

Eine einfache Strategie zur Reinigung und Immobilisierung von Biokatalysatoren

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Benita Kopka
aus Solingen

Mönchengladbach, September 2014

aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
im Forschungszentrum Jülich

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

Referent: Herr Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Korreferentin: Frau Prof. Dr. Martina Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2014

***“Enzymes are proteins,
things of beauty and a joy forever.”***

Richard Nelson Perham

FEBS Lett. 1976 Feb 4; 62 (SUPPL): E20-29

ZUSAMMENFASSUNG

Die Immobilisierung von Enzymen ist besonders für den industriellen Einsatz von großer Bedeutung, um biokatalytische Prozesse ökonomisch und effizient ermöglichen zu können. Jedoch stellen aufwendige Enzymreinigungs- und Immobilisierungsverfahren einen großen Kosten- und Arbeitsaufwand dar, sodass eine möglichst einfache Reinigungs- und Immobilisierungsstrategie für Enzyme wünschenswert wäre, die mit wenigen Schritten und ohne teure Trägermaterialien realisierbar ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierzu die Eignung von alternativen Immobilisierungstags evaluiert. Dazu wurde das Cellulose-Bindemodul der Exoglucanase/Xylanase Cex aus *Cellulomonas fimi*, eine Untergruppe der Kohlenhydrat-Bindemodule (*carbohydrate-binding module*, CBM), als Immobilisierungstag verwendet. Zum einfachen, nicht-invasiven Nachweis der Adsorption bzw. Immobilisierung an das Trägermaterial Cellulose wurde zunächst ein Fusionsprotein bestehend aus dem CBM und einem Flavin-basierten Fluoreszenzprotein (FbFP) erzeugt. Dieses Fusionsmodul wurde im Weiteren mit dem Modellenzym Hydroxynitril-Lyase aus *Arabidopsis thaliana* (AtHNL) fusioniert und die spezifische, affinitätsbasierte Immobilisierung an verschiedene Cellulosematerialien direkt aus *Escherichia coli*-Ganzzellextrakt in einem ausgezeichneten Reinheitsgrad nachgewiesen. Die Untersuchung der AtHNL-Aktivität und Stabilität des freien bzw. immobilisierten Fusionsproteins AtHNL-FbFP-CBM im schwach sauren pH-Bereich zeigte, dass es im Vergleich zur wildtypischen AtHNL über eine deutlich erhöhte pH-Stabilität verfügt, welche durch die Immobilisierung weiter verbessert werden konnte. Durch Fluoreszenzmessungen konnte des Weiteren die Stabilität der Adsorption an Cellulose im schwach sauren pH-Bereich gezeigt werden. Die Immobilisierung des Fusionsproteins AtHNL-FbFP-CBM auf verschiedenen Cellulosematerialien ermöglichte eine effiziente Produktion des enantiomerenreinen Cyanhydrins (*R*)-Mandelonitril in einem mikrowässrigen Reaktionssystem mit monophasischem Methyl-*tert*-Butylether als Reaktionsmedium. Dabei konnten die Cellulose-basierten Immobilisate mehrfach erfolgreich in der Synthesereaktion wiederverwendet werden. Die hier vorgestellte Immobilisierungsstrategie stellt somit eine hervorragende, alternative Möglichkeit dar, Enzyme auf einfache und kosteneffektive Weise zu immobilisieren.

SUMMARY

The immobilization of enzymes is of great importance for industrial applications, i.e. to facilitate economic and efficient biocatalytic processes. However, laborious enzyme purification and immobilization steps represent a major cost and time effort, so that a simple one-step enzyme immobilization strategy without the need for expensive carrier materials would be highly desirable. As part of this thesis the applicability of alternative immobilization tags was evaluated. For that purpose the cellulose-binding module of the exoglucanase/xylanase Cex from *Cellulomonas fimi*, a subfamily of the carbohydrate-binding modules (CBMs), was used as immobilization tag. To enable the easy, non-invasive detection of the adsorption or rather immobilization onto the carrier material cellulose, a fusion protein containing the CBM and a flavin-based fluorescent protein (FbFP) was constructed. This protein module was afterwards fused to the model enzyme hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* (AtHNL) and the specific, affinity-based immobilization to various cellulosic materials with an excellent purity directly from an *Escherichia coli* whole-cell extract was demonstrated. The investigation of AtHNL activity and stability of the free and immobilized fusion protein AtHNL-FbFP-CBM in the weakly acidic pH range revealed a significantly increased pH stability in comparison to the wild-type AtHNL. The stability was further improved by immobilization. Furthermore, the stability of adsorption to the cellulosic material in the weakly acidic pH range could be shown by fluorescence measurements. Immobilization of the fusion protein AtHNL-FbFP-CBM on various cellulosic materials enabled the efficient production of the enantiomerically pure cyanohydrin (*R*)-mandelonitrile in a micro-aqueous reaction system with monophasic methyl *tert*-butyl ether as the reaction medium. The cellulose-based immobilizates could be repeatedly and successfully reused in the synthesis reaction. In conclusion, the here presented immobilization strategy represents a promising alternative method to immobilize enzymes in a simple and cost-effective manner.

PUBLIKATIONEN

Publikationen in Fachjournalen

B. Kopka, M. Diener, A. Wirtz, M. Pohl, K.-E. Jaeger, U. Krauss (2015). **Purification and simultaneous immobilization of *Arabidopsis thaliana* hydroxynitrile lyase using a family 2 carbohydrate-binding module.** *Biotechnol J.*; Mar 9: doi: 10.1002/biot.201400786 [Epub ahead of print]

K. E. Scholz, B. Kopka, A. Wirtz, M. Pohl, K.-E. Jaeger, U. Krauss (2013). **Fusion of a flavin-based fluorescent protein to hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* improves enzyme stability.** *Appl Environ Microbiol.*; 79 (15): 4727-4733

K. E. Scholz, D. Okrob, B. Kopka, A. Grünberger, M. Pohl, K.-E. Jaeger, U. Krauss (2012). **Synthesis of chiral cyanohydrins by recombinant *Escherichia coli* cells in a microaqueous reaction system.** *Appl Environ Microbiol.*; 78 (14): 5025-5027

Vorträge

K.-E. Jaeger*, M. Diener, B. Kopka, M. Pohl, U. Krauss (2014). **CatIBs – highly stable, catalytically-active enzyme inclusion bodies.** *10th International Conference on Protein Stabilisation, ProtStab*, Stresa (Italien)

M. Diener*, B. Kopka, K. E. Scholz, M. Ansorge-Schumacher, M. Pohl, K.-E. Jaeger, U. Krauss (2013). **Alternative strategies for the stabilization of *Arabidopsis thaliana* hydroxynitrile lyase.** *BioNoCo Summer School 2013*, Aachen (Deutschland)

* Vortragender

Posterpräsentationen

B. Kopka, M. Pohl, K.-E. Jaeger, M. Ansorge-Schumacher, U. Krauss (2013). **Fluorescence reporters for the study of biocatalysts in non-conventional media.** *BioNoCo Summer School 2013*, Aachen (Deutschland)

B. Kopka, M. Pohl, K.-E. Jaeger, M. Ansorge-Schumacher, U. Krauss (2013). **Fluorescence reporters for the study of biocatalysts in non-conventional media.** *11th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, Biotrans*, Manchester (England)

B. Kopka, K. E. Scholz, M. Pohl, K.-E. Jaeger, M. Ansorge-Schumacher, U. Krauss (2012). **Fluorescence reporters for the analysis of whole-cell biocatalysts in non-conventional media.** *Zing Biocatalysis Conference 2012, Xcaret* (Mexiko)

DANKSAGUNG

Ein großer Dank gilt allen, die mir bei meiner Doktorarbeit geholfen und mich unterstützt haben. Bei einigen möchte ich mich an dieser Stelle besonders bedanken.

