Enzymatic hydrolysis of indoleacetonitrile [13]. *Nature* 181:1466-1467.
- Thimann KV, Mahadevan S (1964) Nitrilase. I. Occurrence, preparation, and general properties of the enzyme. *Arch Biochem Biophys* 105:133-141.
- Thuku RN, Brady D, Benedik MJ, Sewell BT (2009) Microbial nitrilases: Versatile, spiral forming, industrial enzymes. *J Appl Microbiol* 106:703-727.
- Thuku RN, Weber BW, Varsani A, Sewell BT (2007) Post-translational cleavage of recombinantly expressed nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* J1 yields a stable, active helical form. *FEBS J* 274:2099-2108.
- Tripathi NK, Sathyaseelan K, Jana AM, Rao PVL (2009) High yield production of heterologous proteins with *Escherichia coli*. *Defence Sci J* 59:137-146.
- Veselá AB, Franc M, Pelantová H, Kubáč D, Vejvoda V, Šulc M, Bhalla TC, Macková M, Lovecká P, Janů P, Demnerová K, Martínková L (2010) Hydrolysis of benzonitrile herbicides by soil actinobacteria and metabolite toxicity. *Biodegradation* 21:761-770.
- Wang WC, Hsu WH, Chien FT, Chen CY (2001) Crystal structure and site-directed mutagenesis studies of N-carbamoyl-D-amino-acid amidohydrolase from *Agrobacterium radiobacter* reveals a homotetramer and insight into a catalytic cleft. *J Mol Biol* 306:251-261.
- Wearne JT (1963) Nonspecificity of Hypochlorite-Phenol Estimation of Ammonium in Biological Material. *Anal Chem* 35:327-329.
- Wernérus H, Ståhl S (2004) Biotechnological applications for surface-engineered bacteria. *Biotechnol Appl Biochem* 40:209-228.
- Wyatt JM, Knowles CJ (1995) Microbial degradation of acrylonitrile waste effluents: the degradation of effluents and condensates from the manufacture of acrylonitrile. *Int Biodeterioration Biodegrad* 35:227-248.
- Yamamoto K, Fujimatsu I, Komatsu K-I (1992) Purification and characterization of the nitrilase from *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 responsible for enantioselective hydrolysis of mandelonitrile. *J Ferment Bioeng* 73:425-430.
- Yamamoto K, Oishi K, Fujimatsu I, Komatsu KI (1991) Production of R-(-)-mandelic acid from mandelonitrile by *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750. *Appl Environ Microbiol* 57:3028-3032.
- Yang TH, Kwon MA, Song JK, Pan JG, Rhee JS (2010) Functional display of *Pseudomonas* and *Burkholderia* lipases using a translocator domain of EstA autotransporter on the cell surface of *Escherichia coli*. *J Biotechnol*.
- Zagrobelny M, Bak S, Müller BL (2008) Cyanogenesis in plants and arthropods. *Phytochemistry* 69:1457-1468.

-
- Zhang ZJ, Xu JH, He YC, Ouyang LM, Liu YY, Imanaka T (2010) Efficient production of (R)-(-)-mandelic acid with highly substrate/product tolerant and enantioselective nitrilase of recombinant *Alcaligenes* sp. *Process Biochem* 45:887-891.

VIII. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 19: Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	„volume per volume“ (Volumenanteil)
(w/v)	„weight per volume“ (Massenanteil)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AT	Autotransporter
bla	Gen für β -Lactamase (Ampicillinresistenz)
BSA	„bovine serum albumin“ (Rinderserum Albumin)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Deoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FgaPT2	Prenyltransferase aus <i>Aspergillus fumigatus</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	„High performance liquid chromatography“
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LB	„Lysogeny Broth“
MW	Mittelwert
NitAf	Nitrilase aus <i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>
NitKp	Nitrilase aus <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>
NitSc	Nitrilase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NitAf-AT	Fusionsprotein aus Autotransporter und NitAf als Passagier
NitKp-AT	Fusionsprotein aus Autotransporter und NitKp als Passagier
NitSc-AT	Fusionsprotein aus Autotransporter und NitSc als Passagier
OD ₅₇₈	Optische Dichte bei einer Absorption von 578 nm bestimmt
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Absorption von 600 nm bestimmt
Omp	„Outer membrane protein“ (Außenmembranprotein)
ORF	„open reading frame“ (offener Leserahmen)
p.a.	Pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„Phosphate buffered saline“
PCR	„Polymerase chain reaction“
PEG	Polyethylenglykol

