

**Untersuchung der enzymatischen Synthese
von (R)-(-)-Phenylacetylcarbinol
mit geeigneten Muteinen der
Pyruvatdecarboxylase
aus *Zymomonas mobilis***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Peter Iwan

aus Moers

Jülich 2002

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

Referentin: Frau Prof. Dr. M.-R. Kula

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. M. Braun

2. Korreferentin: Frau Priv.-Doz. Dr. M. Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Februar 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1998 bis September 2001 am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf im Forschungszentrum unter der Leitung von Frau Prof. Dr. M.-R. Kula angefertigt.

Gefördert wurde diese Arbeit mit finanziellen Mitteln im Rahmen des durch die BASF AG geförderten Projektes: „Enzymatische Synthese von L-Phenylacetylcarbinol mittels immobilisierter Pyruvatdecarboxylase“ und im Rahmen des Forschungsprojektes: „Industrielle Enzyme“.

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

<http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/mathnat/2002/iwan.html>

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die durch Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere danke ich,

Frau Prof. Dr. M.-R. Kula für die Übernahme des Hauptreferates, ihre stete Diskussionsbereitschaft und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut für Enzymtechnologie,

Herrn Prof. Dr. M. Braun, Institut für Organische Chemie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, für die freundliche Übernahme des Korreferates,

Frau Priv.-Doz. Dr. M. Pohl für die freundliche Übernahme des Korreferates, die interessante Themenstellung und ihre stete Diskussionsbereitschaft,

Frau Dr. B. Lingen für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und viele interessante Gespräche außerhalb des Laboralltags,

Frau Dr. H. Slusarczyk, Frau Dipl.-Biol. P. Heim, Frau Dipl.-Chem. U. Roemer, Frau Dr. A. Wynen, Herrn Dipl.-Biol. St. Felber, Frau M. Piqueray und Frau K. Range, sowie allen anderen Mitarbeitern des IET's für eine sehr freundschaftliche und produktive Zusammenarbeit. Dies gilt sowohl für naturwissenschaftliche Fragestellungen als auch die Freizeitgestaltung in Jülich.

Meine Eltern und nicht zuletzt meiner Freundin Veronika Nieder.

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	I
II. Abbildungsverzeichnis	V
III. Tabellenverzeichnis	VIII
IV. Abkürzungsverzeichnis	IX
V. Enzymmutantenverzeichnis	X
1. Einleitung	1
1.1 Enzyme	1
1.2 Enzyme als technische Biokatalysatoren	3
1.3 Optimierung biokatalytischer Prozesse	6
1.3.1 Optimierung des Biokatalysators	6
1.3.2 Optimierung der Reaktionsführung	8
1.3.2.1 Rührkesselreaktoren	9
1.3.2.1.1 Satzreaktor	9
1.3.2.1.2 Kontinuierliche Rührkessel	10
1.4 Technische Synthese von (<i>R</i>)-(-)-Phenylacetylcarbinol	11
1.5 Thiamindiphosphat (ThDP)-abhängige Enzyme	15
1.6 ThDP-abhängige Decarboxylasen	17
1.7 Die Pyruvatdecarboxylase aus <i>Zymomonas mobilis</i>	18
1.7.1 Struktur der Pyruvatdecarboxylase aus <i>Z. mobilis</i>	18
1.7.2 Katalysemechanismen der Pyruvatdecarboxylase	20
1.7.3 Optimierung der Pyruvatdecarboxylase für die Katalyse der (<i>R</i>)-PAC-Synthese	21
2. Motivation und Zielsetzung	24
3. Ergebnisse und Diskussion	26
3.1 Expression und Reinigung der Pyruvatdecarboxylase	26
3.1.1 Expression der PDC-Muteine	26
3.1.2 Aufreinigung der PDC-Muteine	26
3.2 Optimierung des Reaktionspuffers	29
3.2.1 Bestimmung des pH-Optimums der Carboligasereaktion	29
3.2.2 Einsatz von Leitungswasser	30
3.2.3 Stabilität der Pyruvatdecarboxylase aus <i>Z. mobilis</i> gegenüber Nitrat	33
3.2.4 Stabilität der Pyruvatdecarboxylase aus <i>Z. mobilis</i> gegenüber Metallionen	35

3.2.4.1 Einfluß auf die Decarboxylaseaktivität der PDC _____	35
3.2.4.2 Sensibilität der PDC gegenüber Cu(II) _____	37
3.2.4.3 Einfluß der Proteinkonzentration auf die Cu(II)-Empfindlichkeit _____	42
3.2.4.3 Die Carboligasereaktion der PDC unter Cu(II)-Einfluß _____	45
3.3 Stabilität der PDC-Muteine gegenüber den Substraten der Carboligasereaktion _____	46
3.3.1 Stabilität gegenüber Acetaldehyd _____	47
3.3.2 Stabilität gegenüber Benzaldehyd (BzA) _____	48
3.4 Vergleichende Charakterisierung der PDC-Muteine aus <i>Z. mobilis</i> _____	51
3.4.1 Vergleich der Stabilität gegenüber Cu(II) _____	52
3.4.2 Temperaturabhängigkeit der Carboligasereaktion _____	53
3.4.3 Vergleich der Carboligaseaktivität _____	54
3.4.3.1 Einfluß von Ethanol als Lösungsvermittler für Benzaldehyd _____	55
3.5 Kinetik der Carboligasereaktion zum (<i>R</i>)-PAC _____	56
3.5.1 Kinetik der Carboligasereaktion der PDC-Muteine _____	58
3.5.1.1 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Acetaldehydkonzentration_	
_____	58
3.5.1.2 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Benzaldehydkonzentration_	
_____	62
3.6 Reaktions- und verfahrenstechnische Versuche zur kontinuierlichen enzymatischen _____	
(<i>R</i>)-PAC-Synthese in Membranreaktoren mit PDC-Muteinen _____	65
3.6.1 Enzymmembranreaktor (gemeinsamer Reaktions- und Filtrationsraum) _____	66
3.6.1.1 Kontinuierliche (<i>R</i>)-PAC Synthese im Enzymmembranreaktor (EMR) _____	66
3.6.2 Membranreaktor mit getrenntem Reaktions- und Filtrationsraum _____	69
3.6.2.1 Kontinuierliche enzymatische (<i>R</i>)-PAC Synthese _____	70
3.6.2.2 Kontinuierliche enzymatische (<i>R</i>)-PAC Synthese mit Ethanolzusatz _____	71
4. Zusammenfassende Diskussion _____	74
5. Material _____	79
5.1 Chemikalien _____	79
5.2 Enzyme _____	80
5.3 Chromatographie- und Filtermaterial _____	81
5.4 Geräte _____	81
5.4 Software _____	83
6. Methoden _____	84

6.1 Proteinchemische Methoden	84
6.1.1 Expression der PDC-W392M-Mutante und weiterer Mutanten	84
6.1.2 Zellaufschluß	85
6.1.3 Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie	85
6.1.4 Anionenaustauschchromatographie	86
6.1.5 Hydrophobe Interaktionschromatographie	86
6.1.6 Gelpermeationschromatographie	87
6.1.7 Lyophilisierung der aufgereinigten PDC-Mutanten	87
6.1.8 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	88
6.2 Analytische Methoden	88
6.2.1 Aktivitätsbestimmung mit einem gekoppelten Enzymtest	88
6.2.2 Aktivitätsbestimmung mit einem direkten Enzymtest	90
6.2.3 Bestimmung des Proteingehaltes	90
6.2.4 Isokratische RP-HPLC-Methoden zur Bestimmung von PAC und Benzaldehyd	91
6.2.4.1 Methode 1: RP 18 Säule	91
6.2.4.2 Methode 2: RP 8 Säule	92
6.2.5 Bestimmung des Enantiomerenüberschusses des PAC mittels HPLC	93
6.2.6 Bestimmung des Enantiomerenüberschusses des PAC mittels chiraler GC	93
6.2.7 Schnelltest zur Bestimmung von PAC	94
6.3 Untersuchungen zur Stabilität der Pyruvatdecarboxylase	95
6.3.1 pH-Optimum der Carboligasereaktion	95
6.3.2 Stabilität in Leitungswasser	95
6.3.3 Stabilität gegenüber Nitrat	96
6.3.4 Stabilität gegenüber Metallionen	96
6.3.5 Stabilität gegenüber Cu(II)	97
6.3.6 Untersuchung des Einflusses der Proteinkonzentration auf die Cu(II)-Empfindlichkeit der PDC	97
6.3.7 Enzymatische C-C-Verknüpfung der PDC unter Cu(II)-Einfluß	98
6.3.8 Stabilität gegenüber Acetaldehyd	99
6.3.9 Stabilität gegenüber Benzaldehyd	99
6.3.10 Temperaturabhängigkeit der Carboligasereaktion	100
6.3.11 Enzymatische (<i>R</i>)-PAC Synthese im Satzreaktor	101
6.3.12 Carboligasereaktion in ethanolhaltigem Reaktionspuffer	101

6.4 Entwicklung eines neuen PDC-Muteins durch gerichtete Mutagenese _____	102
6.5 Reaktionstechnische Methoden _____	103
6.5.1 Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten im Satzreaktor _____	103
6.5.2 Kontinuierliche enzymatische Synthese im Membranreaktor _____	104
6.5.2.1 Enzymmembranreaktor _____	105
6.5.2.1.1 Enzymmembranreaktor: Reaktor- und Membranvorbereitung _____	107
6.5.2.2 Membranreaktor mit getrenntem Reaktions- und Filtrationsraum _____	108
7. Literatur _____	110
8. Anhang _____	122
8.1 Chirale HPLC: Chromatogramm zur Bestimmung des ee- Wertes von (<i>R</i>)-PAC _____	122
8.2 Chirale GC: Chromatogramm zur Bestimmung des ee-Wertes (<i>R</i>)-PAC _____	123
8.3 HPLC: Chromatogramm zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von (<i>R</i>)-PAC _____	124

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schwerpunkte der Optimierung einer biokatalytischen Prozeßführung	8
Abb. 2: Konzentrations-Zeit Profil in einem einfachen Rührkesselreaktor („Batch Reaktor“)	9
Abb. 3: Konzentrations-Zeit Profil in einem CTSR (<i>continuously stirred tank reactor</i>)	11
Abb. 4: Enzymatisch-chemische Synthese von (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)-(-)-Ephedrin (L-Ephedrin),	12
Abb. 5: Umsetzung von (<i>R</i>)-Phenylacetylcarbinol zu L-Ephedrin und D-Pseudoephedrin	12
Abb. 6: Nebenprodukte des fermentativen Prozesses	14
Abb. 7: Struktur des Thiamindiphosphat (ThDP)	15
Abb. 8: Allgemeines Reaktionsschema ThDP-abhängiger Enzymreaktionen	15
Abb. 9: Tetramere Struktur der PDC aus <i>Z.mobilis</i> .	19
Abb. 10: Reaktionswege der PDC	20
Abb. 11: SDS-PAGE verschiedener Fraktionen der Reinigung (IMAC) der <i>PDC-1</i>	27
Abb. 12: SDS-PAGE verschiedener Fraktionen einer Reinigung der <i>PDC-0</i> .	28
Abb. 13: Auftragung der pH-Abhängigkeit der Enzymaktivitäten der <i>PDC-1</i> .	30
Abb. 14: Stabilität der <i>PDC-1</i> in wäßrige Reaktionslösung aus Leitungswasser.	31
Abb. 15: Stabilität der <i>PDC-1</i> in wäßrigem Reaktionspuffer aus Leitungswasser mit 50 mM KP_i , pH 6,5.	32
Abb. 16: Vergleich der Restaktivitäten der <i>PDC-0-RE</i> und <i>PDC-1-RE</i> nach Inkubation in Reaktionspuffer aus Leitungswasser mit 50 mM KP_i , pH 6,5.	33
Abb. 17: Untersuchung der Stabilität der <i>PDC-1-RE</i> gegenüber Nitrat.	34
Abb. 18: Stabilität der <i>PDC-1-RE</i> gegenüber Metallionen (100 μ M).	36
Abb. 19: Stabilität der <i>PDC-1-RE</i> gegenüber $CuSO_4$ (1, 5 oder 10 μ M).	38
Abb. 20: Vergleich der Stabilitäten der <i>PDC-1-RE</i> in Leitungswasser und 1 μ M $CuSO_4$ -Lösung.	39
Abb. 21: Vergleich der Restaktivitäten der PDC-Muteine nach 1,5 h Inkubation mit 1 μ M $CuSO_4$.	40
Abb. 22: Einfluß des Proteingehaltes auf die Stabilität der <i>PDC-1</i> gegenüber 5 μ M $CuSO_4$	43
Abb. 23: Einfluß des Proteingehaltes auf die Stabilität der <i>PDC-1-RE</i> gegenüber Leitungswasser.	44
Abb. 24: Einfluß von 5 μ M oder 50 μ M $CuSO_4$ auf die enzymatische (<i>R</i>)-PAC-Synthese (Batch-Synthese) mit der <i>PDC-1-RE</i> .	45
Abb. 25: Stabilität der <i>PDC-1</i> (<i>PDC-W392M-His₆</i>) gegenüber Benzaldehyd.	49

Abb. 26: Vergleich der Restaktivitäten der PDC-Muteine nach Inkubation mit Benzaldehyd nach 6,5 h. _____	50
Abb. 27: Vergleich der Stabilitäten der PDC-Muteine <i>PDC-1-RE</i> und <i>PDC-2-RE</i> gegenüber 5 μ M CuSO ₄ _____	52
Abb. 28: Temperaturabhängigkeit der Carboligasereaktion der PDC-Muteine aus <i>Z. mobilis</i> . _____	53
Abb. 29: Vergleich der enzymatischen (<i>R</i>)-PAC Batch-Synthese mit den PDC-Muteinen <i>PDC-1</i> und <i>PDC-2</i> ausgehend von Acetaldehyd und Benzaldehyd bei 25°C. _____	55
Abb. 30: Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit im Batchreaktor durch Auftragung der Produktkonzentration gegen die Zeit. _____	57
Abb. 31: Mögliche Reaktionswege der Carboligasereaktion PDC aus <i>Z. mobilis</i> . _____	58
Abb. 32: Reaktionsgeschwindigkeiten der Carboligasereaktion der <i>PDC-1</i> in Abhängigkeit von der Acetaldehyd-(AcA)-Konzentration. _____	59
Abb. 33: Reaktionsgeschwindigkeiten der Carboligasereaktion der <i>PDC-2</i> in Abhängigkeit von der Acetaldehyd-(AcA)-Konzentration. _____	61
Abb. 34: Reaktionsgeschwindigkeiten der Carboligasereaktion der <i>PDC-1</i> in Abhängigkeit von der Benzaldehyd (BzA)-Konzentration. _____	62
Abb. 35: Reaktionsgeschwindigkeiten der Carboligasereaktion der <i>PDC-2</i> in Abhängigkeit von der Benzaldehyd (BzA)-Konzentration. _____	63
Abb. 36: Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten der Carboligasereaktion der <i>PDC-1</i> im äquimolaren Konzentrationsbereich von Acetaldehyd und Benzaldehyd. _____	64
Abb. 37: Unterschiedliche Konzepte von Membranreaktoren _____	65
Abb. 38: Kontinuierliche enzymatische (<i>R</i>)-PAC Synthese mit der <i>PDC-1-RE</i> im EMR. _____	67
Abb. 39: Einfluß der Rührbewegung auf die kontinuierliche enzymatische (<i>R</i>)-PAC Synthese mit der <i>PDC-1-RE</i> im EMR. _____	68
Abb. 40: Schematischer Aufbau des Membranreaktors mit getrenntem Reaktions- und Filtrationsraum. _____	69
Abb. 41: Kontinuierliche enzymatische (<i>R</i>)-PAC Synthese mit der <i>PDC-1-RE</i> oder <i>PDC-2-RE</i> im Membranreaktorsystem mit getrenntem Reaktions- und Filtrationsraum. _____	71
Abb. 42: Kontinuierliche enzymatische (<i>R</i>)-PAC Synthese mit der <i>PDC-2-RE</i> im Membranreaktorsystem mit getrenntem Reaktions- und Filtrationsraum mit 10 % (v/v) Ethanol. _____	72
Abb. 43: Unterschiedliche Bauformen von Membranreaktoren _____	105

Abb. 44: Enzymmembranreaktor Kragl <i>et al.</i> (1991)	106
Abb. 45: Schematischer Aufbau des Membranreaktor mit getrenntem Reaktions- und Filtrationsraum	109
Abb. 46: Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von Phenylacetylcarbinol mittels chiraler HPLC.	122
Abb. 47: Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von Phenylacetylcarbinol mittels chiraler GC.	123
Abb. 48: Quantitative und qualitative Bestimmung von Phenylacetylcarbinol mittels RP-HPLC.	124

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einteilung von Enzymen in sechs Enzymklassen _____	2
Tab. 2: Vor- und Nachteile der Verwendung unterschiedlicher Enzympräparate _____	4
Tab. 3: Ausgewählte enzymatische Biotransformationen in der Industrie _____	5
Tab. 4: Präparate mit Ephedrin nach ‚Rote Liste 1999‘ _____	13
Tab. 5: Reaktionen ThDP-abhängiger Enzyme _____	16
Tab. 6: ThDP-abhängige Decarboxylasen _____	17
Tab. 7: Aufreinigung der <i>PDC-1</i> (PDC-W392M-His ₆) _____	27
Tab. 8: Aufreinigung der <i>PDC-0</i> (PDC-W392M ohne His-tag) _____	28
Tab. 9: Vergleich der Stabilitäten der PDC-Muteine in 35 mM Benzaldehyd _____	50
Tab. 10: Vergleich enzymatischer (<i>R</i>)-PAC Synthesen aus der Literatur mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren _____	78

IV. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
AcA	Acetaldehyd
ADH	Alkoholdehydrogenase
BSA	Rinderserumalbumin
BzA	Benzaldehyd
<i>E. coli</i>	<i>Escherchia coli</i>
ee	enantiomeric excess
EMR	Enzymmembranreaktor
EtOH	Ethanol
FDH	Formiatdehydrogenase
GC	Gaschromatographie
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
(His) ₆	Hexahistidin-tag
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IMAC	immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
K _m	Michaelis-Menten Konstante
KMes	Kalium 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer
KP _i	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MG	Molgewicht
NAD ⁺	oxidiertes Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinucleotid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
η	Ausbeute
OD _x	optische Dichte, Extinktion bei einer Wellenlänge von x Nanometern

(R)-PAC	(R)-(-)-Phenylacetylcarbinol, bzw. (R)-1-Hydroxy-1-phenylpropan-2-on
PEEK	Polyetheretherketon
PDC	Pyruvatdecarboxylase
PEG	Polyethylenglycol
RE	Rohextrakt
rpm	Umdrehungen pro Minute
RP	reversed phase
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
<i>S. cerevisiae</i> oder <i>S.c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. uvarum</i>	<i>Saccharomyces uvarum</i>
ThDP	Thiamindiphosphat
τ	Verweilzeit
U	Unit
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
VE	Vollentsalzt
v/v	Volumenanteil pro Volumen
wt	Wildtyp
<i>Z.mobilis</i> oder <i>Z.m.</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>

V. Enzymmutantenverzeichnis

<i>PDC-0</i>	PDC-W392M (ohne His ₆ -tag)
<i>PDC-1</i>	PDC-W392M-His ₆
<i>PDC-2</i>	PDC-W392M-K553R-His ₆

1. Einleitung

1.1 Enzyme

Enzyme sind natürliche Katalysatoren, die chemische Reaktionen in biologischen Systemen katalysieren. Fast alle bekannten Enzyme sind Proteine. Erst in den achtziger Jahren wurden katalytisch aktive RNA-Moleküle, die Ribozyme entdeckt (Theil, 1997).

Enzyme sind höchst effektive Katalysatoren, die eine Reaktion um den Faktor 10^7 bis 10^{14} beschleunigen können und daher nur in geringen Konzentrationen der Reaktion zugegeben werden müssen. Im allgemeinen werden Katalysatoren bei chemischen Reaktionen in einem Konzentrationsbereich von 0,1-1 mol % eingesetzt. Im Gegensatz dazu können enzymatische Reaktionen mit einer Konzentration des Biokatalysators von 10^{-3} bis 10^{-4} mol % mit guten Ausbeuten durchgeführt werden (Faber, 2000). Enzyme besitzen eine hohe Chemo- und Regioselektivität und arbeiten unter milden Reaktionsbedingungen. Sie beschleunigen die von ihnen katalysierte Reaktion in einem Temperaturbereich von 20°C bis 40°C, bei annähernd neutralen pH-Werten und unter atmosphärischem Druck, wodurch unerwünschte Nebenreaktionen wie Umlagerung, Isomerisierung oder Zersetzung der Edukte bzw. Produkte vermindert werden. Als nachteilig für enzymatisch katalysierte Reaktionen erweisen sich oft die geringe Löslichkeit der Substrate in wässriger Lösung, sowie die Instabilität gegenüber Änderung des Reaktionsmilieus, wie Temperatur und pH-Wert und die Inhibition durch Substrate und Produkte.

Ein Enzym besteht aus Polypeptidketten, bestehend aus Copolymeren von Aminosäuren gleicher absoluter Konfiguration, d.h. sie sind enantiomerenreine Makromoleküle, die, je nach Reaktionstyp, ihre chirale Information während der Reaktion übertragen. Die Höhe der Differenz der Aktivierungsenergie beider Reaktionsrichtungen ist entscheidend für die Enantioselektivität der katalysierten Reaktion. Die entstehenden Enantiomere können unterschiedliche Wirkungen besitzen. Als Beispiele sind hier Asparagin und Methyldopa zu nennen, (*S*)-Asparagin schmeckt bitter, (*R*)-Asparagin süß. Bei Methyldopa zeigt nur das (-)-Enantiomer eine blutdrucksenkende Wirkung.

Viel häufiger tritt aber der Fall auf, daß das andere Enantiomer entweder eine mehr oder weniger unerwünschte Nebenreaktion auslöst oder, wie beim (*R*)-Enantiomer des Penicillamins, sogar toxisch wirkt (Faber, 2000; Christen & Vögtle, 1990).

Die Klassifizierung und Nomenklatur der Enzyme erfolgt anhand der jeweils katalysierten Reaktion. Je nach Reaktionstyp sind Enzyme einer der sechs Hauptklassen zugeordnet (Tab. 1) (IUB, 1992).

Tab. 1: Einteilung von Enzymen in sechs Enzymklassen

Klasse	Enzym	Reaktionstyp
1	Oxidoreduktasen	Oxidation und Reduktion: Oxidation von Alkoholen, von C-H- und C-C-Bindungen; Reduktion von Carbonylverbindungen; Epoxidierung
2	Transferasen	Übertragung funktioneller Gruppen: Acyl-, Phosphat-, Glykosyl-, Carboxyl- und Formylgruppen
3	Hydrolasen	Hydrolyse: Spaltung und Bildung von Estern, Amiden, Glykosiden und Peptiden
4	Lyasen	Eliminierung unter Ausbildung von Doppelbindungen oder Addition an Doppelbindungen oder Spaltungsreaktionen: Anlagerung an CC-, CN- und CO-Doppelbindungen und die Rückreaktion
5	Isomerasen	Isomerisierung: E/Z-Isomerisierung und Racemisierung, intramolekulare Oxidation und Reduktion
6	Ligasen	Bildung kovalenter Bindungen unter Energieverbrauch: Verknüpfung von zwei Molekülen unter Bildung einer C-C-, C-N-, C-O- oder C-S-Bindung

1.2 Enzyme als technische Biokatalysatoren

Die rasche Entwicklung der Biochemie und Molekularbiologie hat in den letzten Jahren zur Entdeckung und Beschreibung von mehr als 3500 Enzymen geführt (Schomburg & Stephan, 1997), jedoch sind bisher nur ca. 10 % kommerziell erhältlich. Herausragende Bedeutung für die organische Synthese haben Hydrolasen, die in 65 % aller enzymkatalysierten Reaktionen eingesetzt werden. Oxidoreduktasen und Lyasen werden in 25 % der Synthesen eingesetzt, gefolgt von Transferasen, Isomerasen und Ligasen (je <5 %) (Theil, 1997).

Hydrolasen und Oxidoreduktasen nahmen 1996 die größten Anteile am industriellen Enzymmarkt ein, wobei die hydrolytisch wirkenden Enzyme immer noch ca. 80 % des Gesamtumsatzes ausmachten. Aber gerade durch die potentiellen Einsatzmöglichkeiten von Oxidoreduktasen im Bereich der enantioselektiven Synthese und Analytik wird eine zunehmende Bedeutung dieser Enzymklasse in den nächsten 10 Jahren erwartet (Wrotnowski, 1997).

Für die enzymatische Katalyse können die Biokatalysatoren in verschiedenen Reinheitsgraden eingesetzt werden. Die Verwendung von isoliertem Enzym, Rohextraktenzympräparaten oder ganzen Mikroorganismen, jeweils in freier oder immobilisierter Form, hängt von folgenden Faktoren ab (Faber, 2000):

1. Reaktionstyp
2. Notwendigkeit einer Cofaktorregenerierung
3. Maßstab des biokatalytischen Prozesses

Tabelle 2 beschreibt die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen biokatalytischen Systeme (Pohl, 2000a; Faber, 2000)

Tab. 2: Vor- und Nachteile der Verwendung unterschiedlicher Enzympräparate

Enzymquelle	Vorteile	Nachteile
Wachsende Zellen	<ul style="list-style-type: none"> • keine Cofaktorregenerierung notwendig • Enzymaufreinigung entfällt • Enzymstabilität höher als im isolierten Zustand • relativ hohe Katalyseaktivität 	<ul style="list-style-type: none"> • Nebenreaktionen durch verschiedene Enzyme, dadurch viele Nebenprodukte • Isolierung des Reaktionsproduktes aus komplexen Medien • große Biomasse • Prozeßkontrolle zum Teil schwierig • geringe Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln
Ruhende Zellen	<ul style="list-style-type: none"> • weniger Nebenprodukte gegenüber wachsenden Zellen • einfaches Reaktionsmedium • Verwendung organischer Lösungsmittel möglich 	<ul style="list-style-type: none"> • geringere Katalyseaktivität • Nebenaktivitäten
Rohextraktenzympräparate	<ul style="list-style-type: none"> • Proteinfraction anreicherbar • Verwendung org. Lösungsmittel möglich 	<ul style="list-style-type: none"> • geringere Katalyseaktivität • eventuell proteolytischer Abbau • eventuell Nebenaktivitäten • Coenzymregenerierung notwendig
Isolierte Enzyme	<ul style="list-style-type: none"> • höchste katalytische Aktivität • gut charakterisiertes Reaktionssystem • keine Nebenaktivitäten • hohe Selektivität • Einsatz hoher Katalysatorkonzentration möglich 	<ul style="list-style-type: none"> • eventuell geringere Stabilität, gerade gegenüber org. Lösungsmitteln • Enzymaufreinigung • Coenzymregenerierung notwendig
Immobilisierte Enzyme	<ul style="list-style-type: none"> • erhöhte Stabilität im Verhältnis zum freiem Enzym • Rückhaltung im Reaktionssystem, dadurch einfache Rezyklierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Aktivitätsverlust durch die Immobilisierung

Prinzipiell gibt es viele Möglichkeiten, Enzyme als Biokatalysatoren gezielt für technische Prozesse einzusetzen, wobei einige Produkte im Megatonnenmaßstab produziert werden (Tab. 3).

Tab. 3: Ausgewählte enzymatische Biotransformationen in der Industrie
(Bommarius *et al.*, 1998)

Enzym	Produkt	Reaktortyp	Jahresproduktion	Hersteller
Glucoseisomerase	Fructose	Festbettreaktor, immobilisierter Enzym-Reaktor	$>10^6$ t/a	diverse
Nitrilhydratase	Acrylamid	Batch-Reaktor	$>10^5$ t/a	Nitto
Lipase (<i>Mucor miehei</i>)	Kakaobutter	Festbettreaktor, immobilisierter Enzym-Reaktor	$>10^5$ t/a	Fuji Oil, Unilever
Penicillinamidase	6-Aminopenicillin-säure	Festbettreaktor, immobilisierter Enzym-Reaktor	$>10^3$ t/a	diverse
Aspartase	L-Aspartat	Festbettreaktor, immobilisierter Enzym-Reaktor	$>10^3$ t/a	Tanabe
Thermolysin	Aspartam	-	$>10^3$ t/a	Tosoh/DSM
Aminoacylase	L-Methionin, L-Valin L-Phenylalanin	Festbettreaktor, immobilisierter Enzym-Reaktor, EMR	>100 t/a	Degussa, Tanabe
β -Tyrosinase	L-Dopa	-	>100 t/a	Ajinomoto
Hydroxylase	L-Carnithin	Batch-Reaktor	>100 t/a	Lonza
Lipase	(<i>R</i>)-Glycidylbutyrat	Batch-Reaktor	>10 t/a	BASF, DSM

1.3 Optimierung biokatalytischer Prozesse

Die Möglichkeiten, interessante Enzyme als Biokatalysatoren für technische Prozesse anzupassen, umfassen intrinsische Methoden, die das Enzym selbst optimieren, sowie extrinsische Methoden, welche die Einflußgrößen einer enzymatischen Reaktion bestimmen. Hierzu zählt nicht nur die Bestimmung und Charakterisierung von Inaktivierungsfaktoren, die kinetische und thermodynamische Charakterisierung des Reaktionssystems, sondern auch die Möglichkeit der Stabilisierung von Enzymen durch Immobilisierung. Die Zusammenführung dieser Erkenntnisse kann dann zur Auswahl eines geeigneten Bioreaktorsystems genutzt werden.

1.3.1 Optimierung des Biokatalysators

Enzyme als Biokatalysatoren in technischen Prozessen werden häufig mit Eigenschaften benötigt, die nicht zu den Eigenschaften des natürlichen Enzyms zählen. Dazu gehören hohe spezifische Aktivitäten auch gegenüber unnatürlichen Substraten, sowie Stabilität unter Prozeßbedingungen, d.h. in Gegenwart organischer Lösungsmittel, bei hohen Temperaturen, bei extremen pH-Werten, Scherkräften, Detergentien und Oxidantien. Um Enzyme für technische Prozesse zu entwickeln, erweisen sich das rationale Protein-Design (gerichtete Mutagenese) und die gerichtete Evolution als geeignete Methoden (Voigt *et al.*, 2000; Bornscheuer & Pohl, 2001). Beide Verfahren beruhen maßgeblich auf der Veränderung der Aminosäuresequenz des zu optimierenden Enzyms durch molekularbiologische Methoden.

Das rationale Proteindesign erfordert neben der Verfügbarkeit des entsprechenden Gens, Informationen zur dreidimensionalen Proteinstruktur und die Kenntnis über die molekularen Ursachen der zu ändernden Eigenschaft des Enzyms. In einigen Fällen sind mögliche molekulare Ursachen der zu ändernden Eigenschaft des Enzyms bekannt bzw. können aus der dreidimensionalen Struktur abgeleitet werden.

Durch gerichtete Mutagenese kann zum Beispiel die Enantioselektivität einer enzymatischen Reaktion geändert werden. Durch zwei Punktmutationen bei der Vanilyl-Alkohol-Oxidase konnte die Enantioselektivität bei der betrachteten Hydroxylierung von 4-Ethylphenol zu 1-(4'-Hydroxy-phenyl)-ethanol von (*R*) zur (*S*) Spezifität (80 % ee) umgekehrt werden (Bornscheuer & Pohl, 2001).

Die gerichtete Mutagenese kann auch zu veränderten Enzymaktivitäten führen. Der Austausch einer Aminosäure in Papain führte zu einer um den Faktor 10^4 erhöhten Wechselzahl bei der Nitril-Hydrataseaktivität des Enzyms im Vergleich zum Wildtypenzym (Cedrone *et al.*, 2000). Die Verbesserung der Carboligaseaktivität einer α -Ketosäuredecarboxylase gelang durch den gezielten Austausch eines sperrigen Tryptophanrestes durch kleinere Aminosäuren im Substratkanal (Pohl, 1997; Pohl, 2000a; Pohl, 2000b).

Der gezielte Austausch einer Aminosäure kann auch zu einer erhöhten Stabilität eines Enzyms zum Beispiel gegenüber Oxidationsmitteln führen. Der Austausch eines Cysteinrestes gegen eine nicht-oxidationsempfindliche Aminosäure führte bei der Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii*, zur signifikanten Erhöhung der Stabilität des Enzyms gegenüber CuCl_2 (Slusarczyk *et al.*, 2000).

Anhand einer dreidimensionalen Proteinstruktur lassen sich die Aminosäurereste, die potentiell an der Katalyse oder an der Bindung von etwaigen Cofaktoren beteiligt sind, relativ unproblematisch bestimmen, wenn das katalytische Zentrum bekannt ist. Die Beurteilung komplexerer molekularer Zusammenhänge, wie sie der Stabilität gegenüber erhöhter Temperatur, organischen Lösungsmitteln, extremen pH-Werten etc. zu Grunde liegen, ist hingegen oft nur unzureichend möglich. Im Einzelfall sind Verbesserungen durch rationales Proteindesign möglich (Bornscheuer & Pohl, 2001). Eine wirkliche Optimierung durch gezielte Einführung von Mehrfachmutanten ist nur schwer erreichbar. In diesen Fällen sind kombinatorische Verfahren, wie die gerichtete Evolution oft wirkungsvoller.

Im Gegensatz zum rationalen Proteindesign sind für kombinatorische Verfahren weder eine strukturelle Information noch die Kenntnis der molekularen Grundlagen der zu ändernden Eigenschaften von Bedeutung. Hier wird statt dessen eine große Anzahl von Mutanten des Enzyms nach der gewünschten verbesserten oder neuen Eigenschaft durchsucht, und so die Wahrscheinlichkeit erhöht, eine solche neue Mutante zu finden. Je größer die Anzahl der Mutanten ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, eine Mutante mit der erhofften Eigenschaft zu finden. Die Diversität an Mutanten wird durch eine Zufallsmutagenese erzeugt. Durch das wiederholte Durchlaufen von Zufallsmutagenese und Selektion sind bei Enzymen bereits signifikante Verbesserungen der Stabilität, Aktivität (Harris & Craik, 1998; Kuchner & Arnold, 1997; Skandalis *et al.*, 1997), Enantioselektivität (May *et al.*, 2000; Liebeton *et al.*, 2000; Reetz, 2000), Änderungen des Substratspektrums (Yano *et al.*, 1998), sowie die Einführung neuer Funktionen in Enzyme gelungen (Arnold, 2001).

1.3.2 Optimierung der Reaktionsführung

Die Reaktionstechnik ist neben der Prozesskunde und den mechanischen und thermischen Grundoperationen ein Hauptgebiet der technischen Chemie (DECHEMA, 1994).

Gerade bei katalytischen, also auch bei enzymkatalysierten Reaktionen, kommt der Reaktionsführung eine wichtige Bedeutung zu. Abbildung 1 zeigt graphisch die Schwerpunkte, die bei der Optimierung eines biokatalytischen Prozesses wichtig sind (Liese, 1998).

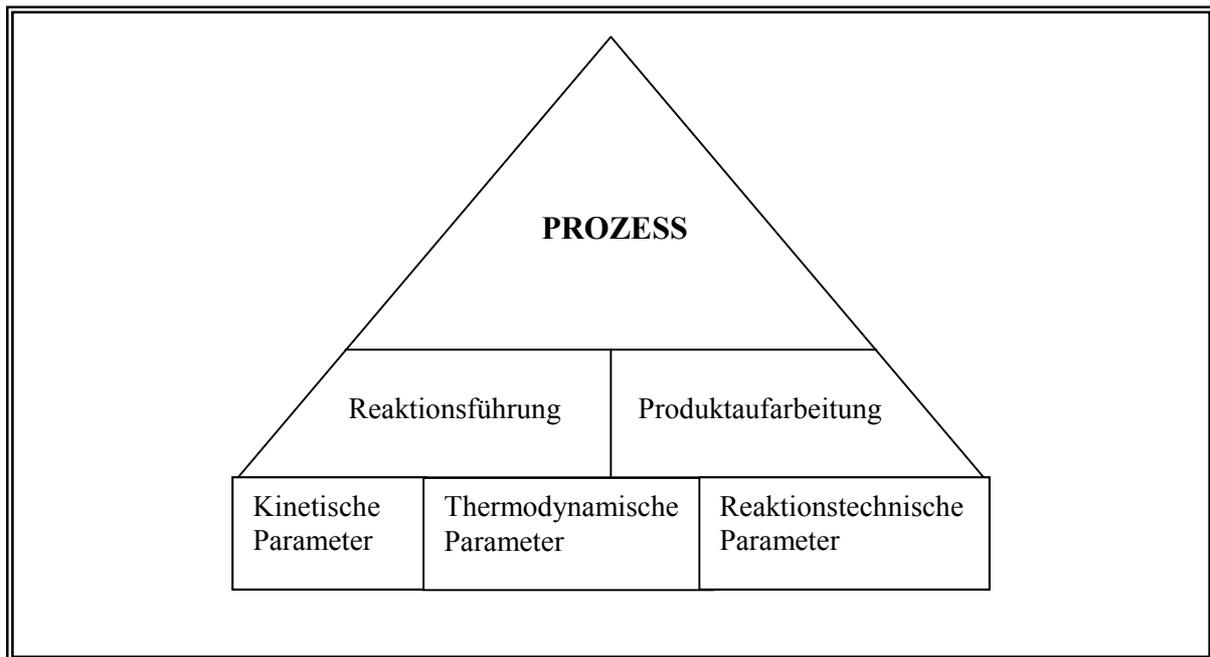


Abb. 1: Schwerpunkte der Optimierung einer biokatalytischen Prozeßführung

Im Mittelpunkt der gerichteten Entwicklung eines biokatalytischen Prozesses stehen die Optimierung der Selektivität, der Raum-Zeit-Ausbeute und des Biokatalysatorverbrauchs. Die Auswahl der optimalen Reaktoren und deren Betriebsweisen erfolgt auf Grundlage der thermodynamischen Konstanten, der Reaktionsbedingungen und der kinetischen Parameter. Aus diesen ergeben sich dann die Reaktionsführung und die Aufarbeitung des gewünschten Produktes (Biselli *et al.*, 1995; Kragl, 1997; Levenspiel, 1998).

In dieser Arbeit werden hauptsächlich zwei verschiedene Typen von Enzymreaktoren betrachtet und verwendet, die beide zur Klasse der Rührkesselreaktoren gehören (Satzreaktor („Batch“) und der kontinuierliche Rührkessel (hier: Enzymmembranreaktor (EMR)).

Die im folgenden vorgestellten Enzymreaktoren sind nur als Denkansätze zu verstehen und können variiert und kombiniert werden, um eine für die jeweilige Reaktion optimale Prozeßführung zu erreichen (Hartmeier, 1986).

1.3.2.1 Rührkesselreaktoren

Die Rührkesselreaktoren sind die in der allgemeinen Biotechnologie am weitesten verbreitete Reaktorform. Grundsätzlich unterscheidet man nach den möglichen Betriebsarten die ansatzweise (engl. "batch") und die kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktoren (CTSR; continuously stirred tank reactor).

1.3.2.1.1 Satzreaktor

Beim idealen Satzreaktor variieren die Konzentrationen von Substrat (S) und Produkt (P) mit der Zeit (Abb. 2). Setzt man eine optimale Durchmischung voraus, sind die Konzentrationen zu jedem Zeitpunkt an jeder Stelle des Reaktors uniform.

Bei diesem Verfahren (Batchverfahren) werden die Biokatalysatoren nach Ende der Reaktion durch Separation oder Filtration abgetrennt und im günstigsten Fall erneut im nächsten Ansatz verwendet.

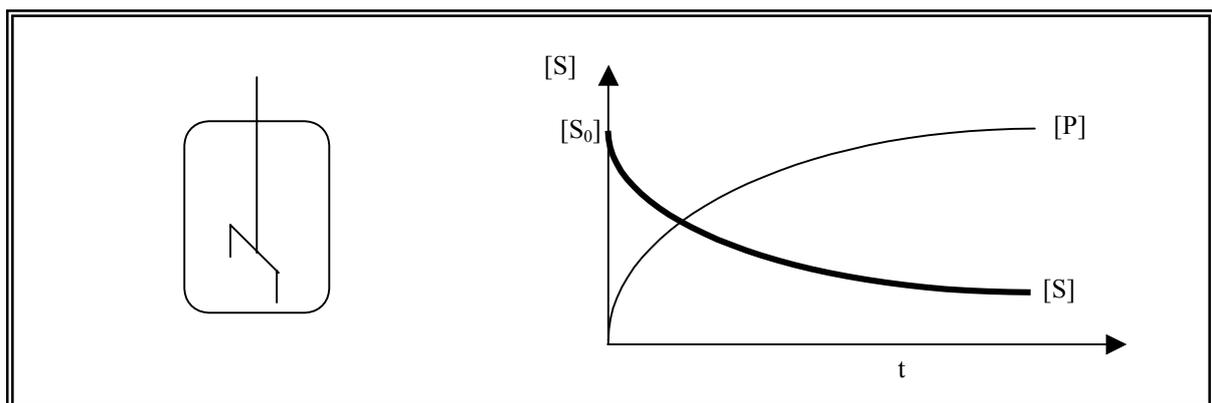


Abb. 2: Konzentrations-Zeit Profil in einem einfachen Rührkesselreaktor („Batch Reaktor“)

Da hier kein Zu- oder Ablauf der Reaktionslösung vorliegt, bleibt das Volumen des Reaktors bzw. der Reaktionslösung während des Reaktionsverlaufes konstant.