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger vom Institut für Molekulare Enzymtechnologie danke ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Martina Pohl vom Institut für Bio- und Geowissenschaften, IBG-1: Biotechnologie des Forschungszentrums Jülich danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats sowie für ihre zahlreichen Anregungen, Tipps und Ideen.

Dem DFG-Graduiertenkolleg „Biocatalysis using non-conventional media“ (BioNoCo, GRK 1166) der RWTH Aachen danke ich für die Finanzierung meiner Promotionsstelle im Rahmen des mir zuerkannten Stipendiums. Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Kollegs für die freundliche Atmosphäre bei den zahlreichen Workshops, Fortbildungskursen und Konferenzen bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ulrich Krauss vom Institut für Molekulare Enzymtechnologie für die sehr engagierte, freundschaftliche und humorvolle Betreuung während der gesamten Doktorarbeit. Für seine sehr guten wissenschaftlichen Anregungen, Tipps und Ideen zu neuen Experimenten möchte ich ihm danken.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie danke ich für das freundliche, hilfsbereite Arbeitsklima und die schöne Zeit.

Bei den ehemaligen und derzeitigen Kolleginnen und Kollegen der AG Molekulare Biophotonik Kathrin Scholz, Katrin Jentzsch, Raj Rani, Marco Kaschner, Timo Fettweiß und Judith Krause möchte ich mich für die schöne Zeit, sowohl im Labor als auch im Büro, die freundschaftliche Atmosphäre und die guten Ideen und Tipps bedanken.

Aischarya Brahma vom Institut für Bio- und Geowissenschaften, IBG-1: Biotechnologie des Forschungszentrums Jülich danke ich für die Bereitstellung der wildtypischen AtfHNL und ihre freundliche Hilfe bei allen Fragen im „Gift“-Labor des IBG-1.

Ganz besonders möchte ich mich bei Martin Diener für die wissenschaftliche Unterstützung bei meinen ersten Mandelonitril-Synthesereaktionen mit „HCN-Plörre“ bedanken. Auch danke ich ihm für die guten Tipps zu Experimenten und für die vielen Diskussionen im Labor- und Büroalltag. Doch vor allem für die jahrelange nicht-wissenschaftliche Unterstützung, die Motivation während des Studiums, der Promotion und in der Schreibphase möchte ich ihm besonders danken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung während der gesamten Studien- und Promotionszeit.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	II
PUBLIKATIONEN	III
DANKSAGUNG	V
INHALTSVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGEN	X
1 EINLEITUNG	1
1.1 Enzyme als Biokatalysatoren	1
1.2 Biokatalyse in nicht-konventionellen Medien	3
1.3 Immobilisierung von Enzymen	4
1.3.1 Immobilisierung mittels Adsorption	5
1.3.2 Immobilisierung mittels kovalenter Bindung	6
1.3.3 Immobilisierung mittels Einschluss	8
1.3.4 Einsatz von immobilisierten Enzymen in der Biokatalyse	9
1.4 Die Hydroxynitril-Lyase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
1.5 Cellulose-Bindemodule	13
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	18
2 MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Bakterienstämme	20
2.2 Plasmide	20
2.3 Oligonukleotide	21
2.4 Enzyme	21
2.5 Chemikalien	22
2.6 Anzucht von Bakterien	22
2.6.1 Kultivierung von Flüssigkulturen	23
2.6.2 Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3) in Überexpressionskulturen	24
2.7 Nukleinsäureisolierung und -reinigung	24
2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA	24
2.7.2 Elution von DNA aus Agarosegelen	24
2.7.3 PCR-Produktreinigung	24
2.8 <i>In vitro</i> Rekombination von DNA	25
2.8.1 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	25
2.8.2 Ligation von DNA-Fragmenten	25

2.8.3	Generierung von kurzen DNA-Fragmenten	25
2.9	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA (modifiziert nach [163])...	26
2.9.1	Herstellung von chemisch transformationskompetenten <i>E. coli</i> -Zellen ..	26
2.9.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	27
2.10	Agarose-Gelelektrophorese.....	27
2.10.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	28
2.11	Polymerasekettenreaktion (PCR) (modifiziert nach [164])	28
2.11.1	<i>Touchdown</i> PCR.....	29
2.11.2	Austausch von Basen mittels ortsgerichteter Mutagenese	30
2.12	Proteinchemische Methoden	31
2.12.1	Zellaufschluss	31
2.12.2	Immobilisierung von Proteinen auf Cellulose.....	31
2.12.2.1	Qualitative Adsorption an CA-Membranfilter	32
2.12.2.2	Herstellung von CA-Disks.....	33
2.12.2.3	Präparation von regenerierter amorpher Cellulose (RAC) [166].....	33
2.12.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	34
2.12.3.1	Konzentrationsbestimmung nach Bradford	34
2.12.3.2	Konzentrationsbestimmung anhand der Absorption bei 280 nm	35
2.12.4	Konzentrierung von Proteinlösungen	36
2.12.5	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ..	36
2.12.5.1	Kolloidal Coomassie-Brillant-Blau-Färbung von SDS-Gelen [171] ..	38
2.12.5.2	Ethanol-fällung von Proteinen aus Guanidinhydrochlorid-haltigen Lösungen [172].....	38
2.12.6	Reinigung von Fusionsproteinen.....	39
2.12.6.1	Affinitätschromatographische Reinigung mittels IMAC.....	39
2.12.6.1.1	HisLink™	40
2.12.6.1.2	TALON® Superflow™	40
2.12.6.2	Entsalzung und Reinigung mittels Gelfiltration	40
2.12.7	Bestimmung der AtHNL-Aktivität mittels Mandelonitril-Spaltungsassay.	41
2.12.7.1	Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität	43
2.12.7.2	Bestimmung der pH-Stabilität	44
2.12.8	Synthese von (<i>R</i>)-Mandelonitril	44
2.12.8.1	Herstellung von 2 M HCN-MTBE-Lösung	45
2.12.8.2	MTBE-Vorbehandlung von Immobilisaten.....	46
2.12.8.3	Vorbehandlung von Immobilisaten mit verschiedenen pH-Werten ..	46
2.12.8.4	Recycling von Immobilisaten zur (<i>R</i>)-Mandelonitril-Synthese.....	47
2.12.9	Cellulose-Bindungsassays	47
2.12.9.1	Zeitlicher Verlauf der Adsorption.....	47

2.12.9.2	Bestimmung von Adsorptionsisothermen	48
2.12.9.3	pH-abhängige Desorption von Protein aus RAC-Immobilisaten.....	49
2.13	Spektroskopische Messungen	50
2.13.1	Qualitativer Nachweis von FbFP-Fluoreszenz	50
2.13.2	Messung von Fluoreszenzemissionsspektren.....	50
2.14	DNA-Sequenzierung	51
2.15	Gensynthese.....	51
2.16	Computerprogramme und Webtools	51
2.17	Geräte.....	52
3	ERGEBNISSE.....	53
3.1	Fusionen von CBMs mit dem Fluoreszenzreporter FbFP	53
3.1.1	Auswahl geeigneter CBMs zur Erzeugung von Fusionsproteinen.....	54
3.1.2	Erzeugung der Expressionsvektoren pCBM-FbFP und pFbFP-CBM	55
3.1.3	Heterologe Produktion und Charakterisierung der Fusionsproteine FbFP-CBM und CBM-FbFP	56
3.1.3.1	Interaktion der Fusionsproteine FbFP-CBM und CBM-FbFP mit Cellulose	57
3.2	Fusion der <i>At</i> HNL mit dem Modul FbFP-CBM.....	59
3.2.1	Erzeugung der Expressionsvektoren p <i>At</i> HNL-FbFP-CBM und p <i>At</i> HNL-FbFP	60
3.2.2	Interaktion von <i>At</i> HNL-FbFP-CBM mit Cellulose.....	61
3.2.2.1	Adsorption aus Ganzzellextrakt.....	62
3.2.2.2	Analyse der Adsorptionseigenschaften	65
3.2.3	Untersuchung der <i>At</i> HNL-Aktivität des Fusionsproteins <i>At</i> HNL-FbFP-CBM.....	70
3.2.3.1	Etablierung eines Endpunkt-basierten Mandelonitril- Spaltungsassays	73
3.2.3.2	Bestimmung der <i>At</i> HNL-Aktivität von <i>At</i> HNL-FbFP-CBM Immobilisaten	75
3.2.4	Analyse der Desorption von RAC-immobilisiertem Fusionsprotein <i>At</i> HNL-FbFP-CBM anhand der FbFP-Fluoreszenz	78
3.2.5	Anwendung von <i>At</i> HNL-FbFP-CBM-Immobilisaten zur (<i>R</i>)-Mandelonitril-Synthese	83
3.2.5.1	MTBE-Vorbehandlung von RAC-basierten Immobilisaten	87
3.2.5.2	Recycling von Cellulose-basierten <i>At</i> HNL-FbFP-CBM- Immobilisaten.....	89
3.2.5.2.1	Recycling von RAC-basierten Immobilisaten	90
3.2.5.2.2	Recycling von CA-basierten Immobilisaten.....	91