PMSF	Polymethylsulfonylfluorid
Rpm	„Revolutions per minute“
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOB	„Super optimal broth“
SOC	„Super optimal broth with catabolite repression“
SP	Signalpeptid
TAE	Tris-Acetat-Elektrophoresepuffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	„Tris-buffered saline“
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	„Tri fluoroacetic acid“
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

2. Sequenzen

Die Nukleinsäuresequenzen der in den Plasmiden pCD001, pCD002 und pCD003 enthaltenen Autodisplay-Fusionsgene, sowie die Translation in das jeweilige Fusionsprotein sind im Folgenden aufgeführt:

1) NitSc-AT (2034 bp/ 678 AS):

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
atggttaaattaaaatttggtgttttttttacagttttactatcttcagcatatgcacatggaacacctcaaaatattac
M V K L K F G V F F T V L L S S A Y A H G T P Q N I T

      90     100     110     120     130     140     150     160
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
tgatttgcgcgagcgaaacacattgttgctgcccttcaaatcggtctcttgccgggctctactaaggataccttgaaaa
D L L E A K H I V A A L Q I G S C P G S T K D T L K

     170     180     190     200     210     220     230     240
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
aaattttgtcatatgagaaggagatcaaggaatctggtgccagtgttgcttatcccagaagccactcttggtggttat
K I L S Y E K E I K E S G A K L V V I P E A T L G G Y

     250     260     270     280     290     300     310     320
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
ccaaagggatcgaaactttggggtttatctaggctaccgtcttcaagaaggaaggaggagtatgctaagtatcttgccga
P K G S N F G V Y L G Y R L Q E G R E E Y A K Y L A E

     330     340     350     360     370     380     390     400
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
agcaattgagatcggaacggagagaaaatccagaaattagtcagttgtgcgcactatcgaaggccaccgacgcacacct
A I E I G N G E K Y P E I S Q L C A L S K A T D A S