Es gilt somit für das Volumen V und die Substratkonzentration S über die Zeit t

$$\frac{dV}{dt} = 0 \text{ und } \frac{dS}{dt} = r_s$$

mit r_s als Geschwindigkeit der Änderung der Substratkonzentration.

Diese Prozeßführung eignet sich für Enzymreaktionen, die in einem großen Substrat- und Produktkonzentrationsbereich eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit aufweisen, d.h. weder durch Substrate noch durch Produkte inhibiert werden.

1.3.2.1.2 Kontinuierliche Rührkessel

Beim kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor (CTSR; continuously stirred tank reactor; z.B. Enzymmembranreaktor, kontinuierlicher Wirbelschichtreaktor) erfolgt eine ständige Zuführung von Substrat und die Abführung von Produkt. Die Enzyme sind dabei im Reaktor durch eine Membran oder durch Bindung an einen Träger immobilisiert. Durch die „ideale Durchmischung“ stellen sich in diesem Reaktortyp nach einer anfänglichen Einlaufphase die Substrat- und Produktkonzentration ein, so daß sie unabhängig von Ort und Zeit sind. Das heißt, daß im Reaktor die gleichen Substrat- und Produktkonzentrationen vorliegen, wie im Ablauf. Dieser Zustand wird „steady state“ genannt. In diesem Zustand fließt im Reaktionsablauf ein konstant definiertes Reaktionsgemisch ab, im Idealfall solange der Reaktor betrieben wird.

Es gilt somit für das Volumen V und die Substratkonzentration S über die Zeit t

$$\frac{dV}{dt} = 0 \text{ und } \frac{dS}{dt} = F \cdot (S_0 - S) + r_s$$

mit S_0 als Substratkonzentration im Zulauf, F als Fluß durch den Reaktor und r_s als Geschwindigkeit der Änderung der Substratkonzentrationen (Abb. 3).

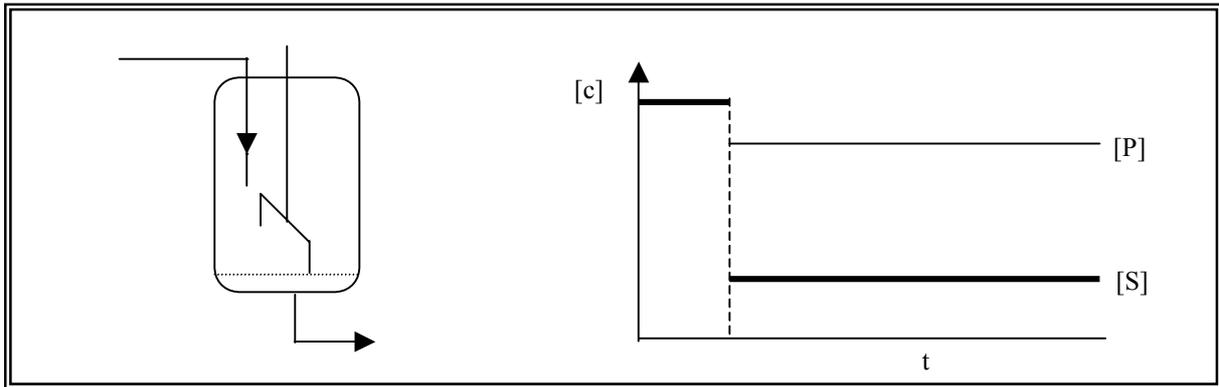


Abb. 3: Konzentrations-Zeit Profil in einem CTSR (*continuously stirred tank reactor*)

Dieser Reaktortyp ist demzufolge gut geeignet für Enzyme, deren Optimum in einem schmalen Substratkonzentrationsfenster liegt und/oder bei denen Substratinhibition vorliegt.

1.4 Technische Synthese von (*R*)-(-)-Phenylacetylcarbinol

Die Fähigkeit gärender Hefe zur Acyloinkondensation wurde 1921 von Neuberg und Hirsch beschrieben (Neuberg & Hirsch, 1921). Wird dem Fermentationsansatz Benzaldehyd zugesetzt, entsteht das enantiomerenreine (*R*)-(-)-1-Phenyl-1-hydroxypropan-2-on (Phenylacetylcarbinol, PAC) (Neuberg & Ohle, 1922). Diese Entdeckung führte zu einer der ersten industriell genutzten, mikrobiellen Transformationen (Hildebrandt & Klavehn, 1932), die bis heute ihre Anwendung findet (Abb. 4). Das aktuelle, schon 1949 beschriebene Herstellungsverfahren (Neuberg, 1949), beruht auf der Fermentation der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* unter kontrollierter Zugabe von Benzaldehyd (Liese *et al.*, 2000). Durch reduktive Aminierung wird dieses Produkt in (1*R*,2*S*)-Ephedrin überführt (Abb. 4).

Die chirale Kondensation von Acetaldehyd und Benzaldehyd zu (*R*)-Phenylacetylcarbinol wird in Hefe, wie auch in verschiedenen anderen Organismen durch das Enzym Pyruvatdecarboxylase (PDC) (EC 4.1.1.1.), einem Thiamindiphosphat-(ThDP) abhängigen Enzym, in einer Nebenreaktion katalysiert. Es katalysiert in der Hauptreaktion die nicht-oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd und CO₂.

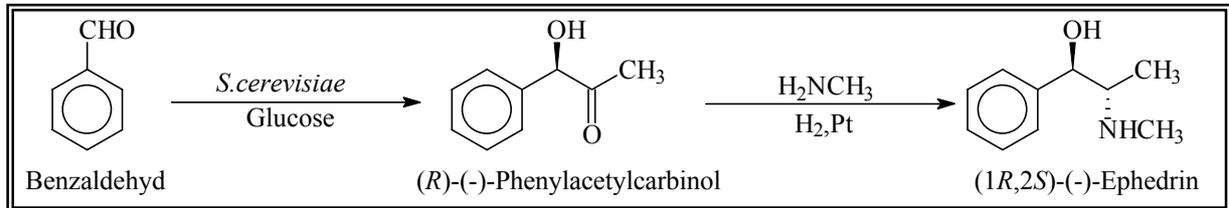


Abb. 4: Enzymatisch-chemische Synthese von (*1R,2S*)-(-)-Ephedrin (L-Ephedrin), (*S.cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae*)

Ephedrin ist ein seit Jahrhunderten bekanntes Arzneimittel. Es wurde 1887 in der chinesischen Ma-Huang-Droge gefunden, die aus verschiedenen Schachtelhalm-Arten (*Ephedra spec.*) gewonnen wird. Pharmakologisch wirkt Ephedrin blutdrucksteigernd und zugleich anregend auf das sympathische Nervensystem (Beyer, 1991). Das L-Ephedrin kann durch eine Inversionsreaktion in das ebenfalls in Medikamenten verwendete D-Pseudo-Ephedrin umgesetzt werden (Abb. 5).

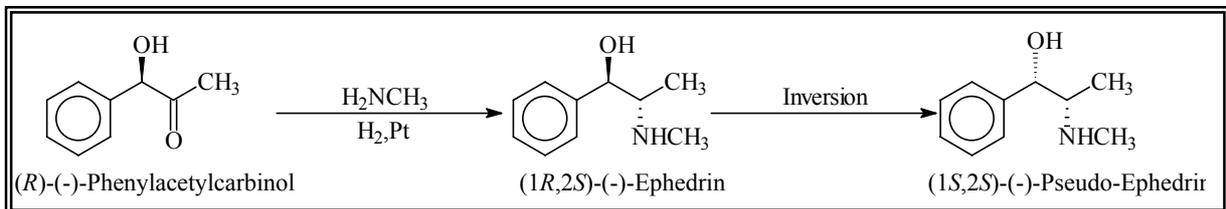


Abb. 5: Umsetzung von (*R*)-Phenylacetylcarbinol zu L-Ephedrin und D-Pseudoephedrin

Diese Medikamente, die in der Human- aber auch Veterinärmedizin verwendet werden, sind von ihrer Herkunft dem Adrenalin verwandte Sympathomimetika, die hauptsächlich als Bronchodilatoren (Bronchien erweiternde Mittel) und Dekongestionsmittel dienen (Rhinologika, schleimhautabschwellende Mittel) (Hoch & König, 1988). Sie werden aber auch bei anderen Indikationen eingesetzt (Tab. 4).

Tab. 4: Präparate mit Ephedrin nach ‚Rote Liste 1999‘

(Unter Inhaltsstoffe ist nur der Ephedrinbestandteil aufgeführt. Bei allen Präparaten handelt es sich um Kombinationspräparate mit zusätzlichen Wirkstoffen).

Präparat	Inhaltsstoff	Indikation	Hersteller
Antiföhnnon-N	Ephedrin-HCl	Antihypotonika	Südmedica
Asthma6-N	Ephedrin-HCl	Bronchiolytika/ Antiasthmatica	Hobein
Ephepect	Ephedrin-HCl	Antitussiva/ Expektorantia	Bolder
Equisil	Ephedrin-HCl	Antitussiva/ Expektorantia	Klein
Felsol Neo	Ephedrin-HCl	Bronchiolytika/ Antiasthmatica	Roland
Fomagrippin N	Ephedrin-HCl	Grippemittel	Michallik
Hevertopect	Ephedrin-HCl	Bronchiolytika/ Antiasthmatica	Hevert
Medigel Gel	Ephedrin-Sulfat	Venentherapeutika	Medice
Perdiphen	Ephedrin-HCl	Grippemittel	Schwabe/Spitzner
Pulmocordio forte	Ephedrin-HCl	Antitussiva/ Expektorantia	Hevert
Stipo Nasenspray	Ephedrin-HCl	Rhinologika	Repha
Vencipon N	Ephedrin-HCl	Abmagerungsmittel/ Appetitzügler	Artesan
Wick MediNait	Ephedrin-Sulfat	Grippemittel	Wick Pharma

Das dargestellte Verfahren zur Herstellung von (*R*)-PAC zeigt jedoch einige Probleme der fermentativen Stoffumwandlung. Wenn eine zu hohe Benzaldehydkonzentration eingesetzt wird (mehr als 9,5 mM), reduziert sich die Vitalität der Hefezellen aufgrund der toxischen Wirkung des Benzaldehyds deutlich (Long & Ward, 1989; Chow *et al.*, 1995; Tripathi *et al.*, 1997).

Außerdem wird das Substrat Benzaldehyd durch die zellulären Alkoholdehydrogenasen zu Benzylalkohol reduziert (Nikolova & Ward, 1991). Diese Abnahme der Benzaldehydkonzentration ist ökonomisch bedeutend, da die Substratkonzentration verringert wird und somit weniger Produkt entstehen kann. Das Phenylacetylcarbinol, als Produkt der enzymatischen Kondensation, wird durch die Aktivität von zellulären Dehydrogenasen teilweise zum Diol reduziert, oder von zellulären Oxidoreduktasen in die jeweiligen Diketon- oder Dihydroxyverbindungen überführt (Abb. 6).

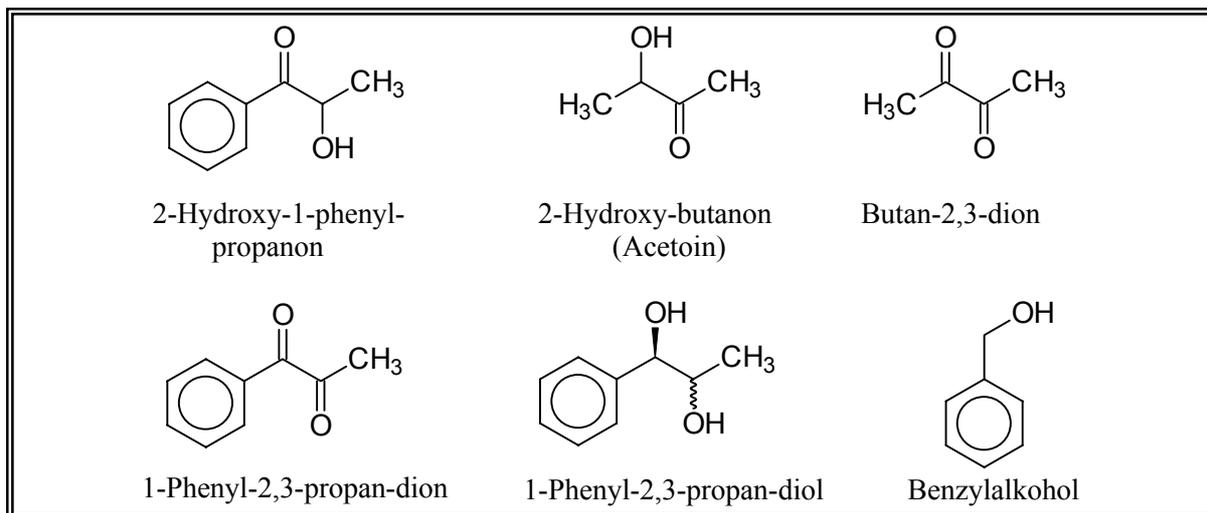


Abb. 6: Nebenprodukte des fermentativen Prozesses

Aufgrund der obengenannten Nebenreaktionen ist die Optimierung des fermentativen Prozesses auch heute noch von großer Bedeutung (Culik *et al.*, 1984; Seely *et al.* 1990 u. 1994). Zum Beispiel können Nebenreaktionen durch Veränderung der Produktionsstämme unterbunden werden oder sogar durch kontinuierliche Fermentation die Raum-Zeit-Ausbeute gesteigert werden.

1.5 Thiamindiphosphat (ThDP)-abhängige Enzyme

Viele Enzyme benötigen für ihre katalytische Aktivität einen niedermolekularen Bestandteil, einen Cofaktor. Dieser kann ein organisches Molekül oder ein Metallion sein. Viele höhere Organismen haben die Fähigkeit zur Biosynthese dieser Substanzen verloren und müssen diese, oder eine Vorstufe, über die Nahrung in Form von Vitaminen aufnehmen. So wird z.B. der Cofaktor Thiamindiphosphat (ThDP) (Abb. 7) vom Menschen als Thiamin (Vitamin B1) aufgenommen.

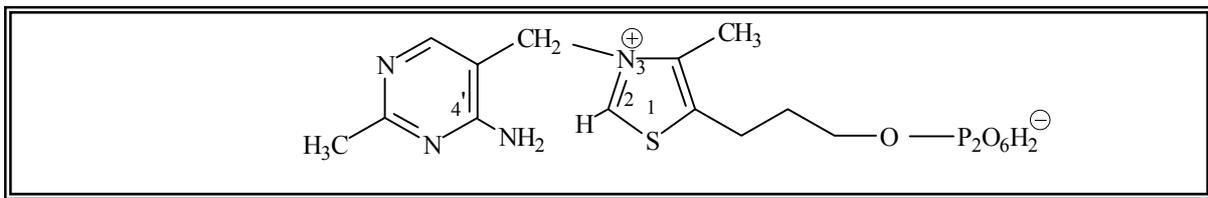


Abb. 7: Struktur des Thiamindiphosphat (ThDP)

Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme haben die Fähigkeit zur Spaltung und auch zur Bildung von C-C-Bindungen (Drauz & Waldmann, 1996; Kluger, 1992; Csuk & Glänzer, 1991). Den Substraten aller ThDP-abhängigen Enzyme ist die Struktur R-CO-X gemeinsam (Abb. 8), wobei X die Abgangsgruppe (CO₂, R-CO) ist, die durch ein Proton (bei Decarboxylasen), eine Carbonylfunktion (bei Transketolase und Acetolactatsynthetase) oder ein zyklisches Disulfid (2-Ketosäuredehydrogenase Komplexe; z.B. bei Pyruvatdehydrogenase Komplex) ersetzt wird.

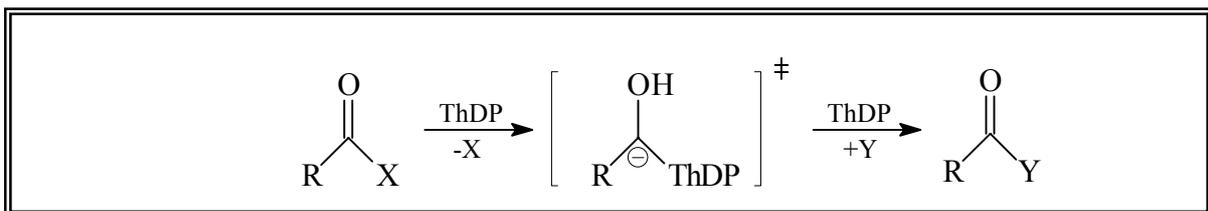
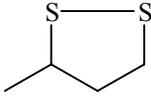


Abb. 8: Allgemeines Reaktionsschema ThDP-abhängiger Enzymreaktionen

ThDP-abhängige Enzyme kommen in unterschiedlichen Organismen (Bakterien, Pilze, Pflanzen, Tiere) und Stoffwechselwegen vor. Tabelle 5 gibt verschiedene Beispiele für die Reaktionen ThDP-abhängiger Enzyme (Schellenberger, 1998; Siegert, 2000).

Tab. 5: Reaktionen ThDP-abhängiger Enzyme

(X=Abgangsgruppe; Y=Übertragende Gruppe)

Enzym [EC-Nummer]	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{X}$	Y	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{Y}$	X
Decarboxylasen (z.B. Pyruvatdecarboxylase) [4.1.1.1]	$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CO}_2^-$	H^+	$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{H}$	CO_2
Pyruvatoxidase [1.2.3.3]	$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CO}_2^-$	PO_4^{3-}	$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OPO}_3^{2-}$	CO_2
Acetolactatsynthetase [4.1.3.18]	$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CO}_2^-$	$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CO}_2^-$	$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{OH}}{\text{C}}}-\text{CO}_2^-$	CO_2
Benzaldehydlyase [4.1.2.38]	$\text{Ph}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\underset{\text{OH}}{\text{C}}-\text{Ph}$	H^+	Ph-CHO	Ph-CHO
Transketolase [2.2.1.1]	$\text{H}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{OH}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{OH}}{\text{C}}}-\text{R}^1$	$\text{R}^2\text{-CHO}$	$\text{H}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{OH}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\underset{\text{H}}{\overset{\text{OH}}{\text{C}}}-\text{R}^2$	$\text{R}^1\text{-CHO}$
Dehydrogenasen (z.B. Pyruvatdehydrogenasekomplex) [1.2.4.1]	$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CO}_2^-$		$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}^-$	CO_2

1.6 ThDP-abhängige Decarboxylasen

ThDP-abhängige Decarboxylasen katalysieren die nicht-oxidative Decarboxylierung von 2-Ketocarbonsäuren zu den entsprechenden Aldehyden (Tab. 6). Sie besitzen alle eine tetramere Struktur und benötigen neben dem ThDP noch ein zweiwertiges Metallion (Magnesium) als Cofaktor zur katalytischen Aktivität.

Die 2-Ketocarbonsäuredecarboxylasen finden sich in vielen Stoffwechselwegen. Die Pyruvatdecarboxylasen kommen in Hefen, Pilzen und Pflanzen sowie einigen Bakterien vor (Pohl, 1997). Ihre physiologische Bedeutung ist die Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd, der durch eine ADH zu Ethanol umgesetzt wird.

Die Benzoylformiatdecarboxylase, Indolpyruvatdecarboxylase und Phenylpyruvatdecarboxylase nehmen am Abbau aromatischer Metabolite teil, wie Aminosäuren und Mandelsäure.

Tab. 6: ThDP-abhängige Decarboxylasen

Enzym	EC-Nummer	Stoffwechselbedeutung	Referenz
Pyruvatdecarboxylase	4.1.1.1	Alkoholische Gärung	Gancedo, 1989
Benzoylformiatdecarboxylase	4.1.1.7	Mandelsäureabbau	Hegemann, 1966a,b
Indolpyruvatdecarboxylase	4.1.1.74	Tryptophanabbau	Asakawa <i>et al.</i> , 1968
Phenylpyruvatdecarboxylase	4.1.1.43	Phenylalaninabbau	Costacurta <i>et al.</i> , 1994
2-Ketoglutaratdecarboxylase	4.1.1.71	Biosynthese des Vitamin K2	Palaniappan <i>et al.</i> , 1992

1.7 Die Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis*

Die Pyruvatdecarboxylase (PDC, E.C. 4.1.1.1) ist ein Schlüsselenzym bei der anaeroben Vergärung von Glucose zu Ethanol und CO₂ (McGill & Dawes, 1971). Sie katalysiert die nicht-oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd und CO₂. Der entstehende Acetaldehyd wird im weiteren Verlauf durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Ethanol reduziert. Pyruvatdecarboxylasen kommen in Pilzen (*Neurospora crassa*, *Aspergillus parasiticus*), insbesondere Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Klyveromyces marxianus*, *Klyveromyces lactis*), *Zygosaccharomyces bisporus*, in Pflanzen wie z.B. Reis (*Oryza sativa*), Tomaten (*Lycopersicon esculentum*), Mais (*Zea maize*), Erbsen (*Pisum sativum*), Tabak (*Nicotiana tabacum*), Weizen (*Triticum aestivum*) und in manchen Bakterien (*Zymomonas mobilis*) vor (Neuser *et al.*, 1999; Pohl, 1997).

Das obligat anaerobe Bakterium *Zymomonas mobilis* (*Z.mobilis*) besitzt eine effektive Pyruvatdecarboxylase und kann Glucose sechs bis sieben mal schneller vergären als *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Das Enzym hat eine spezifische Aktivität von ca. 120-180 U/mg (Pohl, 1997).

1.7.1 Struktur der Pyruvatdecarboxylase aus *Z.mobilis*

Die Pyruvatdecarboxylase von *Z.mobilis* ist ein Homotetramer von 243 kDa. Die vier identischen Untereinheiten bestehen aus je 568 Aminosäuren. Zur katalytischen Aktivität sind als Cofaktoren je ein Mg²⁺-Ion und ein Thiamindiphosphat (ThDP) pro Untereinheit erforderlich (Pohl, 1997).

Im Laufe der letzten Jahre wurden die 3D-Strukturen verschiedener Pyruvatdecarboxylasen durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Dies sind die PDC aus *Saccharomyces uvarum* (*S. uvarum*) (Dyda *et al.*, 1993), *S.cerevisiae* (Arjunan *et al.*, 1996) und die 3D-Struktur der in dieser Arbeit untersuchten PDC aus *Z.mobilis* (Dobritzsch *et al.*, 1998) (Abb. 9).

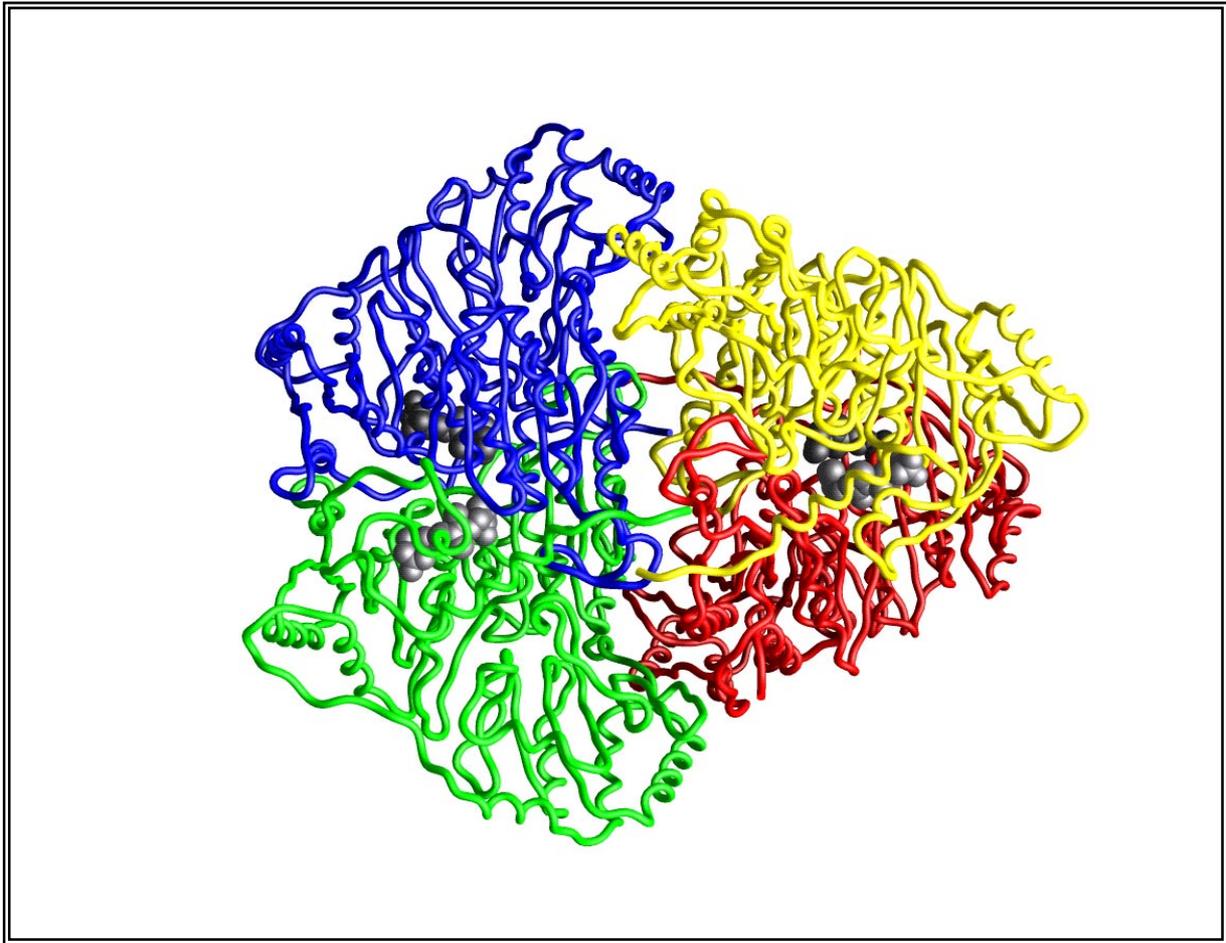


Abb. 9: Tetramere Struktur der PDC aus *Z.mobilis*¹.

Die Monomere sind farbig, das ThDP grau dargestellt. Das rot/gelb dargestellte Dimer ist ca. 90° gegenüber dem blau/grün gezeigten Dimer gedreht.

Jede der vier Untereinheiten der PDC besteht aus drei Domänen. Die α -Domäne, die den Pyrimidinring des ThDP bindet, bildet mit der γ -Domäne der benachbarten Untereinheit, die den Diphosphatrest bindet, ein aktives Zentrum und umgekehrt, so daß jedes Dimer zwei aktive Zentren besitzt. Die β -Domäne vermittelt den Kontakt zwischen den Dimeren und wird mit der allosterischen Regulation der *S.c.*PDC in Verbindung gebracht (Boiteux & Hess, 1970; Jordan *et al.*, 1998). Die *Z.m.*PDC ist dagegen nicht substrataktiviert.

¹ Die computergrafische Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. J. Grötzinger am Inst. für Biochemie der RWTH Aachen entwickelt.

1.7.2 Katalysemechanismen der Pyruvatdecarboxylase

Die Hauptreaktion der PDC ist die Decarboxylierung einer 2-Ketocarbonsäure zu einem Aldehyd unter Abspaltung von Kohlendioxid. Das Enzym aus *Z.mobilis* setzt außer dem natürlichen Substrat Pyruvat nur aliphatische 2-Ketocarbonsäuren um. Bei Vergrößerung des Substrates (2-Ketobutan- bzw. 2-Ketohexansäure) sinkt die Aktivität und steigt der K_M -Wert, der in erster Näherung ein Maß für die Affinität der Substrate zum aktiven Zentrum ist (Bringer-Meyer & Sahn, 1991). In einer Nebenreaktion katalysiert die PDC eine C-C-Verknüpfung zweier Aldehyde im Sinne einer Acyloinkondensation (Abb. 10). Der Reaktionsmechanismus der ThDP-abhängigen Decarboxylierung wurde intensiv untersucht (Schellenberger, 1998; Lu *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001).

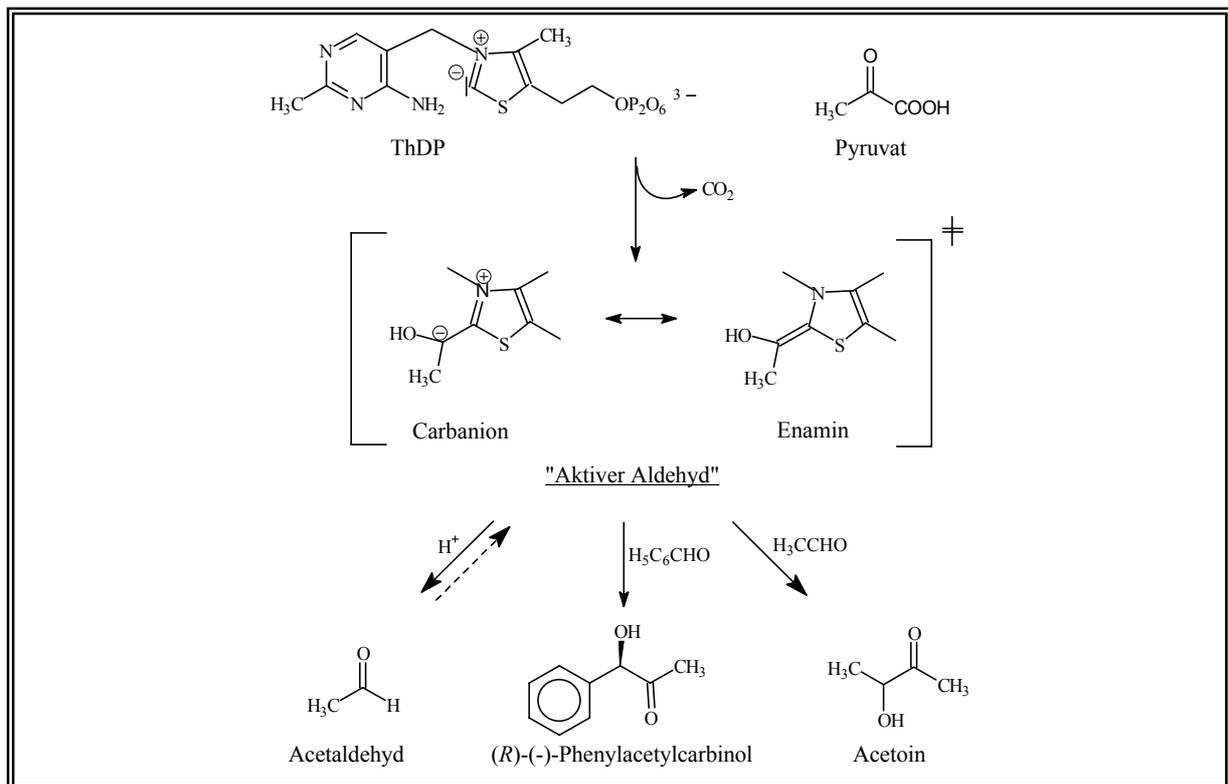


Abb. 10: Reaktionswege der PDC

Zunächst erfolgt die Aktivierung des ThDP im Enzym (Kern *et al.*, 1997). Das Wasserstoffatom am Kohlenstoffatom C2-ThDP ist durch die elektronenziehende Wirkung der benachbarten Heteroatome acide. Durch Deprotonierung entsteht ein ThDP-Ylid, das nukleophil die Carbonylfunktion des Substrats angreift. In einem irreversiblen Schritt wird CO₂ abgespalten und die Reaktivität der Carbonylfunktion umgepolt. Das entstehende Carbanion-Enamin ("aktiver Aldehyd"; Schellenberger, 1967) bleibt, resonanzstabilisiert, am ThDP gebunden. Hieraus entsteht dann nach Protonierung das Hydroxyethyl-ThDP, aus dem nach einem weiteren Protonierungsschritt ein Aldehyd freigesetzt wird. Im Falle von Pyruvat als Ausgangsverbindung entsteht das Hauptprodukt Acetaldehyd. Alternativ kann der "aktive Aldehyd" in einer Nebenreaktion mit einer weiteren Carbonylverbindung zu einem 2-Hydroxyketon kondensiert werden, wobei ein zweiter Aldehyd als Acylakzeptor fungiert. Im Falle des Acetaldehyds entsteht Acetoin und mit Benzaldehyd als Acylakzeptor wird (*R*)-Phenylacetylcarbinol gebildet. Auch freie Aldehyde können an das aktive Zentrum der PDC binden und den reaktiven „aktiven Aldehyd“ bilden, so daß die Synthese der 2-Hydroxyketone auch über diesen alternativen Reaktionsweg möglich ist (Bruhn, 1995a; Iding *et al.*, 1998). Da der nukleophile Angriff des Carbanions in Konkurrenz zur Protonierung steht, ist die Carboligasereaktion stark von der Lebensdauer des Carbanions abhängig.

1.7.3 Optimierung der Pyruvatdecarboxylase für die Katalyse der (*R*)-PAC-Synthese

Das gegenwärtig angewandte biotechnologische Verfahren zur Herstellung von (*R*)-PAC beruht auf einer Ganzzellbiotransformation (Liese *et al.*, 2000). Dieses Verfahren zeigt aber durch seine große Anzahl an Nebenprodukten die Nachteile eines fermentativen Prozesses (Abb. 6). Durch Einsatz eines enzymatischen Prozesses mit einer PDC zur Darstellung von (*R*)-PAC würde die Zahl der Nebenprodukte reduziert werden. Die Fähigkeit zur Carboligaseaktivität mit aromatischen Aldehyden ist bei der Hefe-PDC etwa um das 5-10-fache höher, als die des bakteriellen Enzyms (Bringer-Meyer & Sahn, 1988; Pohl, 1997; Goetz, 1999). Die Kondensation von Acetaldehyd und Benzaldehyd mit der PDC aus Hefe oder aus *Z.mobilis* verläuft absolut enantioselektiv zum (*R*)-PAC mit einem Enantiomerenüberschuß von >98% (Pohl, 1997).

Jedoch ist die Hefe-PDC bezüglich der Dissoziation in ihre Untereinheiten und des Verlustes der Cofaktoren in Abhängigkeit vom pH-Wert instabiler als die *Z.m.*PDC (König *et al.*, 1992; Pohl *et al.*, 1994). Zudem sind die Pyruvatdecarboxylasen der Hefen allosterisch durch Pyruvat kontrolliert (Boiteux & Hess, 1970). Es gibt Hinweise darauf, daß durch allosterische Aktivierung die Struktur der *S.c.*PDC von einer offenen in eine geschlossene Konformation übergeht (Lu *et al.*, 2000).

Um die Carboligaseaktivität der PDC aus *Z.mobilis* zu verbessern, wurde die 3D-Struktur des Enzyms aus der Hefe *S.uvarum* (Dyda *et al.*, 1993) als Modell verwendet. Anhand von Sequenzvergleichen wurde ein Tryptophan-Rest an der Position 392 im Substratkanal der *Z.m.*PDC identifiziert, welcher in allen Hefe-PDCs durch ein Alanin ersetzt ist. Die Annahme, daß dieser sperrige Tryptophan-Rest aromatische Moleküle wie Benzaldehyd und (*R*)-PAC am Durchgang zum bzw. vom katalytischen Zentrum hindern könnte, wurde durch gezielte Mutagenese bestätigt (Bruhn, 1995a; Bruhn *et al.*, 1995b). Das mutierte Enzym PDC-W392A zeigte eine drei bis vier mal höhere Carboligaseaktivität bei Untersuchungen der (*R*)-PAC-Synthese in einem Batch-Reaktor (Bruhn, 1995a; Bruhn *et al.*, 1995b, Bruhn *et al.*, 1995c). Basierend auf diesem PDC-Mutein wurde eine präparative enzymatische (*R*)-PAC Synthese ausgehend von Pyruvat und Benzaldehyd mit isolierter PDC als Biokatalysator durchgeführt (Bruhn *et al.*, 1996). Der durch die Decarboxylierung von Pyruvat hauptsächlich entstehende Acetaldehyd wurde mittels einer Alkoholdehydrogenase (ADH) abgebaut, da das eingesetzte PDC-Mutein PDC-W392A von Acetaldehyd desaktiviert wurde. Da die ADH bei der Reduktion des Acetaldehyds NADH zu NAD⁺ oxidiert, wurde mittels Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* der Cofaktor NADH durch Formiatoxidation regeneriert. Als Produkt entsteht bei diesem Verfahren ausschließlich (*R*)-PAC (Bruhn, 1995a; Bruhn *et al.*, 1995b, Bruhn *et al.*, 1995c; Bruhn *et al.*, 1996).

Es wurden noch weitere Punktmutanten an der Position 392 erzeugt. Einige Mutanten waren stabiler als PDC-W392A und zeigten höhere Aktivität als die wt-PDC aus *Z.mobilis* bezüglich der (*R*)-PAC-Synthese (Mesch, 1997; Pohl, 1997; Pohl, 2000a). Die (*R*)-PAC-Synthese gelang am besten mit den Enzymmutanten, bei denen Tryptophan durch Methionin bzw. Isoleucin ersetzt ist (PDC-W392M und PDC-W392I). Sie zeigen eine Steigerung der katalytischen Aktivität für die (*R*)-PAC-Synthese um das fünffache im Vergleich zum wt-Enzym. Zudem sind diese Muteine deutlich stabiler als PDC-W392A, vor allem gegenüber Acetaldehyd (Mesch, 1997; Pohl, 1997; Pohl, 2000a; Pohl, 2000b).

Diese neuen PDC-Muteine aus *Z.mobilis* wurden in neuen Ansätzen zu einer enzymatischen (*R*)-PAC Synthese eingesetzt (Iwan, 1997; Goetz, 1999). Im ersten Ansatz wurde das *Z.m.PDC-W392I-His₆* Mutein in einer kontinuierlichen enzymatischen (*R*)-PAC Synthese im Enzymmembranreaktor (EMR) eingesetzt (Iwan, 1997). Dieses Reaktorkonzept ermöglicht eine optimale Ausnutzung des Biokatalysators durch Rückhaltung des Enzyms im Reaktorraum (Abb. 3). Ausgehend von Pyruvat, Benzaldehyd und aufgereinigter *PDC-W392I-His₆* gelang eine kontinuierliche enzymatische (*R*)-PAC Synthese im EMR. Die höchste Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) wurde mit 0,4 mg/ml aufgereinigter *PDC-W392I-His₆* ausgehend von 90 mM Pyruvat und 30 mM Benzaldehyd bei 25°C bei einer Verweilzeit von 1 h im EMR mit 27,4g·(*R*)-PAC L⁻¹·d⁻¹ erhalten (Iwan, 1997; Iwan *et al.*, 2001; Goetz *et al.*, 2001).

In einem weiteren Ansatz zur kontinuierlichen enzymatischen (*R*)-PAC Synthese mit einem PDC-Mutein aus *Z. mobilis* wurde Acetaldehyd und Benzaldehyd eingesetzt (Goetz, 1999; Goetz *et al.*, 2001; Iwan *et al.*, 2001). Eine enzymatische (*R*)-PAC Synthese ist ausgehend von Acetaldehyd und Benzaldehyd möglich (Iding *et al.*, 1998). Das Mutein *PDC-W392M-His₆* zeigte eine erhöhte Stabilität gegenüber Acetaldehyd und konnte damit für eine kontinuierliche enzymatische (*R*)-PAC Synthese verwendet werden (Mesch, 1997; Pohl, 1997; Pohl, 2000a; Pohl, 2000b). Durch diesen neuen Ansatz gelang eine kontinuierliche enzymatische (*R*)-PAC Synthese im EMR ausgehend von 50 mM Acetaldehyd, 50 mM Benzaldehyd und 3 mg/ml *PDC-W392M-His₆* (Rohextraktcharge) bei einer Verweilzeit von 1 h bei 27°C mit einer RZA von 81 g·L⁻¹·d⁻¹ (*R*)-PAC (Goetz, 1999; Goetz *et al.*, 2001; Iwan *et al.*, 2001). Gleichzeitig gelang es auch, die enzymatische (*R*)-PAC Synthese unter wirtschaftlichen Bedingungen zu optimieren, da das um den Faktor 4 teurere Pyruvat durch das billigere Substrat Acetaldehyd ersetzt werden konnte. Zudem wurde die Zahl an Nebenprodukten drastisch gesenkt. Es tritt nur Acetoin als Nebenprodukt auf, dessen Bildung durch geschickte Reaktionsführung unterdrückt werden kann (Goetz, 1999; Goetz *et al.*, 2001; Iwan *et al.*, 2001).