4	DISKUSSION	95
4.1	FbFP-CBM stellt ein geeignetes Modul zur Generierung weiterer Fusionsproteine dar.....	95
4.2	<i>At</i> HNL-FbFP-CBM kann in einem Schritt aus <i>E. coli</i> -Ganzzellextrakt (GZE) immobilisiert werden.....	97
4.3	Regenerierte amorphe Cellulose (RAC) ist ein geeignetes Trägermaterial mit hoher Bindungskapazität.....	98
4.4	<i>At</i> HNL-FbFP-CBM besitzt eine hohe <i>At</i> HNL-Aktivität und ist bei niedrigen pH-Werten stabil.....	100
4.5	Fluoreszenzmessungen zeigen eine pH-abhängige Freisetzung des Chromophors FMN aus dem RAC-adsorbierten Fusionsprotein <i>At</i> HNL-FbFP-CBM.....	102
4.6	Cellulose-basierte <i>At</i> HNL-FbFP-CBM-Immobilisate eignen sich zur Synthese von (<i>R</i>)-Mandelonitril im organischen, mikrowässrigen Reaktionssystem.....	104
4.6.1	RAC- und CA-basiertes Immobilisat kann mehrfach zur (<i>R</i>)-Mandelonitril-Synthese wiederverwendet werden.....	105
4.6.2	Vergleich der Cellulose-basierten <i>At</i> HNL-FbFP-CBM-Immobilisate mit herkömmlichen <i>At</i> HNL-Immobilisaten.....	107
4.7	CBMs als alternative Immobilisierungstags für Enzyme im Vergleich zu anderen Strategien.....	112
4.8	Ausblick.....	114
5	ANHANG	116
6	LITERATURVERZEICHNIS	120
	EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	133

ABKÜRZUNGEN

Aminosäuren wurden nach dem gebräuchlichen Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt.

A _{280nm}	Absorption bei 280 nm	min	Minute(n)
Abb.	Abbildung	ml	Milliliter
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz	μ	mikro
A ^t HNL	Hydroxynitril-Lyase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	n	nano
a.u.	<i>arbitrary unit</i>	NTA	Nitrilotriessigsäure
Avicel	Avicel PH-101	OD _{600nm}	optische Dichte bei 600 nm
bp	Basenpaare	p	piko
BSA	Rinderserumalbumin	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
C	Celsius	PCR	Polymerasekettenreaktion
CA	Celluloseacetat	PDB-ID	<i>Protein Data Bank identifier</i>
CBM	<i>carbohydrate-binding module</i>	RAC	regenerierte amorphe Cellulose
DNA	Desoxyribonukleinsäure	REM	Rasterelektronenmikroskop
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat	RT	Raumtemperatur
ee	<i>enantiomeric excess</i>	s	Sekunden
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
FbFP	Flavin-basiertes Fluoreszenzprotein	SV	Säulenvolumen
FMN	Flavinmononukleotid	Tab.	Tabelle
g	Gramm	TB	<i>terrific broth</i>
g	mittlere Erdbeschleunigung	TBE	Tris-Borat-EDTA
GZE	Ganzzelleextrakt	TEA	Triethanolamin
h	Stunde(n)	T _m	Schmelztemperatur
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
k	kilo	U	<i>unit(s)</i>
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz	ÜK	Übernachtkultur
kb	Kilobase	UV	Ultraviolett
kDa	Kilo Dalton	UpM	Umdrehungen pro Minute
l	Liter	V	Volt
LacZ	β-Galaktosidase	VE	vollentsalzt
LB	<i>lysogeny broth</i>	v/v	Volumen pro Volumen
LOV	<i>light, oxygen, voltage</i>	w/v	Gewicht pro Volumen
M	Molar (mol/l)		

1 EINLEITUNG

1.1 Enzyme als Biokatalysatoren

Schon seit mehreren tausend Jahren setzt die Menschheit biotechnologische Prozesse ein, um beispielsweise mittels Fermentation Bier, Brot oder Käse zu produzieren [1, 2]. Bei dieser frühen Form der Biotechnologie wurden lebende Mikroorganismen verwendet, z. B. Hefen, die Zucker verstoffwechseln und durch Gärungsprozesse Alkohol und CO₂ erzeugen. Anfang des 19. Jahrhunderts konnten diese alkoholischen Gärungsprozesse wissenschaftlich aufgeklärt und eindeutig auf lebende Hefezellen zurückgeführt werden [3, 4]. Im Jahre 1858 sprach Moritz Traube von dem Vorhandensein von sogenannten Fermenten, die beispielsweise in Hefezellen für Gärungsprozesse verantwortlich sind [5], und 1877 prägte Wilhelm Kühne das Kunstwort Enzym, das aus dem Griechischen abgeleitet ist und sich mit „in Hefe“ übersetzen lässt [6]. In weiteren Studien konnte Eduard Buchner 1897 die zellfreie Gärung beobachten, indem er einen zellfreien Hefeextrakt zur Produktion von Alkohol und CO₂ ausgehend von Zucker verwendete [7]. Diese Entdeckung kann als Begründung der modernen Biokatalyse angesehen werden. Ein Beispiel für den ersten Einsatz von Enzymen zur asymmetrischen Synthese wurde 1913 von Ludwig Rosenthaler beschrieben [8]. Er setzte Bittermandelextrakt ein, mit dessen Hilfe er Blausäure und Benzaldehyd zu (*R*)-Mandelonitril umsetzen konnte.

In den folgenden Jahrzehnten wurden Enzyme eingehend untersucht und hielten Einzug in den täglichen Gebrauch. So wurde beispielsweise 1914 das erste Enzymhaltige Waschmittel von Otto Röhm entwickelt und kommerzialisiert [9]. Auch bei der Herstellung von Fruchtsäften werden Enzyme seit den 1930er Jahren eingesetzt, wo sogenannte Pektinasen zur Klärung des Safts verwendet werden [10]. Die Entwicklung von rekombinanten DNA-Techniken und Methoden zur Enzymreinigung in den 1970er Jahren revolutionierte die Biokatalyse [11-13]. Durch Verwendung dieser neuen molekularbiologischen und biochemischen Möglichkeiten konnten neuartige Biokatalysatoren identifiziert, mittels Mutagenese optimiert und kostengünstig in Mikroorganismen wie beispielsweise *Escherichia coli* heterolog produziert werden [14, 15]. Aufgrund der hohen Chemo-, Regio- und Stereoselektivität von Enzymen werden sie heutzutage unter anderem in der Feinchemikalien-, Agro- und Pharmaindustrie genutzt, um enantiomerenreine Vorstufen oder Produkte herzustellen [16,

17]. Weiterhin sind Enzyme in der Lage, Reaktionen in wässrigen Lösungen bei neutralen pH-Werten und geringen Temperaturen zu katalysieren, was einen ökonomischen Vorteil gegenüber traditionellen, chemischen Katalysatoren darstellen kann. Des Weiteren stellen Enzyme sehr umweltfreundliche Katalysatoren dar, da sie komplett biologisch abbaubar sind [18].