     410     420     430     440     450     460     470     480
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
tatgtgcgggtgtatagagcgcgatgggacgacattatattgtaccatgggtttatatagatcctaaagatgggtacgtt
L C A G C I E R D G T T L Y C T M V Y I D P K D G Y V

```

490 500 510 520 530 540 550 560
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gggaagcatcgaaaactgatgccgacagctggcgaaagactgatatgggggtcaaggcgatgggttcgactctgcctgtcgt
G K H R K L M P T A G E R L I W G Q G D G S T L P V V

570 580 590 600 610 620 630 640
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ggataccgctgctgggaagattggcgggtgctatctgctgggagaacatgatgcctctactgagatacgccatgtataaaa
D T A A G K I G G A I C W E N M M P L L R Y A M Y K

650 660 670 680 690 700 710 720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
aaggggttgagatctggtgtgccccaacggtggatgctaggcctattggtacccttaatcctacaaaagaaagtgcaggt
K G V E I W C A P T V D A R P I G T L N P T K E S A G

730 740 750 760 770 780 790 800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
aatactcttacogtgcataattactgggacacccgggaagtgtatttctcttgggtggtgtgcttgaaggagataattc
N T L T V S N Y T G T P G S V I S L G G V L E G D N S

810 820 830 840 850 860 870 880
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
acttacggaccgtctggtggtgaaaggttaatacctctggtcaagtgacatcgtttatgtcaatgaagtggcagtggtg
L T D R L V V K G N T S G Q S D I V Y V N E D G S G

890 900 910 920 930 940 950 960
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gtcagacgagagatgggtattaataattatttctgtagagggaaattctgatgcagaattctctctgaagaaccgctagt
G Q T R D G I N I I S V E G N S D A E F S L K N R V V

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gccggagcttatgattacacactgcagaaaggaaacgagagtggtggacagataataagggatgggtatttaaccagctcatct
A G A Y D Y T L Q K G N E S G T D N K G W Y L T S H L

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
tccacatctgataccgggaataacagaccggagaacggaagtattgctaccaatatggcactggctaactcactggttcc
P T S D T R Q Y R P E N G S Y A T N M A L A N S L F

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
tcatggatttgaatgagcgtgaagcaattcaggggccatgagtgaataacacagcctgagtctgcattcgtgtggatgaag
L M D L N E R K Q F R A M S D N T Q P E S A S V W M K

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
atcactggaggaaataagctctggttaagcttaatgacgggcaaaataaaacaacaaccaatcagtttatcaatcagctcgg
I T G G I S S G K L N D G Q N K T T T N Q F I N Q L G

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gggggatatttataaattccatgctgaacaactgggtgattttaccttagggattatgggaggatacgcgaatgcaaaag
G D I Y K F H A E Q L G D F T L G I M G G Y A N A K

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gtaaaacgataaattacacgagcaacaagctgccagaaacacactggatgggtattctgtcggggtatacgggtacgtgg
G K T I N Y T S N K A A R N T L D G Y S V G V Y G T W

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
tatcagaatggggaaaaatgcaacagggtcttttctgtaaaacttgatgcaataaactgggttaaatgcatcagtgaaagg
Y Q N G E N A T G L F A E T W M Q Y N W F N A S V K G

1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
tgacggactggaagaagaaaaatataatctgaatgggttaaccgcttctgcaggtgggggatataacctgaatgtgcaca
D G L E E E K Y N L N G L T A S A G G G Y N L N V H

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
catggacatcacctgaagggaataacaggtgaattctggttacagcctcatttgcaggctgtctggatgggggttacaccg
T W T S P E G I T G E F W L Q P H L Q A V W M G V T P

```
1690      1700      1710      1720      1730      1740      1750      1760
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
gatacacatcaggaggataacggaacggtggtgcaggagcagggaataatattcagacaaaagcagggtattcgtgc
D T H Q E D N G T V V Q G A G K N N I Q T K A G I R A

1770      1780      1790      1800      1810      1820      1830      1840
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
atcctggaaggtgaaaagcacctggataaggataccgggagggttcggtccgtatatacagggcaaacggatccata
S W K V K S T L D K D T G R R F R P Y I E A N W I H

1850      1860      1870      1880      1890      1900      1910      1920
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
acactcatgaatttggtgttaaaatgagtgatgacagccagttggtgtcaggtagccgaaatcagggagagataaagaca
N T H E F G V K M S D D S Q L L S G S R N Q G E I K T

1930      1940      1950      1960      1970      1980      1990      2000
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ggtattgaaggggtgattactcaaaactgtcagtggaatggcggagtcgcataatcaggcaggagggtcacgggagcaatgc
G I E G V I T Q N L S V N G G V A Y Q A G G H G S N A

2010      2020      2030
....|....|....|....|....|....|....|....|
catctccgggagcactgggataaaatcacagcttc
I S G A L G I K Y S F
```

2) NitKp-AT (2409 bp/803 AS):

```
10      20      30      40      50      60      70      80
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
atgggttaaattaaaatttggtgttttttttacagttttactatcttcagcatatgcacatggaacacacctcaaaatattac
M V K L K F G V F F T V L L S S A Y A H G T P Q N I T

90      100     110     120     130     140     150     160
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
tgatttgcgcaggacaccactttcaaaagcagccgctgttcaggccgaaccgggtatggatggatgccgctgcaacagccg
D L L E D T T F K A A A V Q A E P V W M D A A A T A

170     180     190     200     210     220     230     240
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ataagaccgtgaocgtagtagctaaagccgcagcggctggcgcgagctcgtcgcatttcccgaattgtggattccgggc
D K T V T L V A K A A A A G A Q L V A F P E L W I P G