2. Motivation und Zielsetzung

Die Pyruvatdecarboxylase (PDC) und ihre Muteine aus *Zymomonas mobilis* (*Z.mobilis*) sind ThDP-abhängige Enzyme, die neben der Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd, auch die C-C-Verknüpfung von Acetaldehyd und Benzaldehyd zu (*R*)-Phenylacetylcarbinol ((*R*)-PAC) katalysieren können. Das entstehende chirale α -Hydroxyketon ist die Vorstufe von pharmazeutisch eingesetztem Ephedrin.

Ziel dieser Arbeit war es, die enzymatische Synthese von (*R*)-Phenylacetylcarbinol ausgehend von Muteinen der PDC aus *Z.mobilis* weiter zu optimieren und zu charakterisieren. Hierbei standen vor allem ökonomische Aspekte im Vordergrund. So hatten Bewertungen des Laborsystems ergeben, daß der hohe Verbrauch von Puffer für ein kontinuierlich betriebenes Reaktionssystem limitierend ist.

Bei dieser Arbeit ging es deshalb vorrangig um folgende Fragestellungen:

- Optimierung des Reaktionspuffers hinsichtlich Stabilität des verwendeten Enzyms, auch unter Berücksichtigung ökonomischer Gesichtspunkte (eine kontinuierliche Betriebsweise des enzymatischen Prozesses wird angestrebt); d.h.
 - ⇒ Bestimmung der pH-Optima für die enzymatische C-C-Verknüpfung
 - ⇒ Verwendung einer günstigen Wasserqualität (z. B. Leitungswasser)
 - ⇒ Vergleich der Stabilität gegenüber Metallionen als zusätzliche Komponente im Reaktionssystem

Weitere Untersuchungen sollten die Effizienz des kontinuierlich betriebenen Reaktionssystems verbessern. Ansatzpunkte bildeten hier die in vorangegangenen Arbeiten beobachtete Instabilität der PDC-Muteine (Bruhn, 1995a, Goetz, 1999). Einerseits beruht diese Instabilität auf einer Empfindlichkeit gegenüber Rühren im Reaktionssystem, andererseits sind auch inaktivierende Einflüsse der Substrate wahrscheinlich.

In dieser Arbeit sollten daher alternative Reaktorkonzepte erprobt werden und ein neues Mut-ein der PDC, das in Zusammenarbeit mit der BASF AG hergestellt wurde, hinsichtlich seiner Eignung für die Katalyse der enzymatischen (*R*)-PAC-Synthese untersucht werden.

- Im einzelnen sollten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:
 - ⇒ Vergleich der Stabilität der PDC-Muteine gegenüber den Substraten Acetaldehyd und Benzaldehyd
 - ⇒ Einsatz von Ethanol als Lösungsvermittler für das Cosubstrat Benzaldehyd
 - ⇒ Kinetische Untersuchungen der enzymatischen Reaktion
 - ⇒ Untersuchung einer kontinuierlichen Reaktionsführung für eine optimale Ausnutzung des Biokatalysators

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Expression und Reinigung der Pyruvatdecarboxylase

3.1.1 Expression der PDC-Muteine

Die Expression der PDC-Muteine erfolgte in *E. coli* SG13009 Zellen. Als Expressionsvektor wurde pPDC-His₆, bzw. die entsprechenden PDC-Mutanten verwendet. Die Anzucht erfolgte im Schüttelkolben bei 37°C. Die Ausbeute betrug zwischen 2,5 bis 3 g Zellfeuchtmasse pro Liter Kulturvolumen (Schüttelkolbenkultivierung bis 1,5 l). Der Anteil der PDC am löslichen Zellprotein betrug dann ca. 20%. Die PDC-Muteine lagen als Hexahistidininfusionsprotein vor, sodaß eine problemlose Reinigung mittels Metallionen-affinitätschromatographie in einem Schritt durchgeführt werden konnte. Die *PDC-0* (PDC-W392M ohne His-tag) wurde nach einem Protokoll von Bruhn (1995a) aufgereinigt, um für die Stabilitätsuntersuchungen auch ein PDC-Mutein ohne Hexahistidinrest zur Verfügung zu haben.

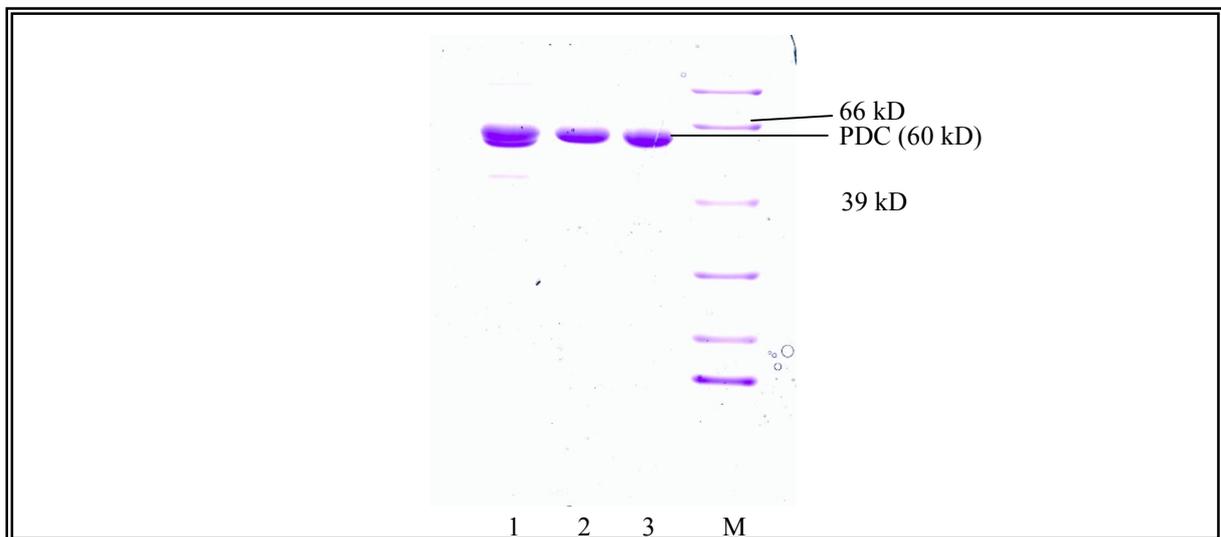
3.1.2 Aufreinigung der PDC-Muteine

Die PDC-Muteine lagen als C-terminale Hexahistidininfusionsproteine vor und konnten so in einem Schritt mittels „Immobilisierter Metallionenaffinitätschromatographie“ (IMAC) bis zur Homogenität aufgereinigt werden (Abb. 11). Da die PDC-Muteine ThDP-frei eluierten, wurde anschließend in cofaktorhaltigen Puffer umgepuffert. Die Decarboxylierungsaktivität ist bei allen Muteinen im Vergleich zur wt-PDC vermindert (Pohl, 1997) (Tab. 7)

Tab. 7: Aufreinigung der *PDC-1* (PDC-W392M-His₆)

Vergleich der Decarboxylaseaktivitäten der wt-PDC mit der *PDC-1* im Rohextrakt und nach der Reinigung mittels IMAC

PDC	Rohextrakt [U/mg]	nach IMAC [U/mg]	Reinigungsfaktor
wt-PDC (Siegert, 2000)	30	120-140	4
<i>PDC-1</i>	20 ± 5	60 ± 10	3 ± 0,5

**Abb. 11:** SDS-PAGE verschiedener Fraktionen der Reinigung (IMAC) der *PDC-1*

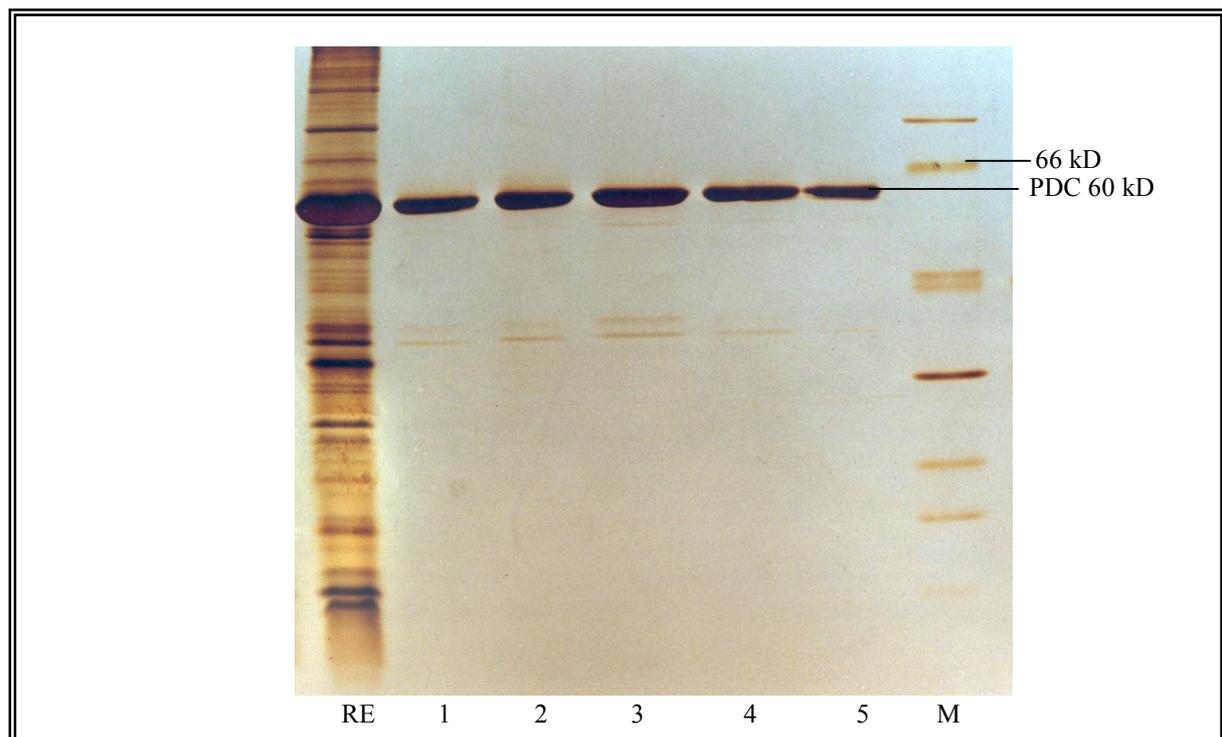
PDC-1 (PDC-W392M-His₆) (Spur 1: IMAC-Fraktion; 2+3: Gefiltrationsfraktion), M = Proteinmarker

Die Reinigung des PDC-Muteins PDC-W392M ohne His-tag (*PDC-0*) gelang mittels Anionenaustauschchromatographie und anschließender hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) (Bruhn, 1995a) (Abb. 12; Tab. 8).

Tab. 8: Aufreinigung der *PDC-0* (PDC-W392M ohne His-tag)

Proteingehalt und Gesamtaktivität des Rohextraktes, der Fraktionen aus der Anionenaustauschchromatographie und der hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC).

Fraktion	Proteingehalt [mg/ml]	Aktivität [U/ml]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	4	180	45	1,0
Anionenaustauschchromatographie	2	150	75	1,7
Hydrophobe Interaktionschromatographie	1,5	120	80	1,8
Gelfiltration	1,2	102	85	1,9

**Abb. 12:** SDS-PAGE verschiedener Fraktionen einer Reinigung der *PDC-0*.

(RE = Rohextrakt, Spur 1-3 = Fraktionen nach Anionenaustauschchromatographie, Spur 4 = Fraktion nach der hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC), Spur 5 = Fraktion nach der Gelfiltration, M = Proteinmarker)

Im Unterschied zum bestehenden Protokoll von Bruhn (1995a) wurde KP_i -Puffer anstatt des teureren $KMes$ -Puffers verwendet. Das Ergebnis (Abb. 12) zeigt, daß der günstigere Puffer verwendet werden kann und gute Enzymaktivitäten erzielt werden.

Die Aufreinigung der PDC-Muteine erfolgte, um sie für eine genaue Charakterisierung einsetzen zu können. Die vollständige Aufreinigung ist für einen technischen Einsatz nicht notwendig und aus ökonomischen Gründen nicht erstrebenswert.

3.2 Optimierung des Reaktionspuffers

3.2.1 Bestimmung des pH-Optimums der Carboligasereaktion

Ziel dieser Untersuchung war es, zu überprüfen, ob das Stabilitäts-pH-Optimum der PDC und des Carboligaseproduktes (*R*)-PAC, im Bereich des pH-Aktivitätsoptimums der Reaktionen der Pyruvatdecarboxylase liegt. Die *Z.m.*PDC ist stabil im KP_i -Puffer im pH-Bereich von 5,8 bis 8,0 (Pohl *et al.*, 1995). (*R*)-PAC zeigt im leicht sauren Milieu die höchste Stabilität, bei pH-Werten von $pH > 7$ setzt spontane Racemisierung ein (Iding, 1998). Es wurde eine enzymatische Synthese von (*R*)-PAC ausgehend von Acetaldehyd und Benzaldehyd in KP_i -Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Günstigerweise liegt das pH-Optimum der Carboligasereaktion der *PDC-1* (PDC-W392M-His₆) auch im leicht sauren Milieu (pH~6,5) (Abb. 13). Das pH-Optimum der Decarboxylierungsreaktion liegt etwas weiter im sauren Bereich (Pohl, 2000a). Unter physiologischen Bedingungen (pH~6,0) sind die Cofaktoren Mg^{2+} und ThDP quasi irreversibel gebunden, oberhalb von pH 7,0 verlieren sie ihre Bindung und das Apoenzym entsteht (Ward & Baev, 2000).

Da das pH-Optimum der Carboligasereaktion mit dem Stabilitätsoptimum des Reaktionsproduktes (*R*)-PAC zusammenfiel, wurden alle weiteren Untersuchungen zur Carboligasereaktion der Pyruvatdecarboxylase bei pH 6,5 durchgeführt.

Im pH-Bereich von pH 6,0 bis pH 7,0 überlappen die pH-Optima der beiden Reaktionen der PDC (Abb. 13). In der Literatur gibt es keinen Hinweis für unterschiedliche aktive Zentren für die Haupt- und Nebenreaktion der PDC, deshalb kann man davon ausgehen, daß beide Reaktionen im gleichen aktiven Zentrum der PDC katalysiert werden. Für die weiteren Stabilitätsuntersuchungen wurde deshalb die Decarboxylierungsreaktion der PDC betrachtet, da man von einer gleichen Deaktivierung beider Reaktionen ausgehen kann.

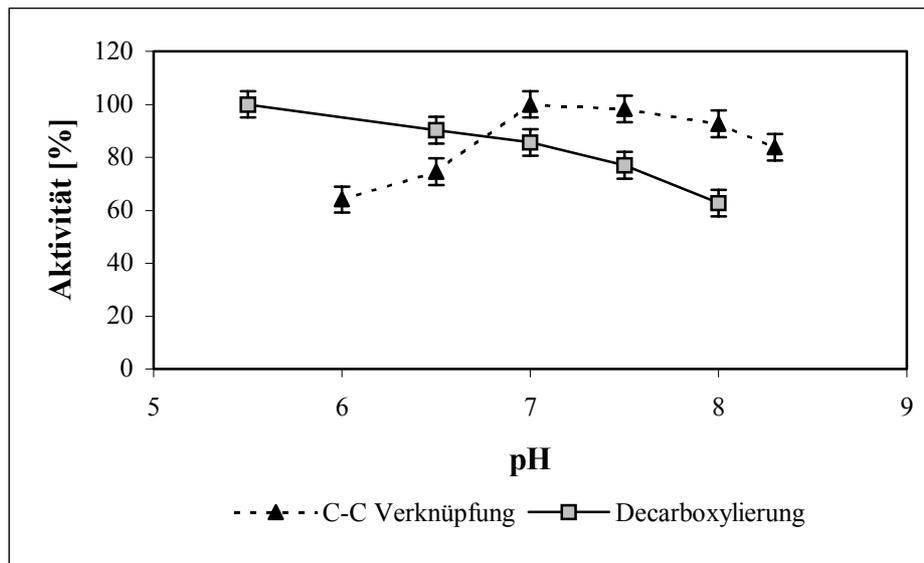


Abb. 13: Auftragung der pH-Abhängigkeit der Enzymaktivitäten der *PDC-I*.

Die Angaben der Enzymaktivitäten sind auf 100 % normiert.

3.2.2 Einsatz von Leitungswasser

Iwan (1997) und Goetz (1999) zeigten, daß eine kontinuierliche enzymatische Synthese von (*R*)-PAC mit der *Z.m.*PDC im Reaktionspuffer aus 50 mM KP_i Puffer pH 6,5 mit Cofaktoren möglich ist. Bei dieser kontinuierlichen Betriebsführung und der geringen Substratlöslichkeit werden große Mengen an VE-(voll entsalztes) Wasser verbraucht. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob Leitungswasser anstelle des im Laborbetrieb verwendeten VE-Wassers, im wässrigen Reaktionspuffer verwendet werden kann. Das Leitungswasser im FZ Jülich hat einen pH-Wert von 6,7-7,2. Es wurde nun die Stabilität aufgereinigter *PDC-I* (*PDC-W392M-His₆*) im Leitungswasser untersucht, da der festgestellte pH-Wert des Leitungswassers im Bereich des Plateaus der pH-Optima der von der PDC katalysierten Reaktionen liegt.

Zur Aktivitätsüberprüfung wurde die Decarboxylaseaktivität zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Der verwendete Reaktionspuffer enthielt neben Leitungswasser die Cofaktoren Magnesium und ThDP, der pH lag bei 6,8. In dieser Untersuchung wurde auf den Einsatz der KP_i -Puffersalze verzichtet, da diese bei einer technischen kontinuierlichen Umsetzung das Abwasser zusätzlich belasten würden.

Bei Verwendung von Leitungswasser im wäßrigen Reaktionspuffer nimmt die Aktivität der aufgereinigten *PDC-I* im betrachteten Zeitraum drastisch ab (Abb. 14). Nach 7 h Inkubation wird nur noch eine Restaktivität von 20 % bestimmt.

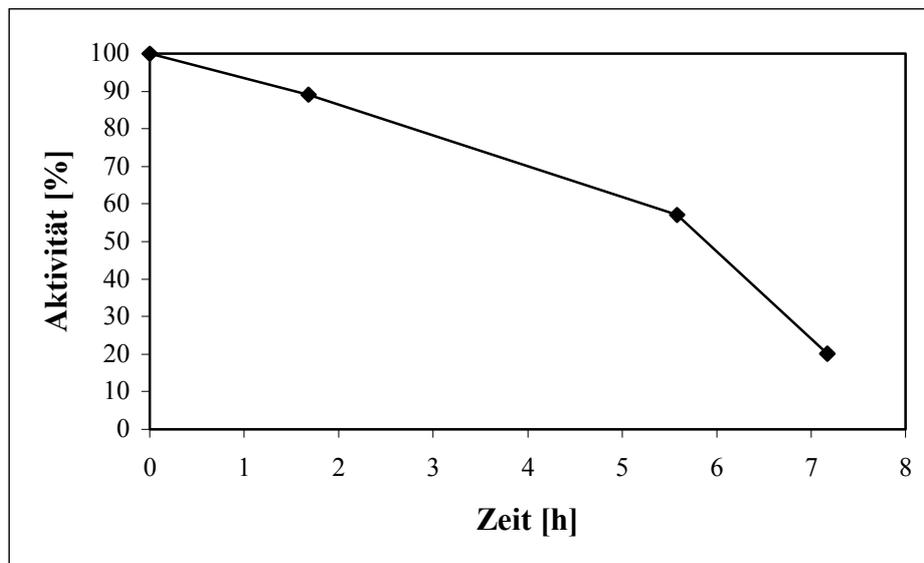


Abb. 14: Stabilität der *PDC-I* in wäßrige Reaktionslösung aus Leitungswasser.

Reaktionspuffer aus Leitungswasser mit Cofaktoren (5 mM $MgSO_4$; 0,1 mM ThDP), pH 6,8; *PDC-I* (*PDC-W392M-His₆*) aufgereinigtes Protein; Gesamtproteingehalt: 0,02 mg/ml; Gemessen wurde die Decarboxylaseaktivität; 100 % Aktivität entspricht der Aktivität zum Zeitpunkt 0 h.

In wäßrigem Reaktionspuffer aus VE-Wasser mit 50 mM KP_i pH 6,5 und Cofaktoren wird eine Halbwertszeit² $t_{1/2} \gg 100$ h beschrieben (Sprenger & Pohl, 1999). Deshalb wurde für eine weitere Untersuchung 50 mM KP_i in Leitungswasser mit einem pH-Wert von 6,5 mit Cofaktoren eingesetzt. Es sollte überprüft werden, ob die Verwendung von KP_i die Stabilität der aufgereinigten *PDC-I* in Leitungswasser erhöht. Abbildung 15 beschreibt den Verlauf dieser Untersuchung. Auch bei dieser Untersuchung wird deutlich, daß der Einsatz von Leitungswasser im Reaktionspuffer einen starken Einfluß auf die Stabilität der *PDC-I* hat. Die Restaktivität sinkt nach 7 h Inkubation auf fast 50 %.

² Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ ist die Zeit, nach der noch 50 % Restaktivität bestimmt werden.

Der Einsatz von 50 mM KP_i erhöht die Stabilität der *PDC-1* zwar deutlich, trotzdem wird die hohe Stabilität in VE-Wasser mit einer Halbwertszeit $t_{1/2} \gg 100$ h bei weitem nicht erreicht (Abb. 15).

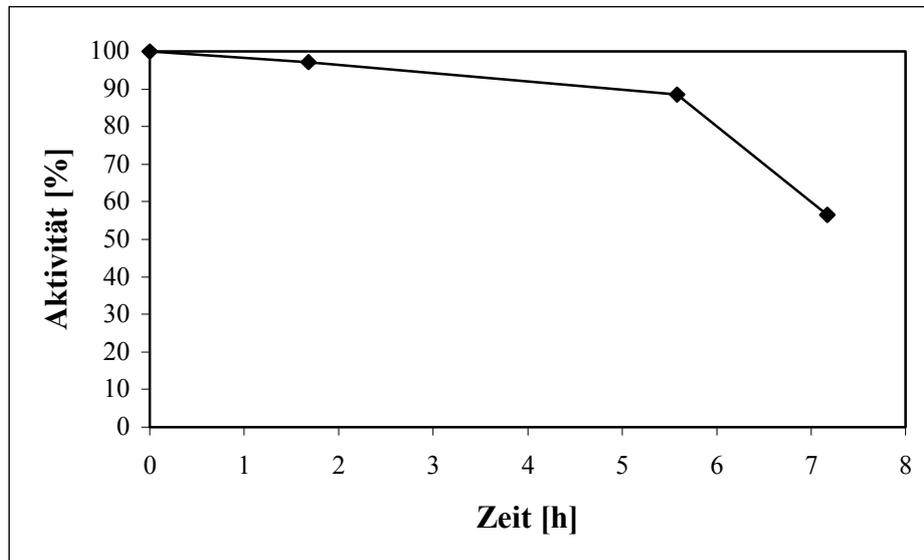


Abb. 15: Stabilität der *PDC-1* in wässrigem Reaktionspuffer aus Leitungswasser mit 50 mM KP_i , pH 6,5.

Reaktionspuffer aus Leitungswasser 50 mM KP_i , pH 6,5, mit Cofaktoren (5 mM $MgSO_4$; 0,1 mM ThDP), *PDC-1* (PDC-W392M-His₆) als aufgereinigtes Protein; Gesamtproteingehalt: 0,02 mg/ml; Gemessen wurde die Decarboxylaseaktivität; 100 % Aktivität entspricht der Aktivität zum Zeitpunkt 0 h.

Die Verwendung von Leitungswasser im Reaktionspuffer für aufgereinigte *PDC-1* erscheint nicht sinnvoll, da innerhalb weniger Stunden drastische Aktivitätseinbußen zu beobachten sind. Aus ökonomischer Sicht ist der Einsatz von Rohextraktzympräparaten in einer kontinuierlichen technischen enzymatischen Synthese anzustreben. Deshalb wurde überprüft, ob der Einsatz von Leitungswasser im Reaktionspuffer auch Einfluß auf die Stabilität einer Rohextraktcharge der PDC hat. Zudem sollte festgestellt werden, ob der His-tag der *PDC-1* Einfluß auf die Deaktivierung in Leitungswasser hat. Es wurden deshalb Rohextraktchargen der *PDC-1* (mit His-tag) und der *PDC-0* (PDC-W392M ohne His-tag) in Leitungswasser mit 50 mM KP_i und Cofaktoren bei pH 6,5 untersucht (Abb. 16). Auch hier wird keine annähernd gute Halbwertszeit der beiden PDC-Mutene als Rohextraktchargen in Leitungswasser beobachtet. Sie liegt bei beiden untersuchten Muteinen deutlich unter 30 h (Abb. 16). Dabei scheint der His-tag keinen signifikanten Einfluß auf die Deaktivierung zu haben, denn beide Muteine besitzen nach ca. 25h Inkubation in Leitungswasser nur noch etwa 40 % Restaktivität.

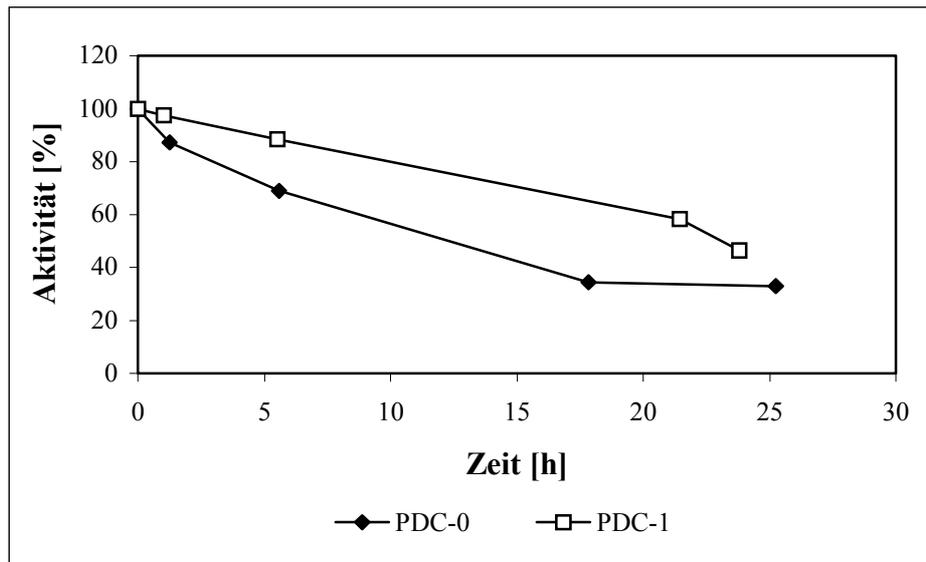


Abb. 16: Vergleich der Restaktivitäten der *PDC-0-RE* und *PDC-1-RE* nach Inkubation in Reaktionspuffer aus Leitungswasser mit 50 mM KP_i , pH 6,5.

Reaktionspuffer aus Leitungswasser 50 mM KP_i , pH 6,5, mit Cofaktoren (5 mM $MgSO_4$; 0,1 mM ThDP), *PDC-1* (*PDC-W392M-His₆*) und *PDC-0* (*PDC-W392M* ohne His-tag) RE = Rohextraktchargen; Gesamtproteingehalt: 0,1 mg/ml; Gemessen wurde die Decarboxylaseaktivität; 100 % Aktivität entspricht der Aktivität zum Zeitpunkt 0 h.

Als Fazit kann festgestellt werden, daß die signifikanten Stabilitätseinbußen bei Verwendung von Leitungswasser im wäßrigen Reaktionspuffer selbst bei Rohextraktchargen der PDC-Mutante den Einsatz in einer technischen Anwendung nicht zulassen.

3.2.3 Stabilität der Pyruvatdecarboxylase aus *Z.mobilis* gegenüber Nitrat

Um nähere Informationen über die für den technischen Einsatz notwendige Wasserqualität zu erhalten, wurde nun untersucht, welche Faktoren für die drastischen Aktivitäts- und Stabilitätseinbußen der PDC als aufgereinigtes Enzym oder Rohextraktcharge im Leitungswasser eine Rolle spielen. In Leitungswasser sind neben sehr geringen Mengen an Kupfer, Eisen, Zink, Aluminium und Mangan typische Salzkationen wie Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ und Na^+ vorhanden. Typische Anionen im Leitungswasser sind Nitrat, Chlorid, Sulfat und Phosphat. Für SO_4^{2-} - oder PO_4^{3-} -Ionen und Mg^{2+} -, K^+ - sowie Na^+ -Ionen sind eher stabilisierende als deaktivierende Eigenschaften für die PDC aus *Z.mobilis* bekannt (Pohl *et al.*, 1995). Für Nitrat und Ca^{2+} -Ionen gibt es bisher keine Daten zur Wirkung auf die PDC.

Als erstes wurde der Einfluß von Nitrat auf die *PDC-1* als Rohextraktcharge untersucht, dazu wurde dieses Mutein mit Lösungen inkubiert, die Nitrate enthielten ($137 \mu\text{M Ca}(\text{NO}_3)_2$ oder $383 \mu\text{M NaNO}_3$), das entspricht ca. 33 mg/ml Nitrat im Wasser. Dieser Wert liegt deutlich unter dem Grenzwert für Nitrat im Trinkwasser (50 mg/ml) (BBGes, 2001) und über dem festgestelltem Wert im Leitungswasser des FZ Jülich (zwischen 6 – 12 mg/ml; ZCH, 1998). Zur Bestimmung der Stabilität wurde die Decarboxylaseaktivität überprüft. Abbildung 17 zeigt den Verlauf der Stabilitätsmessung.

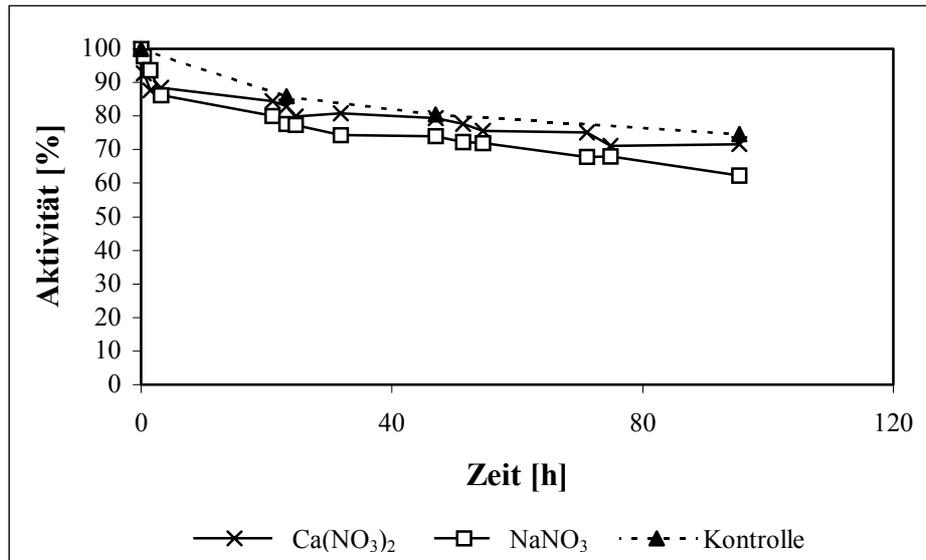


Abb. 17: Untersuchung der Stabilität der *PDC-1-RE* gegenüber Nitrat.

VE-Wasser mit 50 mM KP_i , pH 6,5, mit Cofaktoren (5 mM MgSO_4 ; 0,1 mM ThDP); *PDC-1-RE* (PDC-W392M-His₆); RE = Rohextraktcharge; die Ansätze enthielten $137 \mu\text{M Ca}(\text{NO}_3)_2$ bzw. $383 \mu\text{M NaNO}_3$; Gesamtproteingehalt: 0,1 mg/ml; Gemessen wurde die Decarboxylaseaktivität; 100 % Aktivität entspricht der Aktivität zum Zeitpunkt 0 h.

Aus Abb. 17 wird ersichtlich, daß Nitrat im Wasser nicht der letale Faktor bei der drastischen Aktivitätsabnahme bei der Inkubation in Leitungswasser sein kann. Nach ca. 90 h sind bei $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ noch ca. 70 % und bei NaNO_3 noch ca. 60 % Restaktivität zu beobachten. Die Restaktivitäten in nitrathaltigen Lösungen sind der Restaktivität der Kontrollprobe in Reaktionspuffer aus VE-Wasser ohne Nitrat vergleichbar.

3.2.4 Stabilität der Pyruvatdecarboxylase aus *Z.mobilis* gegenüber Metallionen

3.2.4.1 Einfluß auf die Decarboxylaseaktivität der PDC

Ein wichtiger Faktor, der Leitungswasser von VE-Wasser unterscheidet, ist der Gehalt an Metallionen. In dieser Arbeit wurde eine PDC mit sechs C-terminalen Histidinresten ((His)₆-tag) pro Untereinheit verwendet, welche dadurch eine Affinität zu Metallionen hat, daher kann sie über eine IMAC (immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie) mit Ni-NTA (Nitriolotriessigsäure) als Liganden aufgereinigt werden. Zudem besitzt die PDC aus *Z.mobilis* sieben Cysteinreste pro Untereinheit (Dobritzsch *et al.*, 1998), die auch einen Einfluß auf die Metallionenempfindlichkeit der PDC haben könnten. Als erstes wurde diese His-tag PDC, die *PDC-1*, als Rohextraktcharge mit unterschiedlichen metallionenhaltigen Puffern (100 µM) inkubiert, um zunächst das/die Metallion(en) zu ermitteln, welche die drastischen Stabilitäts- und Aktivitätseinbußen im Leitungswasser verursachen.

Bei diesen Untersuchungen wurde das PDC-Mutein mit unterschiedlichen zweiwertigen Metallionen in einer Konzentration von 100 µM in 50 mM KP_i-Reaktionspuffer mit Cofaktoren inkubiert. Abbildung 18 zeigt den Verlauf dieser Untersuchung. Die Inkubationslösung mit 100µM CuSO₄ hat die stärkste Wirkung auf die Aktivität und Stabilität der *PDC-1*. Nach nur 5 min ist nur noch ca. 30 % Aktivität vorhanden und nach 15 min ist keine Aktivität mehr meßbar. Die anderen untersuchten Metallionen beeinträchtigen auch die Stabilität, bzw. Aktivität der *PDC-1*, die Verluste sind aber nicht so ausgeprägt. Die Aktivität sinkt nach 30 h Inkubation um maximal 30 % (Abb. 18).

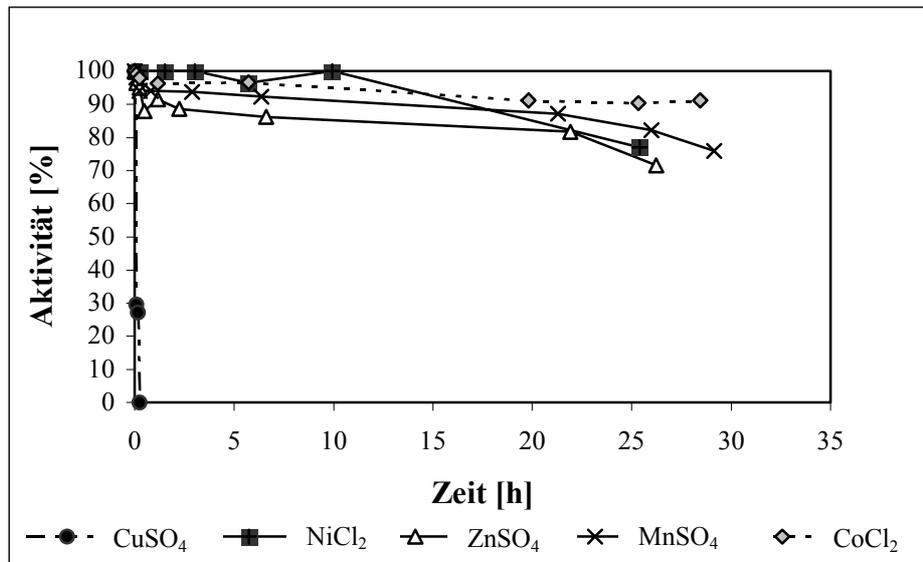


Abb. 18: Stabilität der *PDC-I-RE* gegenüber Metallionen (100 µM).

50 mM KP_i , pH 6,5, mit Cofaktoren (5 mM $MgSO_4$; 0,1 mM ThDP); *PDC-I-RE* (PDC-W392M-His₆); RE = Rohextraktcharge; Proteingehalt: 0,1 mg/ml; Gemessen wurde die Decarboxylaseaktivität; 100 % Aktivität entspricht der Aktivität zum Zeitpunkt 0 h.

Die folgenden Untersuchungen sollten nun zeigen, ob diese drastische Aktivitätsabnahme in Gegenwart von Cu^{2+} -Ionen auf den C-terminalen Hexahistidinrest der *PDC-I* oder auf eine intrinsische Eigenschaft der PDC aus *Z.mobilis* zurückzuführen ist.

Die oben vorgestellte Untersuchung wurde auch mit einer Rohextraktcharge von der *PDC-0* (PDC-W392M ohne His-tag) durchgeführt. Auch diese Untersuchung zeigte eine starke Cu^{2+} -Abhängigkeit der PDC-Stabilität. Wie bei der *PDC-I* mit His-tag nahm die Aktivität in dem Inkubationsansatz mit 100 µM $CuSO_4$ drastisch ab. Nach 5 min zeigt die untersuchte *PDC-0* nur noch 10 % Restaktivität. Die anderen untersuchten Metallionen zeigen nur eine geringe Wirkung auf die Stabilität, bzw. Aktivität der *PDC-0*.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Inaktivierung durch 100 µM $CuSO_4$ scheinbar unabhängig vom C-terminalen His-tag des verwendeten PDC-Muteins ist. In weiteren Untersuchungen sollte nun geklärt werden, in welchem Konzentrationsbereich Cu^{2+} inaktivierend wirkt und ob Cu^{2+} -Konzentrationen, wie sie in Leitungswässern bzw. durch Verunreinigungen in technischen Anlagen vorkommen, problematisch für die PDC-katalysierten Reaktionen sind.

3.2.4.2 Sensibilität der PDC gegenüber Cu(II)

Zunächst sollte geklärt werden, in welchem Konzentrationsbereich Cu(II) die PDC inaktiviert. Kupfer ist in Leitungswasser in geringen Konzentrationen enthalten, diese Konzentrationen liegen aber weit unter den für den ersten Versuch verwendeten 100 μM . Der Grenzwert für Kupfer im Trinkwasser liegt bei 3 mg/l nach 12 h Stagnation (BBGes, 2001). Üblicherweise liegt die Kupferkonzentration im Trinkwasser nach der Zubereitung bei 40 $\mu\text{g/l}$ (Umweltministerium Bayern, 2000). In Leitungswasser von Wohnhäusern sind aber schon Kupferkonzentrationen im Bereich von 0,4 bis 15,5 mg/l aufgrund des Kupferrohrsystems festgestellt worden (Umweltministerium Bayern, 2000). Das Leitungswasser des FZ Jülich enthält nach der Zubereitung 20 $\mu\text{g/l}$ Kupfer (ZCH, 1998). Im Leitungswasser des genutzten Labors betrug die Kupferkonzentration 260 $\mu\text{g/l}$ (ZCH, 1998). Das PDC-Mutein *PDC-I* wurde als Rohextraktcharge mit unterschiedlichen CuSO_4 -Lösungen inkubiert, deren Konzentrationen im Bereich der im Leitungswassers festgestellten Konzentration lagen (1 $\mu\text{M} \approx 0,25 \text{ mg/l}$; 5 $\mu\text{M} \approx 1,25 \text{ mg/l}$; 10 $\mu\text{M} \approx 2,5 \text{ mg/l}$). Zu bestimmten Zeitpunkten wurde die Decarboxylaseaktivität über den gekoppelten Enzymtest überprüft. Selbst in diesen Konzentrationsbereichen sinkt die Aktivität der *PDC-I* sehr stark (Abb. 19). Bei 5 μM und 10 μM CuSO_4 ist die Aktivität und Stabilität der *PDC-I* deutlich verringert. Nach 1,5 h Inkubation wird für die *PDC-I* in der 10 μM CuSO_4 -Lösung nur noch ca. 16 % Restaktivität bestimmt, bei der 5 μM Lösung nur noch ca. 30 % (Abb. 19). In Gegenwart von mit 1 μM CuSO_4 steigt die Halbwertszeit der *PDC-I* deutlich, liegt jedoch mit unter 40 h deutlich unter dem der Kontrolle ($t_{1/2} > 90 \text{ h}$) in KP_1 Puffer mit Cofaktoren.