All diese Gründe tragen dazu bei, dass Enzyme heutzutage in nahezu allen Bereichen der Industrie eingesetzt werden (Tab. 1) [18, 19]. Beispielsweise werden in der Papier- und Zellstoffindustrie Laccasen eingesetzt, die das im Holz enthaltene Lignin oxidieren und zu einer Aufhellung des daraus hergestellten Papiers beitragen [20]. Ein weiteres Beispiel der industriellen Nutzung von Enzymen ist der Einsatz von Pektat-Lyasen in der Textil-Industrie. Diese Enzyme bauen das in Rohbaumwolle enthaltene Pektin ab, das eine Verunreinigung für die weitere Verarbeitung und Verwendung der Baumwolle darstellt [21].

Tab. 1: Beispiele für den industriellen Einsatz von Enzymen. Modifiziert nach Jegannathan und Nielsen [22].

Industrie	Prozess	Enzym	Funktion
Papier und Zellstoff	Bleichen	Laccase	Oxidation von Lignin
Leder	Beizen	Protease, Lipase	Entfernung von Haaren und Fett
Textil	Auswaschung	Pektat-Lyase	Abbau von Pektin in Rohbaumwolle
Waschmittel	Waschen	Protease, Lipase, Amylase, Cellulase	Fleckentfernung
Nahrung und Getränke	Fruchtsaftproduktion	Pektinase	Saftklärung durch Abbau von Pektin
Futtermittel	Futterproduktion	Protease	Hydrolyse von Proteinen im Futter
Feinchemikalien	α -Naphthol-Produktion	Monooxygenase	Oxidation von Naphthalin
Pharma	6-Aminopenicillansäure-Produktion	Penicillin Amidase	Deacetylierung von Penicillin
Kosmetik	Esterproduktion	Lipase	Transesterifizierung von pflanzlichen Ölen
Biodiesel	Methylesterproduktion	Lipase	Transesterifizierung von Ölen mit Methanol

Ein Vorteil der Nutzung von Enzymen gegenüber chemischen Katalysatoren ist zudem, dass die gewünschten Reaktionen oftmals effizienter und in weniger Schritten realisiert werden können [23, 24]. So benötigt beispielsweise die chemokatalytische Herstellung des Typ-2 Diabetesmittels Sitagliptin einen Übergangsmetall-basierten Hydrogenierungskatalysator und mehrere Reaktionsschritte. Der Einsatz einer mittels molekularbiologischer Methoden optimierten ω -Transaminase konnte die Ausbeute an Sitagliptin verbessern, die Produktivität erhöhen und die Produktion von Abfall reduzieren [25].

Die Tatsache, dass Enzyme Reaktionen in wässrigen Medien katalysieren, kann jedoch einen Nachteil darstellen, wenn es um die Umsetzung von sehr hydrophoben Substraten geht, die schwer in Wasser löslich sind. Für solche Reaktionen wäre beispielsweise der Einsatz von Enzymen in organischen Lösungsmitteln wünschenswert.

1.2 Biokatalyse in nicht-konventionellen Medien

Für Enzyme stellt Wasser das natürliche Lösungsmittel dar, sodass alle von Wasser abweichenden Medien als nicht-konventionelle Medien bezeichnet werden. Dazu gehören beispielsweise organische Lösungsmittel [26], ionische Flüssigkeiten [27] und superkritische Fluide [28], aber auch die Gasphasenkatalyse [29] kann dazu gerechnet werden. Die Gemeinsamkeit der nicht-konventionellen Medien stellt dabei ein reduzierter Wasseranteil dar [30]. Bereits in den 1930er Jahren konnte von Sym die Aktivität einer Esterase in organischen Lösungsmitteln gezeigt werden [31]. Jedoch wurde dieses Phänomen erst in den 1980er Jahren unter anderem von Klivanov weiter untersucht und die Aktivität von verschiedenen Enzymen in organischen Lösungsmitteln nachgewiesen [32-35].

Dabei weist der Einsatz von Enzymen in nicht-konventionellen Medien einige Vorteile gegenüber der Katalyse in Wasser auf [26]. Schwer wasserlösliche Substrate können beispielsweise in nicht-konventionellen Medien meist besser gelöst werden als in wässrigen Systemen, wodurch ein breiteres Spektrum an Produkten zugänglich wird. Auch die Verschiebung von chemischen Gleichgewichten stellt einen Vorteil dar, da so beispielsweise Produktausbeuten verbessert werden können [36]. Des Weiteren werden häufig Nebenreaktionen unterdrückt, die in wässriger Umgebung ablaufen würden [37]. Auch die mögliche Beeinflussung der Chemo- und Stereoselektivität

stellt einen Vorteil des Einsatzes von nicht-konventionellen Medien dar [38-41]. Durch die Verwendung von nicht-konventionellen Medien in der Biokatalyse können sich jedoch auch Probleme ergeben. So können beispielsweise Enzyme in reinen organischen Lösungsmitteln oder in Zweiphasen-Systemen inaktiviert werden. Des Weiteren zeigen isolierte Enzyme in diesen Medien oftmals eine verringerte Aktivität und können nicht effizient wiederverwendet werden [38, 40, 42].

Nicht-konventionelle Medien spielen beispielsweise bei der biokatalytischen Produktion von Biodiesel durch Lipasen eine Rolle [43]. Dabei kommt es zu einer Transesterifizierung von Triacylglyceriden und dem organischen Lösungsmittel Methanol, wodurch Fettsäure-Methylester entstehen. Doch auch bei der enzymatischen Herstellung von chiralen Bausteinen und Produkten, z. B. von fluorierten Aminosäurederivaten [44] oder von antiviralen Arzneimitteln [45] in der Pharmaindustrie, finden nicht-konventionelle Medien Anwendung.

1.3 Immobilisierung von Enzymen

Für einen ökonomisch rentablen Einsatz von Enzymen als Biokatalysatoren in der Industrie müssen sie entweder für mehrere Reaktionen wiederverwendbar sein oder in kontinuierlichen Prozessen eingesetzt werden können [46]. Weiterhin müssen Enzyme unter den Prozessbedingungen stabil sein. Daher werden Enzyme für den industriellen Einsatz häufig immobilisiert, um eine einfache Abtrennung und eine Wiederverwendung zu ermöglichen [47, 48]. Die Geschichte der Immobilisierung von Enzymen reicht dabei weit zurück. 1916 beschrieben erstmals Nelson und Griffin die Immobilisierung einer Invertase auf Aluminiumhydroxid bzw. Aktivkohle [49]. Im Laufe der Jahre wurde eine Vielzahl weiterer Immobilisierungsstrategien entwickelt, die sich grundlegend in drei Konzepte unterteilen lassen [50]. Dabei kann die Immobilisierung von Enzymen entweder durch Adsorption bzw. durch kovalente Bindung an ein Trägermaterial oder durch Einschluss erfolgen (Abb. 1).