250     260     270     280     290     300     310     320
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
taccaggaattcatgctcacgcacaaccaaaccgaaaccctaccattcatcattaaataccgcaagcagggaatcgccgc
Y P G F M L T H N Q T E T L P F I I K Y R K Q A I A A

330     340     350     360     370     380     390     400
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cgatggaccagaaatcgaaaaaattcgtcgcgcggctcaggagcataacattgcgctctcctttgggtacagcgaacggg
D G P E I E K I R R A A Q E H N I A L S F G Y S E R

410     420     430     440     450     460     470     480
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ctggcggtacgcctctacatgtcacaatgcttatcgatgcccgtggcatcaccaaaattcgctcgtcgaaagctcaaacca
A G G T L Y M S Q M L I D A D G I T K I R R R K L K P

490     500     510     520     530     540     550     560
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
accgcgttgaaacgagaactctttggcgaaggtgacggatcggaacttacaggtcgcccaaactagcgttggtcgggtggg
T R F E R E L F G E G D G S D L Q V A Q T S V G R V G

570     580     590     600     610     620     630     640
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
tgccctcaactcgcgaggagaatttgagtcgctaaacaagtttgcgcttgctgcgcagggtgaacagatcacatctccg
A L N C A E N L Q S L N K F A L A A Q G E Q I H I S

650     660     670     680     690     700     710     720
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cctggccattcacgcttggaagccctgtgctcgtcggagactccatcggcgccatcaaccaggtctacgcggccgagacg
A W P F T L G S P V L V G D S I G A I N Q V Y A A E T

730     740     750     760     770     780     790     800
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
gggaccttcgttctcatgtcgacgcagggtggttgaccgacggcatcgccgcttcgagatcgaagacagggtacaaccg
G T F V L M S T Q V V G P T G I A A F E I E D R Y N P
```

810 820 830 840 850 860 870 880
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gaatcagtatcttgggtgggtacgcgcggatctacgggctgacatgcagttgaagagcaagtcgttgtcaccgaccg
N Q Y L G G G Y A R I Y G P D M Q L K S K S L S P T

890 900 910 920 930 940 950 960
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
aagaggcatcgtctacgccgagatcgacctgtcgatgcttgaggcagcaaagtactcgtcgcgacccacgggcccactat
E E G I V Y A E I D L S M L E A A K Y S L D P T G H Y

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
tcggccctgatgtgttcagcgtgtcgattaacccggcaacggcagcctgcgggtgtcagaagttatcgactcaaacgggtga
S R P D V F S V S I N R Q R Q P A V S E V I D S N G D

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cgaggaccgagagcagcatgcggtacccttaactctacaaaagaaagtgcaggtaatactcttaccgtgtcaaatata
E D P R A A C G T L N P T K E S A G N T L T V S N Y

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ctgggacaccgggaagtgttatttctcttgggtgtgcttgaaggagataattcacttacggaccgtctggtggtgaaa
T G T P G S V I S L G G V L E G D N S L T D R L V V K

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ggtaataacctctggtcaaagtgcacatcgtttatgtcaatgaagatggcagtggtggtcagacgagagatgggtattaatat
G N T S G Q S D I V Y V N E D G S G G Q T R D G I N I

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
tatttctgtagagggaaattctgatgcagaattctctctgaagaaccgcgtagttgccggagcttatgattacacactgc
I S V E G N S D A E F S L K N R V V A G A Y D Y T L

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
agaaaggaaacgagagtgaggacagataataagggatgggtatttaaccagtcactctccacatctgatacccggaatac
Q K G N E S G T D N K G W Y L T S H L P T S D T R Q Y

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
agaccggagaacggaagtattgctaccaatatggcactggctaactcactgttctcatggatttgaatgagcgttaagca
R P E N G S Y A T N M A L A N S L F L M D L N E R K Q

1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
attcaggggcatgagtgataatacacagcctgagctctgcattccgtgtggatgaagatcactggaggaataagctctggta
F R A M S D N T Q P E S A S V W M K I T G G I S S G

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
agcttaatgacgggcaaaataaaacaacaaccaatcagtttatcaatcagctcgggggggatatttataaaattcatgct
K L N D G Q N K T T T N Q F I N Q L G G D I Y K F H A

1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gaacaactgggtgattttaccttagggattatgggaggatagcgaatgcaaaagggtaaaacgataaattacacgagcaa
E Q L G D F T L G I M G G Y A N A K G K T I N Y T S N

1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
caaagctgccagaacacactggatgggtatttctgctgggtatagcggtacgtgggtatcagaatggggaaaatgcaacag
K A A R N T L D G Y S V G V Y G T W Y Q N G E N A T

1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ggctcttctgctgaaacttgatgcaataaactggtttatgcatcagtgaaagggtgacggactggaagaagaaaaatat
G L F A E T W M Q Y N W F N A S V K G D G L E E E K Y

1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
aatctgaatggtttaaccgcttctgcaggtgggggatataacctgaatgtgcacacatggacatcacctgaaggaaataac
N L N G L T A S A G G G Y N L N V H T W T S P E G I T