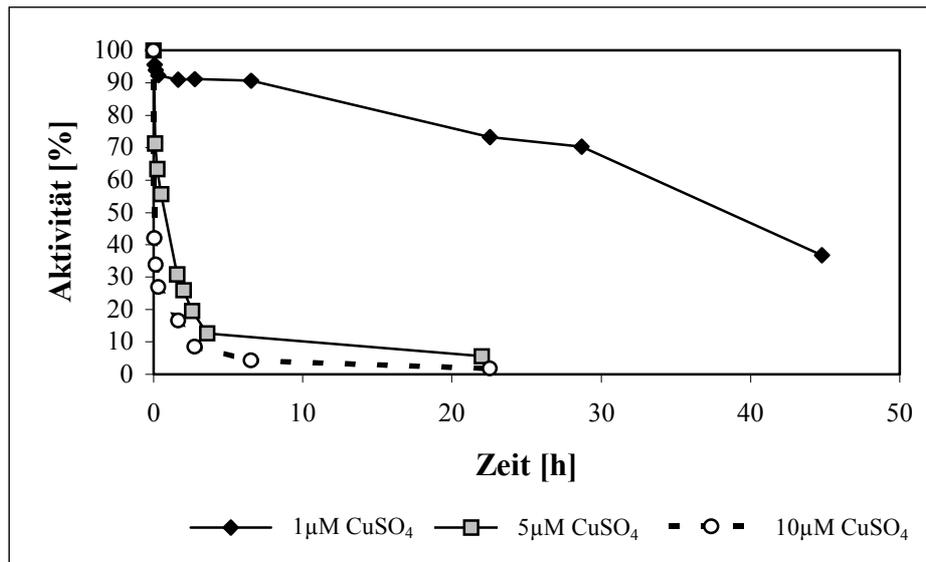


Abb. 19: Stabilität der *PDC-I-RE* gegenüber CuSO_4 (1, 5 oder 10 μM).

50 mM KP_i , pH 6,5, mit Cofaktoren (5 mM MgSO_4 ; 0,1 mM ThDP); *PDC-I-RE* (PDC-W392M-His₆); RE = Rohextraktcharge; Proteingehalt: 0,1 mg/ml; Gemessen wurde die Decarboxylaseaktivität; 100 % Aktivität entspricht der Aktivität zum Zeitpunkt 0 h.

1 μM CuSO_4 entspricht ungefähr der Kupferkonzentration in dem im Laborbetrieb verwendetem Leitungswasser. Die Aktivitäts- und Stabilitätseinbußen der *PDC-I* als Rohextraktcharge im Leitungswasser und in der 1 μM CuSO_4 Lösung sind vergleichbar (Abb. 20). In Leitungswasser besitzt die *PDC-I* nach 22 h Inkubation ca. 60 % Restaktivität, nach 22,5 h Inkubation in 1 μM CuSO_4 besitzt dieses PDC-Mutein als Rohextraktcharge noch ca. 70 % Restaktivität. Cu^{2+} -Ionen scheinen die Komponenten im Leitungswasser zu sein, die für die signifikanten Stabilitätseinbußen der PDC-Muteine in Leitungswasser verantwortlich sind, da Cu^{2+} -Konzentrationen, wie sie in Leitungswasser vorkommen, inaktivieren.

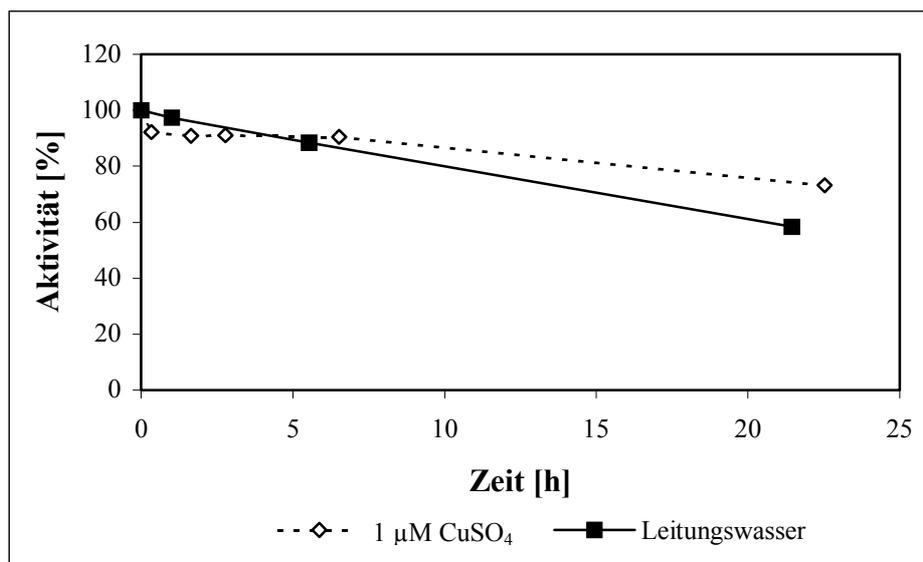


Abb. 20: Vergleich der Stabilitäten der *PDC-I-RE* in Leitungswasser und 1 µM CuSO₄-Lösung.

50 mM KP_i, pH 6,5, mit Cofaktoren (5 mM MgSO₄; 0,1 mM ThDP) in Leitungswasser oder in VE-Wasser mit 1 µM CuSO₄; *PDC-I-RE* (*PDC-W392M-His₆*); RE = Rohextraktcharge; Proteingehalt: 0,1 mg/ml; Gemessen wurde die Decarboxylaseaktivität; 100 % Aktivität entspricht der Aktivität zum Zeitpunkt 0 h.

Durch weitere Untersuchungen sollte nun geklärt werden, ob die beobachtete Sensibilität gegenüber Cu²⁺-Ionen auf den C-terminalen His-tag oder auf intrinsische Eigenschaften der PDC aus *Z.mobilis* zurückzuführen ist. Für diese Untersuchung wurde das PDC-Mutein *PDC-W392M* ohne His-tag (*PDC-0*) als Rohextraktcharge und aufgereinigtes Enzym mit 1 µM CuSO₄ inkubiert und die erhaltenen Stabilitätsdaten mit denen des PDC-Muteins *PDC-W392M-His₆* als Rohextraktcharge und aufgereinigtes Enzym verglichen (Abb. 21). Man beobachtet bei dem PDC-Mutein ohne C-terminalen His-tag (*PDC-0*) dieselben Inaktivierungseffekte durch CuSO₄ wie bei dem Mutein mit C-terminalen His-tag (*PDC-I*). Nach 1,5 h Inkubation in 1 µM CuSO₄ zeigt die *PDC-0* als Rohextraktcharge 87 %, als aufgereinigtes Enzym nur noch 53 % Restaktivität. Das PDC-Mutein *PDC-I* mit C-terminalem His-tag zeigt eine ähnliche Sensibilität gegenüber CuSO₄ (Abb. 21). Als Rohextraktcharge wird nach 1,5 h Inkubation noch 91 %, als aufgereinigtes Enzym nur noch 48 % Restaktivität bestimmt.

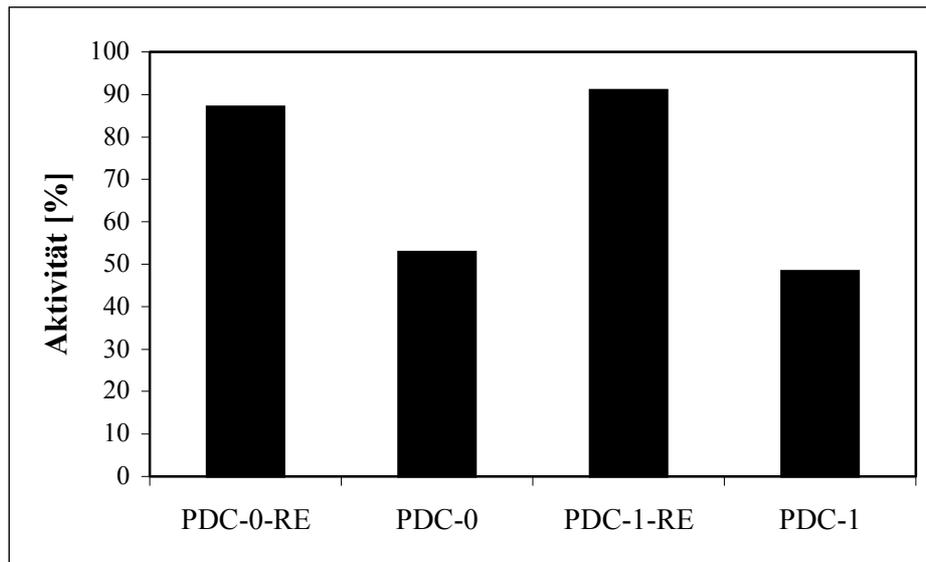


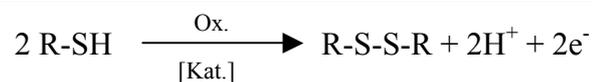
Abb. 21: Vergleich der Restaktivitäten der PDC-Mutante nach 1,5 h Inkubation mit 1 µM CuSO₄.

10 ml Inkubationsansatz; Gesamtproteingehalt: 0,02 mg/ml (aufgereinigtes Enzym) oder 0,1 mg/ml (Rohextraktcharge); 1 µM CuSO₄; 50 mM KPi, pH 6,5; 5 mM MgSO₄; 0,1 mM ThDP; *PDC-0* (PDC-W392M ohne His-tag); *PDC-1* (PDC-W392M-His₆); RE = Rohextraktcharge; ohne Index = aufgereinigte PDC; Gemessen wurde die Decarboxylaseaktivität; 100 % Aktivität entspricht der Aktivität zum Zeitpunkt 0 h.

Der C-terminale His-tag hat keinen direkten Einfluß auf die Kupferempfindlichkeit der PDC-W392M. Die Kupferempfindlichkeit muß also auch auf andere Proteineigenschaften zurückzuführen sein.

Wichtigste Angriffspunkte für Cu²⁺-Ionen sind Cysteinreste im Protein. Die Oxidation der Sulfhydrylgruppe (-SH) des Cysteins wird von molekularem Sauerstoff in Gegenwart von katalytischen Mengen zweiwertiger Übergangsmetallionen wie z. B. Cu²⁺ (Slusarczyk *et al.*, 2000; Michaelis, 1929; Kolthoff & Willeford, 1958) unterstützt.

Diese Reaktion kann wie folgt beschrieben werden:



Es werden Disulfidbindungen (Cystinreste) gebildet, die zu Proteinaggregation führen können, wodurch das Enzym inaktiviert wird. In Fällen, bei denen der Kontakt zwischen den Sulfhydrylgruppen unterschiedlicher Cysteinreste im Protein aus sterischen Gründen nicht möglich ist oder wenn das Protein nur einen Cysteinrest besitzt, können keine intramolekularen Disulfid-Brücken gebildet werden.

Unter geeigneten sterischen Bedingungen können aber intermolekulare Bindungen zu einem anderen Proteinmolekül ausgebildet werden, was dann zur Bildung von Aggregaten führt (Little & O'Brien, 1967).

Eine Analyse der 3D-Struktur der PDC aus *Z.mobilis* (Dobritzsch *et al.*, 1998) ergab, daß von den sieben Cysteinresten in jeder Untereinheit der PDC, vier für Cu^{2+} -Ionen zugänglich sind³. Der Austausch dieser Cysteine gegen nicht-oxidationsempfindliche Aminosäuren könnte die Stabilität der PDC aus *Z. mobilis* gegenüber Cu^{2+} verbessern. Bei der Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* führte der Austausch von Cysteinen gegen nicht-oxidationsempfindliche Aminosäuren zur signifikanten Erhöhung der Stabilität des Enzyms gegenüber CuCl_2 (Slusarczyk *et al.*, 2000). Ein analoger Ansatz führte bei der PDC aus *Z.mobilis* zu keinem Erfolg. Es wurden vier Einzelmutanten erzeugt, bei denen jeweils ein Cysteinrest gegen einen Serinrest ausgetauscht wurde. Die Stabilität gegenüber Cu(II) konnte nicht erhöht werden.

Die die PDC inaktivierenden Konzentrationen an Kupfer können bei einer technischen Anwendung schnell erreicht werden. Auswaschungen aus Stahl- oder Kupferkomponenten im Reaktionssystem erhöhen den Metallionengehalt in den Reaktionslösungen, so daß eine erhöhte Deaktivierung zu erwarten wäre. Die Erhöhung des Gesamtproteingehaltes könnte zur einer Minimierung der Deaktivierung durch Kupfer führen. Es zeigte sich, daß die untersuchten Rohextraktchargen der PDC-Muteine wahrscheinlich aufgrund ihrer Fremdproteine, die als Schutzproteine wirken, eine erhöhte Stabilität gegenüber Kupfer zeigen (Abb. 21). Der Gesamtproteingehalt in den Inkubationsansätzen der Rohextraktchargen ist um den Faktor 5 höher als bei denen der aufgereinigten Enzyme.

Der Zusammenhang zwischen Gesamtproteinkonzentration und der Kupferempfindlichkeit der PDC wurde im folgenden untersucht.

³ Die computergrafischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. J. Grötzinger am Inst. für Biochemie der RWTH Aachen durchgeführt.

3.2.4.3 Einfluß der Proteinkonzentration auf die Cu(II)-Empfindlichkeit

Um zu untersuchen, ob die erhöhte Stabilität der PDC-Muteine im Rohextrakt gegenüber Cu^{2+} -Ionen auf den höheren Proteingehalt durch die Fremd- bzw. Schutzproteine im Rohextrakt zurückzuführen ist, wurde ein Ansatz gewählt, der einen erhöhten Proteingehalt im Inkubationsansatz simuliert. Aufgereinigte *PDC-1* wurde mit unterschiedlichen BSA-Konzentrationen in einem Ansatz zusammen mit $5 \mu\text{M}$ CuSO_4 inkubiert und die Enzymaktivität über den gekoppelten Decarboxylierungstest zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. BSA wurde als Fremdprotein gewählt, da es als Stabilisator und Schutzprotein für Enzyme und andere Proteine eingesetzt wird (Scopes, 1993). Die höhere CuSO_4 -Konzentration im Vergleich zu den vorhergegangenen Untersuchung (Kap. 3.2.4.2) wurde gewählt, um den Zusammenhang zwischen Proteingehalt und der Deaktivierung besser darzustellen.

Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung. Der Proteingehalt in den Inkubationslösungen war so eingestellt, daß ähnliche Konzentrationen vorlagen wie bei den Untersuchungen zur Bestimmung der Cu^{2+} -Empfindlichkeit der PDC-Muteine als Rohextraktcharge. Die Lösung mit $0,025 \text{ mg/ml}$ Proteingehalt enthält nur die aufgereinigte *PDC-1* und kein zusätzliches BSA. Die Aktivität, bzw. Stabilität der *PDC-1* in diesem Inkubationsansatz mit der geringsten Proteinkonzentration sinkt drastisch. Die Halbwertszeit liegt deutlich unter 30 min (Abb. 22). Im Inkubationsansatz mit $0,15 \text{ mg/ml}$ Gesamtprotein beträgt die Halbwertszeit 5 h . Die Inkubationslösungen mit einem Gesamtproteingehalt von $0,45$, bzw. $1,15 \text{ mg/ml}$ zeigen eine nur geringe Aktivitäts- und Stabilitätsabnahme in dem gleichen beobachteten Zeitraum. In beiden Inkubationsansätzen wird nach 3 h Inkubation noch über 90% Restaktivität bestimmt (Abb. 22).

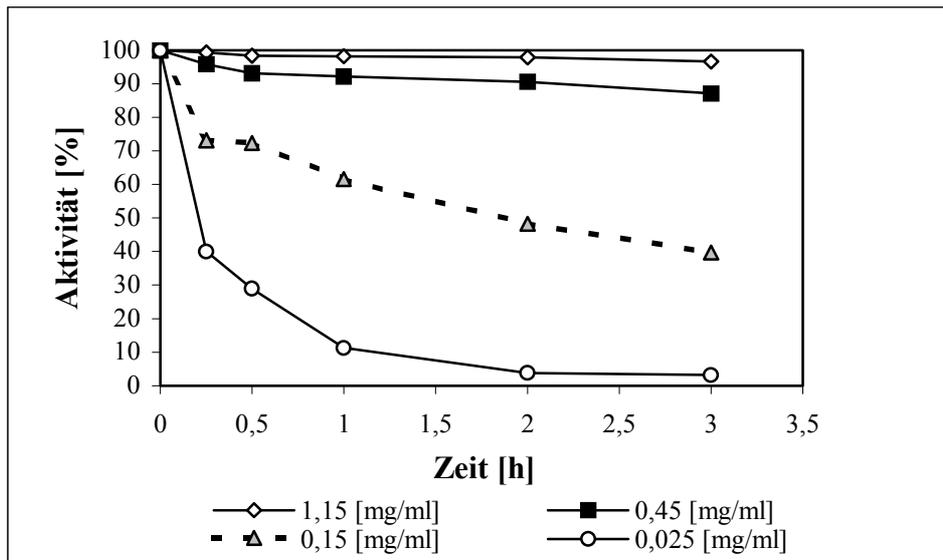


Abb. 22: Einfluß des Proteingehaltes auf die Stabilität der *PDC-1* gegenüber $5 \mu\text{M}$ CuSO_4

Ansatz: 10 ml; Gesamtproteingehalt ist angegeben; im 0,025 mg/ml-Ansatz ist kein BSA enthalten; aufgereinigte *PDC-1* (*PDC-W392M-His₆*); $5 \mu\text{M}$ CuSO_4 ; 50 mM KP_i , pH 6,5, Puffer mit Cofaktoren 5 mM MgSO_4 ; 0,1 mM ThDP; Gemessen wurde die Decarboxylaseaktivität; 100 % Aktivität entspricht der Aktivität zum Zeitpunkt 0 h.

Das eingesetzte BSA fungiert als Schutzprotein und stabilisiert die *PDC-1* gegenüber Cu(II) . Cu(II) reagiert auch mit BSA und kann so nicht mehr zur Deaktivierung der *PDC-1* beitragen. Die Deaktivierung der aufgereinigten *PDC-1* durch $5 \mu\text{M}$ CuSO_4 kann durch Zusatz von BSA unterdrückt werden, wenn der Gesamtproteingehalt im Bereich von 0,5 - 1 mg/ml eingestellt wird.

Da ein Zusammenhang zwischen dem Proteingehalt und der Cu(II) -Empfindlichkeit der *PDC-1* gefunden worden ist, wurden die erhaltenen Ergebnisse für eine neue Untersuchung in Reaktionspuffer aus Leitungswasser verwendet. Es wurde *PDC-1* als Rohextraktcharge in Reaktionspuffer aus Leitungswasser mit einem Gesamtproteingehalt von 0,5 mg/ml inkubiert und die Decarboxylaseaktivität zu bestimmten Zeitpunkten überprüft. Abbildung 23 zeigt den Vergleich der Inkubationsansätze mit einem Gesamtproteingehalt von 0,1 mg/ml und einem Gesamtproteingehalt von 0,5 mg/ml.

Im Ansatz mit einem Gesamtproteingehalt von 0,5 mg/ml nimmt die Aktivität nur geringfügig ab. Nach 51 h Inkubation in einem Reaktionspuffer aus Leitungswasser mit 50 mM KP_i , pH 6,5, und Cofaktoren wird für die *PDC-1* als Rohextraktcharge über 90 % Restaktivität bestimmt (Abb. 23). Im Gegensatz dazu erfolgt mit einem Fünftel der Proteinkonzentration eine rasche Inaktivierung innerhalb von 24 h, so daß nur noch 50 % Restaktivität bestimmt werden (Abb. 23).

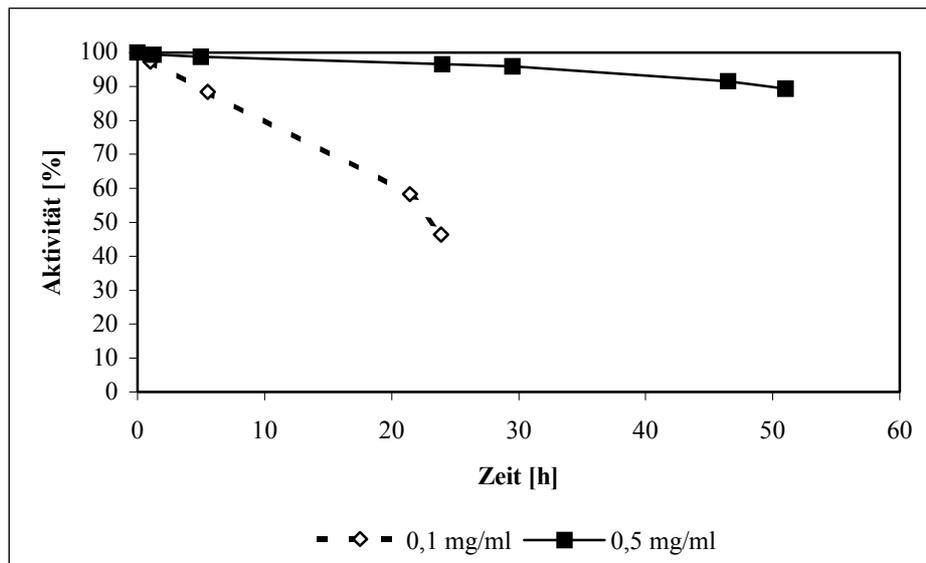


Abb. 23: Einfluß des Proteingehaltes auf die Stabilität der *PDC-1-RE* gegenüber Leitungswasser.

10 ml Ansatz; Gesamtproteingehalt ist angegeben; *PDC-1-RE* (*PDC-W392M-His₆*); RE = Rohextraktcharge; Reaktionspuffer aus Leitungswasser mit 50 mM KP_i , pH 6,5, Puffer. 5 mM $MgSO_4$ und 0,1 mM ThDP); Gemessen wurde die Decarboxylaseaktivität; 100 % Aktivität entspricht der Aktivität zum Zeitpunkt 0 h.

Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß ein Zusammenhang zwischen dem Proteingehalt in Inkubationslösungen und der Cu(II)-Sensibilität der *PDC-1* aus *Z.mobilis* besteht. Dies kann in einem technischen Prozeß durch den Einsatz von Rohextraktpräparaten in einfacher Weise erreicht werden.

3.2.4.3 Die Carboligasereaktion der PDC unter Cu(II)-Einfluß

Nachdem in den vorhergegangenen Untersuchungen der Einfluß von Cu^{2+} -Ionen auf die Decarboxylaseaktivität als Maß für die Stabilität des Enzyms untersucht wurde, sollte nun in weiteren Untersuchungen die Carboligation der PDC ausgehend von Acetaldehyd und Benzaldehyd zu (*R*)-PAC, in Gegenwart von Cu^{2+} -Ionen im Reaktionspuffer betrachtet werden. Es sollte überprüft werden, ob auch die PDC-katalysierte (*R*)-PAC-Synthese der PDC durch eine hohe Proteinkonzentration gegenüber Cu(II) stabilisiert wird. In einem Batch-Syntheseansatz mit je 30 mM Benzaldehyd und 30 mM Acetaldehyd und *PDC-I* als Rohextraktcharge und einem Gesamtproteingehalt von 0,5 mg/ml wurde zu bestimmten Zeitpunkten die Produktkonzentration bestimmt. Die Synthese wurde in Anwesenheit von 5 μM oder 50 μM CuSO_4 durchgeführt. Es wurde auch mit 50 μM CuSO_4 inkubiert, um eine sehr starke Auswaschung von Cu(II) in einer technischen Großanlage zu simulieren. In Abb. 24 erkennt man, daß unter den gewählten Reaktionsbedingungen keine Inaktivierung der *PDC-I* durch Cu(II) festzustellen ist. Die (*R*)-PAC-Konzentration im Ansatz nimmt über dem betrachteten Synthesezeitraum von 3 h stetig zu (Abb. 24). Die *PDC-I* bleibt unter diesen Bedingungen katalytisch aktiv. Es gibt keinen Unterschied zwischen der Carboligaseaktivität der *PDC-I* mit oder ohne Cu(II) im Ansatz (Abb. 24).

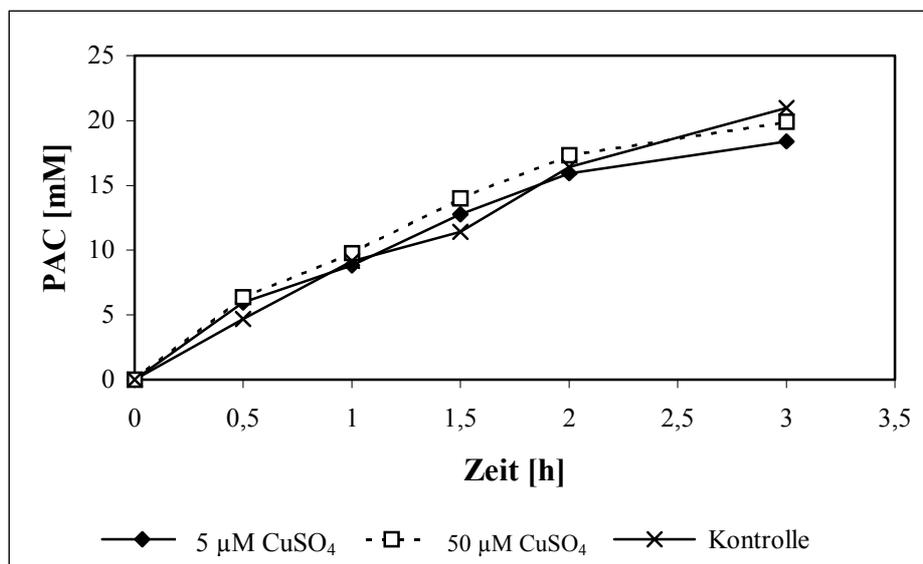


Abb. 24: Einfluß von 5 μM oder 50 μM CuSO_4 auf die enzymatische (*R*)-PAC-Synthese (Batch-Synthese) mit der *PDC-I-RE*.

10 ml Ansatz: 30 mM AcA; 30 mM BzA; 50 mM KP_i , pH 6,5, mit Cofaktoren; 5 μM oder 50 μM CuSO_4 ; Proteingehalt: 0,5 mg/ml; *PDC-I* (*PDC-W392M-His₆*); RE = Rohextraktcharge; Kontrolle ohne CuSO_4 , 25°C

Mit den für diese Untersuchungen eingesetzten Proteinkonzentrationen wurden schon kontinuierliche enzymatische (*R*)-PAC Synthesen erfolgreich durchgeführt (Iwan, 1997; Goetz, 1999; Iwan *et al.*, 2001; Goetz *et al.*, 2001). Mit 1 mg/ml *PDC-1* Rohextrakt gelang eine kontinuierliche enzymatische Synthese von (*R*)-PAC ausgehend von Acetaldehyd und Benzaldehyd (Goetz, 1999; Goetz *et al.*, 2001). Durch Einsatz von 0,4 mg/ml aufgereinigter *PDC-W392I-His₆* gelang eine kontinuierliche enzymatische Synthese von (*R*)-PAC ausgehend von Pyruvat und Benzaldehyd (Iwan, 1997; Iwan *et al.*, 2001). Für eine großtechnische Anwendung sollte eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml nicht unterschritten und aus ökonomischen Gründen Rohextraktenzympräparate eingesetzt werden. Bei Einhaltung dieser Voraussetzungen ist die Cu(II)-Empfindlichkeit der *PDC*-Muteine nicht limitierend für den Einsatz in technischen Prozessen.

3.3 Stabilität der *PDC*-Muteine gegenüber den Substraten der Carboligasereaktion

Nachdem in den vorangegangenen Untersuchungen die Zusammensetzung des Reaktionspuffers und deren Wirkung auf die *PDC-1* untersucht worden ist, sollte in einer weiteren Charakterisierung und Optimierung der enzymatischen (*R*)-PAC Synthese mit der *PDC* aus *Z.mobilis* die Stabilität des Enzyms gegenüber den eingesetzten Substraten Acetaldehyd und Benzaldehyd untersucht werden. Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein neues *PDC*-Mutein (*PDC-W392M-K553R-His₆*) in parallellaufenden Arbeiten entwickelt⁴. Die *PDC-W392M-K553R-His₆* (*PDC-2*) enthält im Vergleich zur *PDC-1* (*PDC-W392M-His₆*) einen zusätzlichen Aminosäureaustausch an der Position 553. Diese Position wurde bei parallellaufenden Untersuchungen zur Stabilität der *PDC* aus *Z.mobilis* als empfindlich gegenüber Acetaldehyd beschrieben (Breuer, 1998). Die ϵ -Aminogruppe des Lysins 553 scheint anfällig für eine Reaktion mit Acetaldehyd zu sein und kann so zu einer Deaktivierung der *PDC* führen. Die Acetaldehyd-abhängige Inaktivierung der *PDC* beruht wahrscheinlich auf einer kovalenten Modifikation des Proteins an der Position 553.

⁴ Die Untersuchungen wurden von Dr. M. Breuer, BASF AG, Ludwigshafen durchgeführt.

Es wird vermutet, daß die ϵ -Aminofunktion des Lysinrestes an der Position 553 kovalent mit dem Acetaldehyd im Sinne einer Schiffischen Base reagiert. Da K553 im C-terminalen Bereich der PDC an der Proteinoberfläche zugänglich ist, wird diese Vermutung durch strukturelle Daten gestützt⁵

3.3.1 Stabilität gegenüber Acetaldehyd

Zunächst wurde die Stabilität der PDC-Muteine *PDC-1* (PDC-W392M-His₆) und *PDC-2* (PDC-W392M-K553R-His₆) gegenüber 50 mM Acetaldehyd bei 4°C unter N₂ Atmosphäre untersucht. Die tiefe Temperatur und die N₂-Atmosphäre wurde gewählt, um ein Entweichen des Acetaldehydes zu unterdrücken und die Bildung des Carboligaseproduktes Acetoin zu verhindern, da die Carboligasereaktion bei 4°C stark verlangsamt wird (Iding, 1998). Acetaldehyd besitzt einen Siedepunkt von 21 °C, daher würde eine Inkubation bei Raumtemperatur schnell zum Ausgasen des Acetaldehydes aus der Lösung führen. Acetoin könnte auch einen Einfluß auf die Stabilität der PDC haben. Für die Untersuchungen wurden aufgereinigte Enzyme verwendet, um die direkten Einflüsse von Acetaldehyd zu untersuchen. Die hohe Acetaldehydkonzentration wurde gewählt, um einen signifikanten Unterschied in der Stabilität der beiden PDC-Muteine bestimmen zu können.

Bei dieser Untersuchung konnte die Restaktivität der PDC-Muteine nicht direkt über den gekoppelten photometrischen Test bestimmt werden, da der vorhandene Acetaldehyd von der ADH aus Hefe im Test umgesetzt würde und zu einer hohen Hintergrundaktivität führen würde. Darum mußte vorher der Acetaldehyd aus den zu vermessenden Proben über eine Ultrafiltration entfernt werden. Für die *PDC-1* wird unter den vorliegenden Reaktionsbedingungen eine Halbwertszeit von ca. 70 min bestimmt. Das PDC-Mutein *PDC-2* ist stabiler und besitzt eine Halbwertszeit von > 280 min. Dies bestätigt die Ergebnisse von Breuer (1998).

⁵ Die computergrafischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. J. Grötzinger am Inst. für Biochemie der RWTH Aachen durchgeführt.

Die *PDC-2* scheint aufgrund ihrer zusätzlichen Mutation stabiler als die *PDC-1* gegenüber Acetaldehyd zu sein. Es sollte aber beachtet werden, daß diese Untersuchung nicht unter normalerweise eingesetzten Reaktionsbedingungen durchgeführt wurde. Die enzymatische (*R*)-PAC Synthese mit der *Z.m.PDC* wird bei 25°C durchgeführt (Iwan, 1997; Goetz, 1999; Iwan *et al.*, 2001; Goetz *et al.*, 2001). Aus meßtechnischen Gründen mußte für die Inkubation mit Acetaldehyd eine tiefere Temperatur (4°C) gewählt werden. Die Stabilitätsunterschiede bei 4°C müssen nicht notwendigerweise denen bei 25°C entsprechen. Abgesehen davon fehlt im Inkubationsansatz das 2. Substrat Benzaldehyd, das ebenfalls die Stabilität des Enzyms beeinflussen kann.

3.3.2 Stabilität gegenüber Benzaldehyd (BzA)

Die folgende Untersuchung sollte zeigen, ob der zusätzliche Aminosäureaustausch der *PDC-2* gegenüber der *PDC-1* auch zu einer Stabilitätssteigerung bei Inkubation mit Benzaldehyd führt. Hierzu wurden drei verschiedene Konzentrationen an Benzaldehyd eingesetzt. Die Untersuchungen mußten bei 25°C durchgeführt werden, da sich Benzaldehyd bei niedrigen Temperaturen nicht mehr im Reaktionspuffer löst.

In diesem Fall kann man die Restaktivität nach Inkubation mit Benzaldehyd direkt über den gekoppelten Decarboxylase-Test bestimmen. Der noch vorhandene Benzaldehyd wird von der im Test eingesetzten ADH aus Hefe nur im sehr geringen Maße als Substrat akzeptiert. Die bei den Aktivitätsmessungen in den Enzymassay eingetragenen Benzaldehydkonzentrationen haben keinen Einfluß auf die Messung. In den Inkubationsansätzen lag ein Gesamtproteingehalt 0,5 mg/ml vor. Es wurden aufgereinigte Enzyme eingesetzt, um die Stabilitätseffekte nur auf die untersuchte PDC zurückzuführen. Abbildung 25 zeigt den Verlauf dieser Untersuchung mit der *PDC-1*. Im untersuchten Konzentrationsbereich hat Benzaldehyd einen signifikanten Einfluß auf die Stabilität der *PDC-1*. Die Restaktivität nimmt mit zunehmender Inkubationszeit ab (Abb. 25). In 35 mM Benzaldehyd wird eine Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 3,5 h bestimmt. Bei den niedrigeren Benzaldehydkonzentrationen sind die Aktivitätsverluste nicht ganz so gravierend, aber schon signifikant.

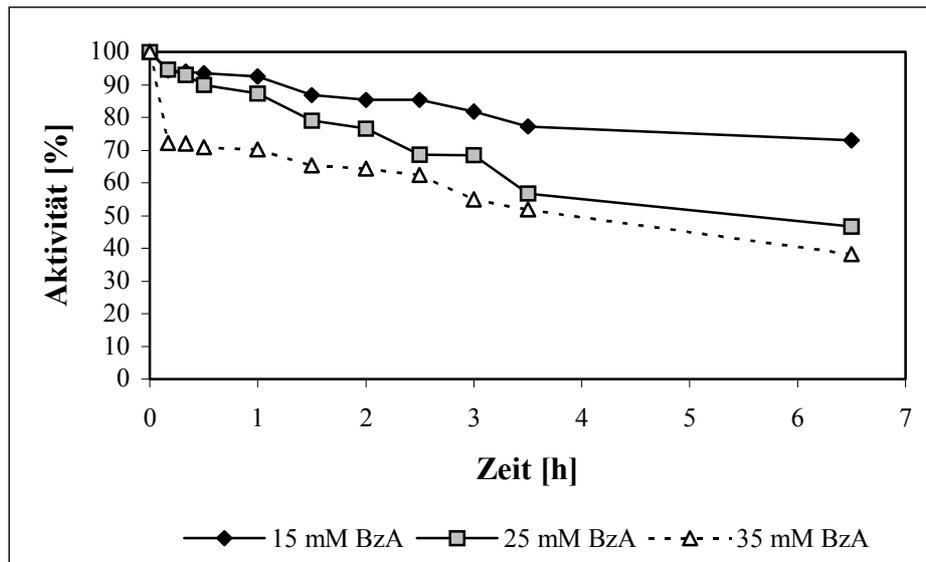


Abb. 25: Stabilität der *PDC-1* (PDC-W392M-His₆) gegenüber Benzaldehyd.

Inkubationsansatz 5 ml; Proteingehalt 0,5 mg/ml; 50 mM KPi, pH 6,5, mit Cofaktoren (5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP); 25°C; BzA: 15, 25 oder 35 mM; Gemessen wurde die Decarboxylaseaktivität; 100 % Aktivität entspricht der Aktivität zum Zeitpunkt 0 h.

Abbildung 26 vergleicht die Restaktivitäten der PDC-Muteine *PDC-1* und *PDC-2* nach 6,5 h Inkubation in Gegenwart unterschiedlicher Benzaldehydkonzentrationen. Die Inaktivierung der PDC-Muteine steigt mit zunehmender Benzaldehydkonzentration (Abb. 25, Abb. 26). Bei einer Konzentration von 15 mM Benzaldehyd wird bei der *PDC-1* noch ca. 75 %, bei der *PDC-2* nur 45 % Restaktivität gefunden, bei 35 mM Benzaldehyd für die *PDC-1* nur noch 40 % Restaktivität und für die *PDC-2* nur noch 30 % Restaktivität. Es werden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stabilitäten der untersuchten PDC-Muteine bestimmt. Der gezielte Aminosäureaustausch an der Position 553 der *PDC-2* hat keinen Einfluß auf die Stabilität gegenüber Benzaldehyd.

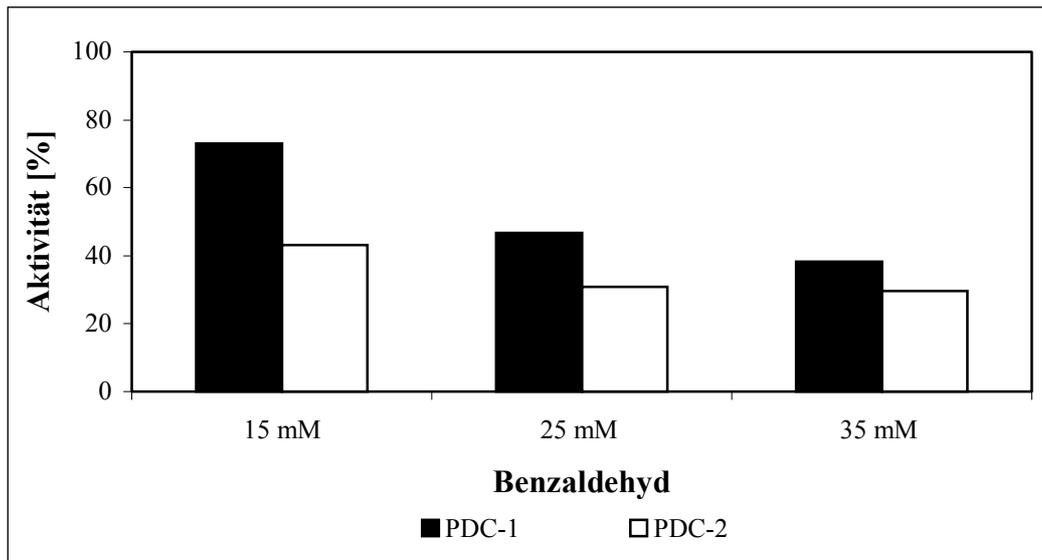


Abb. 26: Vergleich der Restaktivitäten der PDC-Muteine nach Inkubation mit Benzaldehyd nach 6,5 h.

Inkubationsansatz 5 ml; Proteingehalt 0,5 mg/ml; 50 mM KP_i , pH 6,5, mit Cofaktoren (5 mM $MgSO_4$, 0,1 mM ThDP); 25°C; BzA: 15, 25 oder 35 mM; *PDC-1* (PDC-W392M-His₆); *PDC-2* (PDC-W392M-K553R-His₆). Gemessen wurde die Decarboxylaseaktivität; 100 % Aktivität entspricht der Aktivität zum Zeitpunkt 0 h.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurden weitere Untersuchungen mit höheren Proteinkonzentrationen durchgeführt, um den Einfluß der Proteinkonzentration und dem Aufreinigungsgrad der Enzyme zu bestimmen. Es wurde 1 mg/ml Gesamtprotein als aufgereinigte Enzyme oder als Rohextraktcharge mit 35 mM Benzaldehyd inkubiert und die Restaktivitäten mit Hilfe der Decarboxylaseaktivität bestimmt. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Halbwertszeiten der PDC-Muteine.

Tab. 9: Vergleich der Stabilitäten der PDC-Muteine in 35 mM Benzaldehyd

	<i>PDC-1</i>	<i>PDC-2</i>
	Halbwertszeit $t_{1/2}$ [h]	Halbwertszeit $t_{1/2}$ [h]
Aufgereinigtes Enzym [1 mg/ml]	17	3
Rohextraktcharge [1 mg/ml]	> 49	> 49

Aus Tab. 9 wird ersichtlich, daß die Inaktivierung der PDC-Muteine durch höheren Proteingehalt sinkt. Bei einem Gesamtproteingehalt von 0,5 mg/ml aufgereinigter PDC-Muteine wurde für die *PDC-1* und die *PDC-2* bei 35 mM Benzaldehyd eine Halbwertszeit von ca. 2 h bestimmt. Mit einem Gesamtproteingehalt von 1 mg/ml aufgereinigter *PDC-1* wird eine Halbwertszeit von 17 h und für die *PDC-2* von 3 h bestimmt. Der stabilisierende Effekt höherer Proteinkonzentrationen bei aufgereinigtem Enzym wirkt sich bei der *PDC-1* deutlicher aus als bei der *PDC-2* (Tab. 9). Der zusätzliche gezielte Aminosäureaustausch an der Position 553 der *PDC-2* hat auch bei dieser Proteinkonzentration keinen Einfluß auf die Stabilität gegenüber Benzaldehyd.