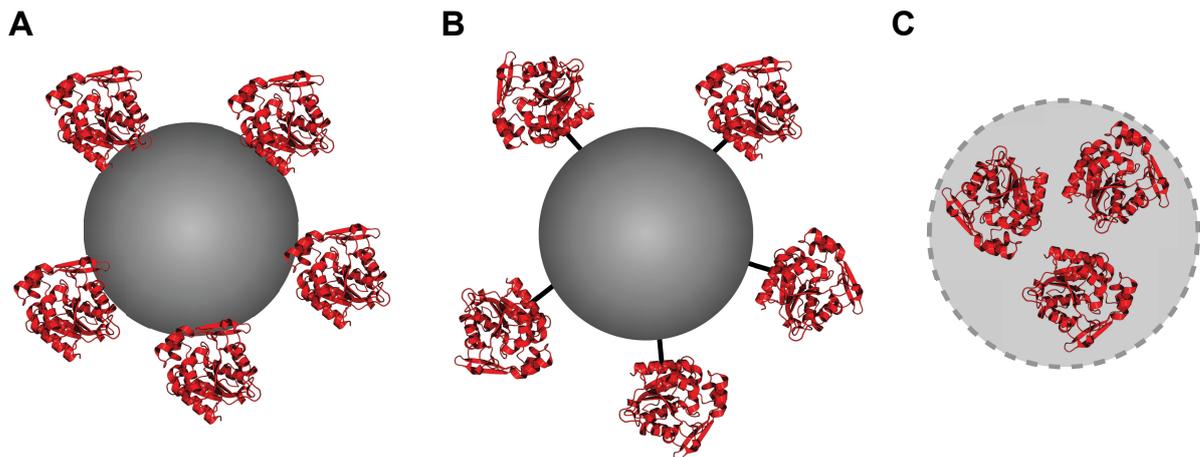


Abb. 1: Verschiedene Konzepte der Immobilisierung von Enzymen. **A** Adsorption des Enzyms an ein Trägermaterial. **B** Kovalente Bindung des Enzyms an ein Trägermaterial. **C** Einschluss des Enzyms in ein abgetrenntes Kompartiment.

1.3.1 Immobilisierung mittels Adsorption

Die Immobilisierung mittels Adsorption an ein Trägermaterial kann weiterhin anhand der Art der Adsorption unterteilt werden [51]. So wird beispielsweise Adsorption durch hydrophobe Wechselwirkungen, durch ionische Wechselwirkungen, durch Interaktion mit Metallionen und affinitätsbasierte Adsorption unterschieden (Abb. 2) [52-54].

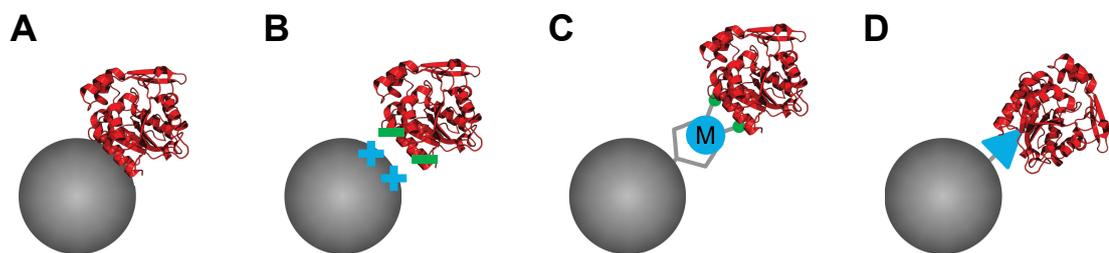


Abb. 2: Verschiedene Arten der Immobilisierung mittels Adsorption. **A** Hydrophobe Bereiche des Enzyms interagieren mit der hydrophoben Oberfläche des Trägermaterials. **B** Geladene Aminosäurereste des Enzyms interagieren über ionische Wechselwirkungen mit gegensätzlich geladenen Funktionalitäten des Trägermaterials. **C** Spezielle Tags (z. B. His-Tag) des Enzyms ermöglichen die Immobilisierung durch Interaktion mit am Trägermaterial chelatisierten Metallionen. **D** Das Enzym besitzt Affinität zu einem auf dem Trägermaterial immobilisierten Partner (z. B. einem Liganden).

Bei der Adsorption über hydrophobe Wechselwirkungen kommt es zur Immobilisierung durch Wechselwirkungen von hydrophoben Bereichen des Enzyms und des Trägermaterials (Abb. 2 A). Die hydrophoben funktionellen Gruppen, wie beispielsweise Butyl-, Hexyl- oder Octylreste, werden dazu zunächst kovalent an ein Trägermaterial gebunden [55]. Dies können unter anderem natürliche Polymere wie

Cellulose [56] oder Agarose [57], anorganische Polymere wie Silica [58] oder synthetische Polymere wie Sepabeads sein [59]. Gerade für Enzyme mit stark ausgeprägten hydrophoben Oberflächenbereichen, wie beispielsweise Lipasen, eignet sich diese Art der Immobilisierung gut [59, 60].

Für die Adsorption mittels ionischer Wechselwirkungen werden Trägermaterialien benötigt, die geladene funktionelle Gruppen besitzen, welche anschließend mit ebenfalls geladenen Aminosäureresten des Enzyms interagieren (Abb. 2 B). Bei diesen Trägermaterialien handelt es sich unter anderem um klassische Ionenaustauschermaterialien, die oftmals Derivate von quervernetzten Polysacchariden sind, beispielsweise Cellulose oder Sepharose [61]. Diese Materialien verfügen über ionische Funktionalitäten, die entweder einen anionischen oder kationischen Charakter besitzen. Beispielsweise werden kationische Diethylaminoethyl- oder anionische Carboxymethyl-Funktionalitäten verwendet [62, 63].

Eine weitere Art der Immobilisierung mittels Adsorption beruht auf der Interaktion des Enzyms mit Metallionen, die über chelatisierende Reste an ein Trägermaterial gebunden sind (Abb. 2 C). So werden beispielsweise carboxymethylierte Amine wie Nitrilotriessigsäure an Trägermaterialien wie Sepharose gebunden, die mit zweiwertigen Übergangsmetallionen (z. B. Ni^{2+}) beladen werden [64]. Für die Immobilisierung muss das Enzym über einen mittels molekularbiologischer Methoden fusionierten Affinitätstag verfügen, beispielsweise einen Hexahistidin-Tag (His_6), der spezifisch mit den immobilisierten Metallionen interagiert [13, 65].

Bei der affinitätsbasierten Adsorption werden beispielsweise Antikörper auf ein Trägermaterial gebunden und zur Immobilisierung des entsprechenden Antigens genutzt (Abb. 2 D) [66]. In diese Kategorie der Immobilisierung mittels Adsorption fällt auch die Nutzung des sogenannten Strep-Tags, welcher spezifisch mit dem an ein Trägermaterial gebundenen Protein Streptavidin interagiert [67, 68].

1.3.2 Immobilisierung mittels kovalenter Bindung

Die Immobilisierung von Enzymen mittels kovalenter Bindung kann weiter unterteilt werden in Trägermaterial-basierte und Trägermaterial-freie Immobilisierung (Abb. 3) [69]. Bei der Immobilisierung mit Trägermaterial wird das Enzym kovalent über spezielle Aminosäurereste an ein Material gebunden, welches mit entsprechenden Funktionalitäten modifiziert ist [70].