```

      2010      2020      2030      2040      2050      2060      2070      2080
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
aggtgaattctggttacagcctcatttgcaggctgtctggatgggggttacaccggatacacatcaggaggataacggaa
  G E F W L Q P H L Q A V W M G V T P D T H Q E D N G

      2090      2100      2110      2120      2130      2140      2150      2160
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cgggtggtgcaggaggcagggaataatattcagacaaaagcagggtattcgtgcatcctggaagggtgaaaagcacctgt
  T V V Q G A G K N N I Q T K A G I R A S W K V K S T L

      2170      2180      2190      2200      2210      2220      2230      2240
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
gataaggataccgggcgagggttcgctcgtatatagaggcaactggatccataaacactcatgaatttggtgttaaaat
  D K D T G R R F R P Y I E A N W I H N T H E F G V K M

      2250      2260      2270      2280      2290      2300      2310      2320
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
gagtgatgacagccagttgttgtcaggtagccgaaatcaggagagataaagacagggtattgaaggggtgattactcaaa
  S D D S Q L L S G S R N Q G E I K T G I E G V I T Q

      2330      2340      2350      2360      2370      2380      2390      2400
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
acttgtaagtgaatggcgagtcgcataatcaggcagggtcacgggagcaatgccatctccggagcactggggataaaa
  N L S V N G G V A Y Q A G G H G S N A I S G A L G I K

....|....
tacagcttc
  Y S F

```

3) NitAf-AT (2505 bp/835 AS):

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
atgggttaaatataatttgggtgttttttttacagttttactatcttcagcatatgcacatggaacacctcaaaaattac
  M V K L K F G V F F T V L L S S A Y A H G T P Q N I T

      90     100     110     120     130     140     150     160
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
tgatttgctcgagcagacaagaaaaatcgctccgggcagcgccgtacaggccgcctctcccaactacgatctggcaacgg
  D L L E Q T R K I V R A A A V Q A A S P N Y D L A T

      170     180     190     200     210     220     230     240
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
gtgttgataaaaccattgagctggctcgtcaggcccgcatgagggctgtgacctgatcgtgttggtgaaacctggctg
  G V D K T I E L A R Q A R D E G C D L I V F G E T W L

      250     260     270     280     290     300     310     320
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cccggtatccctccacgtctggctggggcgacggcgctggtcgctgaaatacagtgcccgctactatgccaaactcgct
  P G Y P F H V W L G A P A W S L K Y S A R Y Y A N S L

      330     340     350     360     370     380     390     400
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ctcgctggacagtgcagagtttcaacgcattgccaggcgacggacgttggtattttcatcgcaactgggttatagcg
  S L D S A E F Q R I A Q A A R T L G I F I A L G Y S

      410     420     430     440     450     460     470     480
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
agcgcagcggcgagcctttacctgggccaatgcctgatcgacgacaagggccagatgctgtggtcgctcgcaaaactc
  E R S G G S L Y L G Q C L I D D K G Q M L W S R R K L

      490     500     510     520     530     540     550     560
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
aaacctacacatgttgagcgaccggtgttggtgaaggttatgcccgagatctgattgtgtccgacaccgagctggcgcg
  K P T H V E R T V F G E G Y A R D L I V S D T E L G R

      570     580     590     600     610     620     630     640
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
cgtcggtgcctgtgctgctgggagcacctgtcccccttgagcaagtagcgctgtactcccagcacgaagccattcaca
  V G A L C C W E H L S P L S K Y A L Y S Q H E A I H

      650     660     670     680     690     700     710     720
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ttgccgctggcgctccttttcgctgtacagcgaaacaggcccatgcgctcagcgccaaggtgaacatggctgcctcgaa
  I A A W P S F S L Y S E Q A H A L S A K V N M A A S Q