Der Einsatz von Rohextrakt im Konzentrationsbereich von 1 mg/ml erhöht die Halbwertszeit bei beiden PDC-Muteinen auf über 49 h (Tab. 9). In diesem Fall wurden keine signifikanten Unterschiede im Inaktivierungsverhalten der PDC-Muteine festgestellt. Die im Rohextrakt vorliegenden Fremdproteine stabilisieren durch ihre Schutzfunktion die PDC-Muteine gegenüber Benzaldehyd. Es zeigt sich auch hier, daß der Einsatz von Rohextraktchargen für eine enzymatische (*R*)-PAC Synthese aus Stabilitätsgründen die beste Wahl ist. Stabilitätsuntersuchungen in Gegenwart beider Substrate konnten nicht durchgeführt werden, da in diesem Fall aufgrund der ablaufenden Biokatalyse verfälschte Bedingungen vorliegen würden.

3.4 Vergleichende Charakterisierung der PDC-Muteine aus *Z. mobilis*

Im Verlauf dieser Arbeit wurde in parallellaufenden Arbeiten⁶ eine neue Mutante der Pyruvatdecarboxylase aus *Z. mobilis* entwickelt (PDC-W392M-K553R-His₆ = *PDC-2*). Um aus den zur Verfügung stehenden PDC-Muteinen, die PDC-Variante mit der größten (*R*)-PAC Syntheseaktivität und höchsten Stabilität unter den Synthesebedingungen auswählen zu können, wurden die Muteine *PDC-1* (PDC-W392M-His₆) und *PDC-2* (PDC-W392M-K553R-His₆) bezüglich ihrer spezifischen Eigenschaften genauer charakterisiert.

⁶ Die Untersuchungen und Arbeiten wurden von Dr. M. Breuer, BASF AG, Ludwigshafen durchgeführt

3.4.1 Vergleich der Stabilität gegenüber Cu(II)

Nachdem die *PDC-1* in vorhergegangenen Untersuchungen eine Cu(II)-Empfindlichkeit gezeigt hatte (Kap. 3.2.4.2), sollte das Stabilitätsverhalten der *PDC-2* gegenüber Cu(II) untersucht werden. Für diese Untersuchung wurden die PDC-Muteine *PDC-1* und *PDC-2* als Rohextraktchargen mit einem Gesamtproteingehalt von 0,5 mg/ml mit 5 μ M CuSO₄ inkubiert und die Decarboxylaseaktivität zu bestimmten Zeitpunkten überprüft. Abbildung 27 zeigt, daß die Unterschiede in der Stabilität gegenüber 5 μ M CuSO₄ nur geringfügig sind. Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ ist bei beiden PDC-Muteinen größer 50 h (Abb. 27). Die *PDC-1* zeigt als Rohextraktcharge nach 49 h Inkubation noch ca. 65 % Restaktivität, die *PDC-2* als Rohextraktcharge noch ca. 80 %. Die PDC-Muteine unterscheiden sich kaum. Die zusätzliche gezielte Mutation an der Position 553 hat keinen Einfluß auf die Stabilität der *PDC-2* gegenüber Cu(II).

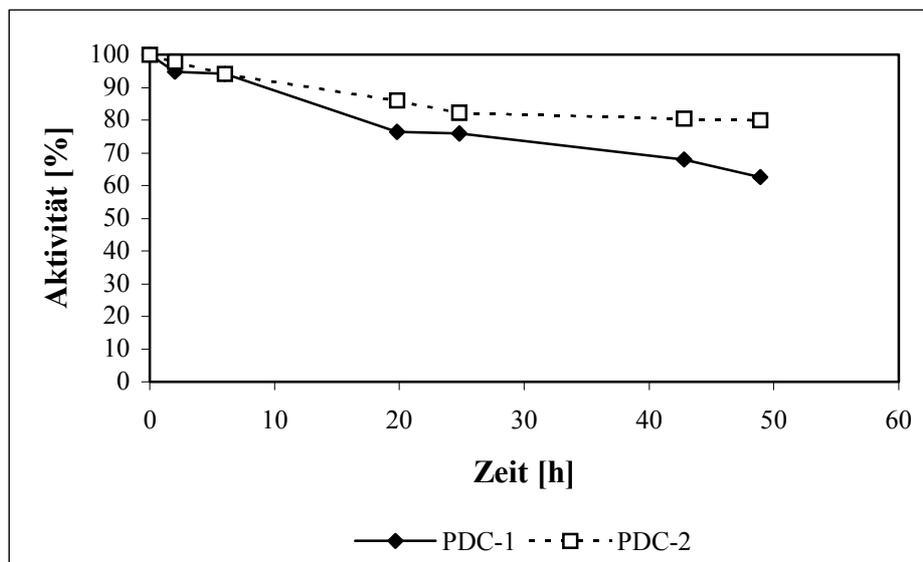


Abb. 27: Vergleich der Stabilitäten der PDC-Muteine *PDC-1-RE* und *PDC-2-RE* gegenüber 5 μ M CuSO₄

50 mM KPi, pH 6,5, mit Cofaktoren (5 mM MgSO₄; 0,1 mM ThDP); 5 μ M CuSO₄; *PDC-1-RE* (PDC-W392M-His₆); *PDC-2-RE* (PDC-W392M-K553R-His₆); RE = Rohextraktcharge; Proteingehalt: 0,5 mg/ml; Gemessen wurde die Decarboxylaseaktivität; 100 % Aktivität entspricht der Aktivität zum Zeitpunkt 0 h.

3.4.2 Temperaturabhängigkeit der Carboligasereaktion

Zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der Carboligasereaktion der PDC-Muteine *PDC-1* und *PDC-2* wurde die enzymatische Synthese von (*R*)-PAC in Batchsynthesen ausgehend von Acetaldehyd und Benzaldehyd bei unterschiedlichen Temperaturen betrachtet. Hierbei wurden nach 15 min die PDC-Muteine in den Reaktionsansätzen mit einem Hitzestop inaktiviert und dann die Produktkonzentrationen bestimmt. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Carboligasereaktion nimmt bei beiden PDC-Muteinen mit steigender Temperatur zu. Abbildung 28 zeigt, daß bei einer Temperaturerhöhung von 25 auf 50°C eine Steigerung der katalytischen Aktivität um den Faktor 2 erreicht wird. Die PDC-Muteine zeigen die gleiche Temperaturabhängigkeit und unterscheiden sich kaum (Abb. 28). Allerdings neigt das Reaktionsprodukt (*R*)-PAC bei Temperaturen von $\geq 30^\circ\text{C}$ zur Racemisierung (Iding, 1998). Auch wenn die Aktivität bei 50°C doppelt so hoch ist wie bei 25°C, wurden die weiteren Untersuchungen bei der tieferen Temperatur durchgeführt, um die Ausbeute an enantiomerenreinem (*R*)-PAC zu gewährleisten.

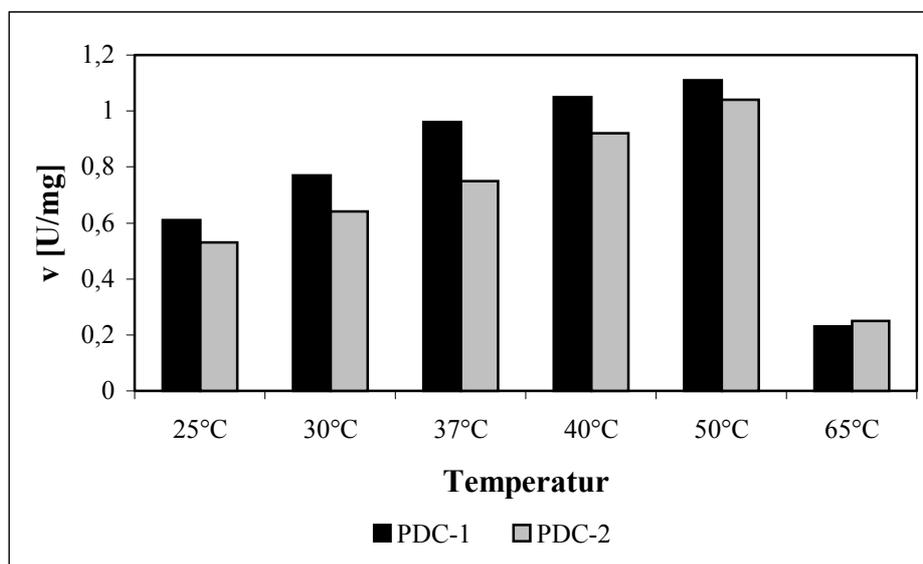


Abb. 28: Temperaturabhängigkeit der Carboligasereaktion der PDC-Muteine aus *Z. mobilis*.

Reaktionsansatz: 30 mM AcA; 30 mM BzA; 50 mM KP_i , pH 6,5; 5 mM MgSO_4 ; 0,1 mM ThDP;

Enzym: 0,4 mg/ml; *PDC-1* (PDC-W392M-His₆); *PDC-2* (PDC-W392M-K553R-His₆); Reaktionszeit: 15 min

Aus dieser Untersuchung konnte zusätzlich die Aktivierungsenergie der Carboligasereaktion der PDC bestimmt werden. Die Aktivierungsenergie E_A der Carboligasereaktion der PDC kann unter der Annahme, daß die Aktivierungsenergie E_A über den verhältnismäßig engen Temperaturbereich einer enzymatischen Reaktion praktisch konstant ist, aus der logarithmischen Arrhenius Beziehung

$$\log k = \log A - E_A / (2,303 \cdot R \cdot T)$$

abgeschätzt werden. Die Steigung in der Arrheniusgrafik, die durch Auftragen von $\log v_{\max}$ gegen $1/T$ erhalten wird, entspricht der Aktivierungsenergie. Aus den erhaltenen Daten wird für beide PDC-Muteine eine Aktivierungsenergie von ca. 28 kJ für die Carboligasereaktion bestimmt.

3.4.3 Vergleich der Carboligaseaktivität

Die bisher beschriebenen Untersuchungen ergaben keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden PDC-Muteinen, daher sollte nun das Synthese-Potential beider Muteine verglichen werden. Für eine optimale Biokatalysatorausnutzung sollte das PDC-Mutein mit der höchsten Carboligaseaktivität genutzt werden.

Dies erfolgte zunächst in einer Batchreaktion ausgehend von 30 mM Acetaldehyd und 30 mM Benzaldehyd bei 25°C. Abb. 29 beschreibt den Syntheseverlauf über 24 h. Über diesen Zeitraum ist kein Unterschied im (*R*)-PAC-Synthesepotential der beiden PDC-Muteine feststellbar. Die spezifische Aktivität der enzymatischen C-C-Verknüpfung ausgehend von Acetaldehyd und Benzaldehyd bei 25°C wurde im annähernd linearen Bereich der Produktkurven für die *PDC-1* mit 0,26 U/mg und für die *PDC-2* mit 0,27 U/mg bestimmt.

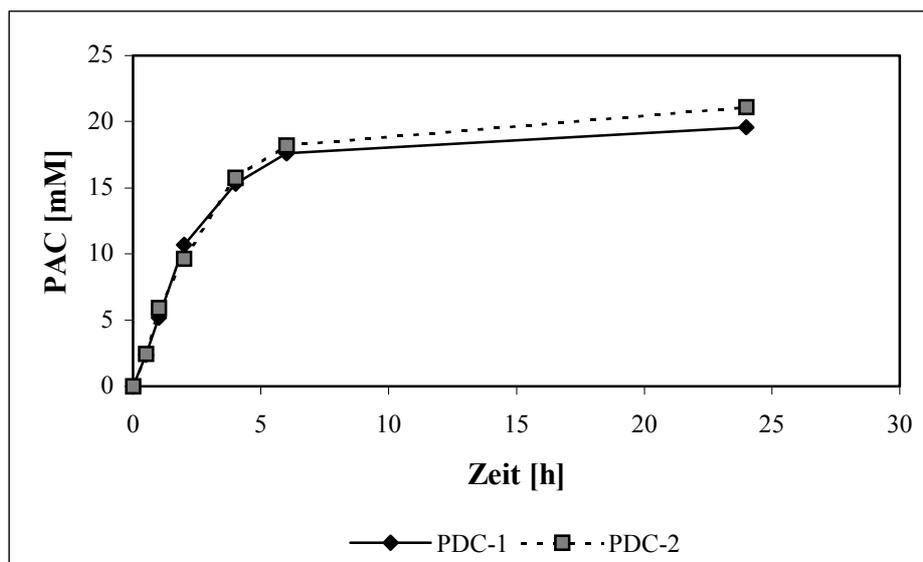


Abb. 29: Vergleich der enzymatischen (*R*)-PAC Batch-Synthese mit den PDC-Muteinen *PDC-1* und *PDC-2* ausgehend von Acetaldehyd und Benzaldehyd bei 25°C.

Ansatz 10 ml: 30 mM AcA; 30 mM BzA; 50 mM KP_1 , pH 6,5, mit Cofaktoren (5 mM $MgSO_4$, 0,1 mM ThDP); 25°C; Proteingehalt: 0,4 mg/ml; aufgereinigte Enzyme; *PDC-1* (PDC-W392M-His₆); *PDC-2* (PDC-W392M-K553R-His₆)

3.4.3.1 Einfluß von Ethanol als Lösungsvermittler für Benzaldehyd

Die in den beschriebenen Batchsynthesen verwendeten Konzentrationen von 30 mM der Substrate (Aldehyde) liegen hinsichtlich des Benzaldehydes bereits sehr nahe an der Löslichkeitsgrenze in wäßrigem Puffer (35,5 mM; Merck, 1999). Im wäßrigen System ist eine weitere Konzentrationserhöhung zur Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit daher nicht möglich. Es gibt jedoch Hinweise aus vorangegangenen Arbeiten, daß die Katalysegeschwindigkeit der PDC bei 30 mM Benzaldehyd nicht maximal ist (Goetz, 1999).

Die Löslichkeit von Benzaldehyd läßt sich durch Zusatz von 20 % Ethanol zum Reaktionspuffer verdoppeln, allerdings wird die *PDC-1* in Gegenwart von 20 % Ethanol deutlich inaktiviert (Schmitz, 1997). Es wurden Batch-Synthesen ausgehend von 30 mM Acetaldehyd und 30 mM Benzaldehyd mit 10 % (v/v) oder 20 % (v/v) Ethanol mit den PDC-Muteinen *PDC-1* und *PDC-2* bei 25°C durchgeführt. Die Substratkonzentrationen wurden im Vergleich zur Batch-Synthese aus Kap.3.4.3 nicht verändert, um auftretende Änderungen der Aktivität oder Stabilität der betrachteten PDC-Muteine nur auf die Anwesenheit von Ethanol zurückführen zu können. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde die Syntheseleistung überprüft.

Wie auch schon bei der Batch-Synthese ohne Ethanol im Reaktionspuffer gibt es keine signifikanten Unterschiede der Stabilität oder Aktivität der beiden betrachteten PDC-Muteine. Die spezifische Carboligaseaktivität, die im annähernd linearen Bereich der Produktkurven bestimmt wurde, verdoppelt sich durch den 10%-igen Ethanolzusatz auf 0,54 U/mg für die *PDC-1* und 0,57 U/mg für die *PDC-2*. Die Erhöhung der Carboligaseaktivität könnte auf der erleichterten Löslichkeit des Cosubstrates Benzaldehyd im Reaktionspuffer beruhen. Mit 10% Ethanol kann die Löslichkeit nahezu verdoppelt werden.

Unabhängig davon wurde die Aktivierung von Enzymen durch moderate Konzentrationen organischer Lösungsmittel häufig beschrieben. Die Gründe für diese Aktivierung konnten aber noch nicht genau geklärt werden (Kudryashova *et al.*, 1997).

Bei Untersuchung eines 20%-igen Ethanolzusatzes im Reaktionspuffer wird kein signifikanter Unterschied im Synthesepotential der *PDC-1* und *PDC-2* festgestellt. Die spezifische Carboligaseaktivität verringert sich vermutlich durch Inaktivierungsprozesse auf 0,19 U/mg für die *PDC-1* und 0,24 U/mg für die *PDC-2*. Der von Schmitz (1997) beschriebene Aktivitätsverlust der PDC bei der Decarboxylierungsreaktion in Gegenwart von 20 % Ethanol ist somit auch bei der Carboligasereaktion bemerkbar. Da ein Zusatz von 10 % Ethanol schon bei niedrigen Benzaldehydkonzentrationen positive Auswirkungen auf die enzymatische (*R*)-PAC Synthese hat, wurde diese Pufferzusammensetzung für die weiteren Untersuchungen verwendet.

3.5 Kinetik der Carboligasereaktion zum (*R*)-PAC

Um eine genauere Information über die optimalen Substratkonzentrationen und die kinetischen Konstanten zu erhalten, wurden die kinetischen Parameter der enzymatischen (*R*)-PAC-Synthese ausgehend von Acetaldehyd und Benzaldehyd mit den PDC-Muteinen *PDC-1* und *PDC-2* vergleichend untersucht. Die kinetischen Messungen werden mit 10 % (v/v) Ethanol in den Ansätzen durchgeführt, um die Löslichkeit des Cosubstrates Benzaldehyd zu gewährleisten. Zudem zeigten die Voruntersuchungen zur Carboligaseaktivität der unterschiedlichen PDC-Muteine, daß 10 % (v/v) Ethanol einen positiven Effekt auf die Carboligaseaktivität der PDC hat (Kap. 3.4.3.1).

Es wurde eine Doppelsubstratkinetik aufgenommen, bei der erst die Acetaldehydkonzentration und anschließend die Benzaldehydkonzentration variiert wurde. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten wurden in kleinen Satzreaktoren im Batchverfahren gemessen.

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist über einen Zeitraum konstant, in dem weniger als 10 % des eingesetzten Substrates umgesetzt worden sind, somit kann die Abnahme der Substratkonzentration vernachlässigt werden. Dieser Bereich lässt sich linear interpolieren. Die Steigung dieser Geraden entspricht bei einer Auftragung der Produktkonzentration gegen die Zeit der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit (Abb. 30).

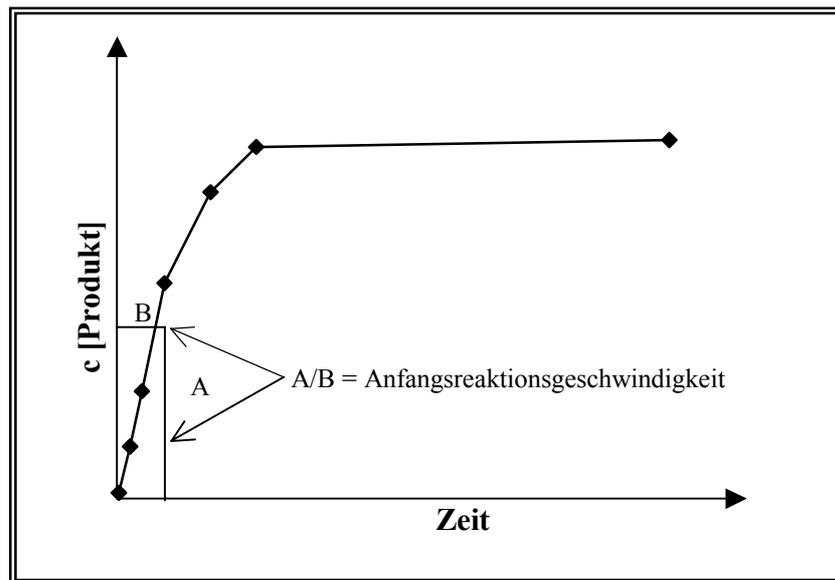


Abb. 30: Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit im Batchreaktor durch Auftragung der Produktkonzentration gegen die Zeit.

Im Bereich niedriger Produktkonzentration im Vergleich zur Ausgangssubstratkonzentration lässt sich diese Kurve linear interpolieren. Die Steigung der Geraden beschreibt die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit.

Zur Beschreibung und Modellierung der Daten aus der Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der enzymatischen Carboligasereaktion der PDC ausgehend von Acetaldehyd und Benzaldehyd müssen die möglichen Reaktionswege der PDC beschrieben werden (Abb. 31).

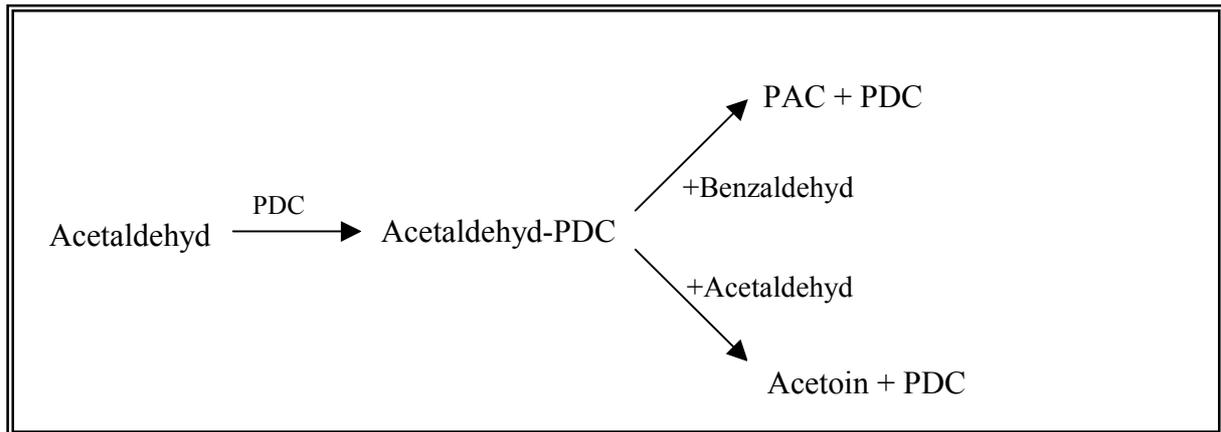


Abb. 31: Mögliche Reaktionswege der Carboligasereaktion PDC aus *Z. mobilis*.

3.5.1 Kinetik der Carboligasereaktion der PDC-Mutante

3.5.1.1 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Acetaldehydkonzentration

Die Ergebnisse der kinetischen Messungen zur Beschreibung der Carboligasereaktion der PDC-Mutante wurden zur einfachen Anpassung getrennt voneinander betrachtet und verglichen. Abbildung 32 beschreibt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Carboligasereaktion von der Acetaldehydkonzentration für die *PDC-1*. Die Benzaldehydkonzentration wurde mit 30 mM konstant gehalten. Die Anpassung der experimentellen Daten gelang am besten mit einem Modell für einen sequentiellen Ordered bi-bi Mechanismus. Dieser Mechanismus beschreibt eine Zwei-Substrat-/Zwei-Produkt-Reaktion, bei der die Reihenfolge der Bindung der Substrate festgelegt ist. Nach Abb. 31 gibt es zwei mögliche Reaktionswege der Carboligasereaktion der PDC ausgehend von Acetaldehyd und Benzaldehyd. Acetaldehyd wird zuerst im Enzym gebunden (Iding *et al.*, 1998) und kann dann entweder mit einem Benzaldehydmolekül (*R*)-PAC oder mit einem weiteren Acetaldehydmolekül Acetoin bilden. Die Acetoinbildung läuft verstärkt ab, wenn die Acetaldehydkonzentration deutlich größer ist als die Benzaldehydkonzentration (Goetz, 1999)

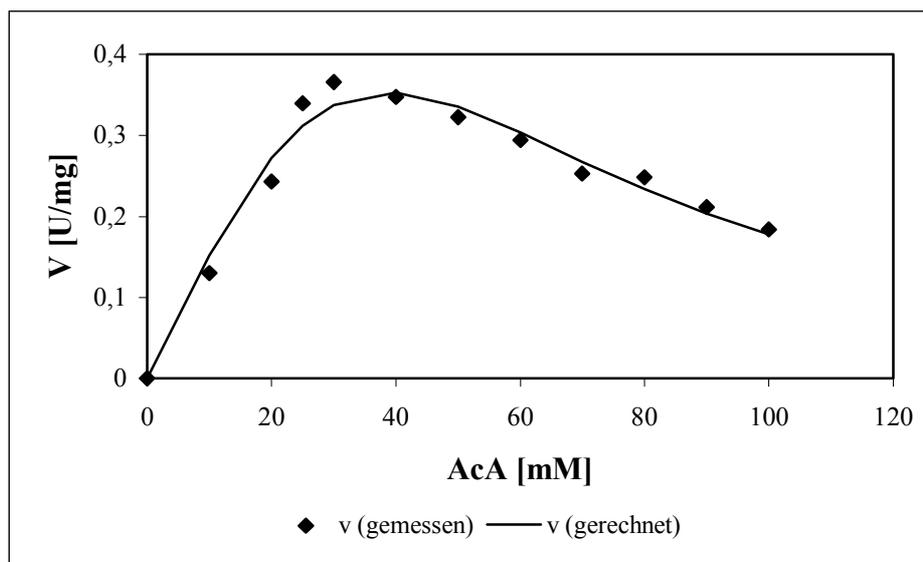


Abb. 32: Reaktionsgeschwindigkeiten der Carboligasereaktion der *PDC-1* in Abhängigkeit von der Acetaldehyd-(AcA)-Konzentration.

Berechnete Reaktionsgeschwindigkeiten wurden über einen Ordered Bi-Bi Mechanismus für eine Zweisubstrat-/Zweiproduktreaktion angepaßt (Softwareprogramm Scientist, MicroMath (Salt Lake City, USA)).

Bedingungen: 0,5 mg/ml aufgereinigte *PDC-1* (PDC-W392M-His₆); 30 mM Benzaldehyd; 50 mM KPi, pH 6,5; 5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP; 10 % (v/v) Ethanol; Acetaldehyd variabel; 25°C

Die Gleichung für eine irreversible Ordered Bi-Bi Reaktion wird wie folgt beschrieben (Bisswanger, 2000):

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [A] \cdot [B]}{K_{iA} \cdot K_{mB} + K_{mB} \cdot [A] + K_{mA} \cdot [B] + [A] \cdot [B]}$$

mit

v	Reaktionsgeschwindigkeit
v _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
[A]	Konzentration Substrat A
[B]	Konzentration Substrat B
K _{mA}	Michaelis-Menten-Konstante Substrat A
K _{mB}	Michaelis-Menten-Konstante Substrat B
K _{iA}	Inhibierungskonstante für Substrat A

Wenn man eine Substratüberschußinhibierung des Acetaldehyd einfügt, gelingt die Anpassung der experimentellen Daten mit einer Korrelation von 0,985.

Folgende Gleichung beschreibt einen sequentiellen Ordered Bi-Bi-Mechanismus mit einer Substratüberschußinhibierung des Acetaldehyds nach Segel (1975).

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [AcA] \cdot [BzA]}{K_{iAcA} \cdot K_{mBzA} + K_{mBzA} \cdot [AcA] \cdot \left(1 + \frac{[AcA]}{K_{iAcA}}\right) + K_{mAcA} \cdot [BzA] + [AcA] \cdot \left(1 + \frac{[AcA]}{K_{iAcA}}\right) \cdot [BzA]}$$

mit

v	Reaktionsgeschwindigkeit
v_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
$[AcA]$	Konzentration Substrat Acetaldehyd
$[BzA]$	Konzentration Substrat Benzaldehyd (= 30 mM)
K_{mAcA}	Michaelis-Menten-Konstante Substrat Acetaldehyd
K_{mBzA}	Michaelis-Menten-Konstante Substrat Benzaldehyd (= 71 mM)
K_{iAcA}	Inhibierungskonstante für Substrat Acetaldehyd

Die Anpassung mit dem Softwareprogramm Scientist ergibt für die *PDC-1* folgende kinetische Parameter:

v_{\max}	128,6 U/mg
K_{mAcA}	8,05 M
K_{iAcA}	58,9 mM

Das Modell kann die experimentellen Daten zwar gut beschreiben, doch sind die kinetischen Parameter sehr stark voneinander abhängig, so daß viele Parameterpaare (v_{\max} , K_m) als Lösung berechnet werden können. Eine Anpassung der experimentellen Daten mittels Linearisierung führt nicht zu besseren Ergebnissen (Degenring, 2001).

Abbildung 33 zeigt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten der Carboligasereaktion der *PDC-2* von der Acetaldehydkonzentration. Die v/s -Graphiken der *PDC-1* und *PDC-2* unterscheiden sich kaum. Auch hier gelingt die Anpassung der experimentellen Daten am besten mit einem Modell für einen sequentiellen odered bi-bi Mechanismus mit Acetaldehydüberschußinhibierung (Abb. 33). Die Korrelation beträgt 0,99.

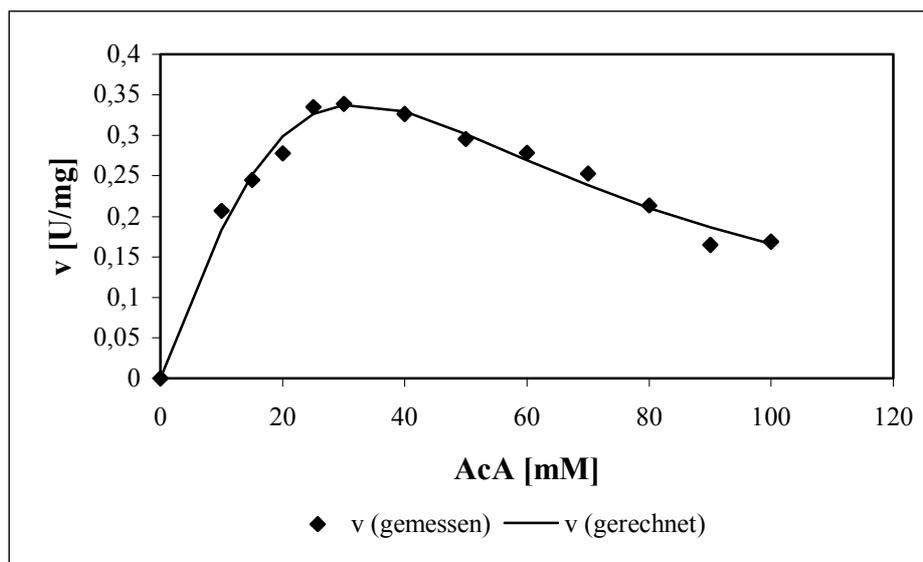


Abb. 33: Reaktionsgeschwindigkeiten der Carboligasereaktion der *PDC-2* in Abhängigkeit von der Acetaldehyd-(AcA)-Konzentration.

Berechnete Reaktionsgeschwindigkeiten wurden über einen Ordered Bi-Bi Mechanismus für eine Zweisubstrat-/Zweiproduktreaktion angepaßt (Softwareprogramm Scientist, MicroMath (Salt Lake City, USA)).

Bedingungen: 0,5 mg/ml aufgereinigte *PDC-2* (PDC-W392M-K553R-His₆); 30 mM Benzaldehyd; 50 mM KP_i, pH 6,5; 5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP; 10 % (v/v) Ethanol; Acetaldehyd variabel; 25°C

Die Anpassung mit dem Softwareprogramm Scientist ergibt für die *PDC-2* folgende kinetische Parameter:

v_{\max}	68,7 U/mg
K_{mAcA}	2,9 M
K_{iAcA}	200,2 mM

Die Probleme der Anpassung sind die gleichen wie bei der *PDC-1*. Man beobachtet aber eine Übereinstimmung der grundsätzlichen Tendenzen in dieser Untersuchung. Beide PDC-Muteine besitzen im Bereich von 30 bis 40 mM Acetaldehyd, d.h. im nahezu äquimolaren Konzentrationsbereich ihre höchste Carboligaseaktivität (Abb. 32, Abb. 33). Diese Ergebnisse korrelieren mit denen vorrangegangener Arbeiten (Goetz, 1999; Goetz *et al.*, 2001; Iwan *et al.*, 2001), bei denen die höchste Carboligaseaktivität im äquimolaren Substratbereich bei 30 mM Acetaldehyd und 30 mM Benzaldehyd beschrieben wurden. Die hier bestimmten Carboligaseaktivitäten liegen aufgrund des Ethanolzusatzes höher.

Im zweiten Teil der kinetischen Charakterisierung der Carboligasereaktion der PDC-Muteine wurden nun entsprechende Untersuchungen unter Variation der Benzaldehydkonzentration durchgeführt.

3.5.1.2 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Benzaldehydkonzentration

Durch den Einsatz von 10 % Ethanol kann die gelöste Benzaldehydkonzentration gegenüber der im wässrigen Puffer (ca. 35 mM) auf ca. 60 mM erhöht werden. Abbildung 34 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung für die *PDC-1*. Die Anpassung der experimentellen Daten gelingt mit einer Korrelation von 0,99 mit einem einfachen Michaelis-Menten Modell. Trotz Ethanol Zusatz wird die maximale Reaktionsgeschwindigkeit nicht erreicht und daher kann auch kein realistischer K_m -Wert bestimmt werden (Abb. 34). Die erreichten Reaktionsgeschwindigkeiten liegen aufgrund der erhöhten Löslichkeit des Benzaldehydes um den Faktor 2 höher als in den vorangegangenen Arbeiten (Goetz, 1999; Goetz *et al.*, 2001; Iwan *et al.*, 2001).

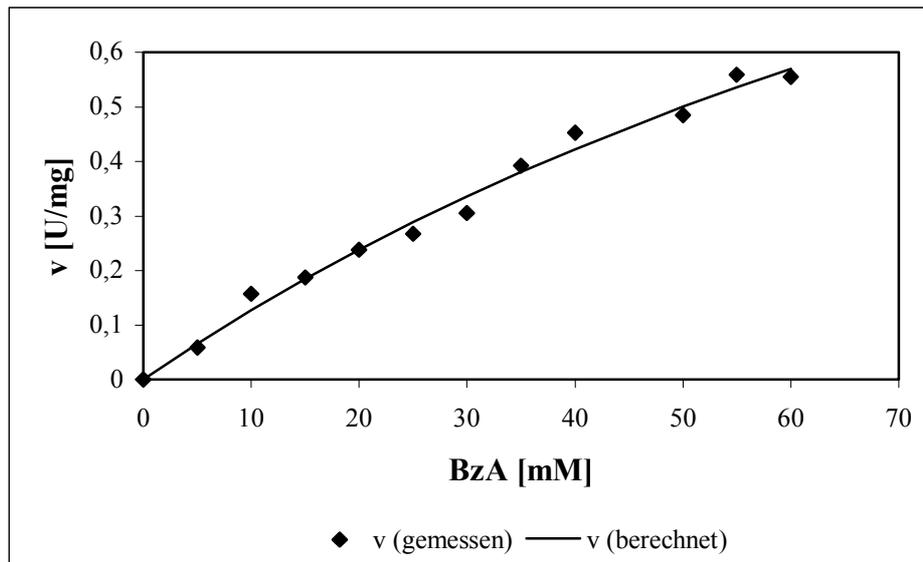


Abb. 34: Reaktionsgeschwindigkeiten der Carboligasereaktion der *PDC-1* in Abhängigkeit von der Benzaldehyd (BzA)-Konzentration.

Berechnete Reaktionsgeschwindigkeiten wurden über eine einfache Michaelis-Menten-Kinetik angepaßt. (Softwareprogramm Scientist, MicroMath (Salt Lake City, USA)).

Bedingungen: 0,5 mg/ml aufgereinigte *PDC-1* (PDC-W392M-His₆); 40 mM Acetaldehyd; 50 mM KP_i, pH 6,5; 5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP; 10 % (v/v) Ethanol; Benzaldehyd variabel; 25°C

Die Anpassung mit dem Softwareprogramm Scientist ergibt für die *PDC-1* folgende kinetische Parameter:

$$\begin{array}{ll} v_{\max} & 1,9 \text{ U/mg} \\ K_{\text{mMBzA}} & 137,6 \text{ mM} \end{array}$$

Für die *PDC-2* ergibt sich eine ähnliche Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Carboligasereaktion von der Benzaldehydkonzentration (Abb. 35). Auch hier gelingt die Anpassung der experimentellen Daten mit einem einfachen Michaelis-Menten Modell mit einer Korrelation von 0,97 am besten.

Die Anpassung mit dem Softwareprogramm Scientist ergibt für die *PDC-2* folgende kinetische Parameter:

$$\begin{array}{ll} v_{\max} & 1,2 \text{ U/mg} \\ K_{\text{mMBzA}} & 76 \text{ mM} \end{array}$$

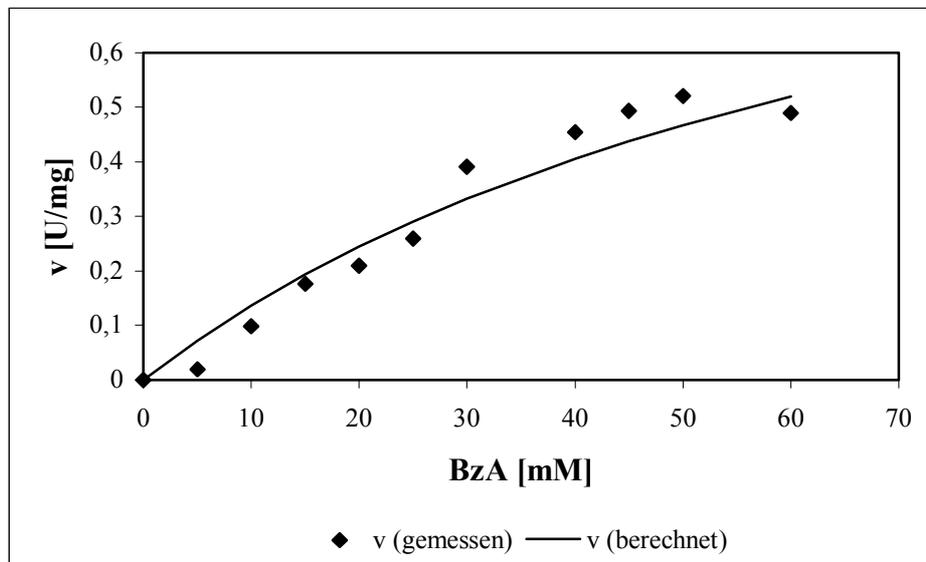


Abb. 35: Reaktionsgeschwindigkeiten der Carboligasereaktion der *PDC-2* in Abhängigkeit von der Benzaldehyd (BzA)-Konzentration.

Berechnete Reaktionsgeschwindigkeiten wurden über eine einfache Michaelis-Menten-Kinetik angepaßt. (Softwareprogramm Scientist, MicroMath (Salt Lake City, USA)).

Bedingungen: 0,5 mg/ml aufgereinigte *PDC-2* (PDC-W392M-K553R-His₆); 40 mM Acetaldehyd; 50 mM KPi, pH 6,5; 5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP; 10 % (v/v) Ethanol; Benzaldehyd variabel; 25°C

Die beiden untersuchten PDC-Mutante unterscheiden sich in ihren kinetischen Eigenschaften kaum.

Es wurde in einer weiteren Untersuchung mit der *PDC-1* überprüft, ob die erhöhte Benzaldehydlöslichkeit einen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeiten in höheren äquimolaren Konzentrationsbereichen hat (Abb. 36). Es zeigt sich, daß bei einer äquimolaren Konzentration von 40 mM Acetaldehyd und 40 mM Benzaldehyd die höchste Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt wird. Höhere Substratkonzentrationen wirken vermutlich inaktivierend auf die *PDC-1* (Abb. 36).

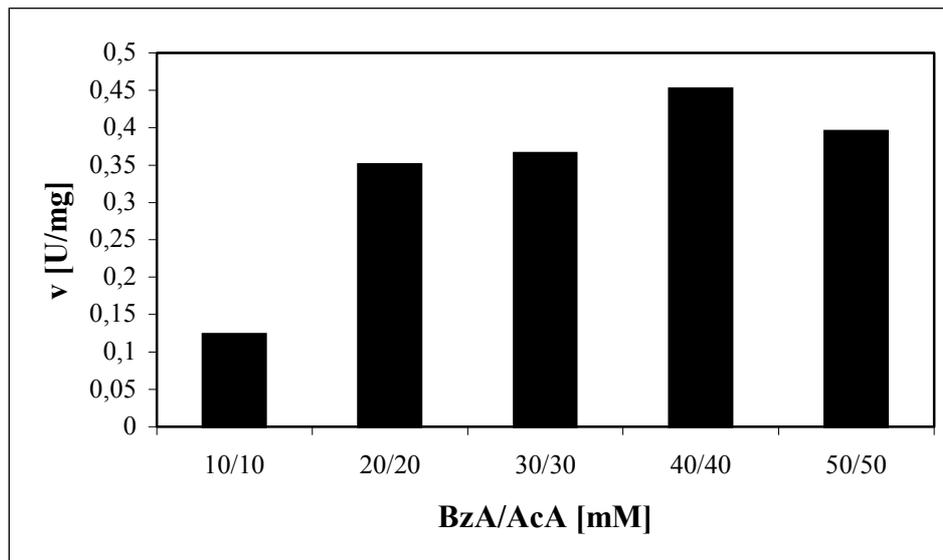


Abb. 36: Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten der Carboligasereaktion der *PDC-1* im äquimolaren Konzentrationsbereich von Acetaldehyd und Benzaldehyd.