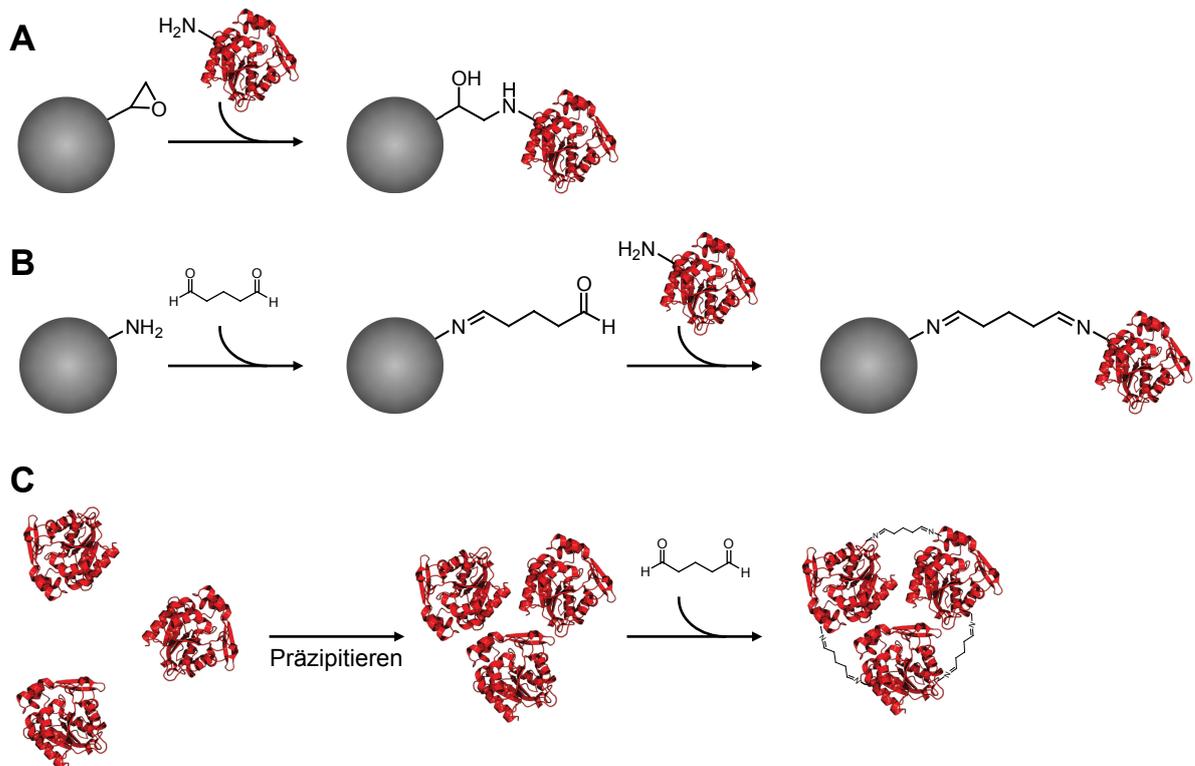


Abb. 3: Verschiedene Möglichkeiten der Immobilisierung von Enzymen mittels kovalenter Bindung. **A** Die Aminofunktionalität des Enzyms kann mit der am Trägermaterial gebundenen Epoxygruppe reagieren, wodurch eine kovalente Bindung entsteht. **B** Eine am Trägermaterial gebundene Aminofunktionalität wird zunächst mit Glutardialdehyd aktiviert, sodass im nächsten Schritt eine Reaktion mit der Aminogruppe des Enzyms ermöglicht wird. Dadurch wird eine kovalente Bindung zwischen Trägermaterial und Enzym hergestellt. **C** Bei der Erzeugung von quervernetzten Enzymaggregaten wird das Enzym zunächst mit einem Fällungsreagenz präzipitiert (z. B. gesättigte Salzlösungen) und anschließend durch Zugabe von Glutardialdehyd quervernetzt. Modifiziert nach Hanefeld *et al.* [71].

Beispielsweise werden synthetische Trägermaterialien eingesetzt, die über Epoxyfunktionalitäten verfügen (z. B. Eupergit C oder Sepabeads) [72, 73]. So können z. B. Aminofunktionen des Enzyms mit den Epoxyresten reagieren und eine kovalente Bindung ausbilden, wodurch das Enzym fest mit dem Trägermaterial verbunden wird (Abb. 3 A). Eine andere Klasse der Trägermaterialien, zu der beispielsweise aminierte poröse Silicate gehören, verfügt über Aminogruppen, die zunächst mit einem bifunktionalen Reagenz wie Glutardialdehyd aktiviert werden müssen, bevor die Bildung einer kovalenten Bindung mit Aminogruppen des Enzyms möglich ist (Abb. 3 B) [74, 75]. Bei der Trägermaterial-basierten Immobilisierung mittels kovalenter Bindung kann das oftmals teure Trägermaterial jedoch nicht zurückgewonnen werden, nachdem das immobilisierte Enzym seine Aktivität verloren hat [76].

Eine Art der Immobilisierung, bei der kein Trägermaterial benötigt wird, ist das Erzeugen von sogenannten quervernetzten Enzymaggregaten (*cross-linked enzyme aggregates*, CLEA) [77]. Dabei wird die Enzymlösung mit einem Fällungsreagenz,

wie z. B. gesättigten Salzlösungen oder wassermischbaren organischen Lösungsmitteln, versetzt, sodass das Enzym präzipitiert (Abb. 3 C). Die Quervernetzung des Enzympräzipitats mit Glutardialdehyd führt anschließend zur Bildung von CLEAs [78, 79].

1.3.3 Immobilisierung mittels Einschluss

Die Immobilisierung von Enzymen kann des Weiteren mittels Einschluss erfolgen (Abb. 4), wobei das Enzym entweder in einem Polymernetzwerk oder in einer semi-permeablen Membran eingeschlossen wird [80, 81]. Zu dieser Kategorie kann auch die Ganzzellkatalyse als natürliche Form des Einschlusses von Enzymen gezählt werden [82].

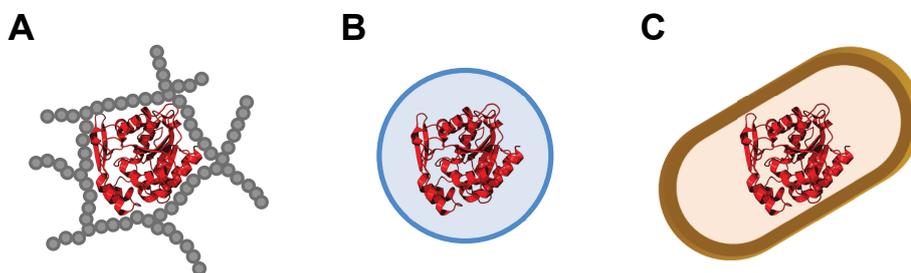


Abb. 4: Verschiedene Arten der Immobilisierung von Enzymen mittels Einschluss. **A** Das Enzym kann in einem Polymernetzwerk (z. B. Sol-Gel) eingeschlossen werden, wobei die Polymerisation in Anwesenheit des Enzyms geschieht. **B** Durch die gezielte Ausbildung einer dünnen Grenzschicht (z. B. Alginat) können membranartige Kompartimente erzeugt werden, in denen das Enzym eingeschlossen ist. **C** Bei der Ganzzellkatalyse ist das Enzym auf natürliche Weise in einer Membran, in Form der Zellmembran, eingeschlossen.

Die einschließende Matrix oder Membran wird in Anwesenheit des Enzyms, beispielsweise durch Polymerisation, hergestellt, sodass das Enzym direkt eingeschlossen wird (Abb. 4 A). Beim Einschluss in einer Matrix werden oftmals sogenannte Sol-Gele auf Siliciumalkoxidbasis verwendet [83]. Die Polymervorstufen, z. B. $\text{Si}(\text{OR})_4$ oder $\text{RSi}(\text{OR})_3$ werden dazu zunächst hydrolysiert, wobei der entsprechende Alkohol frei wird, und anschließend im Beisein des Enzyms zu einem Polymernetzwerk kondensiert. Je nach Wahl der Polymervorstufen und der Art der Trocknung können verschiedene Poren- und Netzstrukturen erzeugt werden [84, 85].

Weiterhin kann der Einschluss von Enzymen beispielsweise mit Alginat erfolgen (Abb. 4 B) [86]. Dabei wird mit einer speziellen Vorrichtung ein Tropfen erzeugt, der im Inneren aus Enzym in Pufferlösung besteht und eine äußere Schicht einer Natrium-Alginat-Lösung besitzt. Dieser Tropfen wird direkt in eine Calciumchlorid-

Lösung getropft, wobei ein Austausch der Natrium-Ionen des Alginats gegen Calcium-Ionen zur Bildung einer stabilen Calcium-Alginatstruktur führt [87], sodass eine dünne Alginat-Schicht um die Enzymlösung herum erzeugt wird [88]. Durch die Grenzschicht können kleine Moleküle ungehindert diffundieren.

Eine natürliche Art der Immobilisierung mittels Einschluss stellt die Verwendung von ganzen Zellen dar, die das gewünschte Enzym überproduziert enthalten (Abb. 4 C). Dabei wirkt die Zellmembran als natürliche Barriere und verhindert eine Inaktivierung oder Freisetzung des Enzyms während des biokatalytischen Einsatzes [82].