```

730 740 750 760 770 780 790 800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
atctattcgggtgaaggccagtgctttaccatcgccgccagcagtgctgcacccaggagacactggacatgctggaagt
I Y S V E G Q C F T I A A S S V V T Q E T L D M L E V

810 820 830 840 850 860 870 880
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
aggatgaacacacacgcctccctgctgaaagtggcgccggcagttccatgatattttgcgccggacggacacattggctc
G E H N A S L L K V G G G S S M I F A P D G R T L A

890 900 910 920 930 940 950 960
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cctacctgccacacgatgccgaaggcctgatcattgccgatctgaacatggaagaaattgccttcgcccaaggcgatcaac
P Y L P H D A E G L I I A D L N M E E I A F A K A I N

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gaccctgtgggcccactactccaaacccgaggccaccgtctgttactggacctggggcaccgtgagcccatgactcgggt
D P V G H Y S K P E A T R L V L D L G H R E P M T R V

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gcattccaaaagcgtgatccaggaagaagctcccgagccgcacgtgcaaagtacggctgcgcccgctgcgcgtcagccaga
H S K S V I Q E E A P E P H V Q S T A A P V A V S Q

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ctcaggactcggatagctactggtgcaagaaccgtccggtagcccttaacctacaaaagaaagtgcaggtaatactctt
T Q D S D T L L V Q E P S G T L N P T K E S A G N T L

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
accgtgtcaaaattatactgggacaccgggaagtgattttctcttgggtggtgcttgaaggagataattcacttacgga
T V S N Y T G T P G S V I S L G G V L E G D N S L T D

1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ccgtctggtggtgaaaggtaataacctctggtcaaagtgcacatcggtttatgtcaatgaagatggcagtggtggtcagacga
R L V V K G N T S G Q S D I V Y V N E D G S G G Q T

1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
gagatggtatttaattattttctgtagagggaattctgatgcagaattctctctgaagaaccgcgtagtgtgccggagct
R D G I N I I S V E G N S D A E F S L K N R V V A G A

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
tatgattacacactgcagaaaggaaacgagagtgggacagataataagggatggtatttaaccagtcattctccacatc
Y D Y T L Q K G N E S G T D N K G W Y L T S H L P T S

1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
tgataccgggcaatacagaccggagaaacggaagttatgctaccaatatggcactggctaactcactgttctctcattgatt
D T R Q Y R P E N G S Y A T N M A L A N S L F L M D

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
tgaatgagcgttaagcaattcagggccatgagtataatacacagcctgagctctgcacccgtgtggatgaagatcactgga
L N E R K Q F R A M S D N T Q P E S A S V W M K I T G

1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ggaataagctctggttaagcttaatgacgggcaaaaataaacaacaaccaatcagtttatcaatcagctcggggggatat
G I S S G K L N D G Q N K T T T N Q F I N Q L G G D I

1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ttataaattccatgctgaacaactgggtgattttaccttagggattatgggaggatagcgaatgcaaaaggtaaaacga
Y K F H A E Q L G D F T L G I M G G Y A N A K G K T

1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
taaattacacgagcaacaagctgccagaaacacactggatggttattctgtcggggtataggtacgtggtatcagaat
I N Y T S N K A A R N T L D G Y S V G V Y G T W Y Q N