Bedingungen: 0,5 mg/ml aufgereinigte *PDC-1* (PDC-W392M-His₆); Acetaldehyd und Benzaldehyd im äquimolaren Konzentrationen; 50 mM KP_i, pH 6,5; 5 mM MgSO₄, 0,1 mM ThDP; 10 % (v/v) Ethanol; 25°C

Der Einsatz von 10 % Ethanol verschiebt den äquimolaren Substratkonzentrationsbereich in den Bereich von 40 mM Substrat im Vergleich zu den Ergebnissen von Goetz (1999). Aus den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wird aber ersichtlich, daß eine darüberhinausgehende Substratkonzentrationen zu einer Inaktivierung der PDC-Mutante führen.

In einem kontinuierlich betriebenen Reaktor (z. B.: CTSR) können die Substratkonzentrationen im Zulauf wesentlich höher sein als die Konzentrationen im steady-state, weil die ja über den Umsatz der Edukte eingestellt wird. Nach den Ergebnissen dieser Untersuchungen darf eine Konzentration von 40 mM im Reaktor nicht überschritten werden.

3.6 Reaktions- und verfahrenstechnische Versuche zur kontinuierlichen enzymatischen (*R*)-PAC-Synthese in Membranreaktoren mit PDC-Muteinen

Ziel dieser Arbeit war es auch, eine kontinuierliche enzymatische (*R*)-PAC in einem Membranreaktorsystem zu etablieren. Damit sollten erste Ergebnisse aus vorangegangenen Arbeiten (Iwan, 1997; Goetz, 1999) weiter optimiert werden. Abbildung 37 zeigt die beiden unterschiedlichen Membranreaktorkonzepte, die zur Wahl standen. Bei diesen Reaktorkonzepten steht die optimale Ausnutzung des Biokatalysators durch Enzymrückhaltung im Vordergrund.

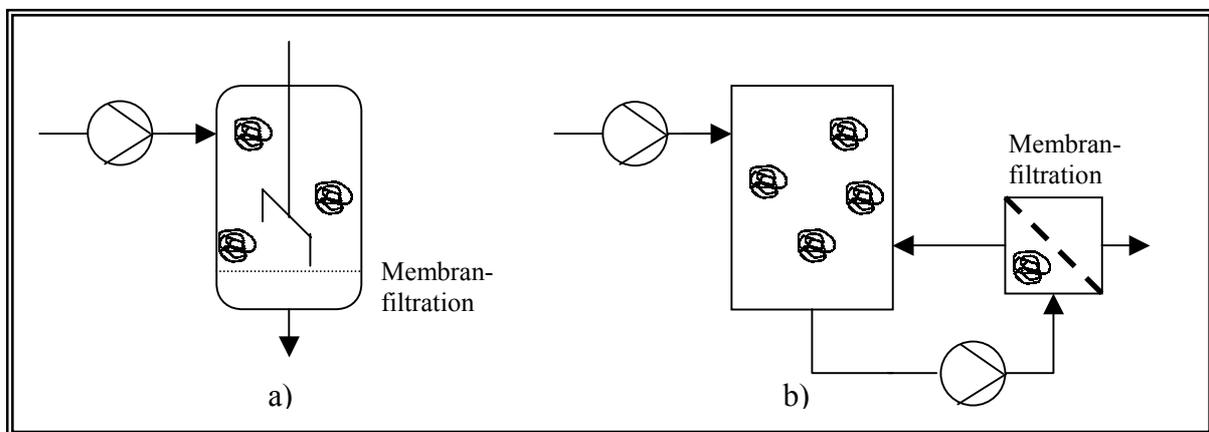


Abb. 37: Unterschiedliche Konzepte von Membranreaktoren

Bei einfachen Laborreaktoren (a), wie dem Enzymmembranreaktor ist die Membran direkt in den Reaktionsraum integriert. Im allgemeinen wird eine Flachmembran eingesetzt. Bei der zweiten Reaktorform sind Reaktions- und Filtrationsraum getrennt (b).

3.6.1 Enzymmembranreaktor (gemeinsamer Reaktions- und Filtrationsraum)

Bei dem Enzymmembranreaktor (EMR) wird die beschriebene Technik der Membranfiltration zur Rückhaltung von Enzymen, die als lösliche Biokatalysatoren zum Einsatz kommen, genutzt (Kragl, 1996) (Abb. 37a).

In dieser Arbeit wurde ein kontinuierlicher Enzymmembranreaktor entsprechend des Patents von Kragl *et al.* (1991) verwendet. Bei diesem Membranreaktor sind Reaktions- und Filtrationsraum nicht getrennt. Der verwendete EMR hat ein Volumen von 10 ml und besteht aus Polyetheretherketon (PEEK). Dieses Material verhindert im Gegensatz zu Polypropylen (PP) die Absorption von Benzaldehyd (Iwan, 1997). Aus demselben Grund wurden auch PEEK-Kapillaren verwendet. Darüber hinaus wurden für das Reaktorsystem die von Iwan (1997) und Goetz (1999) beschriebenen Komponenten eingesetzt.

Es wurde untersucht, ob die in den Standstabilitätstests und Batchsynthesen ermittelten Eigenschaften der PDC-Muteine auch bei kontinuierlicher Betriebsführung gültig sind.

3.6.1.1 Kontinuierliche (R)-PAC Synthese im Enzymmembranreaktor (EMR)

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die Reaktionsbedingungen an die von Goetz (1999) angeglichen. Es wurden die PDC-Muteine *PDC-1* und *PDC-2* als Rohextraktcharge mit einem Proteingehalt von 1 mg/ml Reaktorvolumen bei Substratkonzentrationen von 30 mM Acetaldehyd und 30 mM Benzaldehyd in 50 mM KP_i -Puffer, pH 6,5, mit Cofaktoren eingesetzt. Es wurde schwach gerührt (30 rpm), um eine tangentiale Strömung über der Membran zu erzeugen, damit das Prinzip der Crossflowfiltration gewährleistet war.

Zunächst wurde das PDC-Mutein *PDC-1* als Rohextraktcharge (*PDC-1-RE*) mit einem Gesamtproteingehalt von 1 mg/ml Reaktorvolumen untersucht. Abbildung 38 zeigt den Verlauf der kontinuierlichen (*R*)-PAC Synthese im EMR. Nach fünf Verweilzeiten⁷ war das Gleichgewicht im EMR erreicht, danach sinkt die Syntheseleistung drastisch. Wird die Aktivität beim Erreichen des Gleichgewichtes als 100 % Aktivität gesetzt, verliert man in den nächsten 24 h über 77 % der Carboligaseaktivität (Abb. 38). Die *PDC-2* auch als Rohextraktcharge (*PDC-2-RE*) verhält sich entsprechend. Die Deaktivierungsrate liegt für beide Enzyme bei ca. $3 \text{ \%}\cdot\text{h}^{-1}$. Die Deaktivierungsraten der PDC-Muteine im EMR ist bei diesen Untersuchungen etwa 4-fach höher als die in einer vorangegangenen Arbeit bestimmten Deaktivierung der *PDC-1-RE* im EMR unter denselben Reaktionsbedingungen (Goetz, 1999).

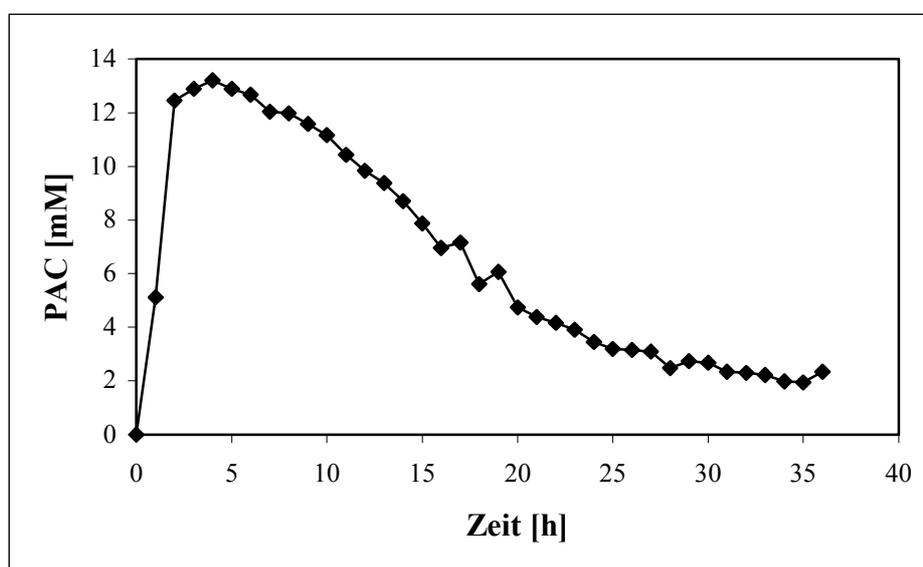


Abb. 38: Kontinuierliche enzymatische (*R*)-PAC Synthese mit der *PDC-1-RE* im EMR.

Reaktorvolumen 10 ml; Proteingehalt: 1 mg/ml; 30 mM Acetaldehyd; 30 mM Benzaldehyd; 50 mM KP_i , pH 6,5, mit Cofaktoren (5 mM MgSO_4 ; 0,1 mM ThDP); *PDC-1-RE* (*PDC-W392M-His*₆); RE = Rohextraktcharge; $\tau = 1$ h; Rührgeschwindigkeit 30 rpm.

⁷ Die mittlere Verweilzeit τ einer Reaktionslösung in einem Reaktorvolumen V wird definiert als der Quotient des Reaktorvolumens und der Flußgeschwindigkeit der Substratlösung durch den Reaktor

Die hier festgestellte höhere Deaktivierung beruht wahrscheinlich auf einer Summe unterschiedlicher Effekte. Der Haupteffekt wird durch das Rühren mit der Rührplatte im EMR verursacht, bei dem Scherkräfte entstehen und wahrscheinlich die PDC-Muteine deaktivieren. Um zu untersuchen, ob die Scherkräfte des Rührvorgangs einen Anteil an den Deaktivierungsvorgängen im EMR hat, wurde die gleiche Reaktion mit der *PDC-1-RE* im EMR ohne Rühren durchgeführt. Abbildung 39 zeigt den Vergleich der beiden unterschiedlichen Reaktionsansätze. Der nichtgerührte Reaktionsansatz erreicht auch nach 5 Verweilzeiten seinen Steady State, jedoch liegt die erzielte PAC-Konzentration mit ca. 10 mM 20 % unter der des gerührten Ansatzes. In den nächsten 24 h verliert die PDC 55 % ihrer Carboligaseaktivität, das entspricht einer Deaktivierungsrate von ca. $2,3 \text{ \%}\cdot\text{h}^{-1}$. Das Rühren macht also ca. ein Drittel des Aktivitätsverlustes im EMR aus. Da durch den Wegfall des Rührvorgangs eigentlich nur noch eine Dead-end-Filtration vorliegt und somit ein Verstopfen der Membran und somit eine weitere Deaktivierung der PDC-Muteine möglich ist, kann auch dieses Reaktionssystem nicht genutzt werden.

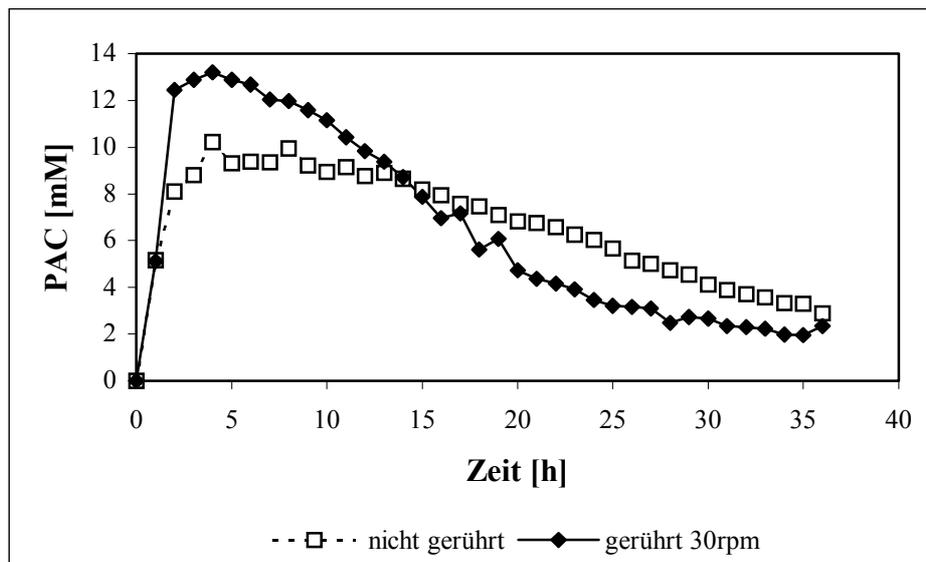


Abb. 39: Einfluß der Rührbewegung auf die kontinuierliche enzymatische (*R*)-PAC Synthese mit der *PDC-1-RE* im EMR.

Reaktorvolumen 10 ml; Proteingehalt: 1 mg/ml; 30 mM Acetaldehyd; 30 mM Benzaldehyd; 50 mM KPi , pH 6,5, mit Cofaktoren (5 mM MgSO_4 ; 0,1 mM ThDP); *PDC-1* (*PDC-W392M-His₆*); RE = Rohextraktcharge; $\tau = 1$ h; Rührgeschwindigkeit: 30 rpm oder nicht gerührt.

3.6.2.1 Kontinuierliche enzymatische (*R*)-PAC Synthese

Als erstes wurde die kontinuierliche enzymatische (*R*)-PAC Synthese unter den von Goetz (1999) beschriebenen Reaktionsbedingungen mit diesem Membranreaktorkonzept verfolgt. Es wurden beide PDC-Muteine, d. h. *PDC-1* und *PDC-2* als Rohextraktchargen eingesetzt. Die Substratlösung enthielt 30 mM Acetaldehyd und 30 mM Benzaldehyd sowie den 50 mM KPi -Puffer, pH 6,5 mit Cofaktoren (5 mM MgSO_4 ; 0,1 mM ThDP). Die mittlere Verweilzeit betrug $\tau = 4$ h. Abbildung 41 zeigt den Syntheseverlauf mit beiden PDC-Muteinen. Die kontinuierliche (*R*)-PAC-Synthese in diesem Reaktorsystem verläuft bei beiden PDC-Muteinen nach Erreichen des Gleichgewichts im System ohne starke Deaktivierung der Enzyme. Die *PDC-1* verliert nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes in der fünften Reaktionsstunde ca. 15 % Carboligaseaktivität während der nächsten 24 h, bei der *PDC-2* geht in diesem Reaktionszeitraum ca. 17 % Carboligaseaktivität verloren. Das entspricht einer Deaktivierungsrate von 0,6 % h^{-1} für die *PDC-1* und 0,7 % h^{-1} für die *PDC-2*. Die *PDC-1* produziert im Durchschnitt 12 mM (*R*)-PAC und die *PDC-2* 11 mM (*R*)-PAC (Abb. 41).

Aus diesen Daten läßt sich die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) bestimmen (Liese, 1998):

$$RZA = \frac{\eta \cdot [S_0] \cdot MG}{\tau}$$

RZA	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	Raum-Zeit-Ausbeute
η		Ausbeute
$[S_0]$	$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Substratkonzentration zum Zeitpunkt $t = 0$ (hier: 30 mM)
MG	$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	Molgewicht ((<i>R</i>)-PAC = 150)
τ	d	Verweilzeit (hier: $\tau = 0,167$)

Daraus ergibt sich eine Raum-Zeit-Ausbeute von 10,8 g (*R*)-PAC pro Liter Reaktorvolumen und Tag bei der *PDC-1* und 9,9 g (*R*)-PAC ($\text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) bei der *PDC-2*. Mit diesem Reaktorkonzept ist ein kontinuierliches Reaktionssystem gefunden worden, das eine deutlich geringe Deaktivierung der PDC-Muteine bewirkt und für die kontinuierliche Betriebsführung geeigneter ist, als der EMR mit gemeinsamen Reaktions- und Filtrationsraum.

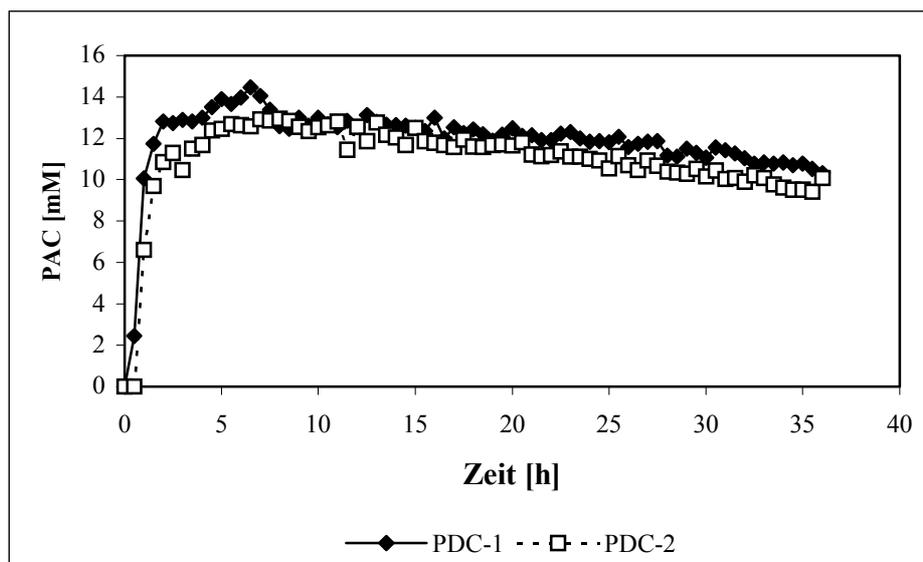


Abb. 41: Kontinuierliche enzymatische (*R*)-PAC Synthese mit der *PDC-1-RE* oder *PDC-2-RE* im Membranreaktorsystem mit getrenntem Reaktions- und Filtrationsraum.

Reaktionsvolumen 80 ml; Proteingehalt: 1 mg/ml; 30 mM Acetaldehyd; 30 mM Benzaldehyd; 50 mM KP_i , pH 6,5, mit Cofaktoren (5 mM $MgSO_4$; 0,1 mM ThDP); *PDC-1* (*PDC-W392M-His₆*); *PDC-2* (*PDC-W392M-K553R-His₆*) RE = Rohextraktcharge; $\tau = 4$ h.

Zur weiteren Optimierung der kontinuierlichen Reaktionsführung werden Reaktorläufe mit Ethanolzusatz in der Substratlösung durchgeführt.

3.6.2.2 Kontinuierliche enzymatische (*R*)-PAC Synthese mit Ethanolzusatz

Da ein Ethanolzusatz von 10 % (v/v) zu der höchsten spezifischen Carboligaseaktivität der untersuchten PDC-Mutante im äquimolaren Substratbereich bei 40 mM Substrat führte, wurde eine kontinuierliche (*R*)-PAC Synthese mit Ethanolzusatz in dem oben entwickelten Reaktorsystem durchgeführt. Die Substratkonzentrationen betragen 40 mM Benzaldehyd und 40 mM Acetaldehyd. Es wurde die *PDC-2* als Rohextraktcharge mit einem Proteingehalt von 1 mg/ml Reaktorvolumen eingesetzt.

Abb. 42 beschreibt den Verlauf dieser kontinuierlichen Synthese. Bereits nach einer Verweilzeit (4 h) ist das System im Gleichgewicht. Die (*R*)-PAC-Konzentration im Auslauf des Reaktorsystems beträgt 22 mM, d. h. die Substratkonzentration im steady state beträgt 18 mM. Das System bleibt über 15 h stabil und anschließend geht der Umsatz mit einer Deaktivierungsrate von $1,2 \% h^{-1}$ zurück.

Im Mittel werden 18,5 mM (*R*)-PAC produziert, das entspricht einer RZA von 16,6 g (*R*)-PAC L⁻¹·d⁻¹. Der Einsatz von Ethanol steigert die RZA in diesem Reaktorsystem deutlich, die Deaktivierungsrate steigt aber durch den deaktivierenden Einfluß des Ethanols oder der Substrate Acetaldehyd und Benzaldehyd im Verlauf der kontinuierlichen Synthese.

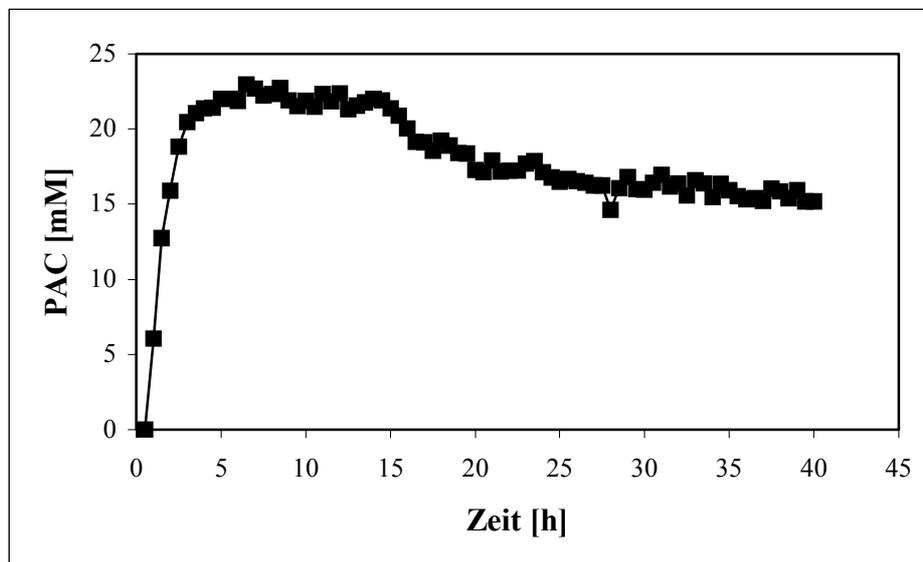


Abb. 42: Kontinuierliche enzymatische (*R*)-PAC Synthese mit der *PDC-2-RE* im Membranreaktorsystem mit getrenntem Reaktions- und Filtrationsraum mit 10 % (v/v) Ethanol.

Reaktionsvolumen 80 ml; Proteingehalt: 1 mg/ml; 10% (v/v) Ethanol; 40 mM Acetaldehyd; 40 mM Benzaldehyd; 50 mM KP_i, pH 6,5, mit Cofaktoren (5 mM MgSO₄; 0,1 mM ThDP); *PDC-2* (*PDC-W392M-K553R-His₆*); $\tau = 4$ h

Die RZA dieses Reaktorsystems konnte durch den Einsatz von 10 % (v/v) Ethanol im äquimolaren Substratkonzentrationsbereich gesteigert werden. In der Literatur sind ähnliche kontinuierliche Prozesse beschrieben (Goetz *et al.*, 2001; Iwan *et al.*, 2001), bei denen höhere RZA erzielt werden. Goetz (2001) erreichte im EMR bei einer Verweilzeit von 1 h und einem Proteingehalt von 3 mg/ml *PDC-1* (Rohextraktcharge) ausgehend von 50 mM Acetaldehyd, 50 mM Benzaldehyd bei 27°C eine RZA von 81 g·L⁻¹·d⁻¹. Iwan (2001) erreichte mit 0,4 mg/ml aufgereinigter *PDC-W392I-His₆* bei einer Verweilzeit von 1 h im EMR ausgehend von 90 mM Pyruvat und 30 mM Benzaldehyd bei 25°C eine RZA von 27,4 g·L⁻¹·d⁻¹. Der Substratumsatz ist in dem in dieser Arbeit beschriebenen Reaktionssystem mit 55 % bezogen auf Benzaldehyd erhöht worden. Goetz *et al.* (2001) erzielten 45 % und Iwan *et al.* (2001) nur 25 % Umsatz.

Die Verweilzeit im Reaktorsystem mit getrenntem Reaktions- und Filtrationsraum ist mit 4 h sehr lange. Aus technischen Gründen konnte die Verweilzeit in dieser Arbeit nicht optimiert werden.

Eine Optimierung der Verweilzeit zusammen mit der Enzymkonzentration könnte zu höheren Raumzeitausbeuten dieses Systems führen. Folgende Gleichung beschreibt den Zusammenhang von Verweilzeit, Substratkonzentration, Reaktionsgeschwindigkeit (Enzymaktivität) und dem Reaktionsumsatz (Liese *et al.*, 2000).

$$\tau = [S]_0 \cdot \frac{1}{v} \cdot dX$$

τ : Verweilzeit

v : Reaktionsgeschwindigkeit (Enzymaktivität)

dX : Umsatz

$[S]_0$: Substratanfangskonzentration

Beim Reaktionsansatz mit 10 % Ethanolzusatz und äquimolaren Substratkonzentrationen von 40 mM wird ein Umsatz von 55 % bezogen auf Benzaldehyd erzielt, im steady state liegen im Reaktionssystem 18 mM Substrat vor. Mit höheren Substratkonzentrationen und ähnlichen Umsätzen könnte man das Reaktionssystem so einstellen, daß 30 mM bis 40 mM Substrat im steady state dem Enzym im Reaktor zur Verfügung stehen und somit die Raumzeitausbeute erhöhen.

4. Zusammenfassende Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die enzymatische Synthese von (*R*)-Phenylacetylcarbinol ((*R*)-PAC) mit Muteinen der Pyruvatdecarboxylase (PDC) aus *Zymomonas mobilis* untersucht und charakterisiert.

Dabei sollte unter anderem geprüft werden, ob die enzymatische Synthese von (*R*)-PAC, alternativ zu den in der Literatur beschriebenen Verfahren, auf Basis der Pyruvatdecarboxylase aus *Z.mobilis* (Bruhn *et al.*, 1996; Iwan, 1997; Goetz, 1999; Goetz *et al.*, 2001; Iwan *et al.*, 2001), auch unter ökonomischen Gesichtspunkten optimiert werden kann.

Folgende Fragestellungen standen dabei im Vordergrund:

- Charakterisierung der enzymatischen Reaktionen der Pyruvatdecarboxylase hinsichtlich pH-Wert, Reaktionspuffer und Temperatur
- Untersuchung und Charakterisierung neuer Mutanten der Pyruvatdecarboxylase aus *Z.mobilis* hinsichtlich ihres Synthese- und Reaktionspotentials sowie ihrer Stabilitätseigenschaften unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen

Zu Beginn dieser Arbeit stand das PDC-Mutein PDC-W392M als Enzym mit (*PDC-1*) oder ohne (*PDC-0*) C-terminalen Hexahistidintag zur Verfügung. Mit diesen PDC-Muteinen wurde eine Optimierung des Reaktionspuffers untersucht.

Zunächst wurde das pH-Optimum der Carboligasereaktion bestimmt, und festgestellt, daß das Stabilitätsoptimum der PDC und des Carboligaseprodukts (*R*)-PAC, im Bereich des pH-Aktivitätsoptimums der Carboligasereaktion der PDC bei pH 6,5 liegt. Es wurde untersucht, ob anstelle des im Laborbetrieb eingesetzten VE- (voll entsalztes) Wassers, preiswertere Wasserqualitäten (z. B. Leitungswasser) verwendet werden können. Hier zeigte sich, daß die Halbwertszeit von $t_{1/2} \gg 100$ h (Sprenger & Pohl, 1999) in KP_i -Puffer aus VE-Wasser auf 7 h in KP_i -Puffer aus Leitungswasser sinkt. Der starke Aktivitätsverlust konnte auf eine Empfindlichkeit der PDC-Muteine gegenüber Cu(II) im Leitungswasser zurückgeführt werden (Abb. 20).

Die Vermutung, der His-Tag des PDC-Muteins sei ursächlich für diese Cu(II)-Empfindlichkeit wurde nicht bestätigt. Diese Cu(II)-Empfindlichkeit konnte durch hohe Fremdproteinkonzentrationen im Inkubationsansatz deutlich reduziert werden. Der Gesamtproteingehalt bei enzymatischen (*R*)-PAC Ansätzen sollte in einem Bereich von 0,5 bis 1 mg/ml liegen. Dies ist bei der Verwendung von Rohextraktchargen üblicherweise gewährleistet. Damit verlängert sich die Halbwertszeit von < 25 h auf >> 50 h.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein neues PDC-Mutein (PDC-W392M-K553R-His₆) in parallelaufenden Arbeiten entwickelt⁸. Die PDC-W392M-K553R-His₆ (*PDC-2*) enthält im Vergleich zur *PDC-1* (PDC-W392M-His₆) einen zusätzlichen Aminosäureaustausch an der Position 553. Diese Position wurde bei Inkubationsversuchen mit Acetaldehyd als empfindlich bezüglich der kovalenten Modifizierung der ε -Aminogruppe des Lysins 553 identifiziert (Breuer, 1998). Computergrafische Untersuchungen stützen die Vermutung, daß aufgrund der Position der Aminosäure 553 die Enzymaktivität durch Bildung einer Schiffschens Base an dieser Stelle beeinträchtigt wird⁹. Die Untersuchungen in dieser Arbeit sollten zeigen, ob aus den artifiziellen Untersuchungen zur Deaktivierung in Gegenwart von Acetaldehyd bei 4°C auf die Stabilität des Muteins unter Synthesebedingungen geschlossen werden kann.

Die beiden PDC-Muteine *PDC-1* (PDC-W392M-His₆) und *PDC-2* (PDC-W392M-K553R-His₆) wurden hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber den als Substraten eingesetzten Aldehyden (Acetaldehyd und Benzaldehyd) und ihrer Carboligaseaktivität vergleichend untersucht.

Bei der Untersuchung der Stabilität gegenüber Acetaldehyd bei 4°C wurde für die *PDC-1* unter den vorliegenden Reaktionsbedingungen eine Halbwertszeit von ca. 70 min bestimmt und für die *PDC-2* eine Halbwertszeit von > 280 min, wodurch die Resultate von Breuer (1998) bestätigt wurden. Die *PDC-2* scheint aufgrund ihrer zusätzlichen Mutation stabiler als die *PDC-1* gegenüber Acetaldehyd zu sein.

Bei der Untersuchung der Stabilität gegenüber Benzaldehyd konnte kein positiver Einfluß des zusätzlichen Aminosäureaustausches festgestellt werden. Die PDC-Muteine zeigten bei einer Inkubation von 1 mg/ml aufgereinigtem Enzym mit 35 mM Benzaldehyd Halbwertszeiten von 17 h für die *PDC-1* und nur 3 h für die *PDC-2*. Diese konnten durch Einsatz von 1 mg/ml Rohextrakt für beide PDC-Muteine auf >49 h erhöht werden. Höhere Fremdproteinkonzentrationen schützen die PDC-Muteine also auch gegenüber der Inaktivierung durch Benzaldehyd.

⁸ Die Untersuchungen wurden von Dr. M. Breuer, BASF AG, Ludwigshafen durchgeführt.

⁹ Die computergrafischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. J. Grötzinger am Inst. für Biochemie der RWTH Aachen durchgeführt.

Beim Vergleich der spezifischen Carboligaseaktivitäten der beiden PDC-Muteine zeigte sich, daß sie sich unter den gewählten Reaktionsbedingungen nicht signifikant unterscheiden. Der Einsatz von 10 % (v/v) Ethanol im Reaktionsansatz bei gleichen Substratkonzentrationen führte in beiden Fällen zu einer Verdopplung der spezifischen Carboligaseaktivität.

Auch die kinetischen Daten der Carboligasereaktion unter Einfluß des 10%-igen Ethanolzusatzes sind bei beiden PDC-Muteine vergleichbar. Beide besitzen im äquimolaren Substratbereich von Acetaldehyd und Benzaldehyd bei 30 mM bis 40 mM ein Aktivitätsmaximum und zeigen gegenüber Acetaldehyd eine Substratinhibierung bei >40 mM.

In dieser Arbeit wurde ein neues Reaktorkonzept zur kontinuierlichen (*R*)-PAC Synthese als Alternative zu dem von Iwan (1997), Goetz (1999), Iwan *et al.* (2001) und Goetz *et al.* (2001) beschriebenen Reaktorsystem erprobt. Es wurde ein Reaktorkonzept angestrebt, bei dem der Biokatalysator durch eine Membran im Reaktor zurückgehalten wird, um so eine optimale Ausnutzung des Katalysators zu gewährleisten. In einem Enzymmembranreaktor mit gemeinsamen Reaktions- und Filtrationsraum sinkt die Carboligaseaktivität der PDC aus *Z.mobilis* aufgrund der durch Rühren verursachten Scherkräfte mit ca. 3 %·h⁻¹. Demgegenüber kann die Reaktionszeit in einem Reaktionssystem mit voneinander getrenntem Filtrations- und Reaktionsraum (Abb. 40) von <25 h beim EMR auf >>40 h erhöht werden.

Mit diesem Reaktorsystem konnte ausgehend von 30 mM Acetaldehyd, 30 mM Benzaldehyd und einem Proteingehalt von 1 mg/ml (\approx 0,2 mg/ml PDC) mit der *PDC-1* (Rohextraktcharge) und einer Verweilzeit von 4 h eine Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) von 0,45 g (*R*)-PAC L⁻¹·h⁻¹ und für die *PDC-2* (Rohextraktcharge) von 0,42 g (*R*)-PAC L⁻¹·h⁻¹ erzielt werden. Mit 10 % (v/v) Ethanol, 40 mM Acetaldehyd, 40 mM Benzaldehyd und einem Proteingehalt von 1 mg/ml der *PDC-2* (Rohextraktcharge) und einer Verweilzeit von 4 h kann die RZA auf 0,7 g (*R*)-PAC L⁻¹·h⁻¹ gesteigert werden. Unter Reaktionsbedingungen erwies sich die *PDC-2* insgesamt nicht stabiler im Vergleich zur *PDC-1*.

Diskontinuierliche enzymatische (*R*)-PAC-Synthesen im Batchverfahren mit aufgereinigter PDC aus unterschiedlichen Organismen werden von Neuser *et al.* (2000) und Shin & Rogers (1996) beschrieben. Tabelle 10 zeigt einen Vergleich enzymatischer (*R*)-PAC Synthesen aus der Literatur mit dem in dieser Arbeit beschriebenen kontinuierlichen Prozeß.

Tabelle 10 zeigt, daß das in dieser Arbeit beschriebene kontinuierliche Verfahren eine gute Alternative zu dem von Goetz *et al.* (2001) und Iwan *et al.* (2001) beschriebenen kontinuierlichen Verfahren im EMR bietet. Mit dem hier vorgestellten Reaktionssystem mit getrennten Reaktions- und Filtrationsraum kann durch Reduktion der Scherkräfte, die das Enzym inaktivieren, die Deaktivierungsrate gesenkt werden und damit die Betriebsdauer des Systems deutlich verlängert werden. Der Umsatz, sowie die PDC-spezifische Produktivität konnte deutlich vergrößert werden. Der Einsatz von Ethanol verbessert die Löslichkeit des Benzaldehyds und erleichtert zudem die Aufarbeitung des Reaktionsproduktes und die Weiterverarbeitung in einer chemischen Synthese während die Stabilität des Enzyms nicht beeinträchtigt wird. In dem verwendeten enzymatischem Reaktionssystem fallen außer dem Hauptprodukt (*R*)-PAC, nur geringe Mengen an Acetoin und die nicht umgesetzten Substrate an. Aus technischen Gründen konnte die Verweilzeit in dieser Arbeit nicht optimiert werden. Durch eine Optimierung der Verweilzeit zusammen mit der Enzymkonzentration könnte man bei einem Einsatz von höheren äquimolaren Substratkonzentrationen (z.B. 60 mM) das System so einstellen, daß im steady state eine äquimolare Substratkonzentration von 30 mM bis 40 mM im Reaktor vorliegt und somit die RZA und die Reaktionsgeschwindigkeit erhöhen.

Iwan *et al.* (2001) im kontinuierlichen EMR, sowie Shin & Rogers (1996) in ihrer Batch-Synthese, setzen Pyruvat und Benzaldehyd für ihre (*R*)-PAC Darstellung ein. Der Einsatz von Pyruvat, das um den Faktor 4 teurer ist als der von Goetz *et al.* (2001) und in dieser Arbeit verwendete Acetaldehyd (Sigma, 2000), ist aus ökonomischer Sicht nicht sinnvoll. Der Umsatz und die RZA ist bei der Batch Synthese von Shin und Rogers (1996) mit partiell gereinigter PDC aus *Candida utilis* ausgehend von Benzaldehyd und Pyruvat am höchsten; die hohe Deaktivierungsrate des Enzyms, die tiefe Reaktionstemperatur und die kurze Reaktionszeit werten dieses Verfahren aus ökonomischer Sicht aber ab. Unter den eingestellten Reaktionsbedingungen wird eine drastische Aktivitätsabnahme von 80 % innerhalb der Reaktionszeit hingenommen. Das in dieser Arbeit eingesetzte Verfahren erlaubt eine kontinuierliche (*R*)-PAC Synthese über einen großen Zeitraum und zeigt den größten Reaktionsumsatz.

Tab. 10: Vergleich enzymatischer (*R*)-PAC Synthesen aus der Literatur mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren

Referenz	Verfahren	PDC-Konz.	T [°C]	Deaktivierungsrate [%·h ⁻¹]	Laufzeit [h]	Umsatz BzA [%]	RZA [g (<i>R</i>)-PAC L ⁻¹ ·h ⁻¹]	PDC-spezifische Produktivität [g (<i>R</i>)-PAC mg ⁻¹ PDC L ⁻¹ ·h ⁻¹]
diese Arbeit	Konti. Memb.-Reak.	1 mg/ml PDC-RE ≈ 0,2 mg/ml PDC	25	0,6	>45	55	0,7	3,5
Goetz <i>et al.</i> , 2001	Konti. EMR	3 mg/ml PDC-RE ≈ 0,6 mg/ml PDC	27	0,8	40	45	1,2	2
Iwan <i>et al.</i> , 2001	Konti. EMR	0,4 mg/ml isol. PDC	25	0,8	18	25	1,1	2,75
Shin & Rogers, 1996	Batch	1,8 mg/ml isol. PDC	4	10	8	95	3,5	1,9

5. Material

5.1 Chemikalien

Jede Handhabung der Enzyme im Rahmen dieser Arbeit wurde, wenn nicht anders angegeben, in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -(KP_i)-Puffer durchgeführt, der 5 mM MgSO_4 und 0,1 mM ThDP enthält. Der Puffer war auf pH 6,5 eingestellt.

Soweit nicht anders angegeben wurden Lösungsmittel und Chemikalien in gewerblich erhältlichen p.a. Qualitäten verwendet.