1.3.4 Einsatz von immobilisierten Enzymen in der Biokatalyse

Die genannten Immobilisierungskonzepte können des Weiteren kombiniert werden, um die Eigenschaften des resultierenden Immobilisats an die Anforderungen eines industriellen Prozesses anzupassen [89]. So kann beispielsweise das Enzym zunächst per Adsorption an ein Trägermaterial immobilisiert und anschließend in eine Polymermatrix eingeschlossen werden [90]. Durch die Verwendung von immobilisierten Enzymen können industrielle Synthesereaktionen ökonomisch rentabel durchgeführt werden, da das Immobilisat mehrfach verwendet bzw. kontinuierlich genutzt werden kann [91]. Auf diese Weise werden die Kosten für den Biokatalysator sowie für das oftmals teure Trägermaterial reduziert. Ein Beispiel für einen industriellen biokatalytischen Prozess mit immobilisiertem Enzym ist die Herstellung von Maissirup (*high fructose corn syrup*) [92]. Dazu wird auf unterschiedliche Weise immobilisierte Glucoseisomerase verwendet; dieser Prozess stellt mit einer Jahresproduktion von etwa 10^7 Tonnen die größte großtechnische Anwendung von Enzymimmobilisaten dar [89].

Durch die Immobilisierung werden die eingesetzten Enzyme oftmals zusätzlich stabilisiert [93]. Jedoch stellt die Immobilisierung keine generelle Strategie zur Stabilisierung eines Enzyms dar und kann beispielsweise auch inaktivierend wirken oder sogar die Selektivität gravierend verändern [94]. Daher müssen oftmals eine Vielzahl an Immobilisierungsstrategien und Protokolle getestet werden, um eine optimale Lösung für den angestrebten Prozess zu identifizieren [95]. Die Immobilisierung kann des Weiteren in vielen Fällen zu verschiedenen Orientierungen des Biokatalysators im Immobilisat führen, was in Unterschieden der erzielten Aktivität resultieren kann, wenn z. B. das aktive Zentrum blockiert wird. Jedoch können Strategien eingesetzt

werden, die eine gerichtete Immobilisierung des Enzyms zur Folge haben, beispielsweise die Verwendung von Affinitätstags [96, 97].

Die Etablierung und Evaluierung neuer Immobilisierungsstrategien stellt weiterhin eine Herausforderung dar. Dazu werden meist Modellenzyme genutzt, die unter definierten Bedingungen instabil sind, sodass direkt verfolgt werden kann, ob eine Immobilisierung den gewünschten stabilisierenden Effekt zur Folge hat. Ein Beispiel für ein solches instabiles Modellenzym ist die Hydroxynitril-Lyase aus *Arabidopsis thaliana*.

1.4 Die Hydroxynitril-Lyase aus *Arabidopsis thaliana*

Die Hydroxynitril-Lyase aus *Arabidopsis thaliana* (*AtHNL*) wurde im Jahre 2007 entdeckt und als erste (*R*)-selektive HNL mit α/β -Hydrolasefaltung beschrieben [98]. Sie besitzt eine molekulare Masse von etwa 29,2 kDa, wobei sie ein Homodimer in Lösung ausbildet (Abb. 5 A). Des Weiteren verfügt die *AtHNL* über eine katalytische Triade aus den Aminosäureresten Ser81, His236 und Asp208 und benötigt keinen Kofaktor [99]. Sie zeigt ein breites Substratspektrum, das aromatische und aliphatische Aldehyde sowie Ketone umfasst [98]. Allgemein werden HNLs auch Oxynitrilasen genannt und gehören zur Enzymklasse der Aldehyd-Lyase (EC 4.1.2). Sie sind in der Lage, die asymmetrische, reversible Spaltung von Cyanhydrinen in eine Carbonylkomponente und Blausäure zu katalysieren (Abb. 5 B) [100]. Die Spaltungsreaktion ist dabei Bestandteil der Cyanogenese, die häufig von sogenannten cyanogenen Pflanzen zur Abwehr von Fraßfeinden eingesetzt wird [101, 102]. Da *Arabidopsis thaliana* jedoch nicht zu den cyanogenen Pflanzen gehört, stellt die *AtHNL* wahrscheinlich ein evolutionäres Relikt dar [98]. Die Umkehrreaktion, d. h. die asymmetrische Synthese eines Cyanhydrins aus einer Carbonylkomponente und Blausäure, wird auch Hydrocyanierung genannt.

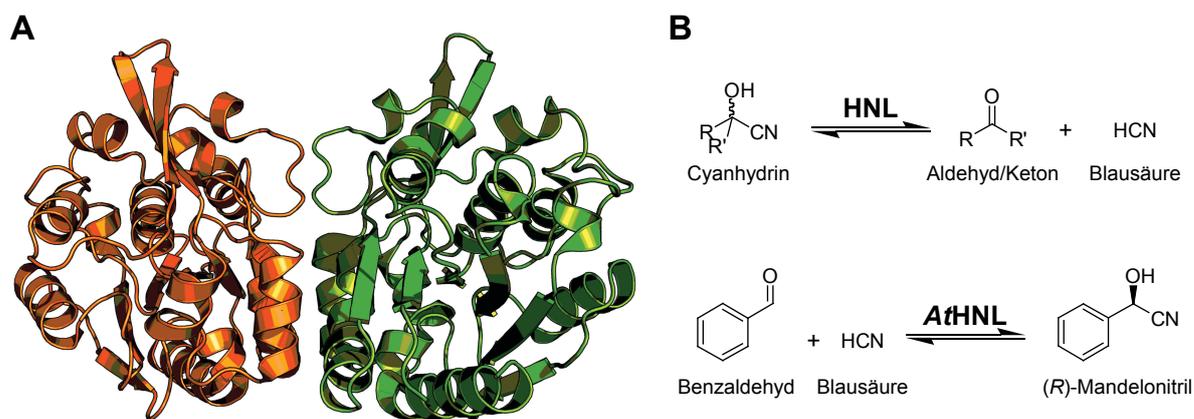


Abb. 5: Dreidimensionale Struktur der dimeren AtHNL und die von HNLs katalysierte Reaktion. **A** Die Struktur des AtHNL-Homodimers (PDB-ID: 3DQZ [99]), wobei die beiden Monomere grün bzw. orange eingefärbt sind. **B** Allgemeine Gleichung der von HNLs katalysierten reversiblen Spaltung eines Cyanhydrins in ein Aldehyd bzw. Keton und Blausäure. Des Weiteren ist die enantioselektive Synthese von (*R*)-Mandelonitril durch die AtHNL ausgehend von Benzaldehyd und Blausäure dargestellt.

HNLs katalysieren die Synthese diverser chiraler Cyanhydrine, die über eine Nitril- und eine Hydroxygruppe verfügen (Abb. 6). Dadurch wird eine Vielzahl von Folgereaktionen ermöglicht, sodass Cyanhydrine interessante chirale Bausteine für Fein- und Agrochemikalien oder für Pharmazeutika darstellen [103-105].

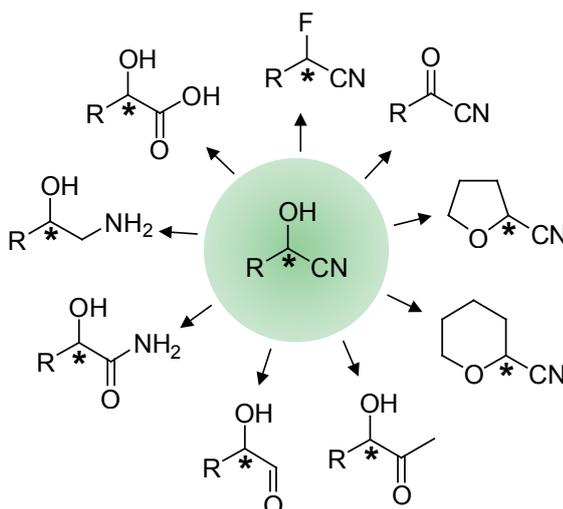


Abb. 6: Cyanhydrine sind interessante, multifunktionale chirale Bausteine für die Industrie. Mithilfe von HNLs können chirale Cyanhydrine erzeugt werden, die als Vorstufe für eine Vielzahl von weiteren chiralen Komponenten genutzt werden können, da das Vorhandensein einer Nitril- und einer Hydroxygruppe im Cyanhydrin viele weitere chemische Reaktionen zulässt. Modifiziert nach Holt und Hanefeld [103].