1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ggggaaaatgcaacagggctctttgctgaaacttggatgcaatataactgggttaatgcatcagtgaaaggtgacggact
G E N A T G L F A E T W M Q Y N W F N A S V K G D G L

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ggaagaagaaaaataaatctgaatgggttaaccgcttctgcaggtgggggataaacctgaatgtgcacacatggacat
E E E K Y N L N G L T A S A G G G Y N L N V H T W T

2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
cacctgaaggaataacaggtgaattctggttacagcctcatttgcaggtgtctggatgggggttacaccggatacacat
S P E G I T G E F W L Q P H L Q A V W M G V T P D T H

2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
caggaggataacggaacggtggtgcagggagcagggaaaaataatattcagacaaaagcaggtattcgtgcatcctggaa
Q E D N G T V V Q G A G K N N I Q T K A G I R A S W K

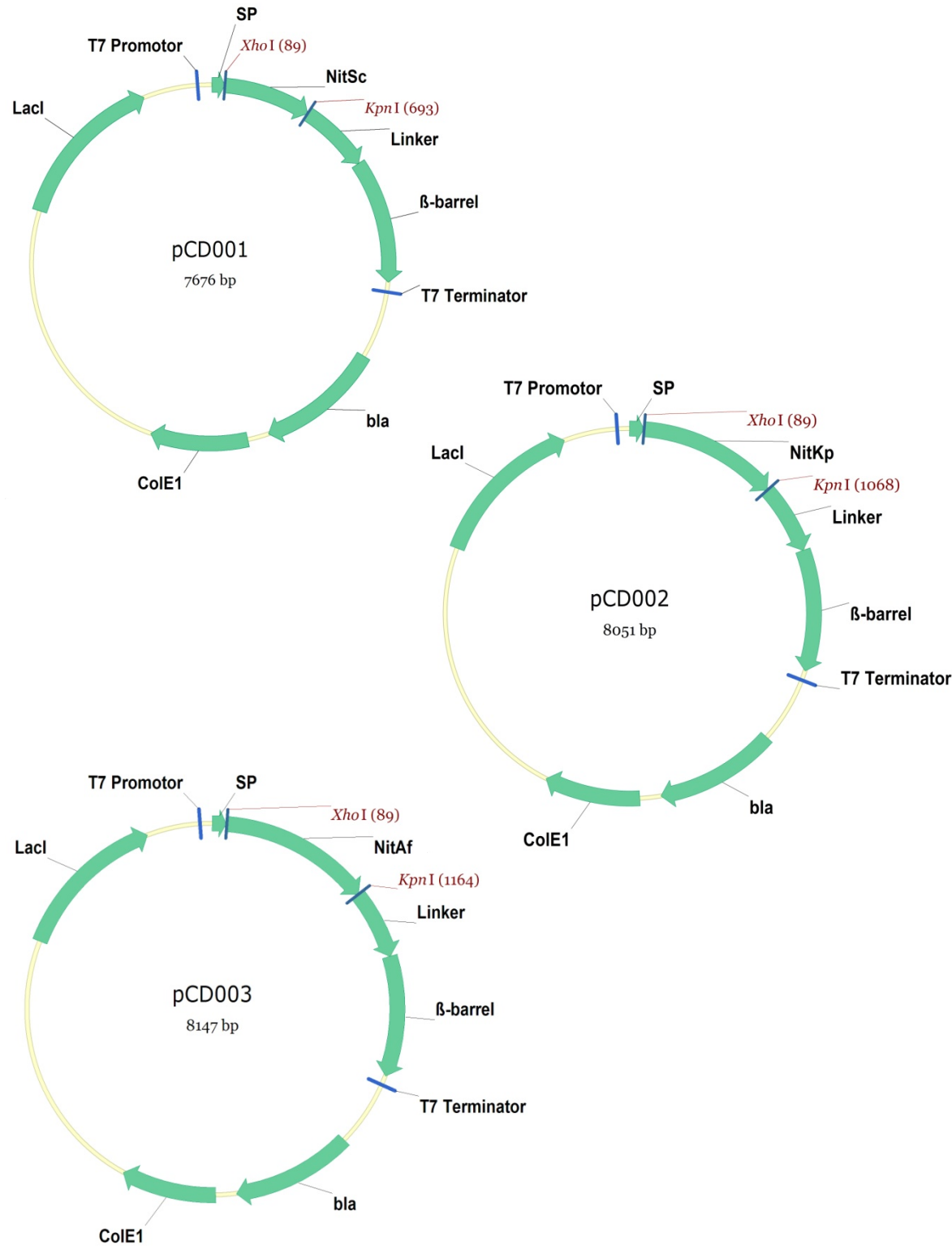
2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ggtgaaaagcacctggataaggataaccgggcggaggttcgcgtccgtatatagaggcaaactggatccataaacactcatg
V K S T L D K D T G R R F R P Y I E A N W I H N T H