Acetonitril, HPLC-grade	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer/NL
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt, D
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen, D
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bacto-Yeast-extract	Difco, Detroit, USA
Benzaldehyd	Merck, Darmstadt, D
Chloroform	Roth, Karlsruhe, D
Cobaltchlorid	Fluka, Neu-Ulm, D
Coccarboxylase Tetrahydrat (ThDP)	Fluka, Neu-Ulm, D
Coomassie-Brilliant-Blue G250	Fluka, Buchs, Schweiz
Eisensulfat	Fluka, Neu-Ulm, D
Ethanol, reinst	Roth, Karlsruhe, D
Imidazol	Fluka, Neu-Ulm, D
Isohexan	Roth, Karlsruhe, D
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D
1-Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid	Serva, Heidelberg; D
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt, D

Mangansulfat	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt, D
Methanol	Roth, Karlsruhe, D
NADH	Boehringer, Mannheim, D
Natriumazid	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
Natriumnitrat	Merck, Darmstadt, D
Neomycin	Serva, Heidelberg, D
Nickelchlorid	Merck, Darmstadt, D
Polyethylenglycol 4000	Fluka, Buchs, Schweiz
Pyruvat (Natriumsalz)	Fluka, Buchs, Schweiz
2,3,4-Triphenyl-2H-Tetrazoliumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Zinksulfat	Fluka, Buchs, Schweiz

5.2 Enzyme

ADH aus Hefe (10 U/ μ l)	Boehringer-Roche, Mannheim, D
PDC-W392M-(His) ₆	K.Mesch, IET, HHU Düsseldorf, D
PDC-W392M ohne His ₆ -tag	BASF AG, Ludwigshafen, D
PDC-W392M-K553R-(His) ₆	BASF AG, Ludwigshafen, D

5.3 Chromatographie- und Filtermaterial

Micron/Amicon YM10 und YM 30	Amicon-Millipore, Eschborn, D
Sterilfilter Minisart N, 0,45µm und 0,2µm	Satorius, Göttingen, D
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden, D
Sephadex G25	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Q-Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Butyl Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
CC 125/4 Spherisorb 80-5 C8	Macherey-Nagel, Düren, D
Chiracel OD	Fa. Daicel/Vertrieb: Mallinckrodt Baker B.V., Deventer/NL
Hypersil ODS 5µ C18-HPLC-Säule (250 mm x 4,6 mm)	Chromatographie Service; Langerwehe, D
GC-Kapillarsäule Lipodex E, 25 m	Shimadzu, Düsseldorf, D
<u>Küvetten</u>	
Halbmikroküvetten (1 ml), Quarzglas	Hellma, Mühlheim/Baden, D
Plastikküvetten, 1,5 halbmikro PS	Plastibrand [®] , Brand GmbH, Wertheim, D

5.4 Geräte

FPLC:	Amersham Pharmacia Biotech FPLC Systems, Freiburg, D
UV/VIS-Spektroskopie:	DU 650 Photometer, Beckmann, Düsseldorf, D
Hochdruckflüssigkeitschromatographie:	reversed phase HPLC; Dionex/Gynkotheke, Germering, D
Gaschromatographie:	GC A9, Shimadzu, Düsseldorf, D

Lyophilisierung:	Lyovac GT3, Leybold Heraeus, Köln, D
Zellaufschluß:	Desintegrator S, IMA GmbH, Zeppelinheim, D
Zentrifugen:	Kühlzentrifugen Sorvall RV-5B; Du Ponts Instruments, Bad Homburg, D
Eppendor fzentrifuge:	Mikro 22R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D
Pumpe:	Gilson Minipuls 3; Abimed, Ratingen, D P1 Pumpe; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D 101 U, Watson-Marlow, Rommerskirchen, D
Eppendorf Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, D

Membranreaktoren

Enzymmembranreaktor (Cross-flow-Reaktor), Volumen 10 ml, aus Polypropylen (Kragl, U., Peters, J., Wandrey, C., Kula, M.-R., 1991)	
Patentschrift: DE 39 37 892 C2	Institut für Biotechnologie, FZ Jülich, D
Enzymmembranreaktor aus PEEK	Institut für Biotechnologie, FZ Jülich, D
Flachmembran YM10; YM 30 regn. Cell.	Amicon-Millipore, Eschborn, D
Millipore Pellikon XL PLCCC5 regn. Cell	Amicon-Millipore, Eschborn, D
UF-Membrankassettenmodul, 50 cm ²	
Reaktormembran, Typ: UF-PA-20H	Hoechst AG, Frankfurt, D
Reaktormembran, Typ: YM 10, YM 30	Amicon; Millipore, Eschborn; D
Blasenfalle mit Septum	FZ Jülich, D
Magnetrührer	Heidolph MR 2000, München, D
Fraktionssammler	Bio Rad, München, D

Druckabnehmer	VDO, Frankfurt, D
Kolbenhubpumpe P500	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
PEEK HPLC Kapillare (1/16'' AØ x 0,75 mm IØ)	Chromatographie Service, Langerwehe, D
Thermostat RM6 Lauda	Dr. Wobster GmbH, Lauda-Königshofen, D
Waage E5500S	Sartorius, Göttingen, D
Pumpe Watson Marlow 101U	Watson-Marlow, Rommerskirchen, D
Glasreaktorgefäß mit Temperiermantel und GL 18 Schraubanschlüssen (V=110ml)	FZ Jülich, D
Schläuche Tygon [®] SE 200 (1/4'' AØ x 1/16'' IØ)	Novodirect, Kehl/Rhein, D
Pumpe:	Gilson Minipuls 3; Abimed, Ratingen, D
Dosiermodul IP 65	Sartorius, Göttingen, D
Luer Tight Fitting System for 1/16''	Upchurch, Vertrieb: GAT, Berlin, D
Small Valve Ferrules	Upchurch, Vertrieb: GAT, Berlin, D
Flangeless Ferrules, ETFE	Upchurch, Vertrieb: GAT, Berlin, D
Flangeless Nuts M6, black PFA, Teflon	Upchurch, Vertrieb: GAT, Berlin, D

5.4 Software

Scientist	MicroMath, Salt Lake City, USA
-----------	--------------------------------

6. Methoden

6.1 Proteinchemische Methoden

6.1.1 Expression der PDC-W392M-Mutante und weiterer Mutanten

Die Pyruvatdecarboxylase wird rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt. Zur Expression wurden *E. coli*-Zellen (SG13009) mit den Plasmiden pREP4 und pPDC-W392M-(His)₆ oder den entsprechenden pPDC Plasmiden für die unterschiedlichen Mutanten der PDC verwendet. pREP4 trägt Gene für eine Neomycinresistenz und den lac-Repressor, pPDC-W392M-(His)₆ besitzt Gene für eine Ampicillinresistenz und die PDC-W392M-(His)₆ oder deren entsprechenden Mutanten. Die Expression steht unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren tac-Promotors.

Die Expressionskultur wurde jeweils im Verhältnis 60:1 mit einer Übernachtskultur (LB + Ampicillin/Neomycin) angeimpft. Nach Erreichen einer optischen Dichte von OD₆₀₀ 0,6-0,8 (ca. 2,5-3h; 37°C; 120 rpm) wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert (37°C; 120 rpm; ca. 21h). Die Antibiotikakonzentration in den verwendeten Medien betrug für Ampicillin 100 µg/ml und für Neomycin 25 µg/ml. Die Expressionskulturen wurden zur Zellernte 20 min bei 4°C bei 8000 rpm zentrifugiert (GS3 Rotor, Sorvall RC 5B). Das Zellpellet wurde bei -20°C gelagert.

LB-Medium: 1% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, pH 7,5

6.1.2 Zellaufschluß

Der Aufschluß der Zellen erfolgte mechanisch. Die Zellen wurden in der 1,5-fachen Volumenmenge 50 mM KP_i -Puffer, pH 6,5, aufgenommen und mit der 2,5-fachen Volumenmenge Glasperlen ($\text{\O} 0,3\text{mm}$) 30 min bei 4000 rpm und Eiskühlung mit einem Desintegrator S (IMA GmbH; Zeppelinheim) aufgeschlossen. Die Aufschlußsuspension wurde 30 min bei 4°C und 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Rückstand wurde im 2-fachen Volumen 50 mM KP_i -Puffer, pH 6,5, resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt.

6.1.3 Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie

Die Reinigung des Enzyms PDC-W392M-His₆ aus dem Rohextrakt erfolgte in zwei Schritten mittels immobilisierter Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC). Das verwendete Säulenmaterial war ein Ni²⁺-haltiger Chelatbildner (Ni-Nitrilotriessigsäure) (Qiagen, Hilden), an den Proteine mit einem (His)₆-Rest bevorzugt binden.

Die Säule wurde zunächst mit dem 2-3-fachen des Säulenvolumens mit 50 mM KP_i -Puffer, pH 7,0, ohne Cofaktoren äquilibriert und der Proteinrohextrakt aufgetragen. Der Äquilibrierungspuffer enthielt keine Cofaktoren, da das Imidazol, das zur Elution des Enzyms verwendet wird, die Cofaktoren ohnehin aus dem Enzym verdrängt. Waschen mit Äquilibrierungspuffer entfernte nichtbindende Proteine.

Im nächsten Waschschriff wurden mit 20 mM Imidazol-haltigem KP_i -Puffer (pH 7,0) schwach gebundene Proteine, also z.B. solche mit Zinkfingermotiv, von der Säule gewaschen.

Mit einer 250 mM Imidazol-haltigen KP_i -Lösung (pH 7,8) eluierte die bis dahin in der Koordinationssphäre des Metallions gebundene PDC-His₆. Die Detektion erfolgte UV-spektroskopisch bei 280 nm in der Durchflußküvette.

Verwendete Lösungen:

- 50 mM KP_i -Puffer ohne Cofaktoren, pH 7,0 (Äquilibrierungspuffer)
- 20 mM Imidazol in KP_i -Puffer, pH 7,0 (Waschpuffer)
- 250 mM Imidazol in KP_i -Puffer, pH 7,8 (Elutionspuffer)

Säulenvolumen: 18,5 ml

Flußrate: 2,5 ml/min

6.1.4 Anionenaustauschchromatographie

Als erster Reinigungsschritt für die PDC ohne His-tag wurde eine Anionenaustauschchromatographie auf einer Q-Sepharose-Fast Flow (\varnothing 2,6 cm x 7,5 cm) mit 5 ml/min durchgeführt. Die Reinigung entspricht dem bei Bruhn (1995a) vorgestellten Protokoll, allerdings wurde hier 10 mM KP_i , pH 6,5 mit 2 mM MgCl_2 und 0,1 mM ThDP anstelle von KMes-Puffer eingesetzt. Die Elution des gebundenen Proteins wurde durch einen linearen NaCl-Gradienten erreicht. Das PDC-Protein eluierte bei einer NaCl-Konzentration von 80 - 100 mM.

6.1.5 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die vereinigten Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie (Kap. 6.1.4) wurden auf einen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gehalt von 50% Sättigung durch Zugabe eines Volumens gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung eingestellt. Die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) wurde auf einer Butylsepharose Fast Flow (\varnothing 5 cm x 8 cm) mit einer Flußrate von 2 ml/min durchgeführt.

Das Material wurde vor dem Beladen mit Protein mit zu 40% gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung in 50 mM KP_i , pH 6,5 mit 2 mM MgCl_2 und 0,1 mM ThDP äquilibriert.

Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte durch einen fallenden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Gradienten. Das PDC-Protein eluierte bei ca. 20%.

6.1.6 Gelpermeationschromatographie

Die Eluate der immobilisierten Metallionenaffinitätschromatographie (Kap.6.1.3) oder der hydrophoben Interaktionschromatographie (Kap.6.1.5) wurden umgepuffert und dann lyophilisiert. Hierzu mußte das Imidazol entfernt werden, das in der aus der IMAC erhaltenen PDC-Fraktion enthalten war. Die Umpufferung erfolgte mittels Gelfiltration. Als Matrix wurde vernetztes Dextran verwendet (Sephadex G25, Pharmacia, Freiburg). Die aus der immobilisierten Metallionenaffinitätschromatographie erhaltene PDC-Fraktion (Kap.6.1.3) oder die PDC-Fraktion aus der hydrophoben Interaktionschromatographie (Kap.6.1.5) wurden hier aufgetragen und mit 10 mM KP_i -Puffer, pH 6,5 mit 5 mM MgSO_4 und 0,1 mM ThDP eluiert.

Die Detektion erfolgte UV-spektroskopisch bei 280 nm in der Durchflußküvette.

Säulenvolumen: 940 ml

Flußrate: 20 ml/min

6.1.7 Lyophilisierung der aufgereinigten PDC-Mutanten

Die aufgereinigten Proteinfraktionen wurden zur sicheren Lagerung gefriergetrocknet und bei -18°C aufbewahrt.

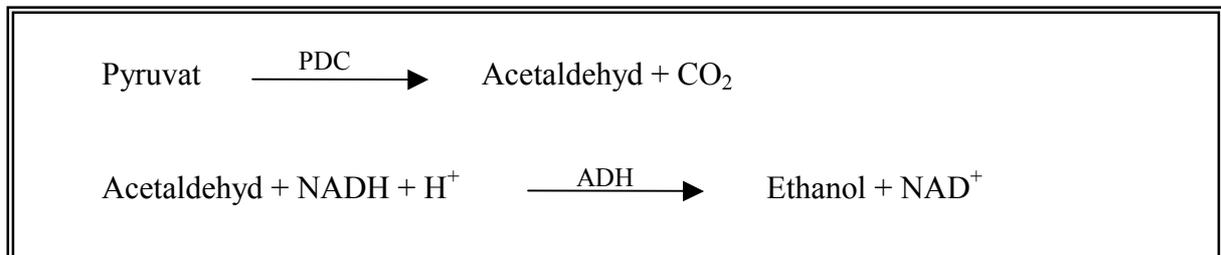
6.1.8 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Überprüfung der Reinheit der Enzympräparate wurde eine denaturierende SDS-PAGE (12,5%-ig) nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug je nach Gelgröße und Anfärbemethode 5 – 20 µg pro Gelspur. Zur Probenvorbereitung wurden die Proteinlösungen 1:1 mit reduzierendem Probenpuffer (2% SDS, 10% Mercaptoethanol) versetzt und exakt 2 min bei 95°C denaturiert. Als Proteinstandard diente der „Premixed Standard“ der Fa. Boehringer. Die Färbung der Gele erfolgte mittels Coomassie- oder Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987).

6.2 Analytische Methoden

6.2.1 Aktivitätsbestimmung mit einem gekoppelten Enzymtest

Die Bestimmung der Decarboxylaseaktivität erfolgte in einem gekoppelten enzymatischen Test (Ullrich, 1970; Pohl *et al.*, 1994).



Durch einen Überschuß an Alkoholdehydrogenase wird die Reaktion der PDC limitierend und somit die Abnahme der NADH-Konzentration direkt proportional der PDC-Aktivität.

Lösungen für die Aktivitätsmessung:

- 50 mM KP_i -Puffer, pH 6,5 mit 5 mM MgSO_4 , 0,1 mM ThDP
- 35 mM Na-Pyruvat in KP_i -Puffer
- 0,36 mM NADH in KP_i -Puffer
- Hefe ADH 10 U/ml

Für den Testansatz wurden folgende Volumina pipettiert:

500 µl Pyruvatlösung

490 µl NADH-Lösung

10 µl ADH-Lösung

Die Messung erfolgte im Photometer bei 340 nm und 30°C.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl entsprechend verdünnter PDC-Lösung gestartet und die Änderung der Extinktion über 90 sec verfolgt. Die Verdünnung wurde dabei so gewählt, daß die Linearität des Testes über die Meßzeit in einem Absorptionsbereich von 1,2 bis 0,5 gewährleistet war.

Die Enzymaktivität berechnet sich nach folgender Formel:

$$U / ml = \frac{\Delta E / \text{min} \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot v} \cdot f = \Delta E / \text{min} \cdot 3,33 \cdot f$$

$\Delta E / \text{min}$	Extinktionsänderung pro Minute
V	Testvolumen (1,050 ml)
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient für NADH ($6,31 \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) bei $\lambda=340 \text{ nm}$
v	Probenvolumen (50 µl)
d	Schichtdicke der Küvette (1 cm)
f	Verdünnungsfaktor

Als 1 U ist die Enzymmenge definiert, die 1 µmol Pyruvat pro Minute bei 30°C umsetzt.

6.2.2 Aktivitätsbestimmung mit einem direkten Enzymtest

Beim direkten Enzymassay wird der direkte Verbrauch des Primärsubstrates Pyruvat durch die Pyruvatdecarboxylase bei 320 nm (Pohl *et al.*, 1995) betrachtet.

Für den Testansatz wurden folgende Volumina pipettiert:

975 µl Pyruvatlösung (35 mM Na-Pyruvat)

50 µl Enzymlösung

$\lambda=320$ nm

Meßzeit: 90 sec

Temperatur: 30°C

Die Enzymaktivität berechnet sich wie folgt:

$$U / ml = \Delta E / \text{min} \cdot 949,09 \cdot f$$

6.2.3 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue G250 bindet an basische und aromatische Seitenketten der Proteine, wobei die Absorption dieses Farbstoffkomplexes bei 595 nm der Konzentration des Proteins in der Lösung in einem definierten Bereich proportional ist. Die Auswertung der Messung erfolgte mittels einer Eichkurve (10 - 100 µg/ml Rinderserumalbumin (BSA)).

6.2.4 Isokratische RP-HPLC-Methoden zur Bestimmung von PAC und Benzaldehyd

6.2.4.1 Methode 1: RP 18 Säule

Eine geeignete Methode der Quantifizierung des PAC besteht in der Trennung der Edukte und Produkte durch die RP HPLC bei gleichzeitiger quantifizierender Detektion der UV-Absorption bei 263 nm. Die Bedingungen der Analyse waren folgende:

- stationäre Phase: C18 Hypersil ODS 5 μ Säule, 250 mm x 4,6 mm (Chromatographie Service, Langerwehe)
- Flußrate: 1,1 ml/min
- Injektion: 20 μ l
- Elution: isokratisch mit 0,5% CH₃COOH / 20% CH₃CN in H₂O
- typische Retention: PAC 10,6 min; Benzaldehyd 18,4 min

Als Standard für die Zuordnung diente der Syntheseextrakt („Rohketol“ der Hefefermentation) der Fa. Knoll AG, Minden. Die Konzentrationsbestimmung für das Produkt PAC und das Edukt Benzaldehyd erfolgte mittels Eichkurven für die RP-HPLC, aus denen folgende Zusammenhänge zwischen der Peakfläche und der Konzentration an PAC, bzw. Benzaldehyd festgestellt wurden:

$$\text{Benzaldehyd: BzA [mM]} = 0,0231 \times \text{Peakfläche (BzA)} - 5,4867$$

$$\text{PAC: PAC [mM]} = 0,1973 \times \text{Peakfläche (PAC)} + 1,0098$$

6.2.4.2 Methode 2: RP 8 Säule

Eine weitere Methode zur Quantifizierung des PAC und Benzaldehyd wurde zur Verkürzung der Analysezeiten eingesetzt. Sie besteht in der Trennung der Substanzen durch die RP HPLC bei gleichzeitiger quantifizierender Detektion der UV-Absorption bei 263 nm. Die Bedingungen der Analyse waren folgende:

- stationäre Phase: 125/4 Spherisorb C8 (125 mm x 4 mm); (Marcherey-Nagel, Düren)
- Flußrate: 1 ml/min
- Temperatur: 40°C
- Injektion: 10 µl
- Elution: isokratisch mit 0,5% CH₃COOH / 20% CH₃CN in H₂O
- typische Retention: PAC 4,2 min; Benzaldehyd 6,5 min

Als Standard für die Zuordnung diente auch hier der Syntheseextrakt („Rohketol“ der Hefefermentation) der Fa. Knoll AG, Minden.

Die Konzentrationsbestimmung für das Produkt PAC und das Edukt Benzaldehyd erfolgte mittels Eichkurven für die RP-HPLC, aus denen folgende Zusammenhänge zwischen der Peakfläche und der Konzentration an PAC, bzw. Benzaldehyd festgestellt wurden:

$$\text{Benzaldehyd: BzA [mM]} = 0,053 \times \text{Peakfläche (BzA)} - 2,3762$$

$$\text{PAC: PAC [mM]} = 0,3265 \times \text{Peakfläche (PAC)} - 1,4567$$

6.2.5 Bestimmung des Enantiomerenüberschusses des PAC mittels HPLC

Die PAC-Enantiomere wurden mittels chiraler HPLC getrennt und quantifiziert. Die Bedingungen der Analyse waren folgende:

- stationäre Phase: Chiracel OD (Daicel)
- Flußrate: 0,75 ml/min
- Temperatur: RT
- Injektion: 20 µl
- Elution: isokratisch mit 90% Isohexan/10% Isopropanol
- Detektion: 254 nm
- typische Retention: (*R*)-PAC 12,2 min; (*S*)-PAC 16,4 min; Benzaldehyd 28,4 min

Als Standard für die Zuordnung diente auch hier der Syntheseextrakt („Rohketol“ der Hefefermentation) der Fa. Knoll AG, Minden.

6.2.6 Bestimmung des Enantiomerenüberschusses des PAC mittels chiraler GC

Die PAC-Enantiomere wurden mittels chiraler Gaschromatographie (Shimadzu, Düsseldorf) getrennt.

Trennbedingungen

- Kapillarsäule: Lipodex E, 25 m
- stat. Phase: Cyclodextrine
- Trägergas: Helium
- Fluß: 48 l/h
- Detektion: Flammenionisationsdetektor
- typische Retention: (*R*)-PAC 58,6 min; (*S*)-PAC 49,5 min

Die Trennung erfolgte bei 110°C Säulentemperatur, die Injektions- und Detektortemperatur betrug je 200°C.

Als Standard diene PAC aus der Hefe-Fermentation der Fa. Knoll AG, die Zuordnung des (*S*)-Enantiomeren gelang durch Vergleich mit dem PAC-Racemat.

Probenvorbereitung: Extraktion des enzymatischen Reaktionsansatzes mit dem doppelten Volumen Chloroform. Es wurde 1 µl der organischen Phase injiziert.

6.2.7 Schnelltest zur Bestimmung von PAC

Zur schnellen Überprüfung einer enzymatischen (*R*)-PAC Synthese wurde ein Farbttest verwendet. PAC läßt sich spezifisch mittels Tetrazolrot (2,3,5 Triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid) bestimmen (Lingen, 1998). PAC reduziert das Tetrazolrot, was zu einem Farbumschlag führt. Hierzu werden 100 µl Probe mit 10 µl Reagenzlösung versetzt. Bei Anwesenheit von mehr als 3 mM PAC entsteht innerhalb von wenigen Sekunden ein roter Farbstoff/Niederschlag. Bei weniger als 3 mM PAC dauert der Farbumschlag von farblos zu rot länger (bis zu 5 min). Eine echte Quantifizierung ist aufgrund der schnellen Reaktion auch bei kleinen PAC-Konzentrationen und der Bildung eines Niederschlages nicht möglich.

Reagenzlösung:

10 mg 2,3,5 Triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid

2,5 ml Methanol

2,5 ml 3 M NaOH

6.3 Untersuchungen zur Stabilität der Pyruvatdecarboxylase

6.3.1 pH-Optimum der Carboligasereaktion

Für die Bestimmung des pH-Optimums der Carboligasereaktion der PDC wurden folgendes PDC-Mutein untersucht:

Ansatz

Volumen: 5 ml
Enzym: PDC-W392M-His₆ (*PDC-I*): 10 U/ml
30 mM Benzaldehyd
30 mM Acetaldehyd
50 mM KP_i pH variabel (pH 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 7,8)
5 mM MgSO₄
0,1 mM ThDP
Temperatur: 25°C
Zeit: 24 h

Die Reaktion wurde durch Hitzestop bei 95°C/2min beendet und auf die Produkt- und Substratkonzentrationen mittels isokratischer RP-HPLC untersucht.

6.3.2 Stabilität in Leitungswasser

Zur Überprüfung der Stabilität der PDC gegenüber Leitungswasser wurde das Enzym mit Reaktionspuffer aus Leitungswasser mit Cofaktoren mit und ohne 50 mM KP_i inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Decarboxylaseaktivität der Enzymlösung mit dem gekoppelten Aktivitätstest (Kap.6.2.1) überprüft. Die Aktivität bei 0 min entspricht 100% Aktivität.

Inkubationsansatz

Volumen: 10 ml
Enzym: 1 U/ml Anfangsaktivität
Proteingehalt: 0,02 mg/ml aufgereinigtes Enzym
 0,1 mg/ml Rohextraktcharge
 0,5 mg/ml Rohextraktcharge
Enzyme: *PDC-0* (Rohextraktcharge)
 PDC-I (Rohextraktcharge/aufgereinigtes Enzym)
50 mM KP_i pH 6,5 oder kein KP_i dann pH 6,8
5 mM MgSO₄
0,1 mM ThDP
Temperatur: RT

6.3.3 Stabilität gegenüber Nitrat

Zur Überprüfung der Stabilität der PDC gegenüber Leitungswasser wurde das Enzym mit NaNO_3 oder $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Decarboxylaseaktivität der Enzymlösung mit dem gekoppelten Aktivitätstest (Kap.6.2.1) überprüft. Die Aktivität bei 0 min entspricht 100% Aktivität.

Inkubationsansatz

Volumen: 10 ml
Enzym: 1 U/ml Anfangsaktivität
Proteingehalt: 0,1 mg/ml
Enzyme: *PDC-0* (Rohextraktcharge)
PDC-1 (Rohextraktcharge)
50 mM KP_i pH 6,5
5 mM MgSO_4
0,1 mM ThDP
Temperatur: RT
383 μM NaNO_3 oder 137 μM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

6.3.4 Stabilität gegenüber Metallionen

Zur Überprüfung der Stabilität der PDC gegenüber Metallionen wurden die Muteine mit Lösungen inkubiert, die jeweils eine Metallionenverbindung enthielten. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Decarboxylaseaktivität der Enzymlösung mit dem gekoppelten Aktivitätstest (Kap.6.2.1) überprüft. Die Aktivität bei 0 min entspricht 100% Aktivität.

Inkubationsansatz

Volumen: 10 ml
Enzym: 1 U/ml Anfangsaktivität
Proteingehalt: 0,02 mg/ml (aufgereinigtes Enzym)
0,1 mg/ml (Rohextraktcharge)
Enzyme: *PDC-0* (Rohextraktcharge)
PDC-1 (Rohextraktcharge/aufgereinigtes Enzym)
50 mM KP_i pH 6,5
5 mM MgSO_4
0,1 mM ThDP
Temperatur: RT
Metallionen: 100 μM
 CuSO_4 ; NiCl_2 ; CoCl_2 ; FeSO_4 ; MnSO_4 ; ZnSO_4

6.3.5 Stabilität gegenüber Cu(II)

Zu Bestimmung der Cu(II)-Empfindlichkeit wurden die PDC-Muteine mit Lösungen inkubiert, die drei unterschiedliche CuSO₄-Konzentrationen (1, 5 oder 10 µM) enthielten. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Decarboxylaseaktivität der Enzymlösung mit dem gekoppelten Aktivitätstest (Kap.6.2.1) überprüft. Die Aktivität zum Zeitpunkt 0 min entspricht 100% Aktivität.

Inkubationsansatz

Volumen: 10 ml
Enzym: 1 U/ml Anfangsaktivität
Proteingehalt: 0,02 mg/ml (aufgereinigtes Enzym)
 0,1 mg/ml (Rohextraktcharge)
Enzyme: *PDC-0* (Rohextraktcharge/aufgereinigtes Enzym)
 PDC-1 (Rohextraktcharge/aufgereinigtes Enzym)
 PDC-2 (Rohextraktcharge/aufgereinigtes Enzym)
50 mM KP_i pH 6,5
5 mM MgSO₄
0,1 mM ThDP
Temperatur: RT
CuSO₄: 1, 5 oder 10 µM

6.3.6 Untersuchung des Einflusses der Proteinkonzentration auf die Cu(II)-Empfindlichkeit der PDC

Um zu überprüfen, ob die Proteinkonzentration einen Einfluß auf die Cu²⁺-Empfindlichkeit der PDC hat, wurden Inkubationsansätze untersucht, die aufgereinigte PDC und Rinderserumalbumin (BSA) als Proteinkomponente in unterschiedlichen Konzentrationen enthielten. Diese Ansätze wurden mit 5 µM CuSO₄ inkubiert und dann zu verschiedenen Zeitpunkten mit dem gekoppelten Enzymtest (Kap. 6.2.1) die Decarboxylaseaktivität der Enzymlösungen überprüft. Die Aktivität zum Zeitpunkt 0 min entspricht 100% Aktivität.

Inkubationsansatz

Volumen: 10 ml
Enzym: 1 U/ml Anfangsaktivität
Proteingehalt: variabel
Enzyme: *PDC-1* (aufgereinigtes Enzym)
Gesamtproteingehalt variabel
50 mM KP_i pH 6,5
5 mM $MgSO_4$
0,1 mM ThDP
Temperatur: RT
 $CuSO_4$: 5 μM
BSA in unterschiedlichen Konzentrationen

6.3.7 Enzymatische C-C-Verknüpfung der PDC unter Cu(II)-Einfluß

Um den Einfluß von Cu^{2+} auf die enzymatische C-C-Verknüpfungsreaktion der PDC zu überprüfen, wurde eine enzymatische PAC-Synthese durchgeführt, bei der unterschiedliche $CuSO_4$ -Konzentrationen im Reaktionsansatz enthalten waren. Es wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen, die Reaktion wurde per Hitzestop (95°C/2 min) beendet und dann auf ihre Produkt- und Eduktkonzentration per RP-HPLC untersucht.

Inkubationsansatz

Volumen: 10 ml
PDC: 10 U/ml Decarboxylierungsaktivität
Enzym: 0,3 mg/ml
Enzyme: *PDC-1* (Rohextraktcharge)
30 mM Benzaldehyd
30 mM Acetaldehyd
50 mM KP_i pH 6,5
5 mM $MgSO_4$
0,1 mM ThDP
Temperatur: 25°C
 $CuSO_4$: 5 oder 50 μM

6.3.8 Stabilität gegenüber Acetaldehyd

Um die Stabilität der untersuchten Muteine gegenüber Acetaldehyd festzustellen, wurde ein anderer Meßansatz gewählt als bei der Messung der Stabilität gegenüber Benzaldehyd (Kap.6.3.9). Die Restaktivität konnte nicht direkt über einen photometrischen Test (Kap.6.2.1) bestimmt werden, da der eventuell noch vorhandene Acetaldehyd von der ADH im Test umgesetzt würde und falsche Aktivitäten vortäuschen würde.

Inkubationsansatz

Volumen: 10 ml
Proteingehalt: 1 mg/ml
Enzyme: *PDC-1* (aufgereinigtes Enzym)
PDC-2 (aufgereinigtes Enzym)
50 mM KP_i pH 6,5
5 mM $MgSO_4$
0,1 mM ThDP
Temperatur: 4°C
unter N_2 -Atmosphäre
Acetaldehyd: 50 mM
Meßzeiten: 35, 70, 105, 140, 175, 210, 245 und 280 min

Zu den genannten Meßzeiten wurden 500 µl Probe in eine Microcon 10kD (Amicon/Millipore, Eschborn) überführt und dann 35 min bei 25°C/14000 x g zentrifugiert, um Acetaldehyd abzutrennen. Das zurückgehaltene Protein wurde dann zweimal mit KP_i (50 mM pH 6,5, 5 mM $MgSO_4$, 0,1 mM ThDP) gewaschen (je 14000 x g/ 35 min) und anschließend wurde der Proteingehalt bestimmt. Zur Überprüfung einer Restaktivität wurde der gekoppelte Enzymtest für die Bestimmung der Decarboxylaseaktivität eingesetzt.

6.3.9 Stabilität gegenüber Benzaldehyd

Zur Überprüfung der Stabilität der PDC-Muteine gegenüber Benzaldehyd wurden die Muteine mit Lösungen inkubiert, die unterschiedliche Benzaldehydkonzentrationen enthielten. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Decarboxylaseaktivität der Enzymlösung mit dem gekoppelten Aktivitätstest (Kap.6.2.1) überprüft. Dieser Test konnte verwendet werden, da die im Test eingesetzte ADH aus Hefe nur im geringen Maße aromatische Aldehyde als Substrat akzeptiert.

Inkubationsansatz

Volumen: 5 ml

Proteingehalt: 0,5 mg/ml (aufgereinigtes Enzym)

1 mg/ml (aufgereinigtes Enzym/Rohextraktcharge)

Enzym: 1 U/ml Anfangsaktivität

Enzyme: *PDC-1* (aufgereinigtes Enzym)

PDC-2 (aufgereinigtes Enzym)

50 mM KP_i pH 6,5

5 mM $MgSO_4$

0,1 mM ThDP

Temperatur: 25

Benzaldehyd: 15, 25 und 35 mM

6.3.10 Temperaturabhängigkeit der Carboligasereaktion

Für die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der Carboligasereaktion wurde die enzymatische PAC-Synthese bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt und nach 15 min durch einen Hitzestop bei 95°C (2 min) beendet. Die Produktkonzentration wurde mittels isokratischer RP-HPLC untersucht.

Ansatz

Volumen: 1 ml

Proteingehalt: 200 µg/ml

Enzyme: *PDC-1* (aufgereinigtes Enzym)

PDC-2 (aufgereinigtes Enzym)

30 mM Benzaldehyd

30 mM Acetaldehyd

50 mM KP_i pH 6,5

5 mM $MgSO_4$

0,1 mM ThDP

Temperatur variabel: 25, 30, 37, 40, 50, 65°C

Zeit: 15 min

6.3.11 Enzymatische (*R*)-PAC Synthese im Satzreaktor

Alle nicht kontinuierlichen Untersuchungen zur enzymatischen Synthese von (*R*)-PAC wurden in Satzreaktoren unterschiedlicher Volumina (1 - 10 ml) durchgeführt. Hierzu wurden die unterschiedlichen Reaktionsgefäße mit der Reaktionslösung bei konstant 25°C inkubiert und zu definierten Zeitpunkten Proben entnommen. Die Reaktionsgefäße (Eppendorfggefäße 1,5 + 2 ml) wurden in einem Eppendorf Thermomixer Komfort (Eppendorf, Hamburg) temperiert, größere Reaktionsvolumina (5 + 10 ml) wurden in Reagenzgläsern mit Verschlussstopfen in einem Wasserbad temperiert.

Ansatz

Volumen: 5 oder 10 ml
Enzym: PDC 10 U/ml
mit 10% Ethanol oder ohne Ethanolzusatz
30 oder 40 mM Benzaldehyd
30 oder 40 mM Acetaldehyd
50 mM KP_i pH 6,5
5 mM $MgSO_4$
0,1 mM ThDP
Temperatur: 25°C
Zeit: 20 - 24 h

Nach der Reaktionszeit wurden die Reaktionen mit einem Hitzestop (2 min/95°C) beendet und dann auf ihre Produkt- und Substratkonzentration mittels RP-HPLC untersucht.

6.3.12 Carboligasereaktion in ethanolhaltigem Reaktionspuffer

Für die Untersuchung des PAC-Synthesepotentials der zu charakterisierenden PDC-Muteine in ethanolhaltigen Reaktionsansätzen wurde die Carboligasereaktion betrachtet.

Ansatz

Volumen: 5 - 10 ml
Enzym: 0,5 - 1,5 mg/ml
Enzyme: *PDC-1* (Rohextraktcharge/aufgereinigtes Enzym)
PDC-2 (Rohextraktcharge/aufgereinigtes Enzym)
10% Ethanol
40 mM Benzaldehyd
40 mM Acetaldehyd
50 mM KP_i pH 6,5
5 mM $MgSO_4$
0,1 mM ThDP
Temperatur: 25°C
Zeit: 16 - 24 h

Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die Reaktion mit einem Hitzestop (2 min/95°C) beendet und dann auf ihre Produkt- und Substratkonzentration mittels RP-HPLC untersucht.

6.4 Entwicklung eines neuen PDC-Muteins durch gerichtete Mutagenese¹⁰

In parallellaufenden Arbeiten und Untersuchungen sollte die Stabilität der Pyruvatdecarboxylase gegenüber den Substraten Acetaldehyd und Benzaldehyd oder organischen Lösungsmitteln erhöht werden, um so die Stabilität der PDC in einem enzymatischen Prozeß zu erhöhen und somit die Ausbeuten des Prozesses zu erhöhen.

Um zu untersuchen, ob die Acetaldehyd-abhängige Inaktivierung der PDC auf einer kovalenten Modifizierung des Proteins beruht, wurde die bei 4°C mit unterschiedlichen Acetaldehydkonzentrationen inkubierte PDC mit NaBH₄ behandelt und mit FITC (Fluorescein-4-isothiocyanat) markiert. Danach wurde dieses Produkt hydrolysiert und die Fragmente mittels HPLC analysiert. Das FITC wird als Fluoreszenz Marker für Lysin-ε-Aminogruppen und N-terminale Aminogruppen anderer Aminosäuren benutzt (Lottspeich & Zorbas, 1998; Ragland *et al.*, 1974). Bei diesen Untersuchungen und darauffolgendem Vergleich mit der aktiven unbehandelten PDC wurde die Position Lysin 553 identifiziert, die einen signifikanten Unterschied in der Reaktion mit FITC zeigte (Breuer, 1998).

Dieses Lysin wurde durch Punktmutation gegen ein Arginin ausgetauscht (K553R), um unter Erhaltung der positiven Ladung eine kovalente Reaktion mit dem Acetaldehyd zu vermeiden. An der Proteinoberfläche der PDC gibt es noch weitere 34 Lysine, bei denen aber keine größeren Unterschiede bei der Reaktion mit FITC festgestellt worden sind (Breuer, 1998).

¹⁰ Die Untersuchungen und Arbeiten wurden von Dr. M. Breuer, BASF AG, Ludwigshafen durchgeführt.

6.5 Reaktionstechnische Methoden

6.5.1 Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten im Satzreaktor

Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten wurden in kleinen Satzreaktoren gemessen. Hierzu wurde ein Reaktionsansatz zusammengestellt, durch Enzymzugabe gestartet und sofort aliquotiert (500 µl). Diese Aliquots wurden zu bestimmten Zeitpunkten durch Hitzestop bei 95°C (2 min) abgestoppt und auf ihre Produkt- und Substratkonzentration untersucht. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist über einen Zeitraum konstant, in dem weniger als 10% des eingesetzten Substrats umgesetzt sind und somit die Abnahme der Substratkonzentration vernachlässigt werden kann.

Dieser Bereich läßt sich linear interpolieren. Die Steigung dieser Geraden entspricht bei einer Auftragung der Produktkonzentration gegen die Zeit der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit.

Ansatz

Volumen: 4 ml, 500 µl Aliquots
Proteingehalt: 0,5 mg/ml
Enzyme: *PDC-1* (aufgereinigtes Enzym)
PDC-2 (aufgereinigtes Enzym)
10% Ethanol
Substrate: Benzaldehyd 5 – 60 mM
Acetaldehyd 10 – 100 mM
50 mM KP_i pH 6,5
5 mM $MgSO_4$
0,1 mM ThDP
Temperatur: 25°C
Meßzeiten: 5, 10, 15, 20, 30 und 60 min

Nach der Reaktionszeit wurden die Reaktionen mit einem Hitzestop (2 min/95°C) beendet und dann auf ihre Produkt- und Substratkonzentration mittels RP-HPLC untersucht.

6.5.2 Kontinuierliche enzymatische Synthese im Membranreaktor

Die Integration eines Trenn- oder Aufarbeitungsprozesses in einen Reaktor kann eine erhebliche Vereinfachung des Verfahrens bedeuten, da ein komplettes, eigenständiges Gerät eingespart wird (Drioli *et al.*, 1996). Dies steht im Gegensatz zur klassischen Anwendung von Membranen zur reinen Aufarbeitung von Produkt und vor allem Abfallströmen (Crespo *et al.*, 1996).

Die Membranen kommen in verschiedenen Formen und Anwendungen zum Einsatz (Rissom, 1999):

- Flachmembranen

Diese Form ist für Laborzwecke die gebräuchlichste und problemlos zu handhaben. Werden Flachmembranen unter Anwendung von Abstandhaltern und einer geeigneten Stromführung gestapelt, spricht man von „Plattenmodulen“.

Auch die Wicklung der Flachmembranen zu sogenannten „Spiralwickelmodulen“ ist gebräuchlich.

- Rohr- oder Kapillarmembranen

Diese Membranart ist eine Hohlfaser und kann mit verschiedenen Durchmessern (ca. 2 cm bis 100 μm) gefertigt werden. Sie bietet sehr günstige Strömungseigenschaften.

Die Verarbeitung als Hohlfasermodule ist wohl die günstigste Einsatzform von Membranen bis in den technischen Maßstab. Die Packungsdichten können bei Verwendung von Kapillarmembranen bis zu 5000 m^2 pro m^3 erreichen und sind damit erheblich höher als bei anderen Bauformen. Die Kapillaren werden an ihren Enden verklebt und somit werden die Faserinnenseite und die Mantelseite voneinander getrennt.

Neben der Bauform der Membran bzw. Membranmoduls können zwei Formen des Reaktor-
aufbaus unterschieden werden (Abb. 43) (Rissom, 1999).

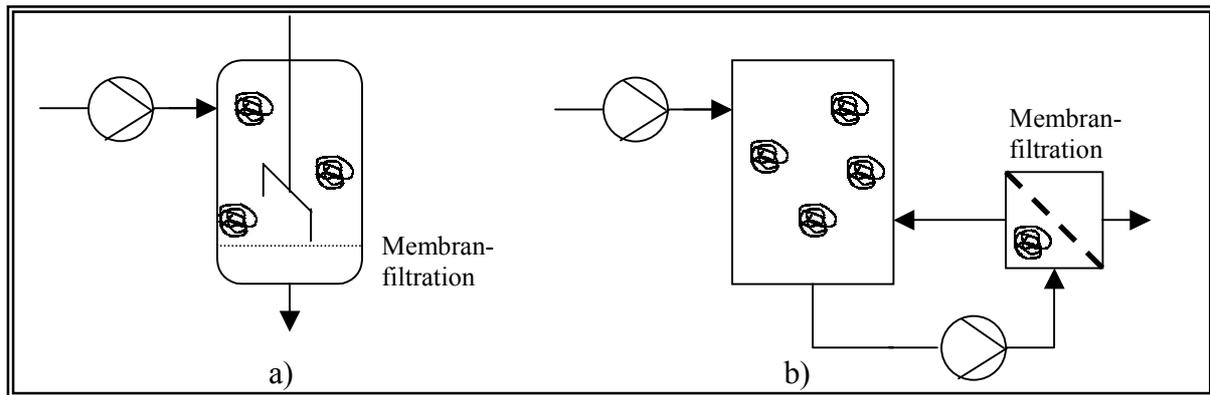


Abb. 43: Unterschiedliche Bauformen von Membranreaktoren

Bei einfachen Laborreaktoren (a) ist die Membran direkt in den Reaktionsraum integriert. Im
allgemeinen wird eine Flachmembran eingesetzt.