2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
aatattggtgttaaaatgagtgatgacagccagttgttgcaggtagccgaaatcaggagagataaagacaggtattgaa
E F G V K M S D D S Q L L S G S R N Q G E I K T G I E

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ggggtgattactcaaaacttgtcagtgatggcggagtcgcataatcaggcaggaggtcacgggagcaatgccatctccgg
G V I T Q N L S V N G G V A Y Q A G G H G S N A I S G

2490 2500
.....|.....|.....|.....|.....|
agcactggggataaaaatacagcttc
A L G I K Y S F

3. Plasmidkarten



4. Veröffentlichungen

Zeitschriftenbeiträge

Detzel, C., Maas, R., Jose, J. (2010) Autodisplay of nitrilase from *Alcaligenes faecalis* in *E. coli* yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of enantiomerically pure R-mandelic acid. ChemCatChem (eingereicht)

Detzel, C., Maas, R., Jose, J. Autodisplay of nitrilase from *Klebsiella pneumoniae* in *E. coli* yields a whole-cell biocatalyst for the bioremediation of Oxylin-herbicides. (Manuskript in Vorbereitung)

Völker, T., Detzel, C., Maas, R., Jose, J. Bioreactor studies with a whole-cell biocatalyst obtained by Autodisplay of a nitrilase from *Alcaligenes faecalis*. (Manuskript in Vorbereitung)

Kranen, E., Detzel, C., Völker, T., Jose, J. Coexpression of a Lipase and a Foldase from *Burkholderia cepacia* by Autodisplay for the Development of a functional Whole-cell Biocatalyst. (Manuskript in Vorbereitung)

Patentanmeldungen

Jose, J., Maas, R., Detzel, C., (2009) Whole cell biocatalyst, European patent application, Application No. 09014294.4-1212.

Jose, J., Kranen, E., Detzel, C. (2010) Coexpression von Lipase und der dazugehörigen Foldase an der Zelloberfläche von *E. coli* durch Autodisplay zur Gewinnung eines Ganzzellbiokatalysator mit Lipaseaktivität und zur Gewinnung von Membranfraktionen mit Lipase Aktivität. Erfindungsmeldung, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Tagungsbeiträge

Vorträge

Detzel, C., Maas, R., Jose, J. (2009) Autodisplay of the nitrilase from *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of enantiomerically pure R-mandelic acid.

DPhG Doktorandentagung, 18.-21. November 2009, Pichlarn, Österreich

Poster

Detzel C, Maas R, Jose J (2010) Enantioselective conversion of mandelonitrile to R-mandelic acid using a whole cell biocatalyst obtained by autodisplay of Nitrilase
Dechema Jahrestagung der Biotechnologen, 21-23. September 2010, Aachen, P.7.06, veröffentlicht in Chemie Ingenieur Technik 9:1525

Detzel, C., Maas, R., Jose, J. (2010) Autodisplay of Nitrilase from *Alcaligenes faecalis* Yields a Whole-cell Biocatalyst for Enantioselective R-Mandelic Acid Production.
biocat 2010, 5th International Congress on Biocatalysis, 29. August - 2. September 2010, Hamburg, P.094