Die Trennung von Reaktions- und Filtrationsraum (b) wird in allen größeren Reaktoren ver-
wirklicht.

6.5.2.1 Enzymmembranreaktor

Bei dem Enzymmembranreaktor wird die oben beschriebene Technik der Membranfiltration
zur Rückhaltung von Enzymen, die als lösliche Biokatalysatoren zum Einsatz kommen, ge-
nutzt (Kragl, 1996).

In dieser Arbeit wurde ein kontinuierlicher Enzymmembranreaktor entsprechend des Patents
von Kragl *et al.* (1991) (Abb. 44) eingesetzt. Der verwendete EMR hatte ein Volumen von 10
ml und war aus Polyetheretherketon (PEEK) hergestellt. Beim Versuchsaufbau wurden
PEEK-Kapillaren verwendet. Des weiteren wurden für das Reaktorsystem folgende Kompo-
nenten eingesetzt (Iwan, 1997; Goetz, 1999):

- Kolbenhubpumpe P500 (Pharmacia, Freiburg)
- Druckabnehmer (VDO, Frankfurt)
- Blasenfalle (eigene Herstellung)
- Magnetrührer (Heidolph MR 2000, München)
- Fraktionssammler (Bio Rad, München)
- Reaktormembran, Typ: UF-PA-20H (Hoechst AG, Frankfurt)
- Reaktormembran, Typ: YM 10, YM 30 (Amicon; Millipore, Eschborn)

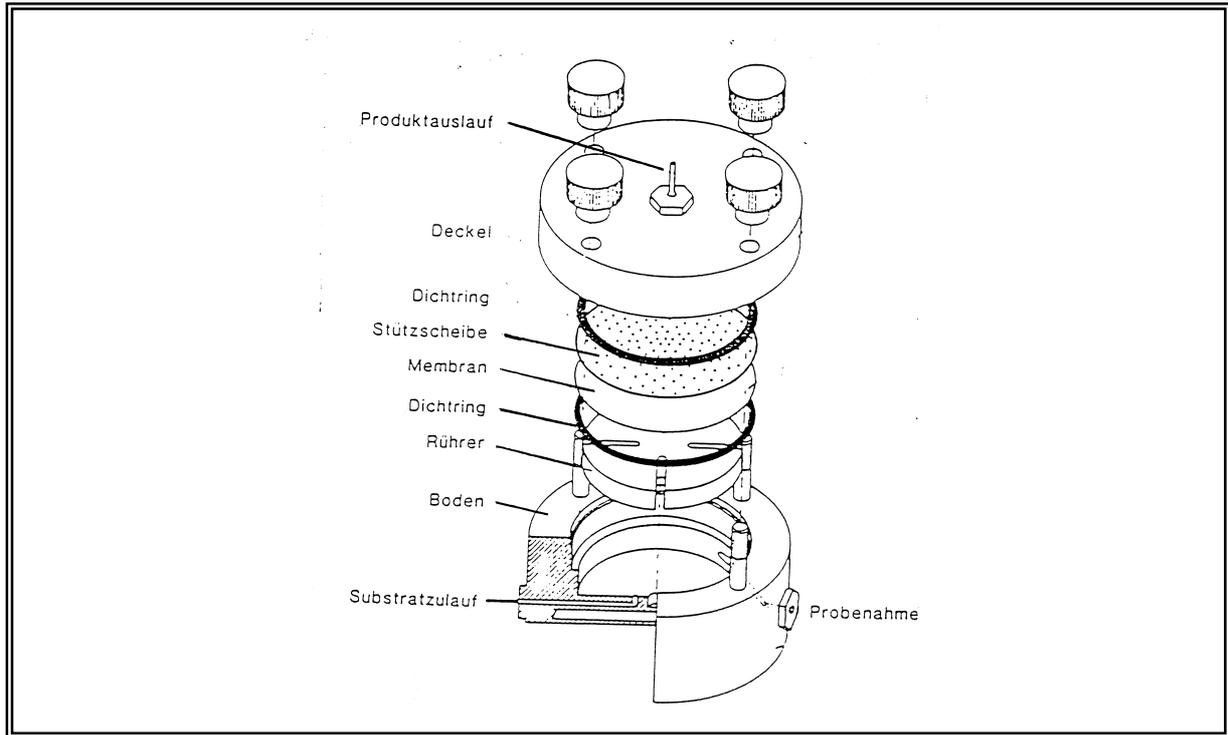


Abb. 44: Enzymmembranreaktor Kragl *et al.* (1991)

Ansatz

Reaktorvolumen: 10 ml
 Proteingehalt: 0,5 – 1,5 mg/ml Reaktorvolumen
 Enzyme: *PDC-1* (Rohextraktchargen/aufgereinigtes Enzym)
 PDC-2 (Rohextraktchargen/aufgereinigtes Enzym)
 mit 10% Ethanol oder ohne
 Benzaldehyd: 30 mM
 Acetaldehyd: 30 mM
 50 mM KP_i pH 6,5
 5 mM $MgSO_4$
 0,1 mM ThDP
 Temperatur: 25°C
 Probennahme: alle 30 oder 60 min

Die Proben wurden mittels RP-HPLC auf Produkt- und Substratkonzentrationen untersucht.

6.5.2.1.1 Enzymmembranreaktor: Reaktor- und Membranvorbereitung

Die verwendete Hoechst-Membran wurde zwischen den Synthesen in 20%-iger Ethanol-Lösung aufbewahrt, um einem mikrobiellen Bewuchs entgegenzuwirken. Die YM-Membranen wurden nur einmal verwendet. Der Enzymmembranreaktor wurde zwischen den unterschiedlichen Syntheseansätzen mit 20%-iger Ethanol-Lösung gespült, um noch eventuell vorhandene Substratlösung aus dem Reaktorsystem zu entfernen.

Das Reaktorsystem (inkl. Membran) wurde vor jedem Syntheseansatz mit 50 mM KPi , pH 6,5, mit 5 mM MgSO_4 und 0,1 mM ThDP gespült, um die alkoholische Lösung aus dem System zu entfernen. Nach dem Spülen mit destilliertem Wasser wurde die Membran mit 5%-iger PEG-4000-Lösung belegt.

Zur Äquilibration wurde das Reaktorsystem mit der jeweiligen Substratlösung gespült. Die enzymatische Synthese im Membranreaktor wurde durch Einspritzen einer Enzymlösung (in 50 mM KPi , pH 6,5, 5 mM MgSO_4 und 0,1 mM ThDP gelöstes Enzymlyophilisat oder Rohextraktchargen) gestartet. Alle 30 oder 60 min wurde im Auslauf eine neue Probe gesammelt und dann auf Substrat- und Produktkonzentration per HPLC untersucht.

6.5.2.2 Membranreaktor mit getrenntem Reaktions- und Filtrationsraum

Dieser gewählte Enzymmembranreaktor entspricht dem unter Abb. 43b vorgestellten Aufbau, bei dem der Reaktionsraum und die Filtrationseinheit getrennt sind. In dieser Arbeit hatte der Reaktionsaufbau folgende Komponenten:

- Druckabnehmer (VDO, Frankfurt)
- Fraktionssammler (Bio Rad, München)
- Millipore Pellikon XL PLCCC5 regn. Cell. UF-Membrankassettenmodul, 50 cm² (Amicon-Millipore, Eschborn)
- Schläuche Tygon[®] SE 200 (1/4'' AØ x 1/16'' IØ) (Novodirect, Kehl/Rhein)
- Pumpe Gilson Minipuls 3 (Abimed, Ratingen)
- Thermostat RM6 Lauda (Dr. Wobster GmbH, Lauda-Königshofen)
- Waage E5500S (Sartorius, Göttingen)
- Pumpe Watson Marlow 101U (Watson-Marlow, Rommerskirchen)
- Glasreaktorgefäß mit Temperiermantel und GL 18 Schraubanschlüssen (V=110ml)
- (FZ Jülich)
- Dosiermodul Sartorius IP 65 (Sartorius, Göttingen)

Zur Reinigung wurde das System mit 0,1 N NaOH gespült, um das Membranmodul von Proteinresten zu befreien. Das Modul wurde auch in dieser 0,1 N NaOH gelagert.

(Abb. 45) zeigt den schematischen Aufbau des Reaktorsystems.

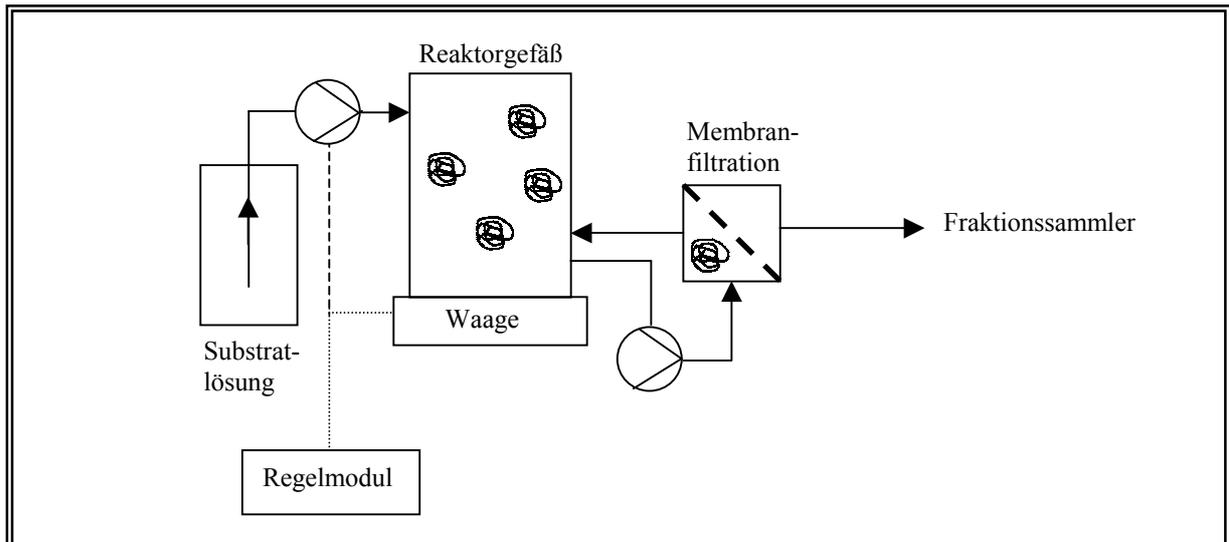


Abb. 45: Schematischer Aufbau des Membranreaktors mit getrenntem Reaktions- und Filtrationsraum

Zur Überprüfung der Stabilität und des Zustandes des Membranmoduls wurde zunächst der Reinstwasserfluss getestet. Vor dem Beginn einer enzymatischen Synthese wurde dieses Reaktorsystem mit Substratlösung äquilibriert und dann neue Substratlösung hinzugegeben. Die kontinuierliche enzymatische Synthese wurde durch Zugabe von Enzymlösung gestartet. Alle 30 min wurde im Auslauf eine neue Probe gesammelt und dann auf Substrat- und Produktkonzentration per HPLC untersucht.

Über eine Dosierstrecke wurde dem Reaktorsystem kontinuierlich Substratlösung zugefügt. Die Substratdosierung war so eingestellt, daß das Gesamtgewicht des Reaktors maximal 5 g vom Sollwert abweichen durfte.

7. Literatur

- Arjunan, P., Umland, T., Dyda, F., Swaminathan, S., Furey, W., Sax, M., Farrenkopf, B., Gao, Y., Zhang, D. und Jordan, F. (1996)
Crystal structure of the thiamin diphosphate dependent enzyme pyruvate decarboxylase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at 2.3 Å resolution
J. Mol. Biol., 256, 590-600
- Arnold, F. H. (2001)
Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design
Nature, 409, 253-257
- Asakawa, T., Wada, H. und Yamano, T. (1968)
Enzymatic conversion of phenylpyruvate to phenylacetate
Biochim. Biophys. Acta, 170, 375-391
- BBGes. (2001)
Berliner Betrieb für Zentrale Gesundheitliche Aufgaben
Institut für Umweltanalytik und Humantoxikologie
www.bbges.de/itox/trink1a.htm
- Beyer, H. (1991)
Lehrbuch der organ. Chemie, 22. Auflage
S. Hirzel Verlag Stuttgart
- Bisswanger, H. (2000)
Enzymkinetik
Theorie und Methoden
S.126 ff.
3., neu bearbeitete Auflage
Wiley-VCH Verlag Weinheim
- Biselli, M., Kragl, U. und Wandrey, C. (1995)
Reaction engineering for enzyme-catalyzed biotransformations
in: Enzyme catalysis in organic synthesis
Drauz, K. und Waldmann, H. (editors)
VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987)
Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels
Electrophoresis, 8, 93-99

-
- Boiteux, A. und Hess, B. (1970)
Allosteric properties of yeast pyruvate decarboxylase
FEBS. Letters, 9, 293-296
 - Bommarius, A.S., Schwarm, M. und Drauz, K.H. (1998)
Biocatalysis to amino-based chiral pharmaceuticals-examples and perspectives
J. Mol. Cat. B: Enzymatic, 5, 1-11
 - Bornscheuer, U. T. und Pohl, M. (2001)
Improved biocatalysts by directed and rational protein design
Curr. Op. in Chem. Biol., 5, 137-143
 - Bradford, M.M. (1976)
A rapid and sensitive method for the qualification of mikrogram quantities of protein using the principle of protein-binding dye
Anal. Biochem., 72, 248-254
 - Breuer, M. (1998)
unveröffentlichte Ergebnisse
 - Bringer-Meyer, S. und Sahm, H. (1988)
Acetoin and phenylacetylcarbinol formation by the pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*
Biocatalysis, 1, 321-331
 - Bringer-Meyer, S. und Sahm, H. (1991)
Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*: properties of the enzyme and catalysis of C-C-bond formation.
In: Biochemistry and Physiology of Thiamin Diphosphate Enzymes
Ed.: Bisswanger, H. und Ullrich, J.; Verlag Chemie Weinheim; p. 123-132
 - Bruhn, H. (1995a)
Verbesserung der Acyloinkondensationsfähigkeit der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis*
Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
 - Bruhn, H., Pohl, M., Grötzinger, J. und Kula, M.-R. (1995b)
The replacement of Trp 392 by alanine influences the decarboxylase/ carboligase activity and stability of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*
Eur. J. Biochem., 234, 650-655
 - Bruhn, H., Pohl, M., Mesch, K. und Kula, M.-R. (1995c)
Deutsche Patentanmeldung 195 23 269.0-41
 - Bruhn, H., Pohl, M., Mesch, K. und Kula, M.-R. (1996)
Verfahren zur Gewinnung von Acyloinen, dafür geeignete Pyruvatdecarboxylasen sowie deren Herstellung und DNA-Sequenz des für diese kodierenden PDC-Gens
Internationales Patent Nr. WO96/37620

- Cedrone, F., Menez, A. und Quemeneur, E. (2000)
Tailoring new enzyme functions by rational redesign
Curr. Op. Struc. Biol., 10, 405-410
- Chow, Y. S., Shin, H. S., Adesina, A. A. und Rogers, P. C. (1995)
A kinetic model for the deactivation of pyruvate decarboxylase (PDC) by benzaldehyde
Biotechn. Lett. Vol. 17, 11, 1201-1206
- Christen, H. R. und Vögtle, F. (1990)
Organische Chemie; Von den Grundlagen zur Forschung, Band 2; S.399-400
Otto Salle Verlag Frankfurt a. M.; Verlag Sauerländer Aarau; 1.Auflage 1990
- Costacurta, A., Keijers, V. und Vanderleyden, J. (1994)
Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase
Mol. Gen. Genet., 243, 463-472
- Crespo, J.G. und Bøddeker, K.W. (1996)
Membrane Processes in separation and purification
NATO ASI Ser., Ser. E, 272, 505
- Csuk, R. und Glänzer, B.I. (1991)
Baker's yeast mediated transformation in organic chemistry
Chem. Rev., 91, 49-91
- Culik, K., Ulbert, S., Vojtisek, V., Vodnansky, M. (1984)
Zpusob ekonomizae vyroby D-(-)-I-fenyl-I-hydroxy-1-propanone pro pipravu L(-)-efedrinu
CSSR Patent Nr. 222941
- DECHEMA (1994)
Lehrprofil technische Chemie
- Degenring, D. (2001)
persönliche Mitteilung
- Dobritsch, D., König, S., Schneider, G. und Lu, G.G. (1998)
High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*-
implication for substrate activation in pyruvate decarboxylase
J. Biol. Chem., 273, 20196-20204
- Drauz, K.H. und Waldmann, H. (1996)
Enzyme catalysis in organic synthesis
VCH Weinheim
- Drioli, E. und Giorno, L. (1996)
Catalytic membrane reactors
Chemistry & Industry, p. 19-22

-
- Dyda, F., Furey, W., Swaminathan, S., Sax, M., Farrenkopf, B. und Jordan, F. (1993)
Catalytic centers in the thiamin diphosphate enzyme pyruvate decarboxylase at 2.4 Å resolution
Biochem., 32, 6165-6170
 - Faber, K. (2000)
Biotransformations in organic synthesis
Springer Verlag Berlin Heidelberg 4th Edition
 - Gancedo, C. und Serano, R. (1989)
Energy yielding metabolism
In: *The yeast* Vol. 3, p. 205-206
Ed.: Rose, A.H., Harrisin, J.S.
 - Goetz, G. (1999)
Untersuchungen zur kontinuierlichen Synthese von (*R*)-Phenylacetylcarbinol mittels Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis*
Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
 - Goetz, G., Iwan, P., Hauer, B., Breuer und M., Pohl, M. (2001)
Continuous production of (*R*)-phenylacetylcarbinol in an enzyme-membrane reactor using a potent mutant of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*
Biotech. Bioeng. 74, 317-325
 - Grötzinger, J. (1999)
persönliche Mitteilung
 - Harris, J. L. und Craik, C. S. (1998)
Engineering enzyme specificity
Curr. Op. Chem. Biol., 2, 127-132
 - Hartmeier, W. (1986)
Immobilisierte Biokatalysatoren
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
 - Hegeman, G.D. (1966 a)
Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*.I. Synthesis of enzymes by the wild type
J. Bact., 91, 1140-1154
 - Hegeman, G.D. (1966 b)
Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*.II. Isolation and properties of blocked mutants
J. Bact., 91, 1155-1160
 - Hildebrandt, G. und Klavehn, W. (1932)
Verfahren zur Herstellung von L-1-phenyl-2-methylaminopropan-1-ol
Deutsches Reichspatent 548459

- Hoch, R.E. und König, B. (1988)
Lexikon der rezeptpflichtigen und rezeptfreien Arzneimittel
Bechtermünzverlag, Eltville
- Huang, C.-Y., Chang, A. K., Nixon, P. F. und Duggleby R. G. (2001)
Site-directed mutagenesis of the ionizable groups in the active site of *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase – Effect on activity and pH dependence
Eur. J. Biochem., 268, 3558-3565
- Iding, H. (1998)
persönliche Mitteilung
- Iding, H., Siegert, P., Mesch, K. und Pohl, M. (1998)
Application of alpha-keto acid decarboxylases in biotransformations
Biochim. Biophys. Acta, 1385, 307-322
- IUB (1992)
Enzyme nomenclature: recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology
- Iwan, P. (1997)
Enzymatische Synthese von (*R*)-Phenylacetylcarbinol
Diplomarbeit, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
- Iwan, P., Goetz, G., Schmitz, S., Hauer, B., Breuer, M. und Pohl, M. (2001)
Studies on the continuous production of (*R*)-(-)-phenylacetylcarbinol in an enzyme-membrane reactor
J. Mol. Cat. B: Enzymatic 11/4-6, 387-396
- Jordan, F., Nemeria, N., Guo, F., Barburina, F., Gao, Y., Kahyaoglu, A., Li, H., Wang, J., Yi, J.I., Guest, J.R. und Furey, W. (1998)
Regulation of thiamin diphosphate dependent 2-oxo acid decarboxylases by substrate and thiamin diphosphate. Mg(II)-evidence for tertiary and quaternary interactions
Biochim. Biophys. Acta, 1385, 287-306
- Kern, D., Kern, G., Neef, H., Tittmann, K., Killenberg-Jabs, M., Wilkner, C.; Schneider, G. und Hübner, G. (1997)
How thiamine diphosphate is activated in enzymes
Science, 275 (5296), 67-70
- Kluger, R. (1992)
Mechanisms of enzymatic carbon-carbon bond formation and cleavage
In: *Enzymes* 10, p. 271-315
Academic Press, Inc. New York

-
- König, S., Svergun, D., Koch, M. H. J., Hübner, G. und Schellenberger, A. (1992)
Synchrotron radiation solution X-ray scattering study of the pH-dependence of the quaternary structure of yeast pyruvate decarboxylase
Biochem., 31, 8726-8731
 - Kolthoff, I. M. und Willeford, B. R., Jr. (1958)
The interaction of copper(II) with bovine serum albumin
J. Am. Chem. Soc., 80, 5673-5678
 - Kragl, U., Peters, J., Wandrey, C. und Kula, M.-R. (1991)
Enzymmembranreaktor
Patentschrift: DE 39 37 892 C2
 - Kragl, U. (1996)
Enzyme membrane reactors
in: *Industrial Enzymology-Application of enzymes in industry*
p.271-283
Godfrey, T. und West, S. (eds.)
 - Kragl, U. (1997)
Reaktionstechnik der asymmetrischen Synthese mit Homogen- und Biokatalysatoren
Habilitationsschrift, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
 - Kuchner, O. und Arnold, F. H. (1997)
Directed evolution of enzymes
TIBTECH, 15, 523-530
 - Kudryashova, E. V., Galdilin, A. K., Vakurov, A. V., Heitz, F., Levashov, A. V. und Mozhaev, V. V. (1997)
Enzyme-polyelectrolyte complexes in water-ethanol mixtures: negatively charged groups artificially introduced into α -Chymotrypsin provide additional activation and stabilization effects
Biotech. Bioeng., 55, 267-277
 - Laemmli, V.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature, 227, 680-685
 - Levenspiel, O. (1998)
Chemical Reaction Engineering
2.Auflage; John Wiley & Sons, New York
 - Liebeton, K., Zonta, A., Schimmossek, K., Nardini, M., Lang, D., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T. und Jäger, K. (2000)
Directed evolution of enantioselective lipase
Chem. Biol., 7, 709-718

- Liese, A. (1998)
Reaktorkonzepte für Biotransformationen in Zweiphasensystemen
Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Liese, A., Seelbach, K. und Wandrey, C. (2000)
Industrial Biotransformations
Wiley-VCH; Weinheim-New York-Chichester-Brisbane-Singapore-Toronto
- Lingen, B. (1999)
persönliche Mitteilung
- Little, C. und O'Brien, P. J. (1965)
Products of oxidation of protein thiol groups after reaction with various oxidizing agents
Arch. Biochem. Biophys., 122/2, 406-410
- Long, A. und Ward, O. P. (1989)
Biotransformation of benzaldehyde by *Saccharomyces cerevisiae*; characterisation of the fermentation and toxicity effects of substrates and products
Biotech. Bioeng., 34, 933-941
- Lottspeich, F. und Zorbas, H. (1998)
Bioanalytik
Kap. 12 Aminosäureanalytik S. 296
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin
- Lu, G., Dobritzsch, D., Baumann, S., Schneider, G. und König, S. (2000)
The structural basis of substrate activation in yeast pyruvate decarboxylase
-A crystallographic and kinetic study-
Eur. J. Biochem., 267, 861-868
- May, O., Nguyen, P. T. and Arnold, F. H. (2000)
Inverting enantioselectivity and increasing total activity of a key enzyme in a multi-enzyme synthesis creates a viable process for L-methionine
Nat. Biotech. 18. 317-320
- Mc Gill, D. J. und Dawes, E.A. (1971)
Glucose and fructose mechanism in *Zymomonas anaerobia*
Biochem. J., 125, 1059-1068
- Merck, (1999)
Katalog: Chemikalien und Reagentien 1999
Merck KGaA, Darmstadt
- Mesch, K. (1997)
Rationales Proteindesign an der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis*
Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

-
- Michaelis, L. (1929)
Oxidation-reduction system of biological significance, VI. The mechanism of the catalytic effect of iron on the oxidation of cysteine
J. Biol. Chem., 84, 777-787
 - Neuberg, C. (1949)
Biochemical reduction at the expenses of sugars
Adv. Carbohydrate Chem., 4, 75-106
 - Neuberg, C. und Hirsch, J. (1921)
Über ein Kohlenstoffketten knüpfendes Ferment (Carboligase)
Biochem. Zeitschr., 115, 282-310
 - Neuberg, C. und Ohle, H. (1922)
Zur Kenntnis der Carboligase. Der Bau biosynthetisch verknüpften mehrgliedrigen Kohlenstoffketten
Biochem. Zeitschr., 127, 326-339
 - Neuser, F., Richter, V. und Berger, R.G. (1999)
Aromarelevante α -Hydroxyketone aus lebensmittelnahen Hefen
Lebensmittelchemie, 53, 4
 - Neuser, F., Zorn, H. und Berger, R. G. (2000)
Formation of aliphatic and aromatic α -hydroxy ketones by *Zygosaccharomyces bisporus*
Z. Naturforsch. 55c, 560-568
 - Nikolova, P. und Ward, O.P. (1991)
Production of 1-phenylacetyl carbinol by biotransformation: product and by-product formation and activities of the key enzymes in wild type and ADH isoenzyme mutants of *Saccharomyces cerevisiae*
Biotechnol. Bioeng., 20, 493-498
 - Palaniappan, C., Sharma, V., Hudspeth, M.E. und Meganathan, R. (1992)
Menaquinone (vitamin K2) biosynthesis: evidence that the *e. coli* menD gene encodes both 2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylic acid synthase and alpha-ketoglutarate decarboxylase activities
J. Bact., 174, 8111-8118
 - Pohl, M., Grötzinger, J., Wollmer, A. und Kula, M.-R. (1994)
Reversible dissociation and unfolding of pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*
Eur. J. Biochem., 224, 651-661
 - Pohl, M., Mesch, K., Rodenbrock, A. und Kula, M.-R. (1995)
Stability investigations on the pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*
Biotechnol. Appl. Biochem. 22, 95-105, 1995

- Pohl, M. (1997)
Protein design on pyruvate decarboxylase (PDC) by site-directed mutagenesis
Adv. Biochem. Eng. Biotech., 58, 16-43
- Pohl, M. (2000a)
Optimierung von Biokatalysatoren und Reaktionsbedingungen für den technischen Einsatz
Habilitationsschrift, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
- Pohl, M. (2000b)
Optimierung von Biokatalysatoren für technische Prozesse
Chem. Ing. Tech., 72, 883-885
- Ragland, W. L., Pace, J. L. und Kemper, D. L. (1974)
Fluorimetric Scanning of Fluoresamine Labeled Proteins in Polyacrylamide Gels
Anal. Biochem. 59, 24-33
- Reetz, M. T. (2000)
Evolution in the test tube as a means to create enantioselective enzymes for use in organic synthesis
Sci. Prog. 83, 157-172
- Rissom, S. (1999)
Membranverfahren für Redoxenzyme
Gasversorgung-Reaktion-Produktextraktion
Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Rogers, P.L., Shin, H.S. und Wang, B. (1997)
Biotransformation for L-Ephedrin production
Adv. Biochem. Eng. Biotech., 56, 33-59
- Rote Liste (1999)
ECV-Editio Cantor Verlag Aulendorf
Herausgeber: Rote Liste[®] Service GmbH
- Schellenberger, A. (1967)
Struktur und Wirkungsweise des aktiven Zentrums der Hefe-Pyruvat-Decarboxylase
Angew. Chem., 79, 1050-1061
- Schellenberger, A. (1998)
Sixty years of thiamin phosphate biochemistry
Biochim. Biophys. Acta, 1385, 177-186
- Schmitz, S. (1997)
Enzymatische Synthese von aromatischen α -Hydroxyketonen
Diplomarbeit, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen

-
- Schomburg, D. und Stephan, D. (eds.) (1997)
Enzyme Handbook 13
GBF-Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York
 - Scopes, R. K. (1993)
Protein Purification
-Principles and Practice-
3rd Edition, Springer Verlag New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo
 - Seely, R.J., Heefner, D.L., Hageman, R.V., Yarus, M.J. and Sullivan S.A. (1990)
A process for producing L-Phenyl-Acetylcarbinol (PAC), an immobilized cell mass for use in the processes and a method for preparing the cell mass
International Patent Nr. WO 90/04639
 - Seely, R.J., Heefner, D.L., Hageman, R.V., Yarus, M.J. and Sullivan S.A. (1994)
Process for making L-Phenyl-Acetylcarbinol (PAC), microorganisms for use in the process, and a method of preparing the microorganisms
U.S. Patent Nr.: 5,312,742
 - Segel, H. (1975)
Enzyme Kinetics behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems
p. 560 ff.
Wiley Interscience New York London
 - Shin, H. S. und Rogers, P. L. (1996)
Production of L-Phenylacetylcarbinol (L-PAC) from benzaldehyde using partially purified pyruvate decarboxylase
Biotech. Bioeng., 49, 52-62
 - Siegert, P. (2000)
Vergleichende Charakterisierung der Decarboxylase- und Carboligasereaktion der Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* und der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* mittels gerichteter Mutagenese
Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
 - Sigma (2000)
Biochemikalien und Reagenzien für die Life Science Forschung
Katalog 2000, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
 - Skandalis, A., Encell, L. P. und Loeb, L. A. (1997)
Creating novel enzymes by applied molecular evolution
Chemistry and Biology, 4, 889-898

- Slusarczyk, H., Felber, S., Kula, M.-R. und Pohl, M. (2000)
Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues
Eur. J. Biochem., 267, 1280-1289
- Sprenger, G. A. und Pohl, M. (1999)
Synthetic potential of thiamine diphosphate-dependent enzymes
J. Mol. Cat. B: Enzymatic, 6, 145-159
- Theil, F. (1997)
Enzyme in der organischen Synthese
Spektrum Verlag Heidelberg Berlin Oxford
- The QIAexpressionist (1982)
2nd edition, 1982
Qiagen GmbH
- Tripathi, C.M., Agarwal, S.C. und Basu, S.K. (1997)
Production of L-Phenylacetylcarbinol by fermentation
J. Ferment. Bioeng., 84.6, 487-492
- Ullrich, J. (1970)
Yeast pyruvate decarboxylase (2-oxoacid carboxylase EC 4.1.1.1.)
Assay of thiamin pyrophosphate
Meth. Enzymol., 18, 109-115
- Umweltministerium Bayern (2000)
www.umweltministerium.bayern.de/service/umwberat/kupfer_w.htm
- Voigt, C. A., Kauffman, S. und Wang, Z. G. (2000)
Rational evolutionary design: the theory of in vitro protein evolution
Adv. Protein Chem., 55, 79-160
- Wang, J., Golbik, R., Seliger, B., Spinka, M., Tittmann, K., Hübner, G. und Jordan, F. (2001)
Consequences of a modified putative substrate activation site on catalysis by yeast pyruvate decarboxylase
Biochemistry, 40, 1755-1763
- Ward, O. P. und Baev, M. V. (2000)
Decarboxylases in stereoselective catalysis
in: Stereoselective Biocatalysis; p. 267-287
ed. by R. N. Patel
Marcel Dekker, Inc.; New York Basel
- Wrotnowski, C. (1997)
Unexpected niche applications for industrial enzymes drives market growth
Gen. Eng. News, February 1, p.14+30

-
- Yano, T.; Oue, S. und Kamamiyama, H. (1998)
Directed evolution of an aspartate amino transferase with new substrate specificities
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 5511-5515
 - ZCH, Zentralabteilung Chemische Analysen des FZ Jülich, 1998

8. Anhang

8.1 Chirale HPLC: Chromatogramm zur Bestimmung des ee-Wertes von (*R*)-PAC

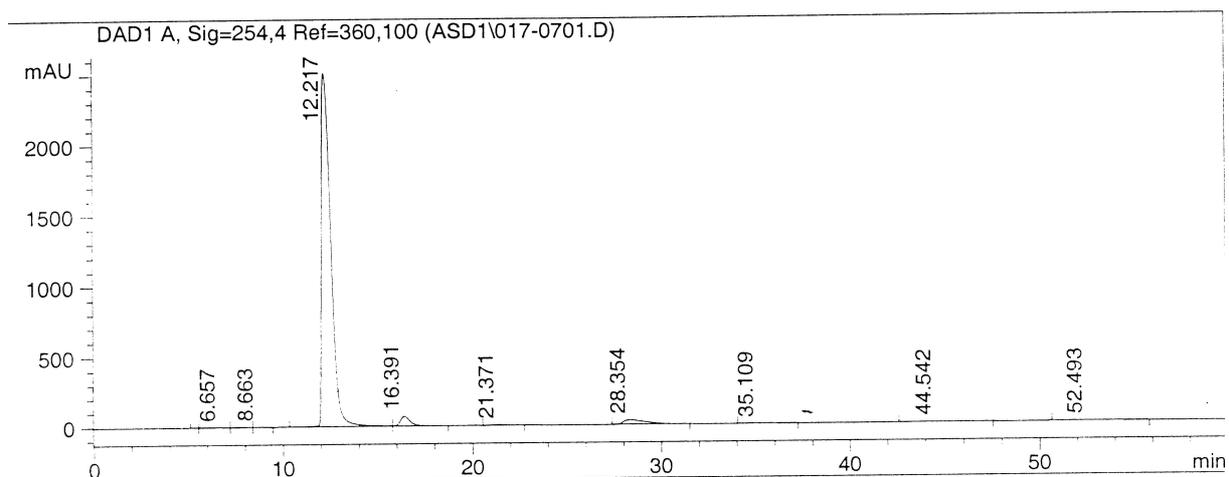


Abb. 46: Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von Phenylacetylcarbinol mittels chiraler HPLC.

Batch-Synthese von (*R*)-Phenylacetylcarbinol mit PDC-W392M-His₆ ausgehend von 30 mM Acetaldehyd und 30 mM Benzaldehyd (ee > 98%)

Zuordnungstabelle:

Retentionszeit [min]	Substanz
12,2	(<i>R</i>)-Phenylacetylcarbinol
16,4	(<i>S</i>)-Phenylacetylcarbinol
28,4	Benzaldehyd

8.2 Chirale GC: Chromatogramm zur Bestimmung des ee-Wertes (*R*)-PAC

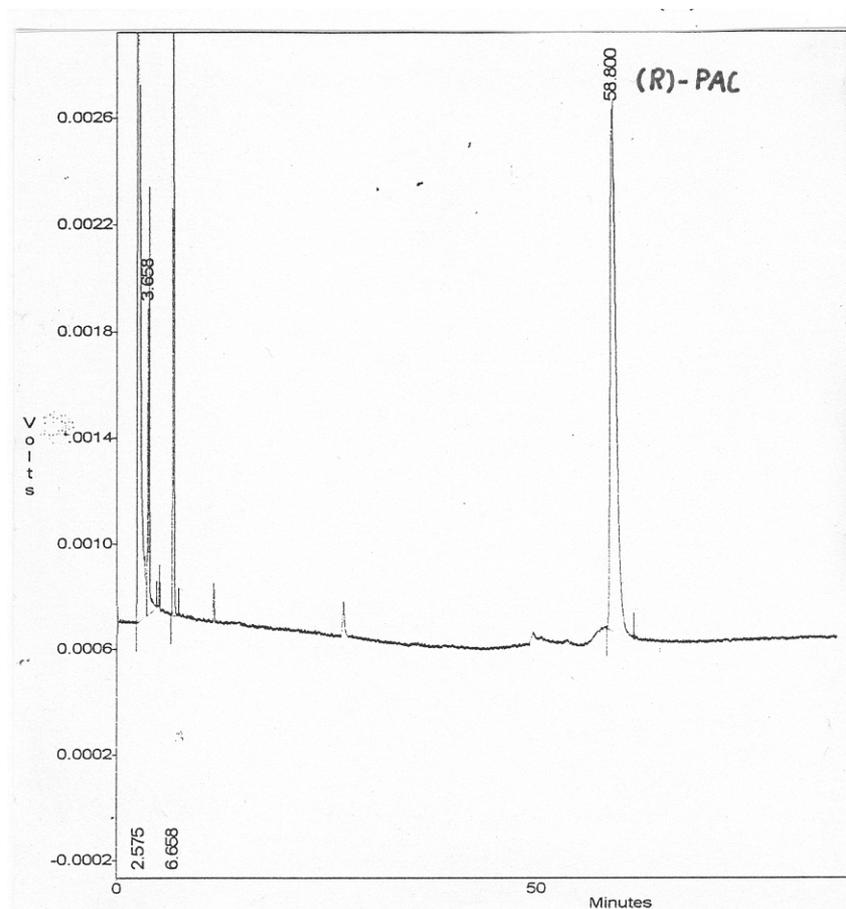


Abb. 47: Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von Phenylacetylcarbinol mittels chiraler GC.

Batch-Synthese von (*R*)-Phenylacetylcarbinol mit PDC-W392M-His₆ ausgehend von 30 mM Acetaldehyd und 30 mM Benzaldehyd (ee > 98%)

Zuordnungstabelle:

Retentionszeit [min]	Substanz
58,8	(<i>R</i>)-Phenylacetylcarbinol
49,5	(<i>S</i>)-Phenylacetylcarbinol

8.3 HPLC: Chromatogramm zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von (*R*)-PAC

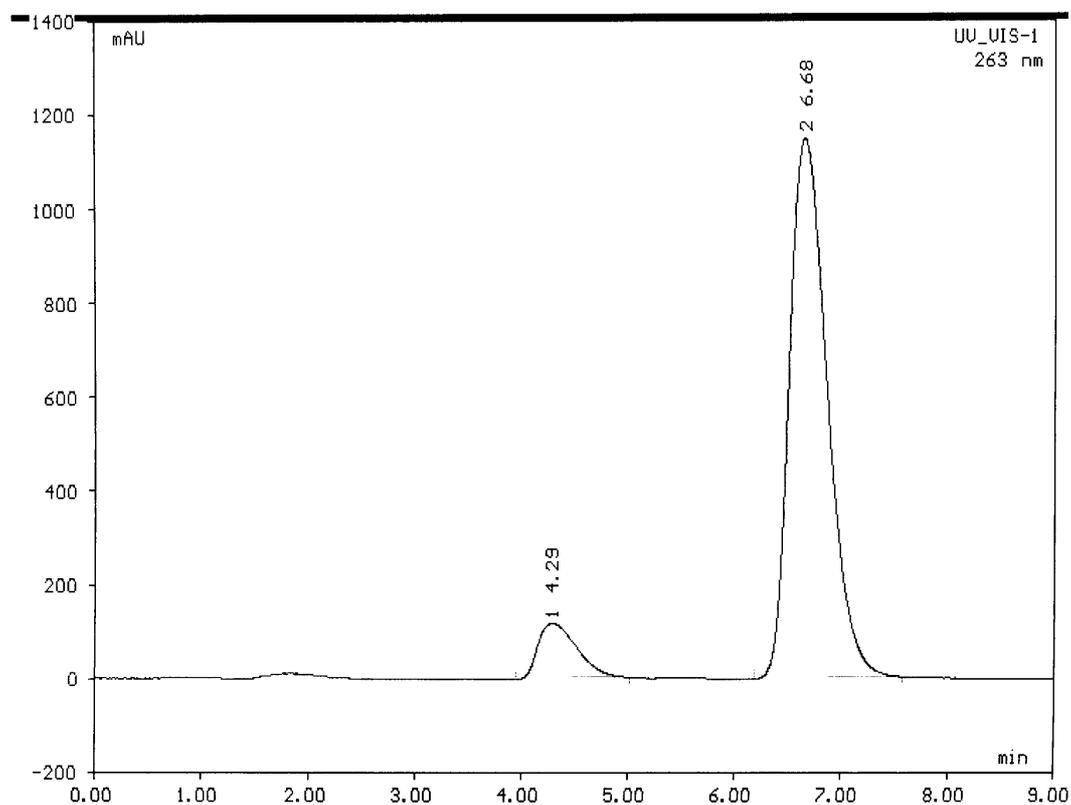


Abb. 48: Quantitative und qualitative Bestimmung von Phenylacetylcarbinol mittels RP-HPLC.

Kontinuierliche Synthese von (*R*)-Phenylacetylcarbinol mit PDC-W392M-His₆ (Rohextraktcharge) ausgehend von 30 mM Acetaldehyd und 30 mM Benzaldehyd (ee>98%) im Reaktionssystem mit getrennten Filtrations- und Reaktionsraum; 4. Synthesestunde

Zuordnungstabelle:

Retentionszeit [min]	Substanz
4,3	(<i>R</i>)-Phenylacetylcarbinol
6,7	Benzaldehyd