Mithilfe der (*R*)-selektiven HNL aus *Prunus amygdalus* [106] kann z. B. aus 2-Chlorbenzaldehyd und Blausäure das Cyanhydrin 2-Chlormandelonitril hergestellt werden, welches als Vorstufe für den Gerinnungshemmer Clopidogrel genutzt wird [107]. Auch die (*S*)-selektiven HNLs aus *Hevea brasiliensis* (HbHNL) [108] bzw. *Manihot*

esculenta (MeHNL) [109] werden zur Produktion von Vorstufen für industrielle Produkte eingesetzt. So können sie beispielsweise aus 3-Phenoxybenzaldehyd und Blausäure das Cyanhydrin (S)-3-Phenoxymandelonitril herstellen [105], welches als chiraler Baustein für die Synthese von Insektiziden aus der Klasse der Pyrethroide verwendet wird [110-112].

Bei der durch HNLs katalysierten stereoselektiven Hydrocyanierung müssen die Reaktionsbedingungen jedoch genau kontrolliert werden, da es zu einer nicht-enzymatischen Nebenreaktion kommen kann. Dabei führt die nicht-selektive Addition eines Cyanidions an das Carbonyl-C-Atom des Aldehyds zur Racematbildung, sodass der Enantiomerenüberschuss (*enantiomeric excess*, *ee*) beeinträchtigt wird. Um diese Nebenreaktion zu unterdrücken, kann beispielsweise der pH-Wert im Reaktionsmedium auf unter pH 5 abgesenkt oder der Wassergehalt des Reaktionssystems verringert werden [113, 114]. Daher werden enzymatische Hydrocyanierungen üblicherweise mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel in Zweiphasen-Systemen oder in mikrowässrigen Systemen, d. h. in reinen oder Puffer-gesättigten organischen Lösungsmitteln, durchgeführt [115, 116]. Die AtHNL ist jedoch im schwach sauren pH-Bereich, d. h. in wässrigen Lösungen, deren pH-Wert unter pH 5 liegt [117], instabil und aggregiert in mikrowässrigen Systemen, sodass sie ein geeignetes Modellenzym zur Evaluierung von neuartigen Stabilisierungs- bzw. Immobilisierungsstrategien darstellt.

In vorangegangenen Arbeiten von Okrob *et al.* wurde die AtHNL auf verschiedene Weise immobilisiert, um die Synthese von enantiomerenreinen (*R*)-Cyanhydrinen im organischen, mikrowässrigen Reaktionssystem zu ermöglichen [118, 119]. So wurde die AtHNL mittels Adsorption auf Kieselgur (Celite), mittels Einschluss in einem Sol-Gel und mittels kovalenter Verknüpfung als CLEA immobilisiert. Die erhaltenen AtHNL-Immobilisate konnten erfolgreich zur Synthese von (*R*)-Cyanhydrinen genutzt und mehrfach wiederverwendet werden. Dabei war die Präparation des Celite-basierten Immobilisats mit dem wenigsten Aufwand verbunden. Gleichzeitig wies das Immobilisat den geringsten Aktivitätsverlust in einem Recyclingexperiment auf [118]. Des Weiteren konnte von Scholz *et al.* die AtHNL „immobilisiert“ in ganzen *E. coli*-Zellen für Synthesereaktionen von (*R*)-Cyanhydrinen genutzt werden [120]. Die Präparation von AtHNL-Immobilisaten ist jedoch – bis auf die Verwendung von rekombinanten ganzen Zellen – mit hohen Kosten und Arbeitsaufwand für die vorherige Enzymreinigung mittels Anionenaustauschers verbunden [117, 121]. Auch die Immobilisierungsverfahren benötigen zum Teil teure, gefährliche und giftige

Materialien, wie z. B. Lösungsmittel, Komponenten für die Sol-Gel Herstellung und Glutardialdehyd für die Quervernetzung. Für einen möglichen industriellen Einsatz der AfHNL wäre daher eine Immobilisierungsstrategie wünschenswert, die ohne aufwendige und teure Enzymreinigungsschritte auskommt, kostengünstig sowie schnell durchzuführen ist und ein aktives sowie stabiles Immobilisat liefert.

Dies könnte durch die Verwendung eines Affinitätstags erreicht werden, der die spezifische, affinitätsbasierte und gerichtete Adsorption des Enzyms an ein Trägermaterial erlaubt. Um eine einfache Reinigung und direkte Immobilisierung des Biokatalysators zu ermöglichen, wäre beispielsweise die Nutzung eines His-Tags oder aber eines Cellulose-Bindemoduls denkbar.

1.5 Cellulose-Bindemodule

Cellulose-Bindemodule stellen eine Unterkategorie der Kohlenhydrat-Bindemodule (*carbohydrate-binding modules*, CBMs) dar und kommen als Domänen von modularen Enzymen, die bei der Verstoffwechslung von Cellulose beteiligt sind, z. B. Cellulasen, in allen Reichen des Lebens vor [122-124]. CBMs können sowohl einzeln als auch mehrfach wiederholt in diesen Enzymen auftreten, wobei sie amino- oder carboxy-terminal in Bezug auf die katalytisch aktive Domäne lokalisiert sind [125]. Dabei vermitteln CBMs die Adsorption des Enzyms an das Substrat, beispielsweise unlösliche Cellulose. Durch diese Adsorption wird die Konzentration des Enzyms an der Cellulose-Oberfläche erhöht, was z. B. zu einer Beschleunigung der Enzymkatalysierten Hydrolyse führt [125, 126]. Eine weitere Rolle spielen CBMs bei der gezielten Anlagerung des Enzyms an spezielle Kohlenhydrate in komplexen Strukturen, die beispielsweise in pflanzlichen Zellwänden existieren [127].

Allgemein kommen CBMs in allen Reichen des Lebens vor und sind in der Lage, unterschiedliche Kohlenhydrate zu binden, beispielsweise Cellulose, Chitin [128], Stärke [129], Glykogen [130] und Xylan [131], aber auch verschiedene Zucker, wie z. B. Arabinofuranose [132], Fucose [133], Lactose [134] und Galactose [135]. CBMs werden in der *carbohydrate-active enzymes* (CAZy) Datenbank [136] aufgeführt und anhand ihrer Aminosäuresequenz in 71 Familien (Stand September 2014) eingeteilt, wobei etwa 40.000 Sequenzen hinterlegt sind. Des Weiteren weisen die aufgeführten CBMs sehr unterschiedliche Größen auf, die sich zwischen etwa 40 und 200 Aminosäuren bewegen. Anhand der verfügbaren Kristallstrukturen zeigt sich, dass CBMs

hauptsächlich aus β -Faltblätter bestehen, wobei sie sich anhand ihrer Faltungsmotive in sieben Gruppen weiter unterteilen lassen [124]. Das häufigste Faltungsmotiv ist das sogenannte β -Sandwich [137], bei dem sich zwei Faltblätter, die jeweils aus drei bis sechs antiparallelen β -Strängen bestehen, zu einer Art Sandwich zusammenlagern (Abb. 7 A). Das zweithäufigste Faltungsmotiv ist das sogenannte β -*trefoil*, dessen Struktur an ein dreiblättriges Kleeblatt erinnert, da es eine dreifache Symmetrie aufweist (Abb. 7 B) [138].

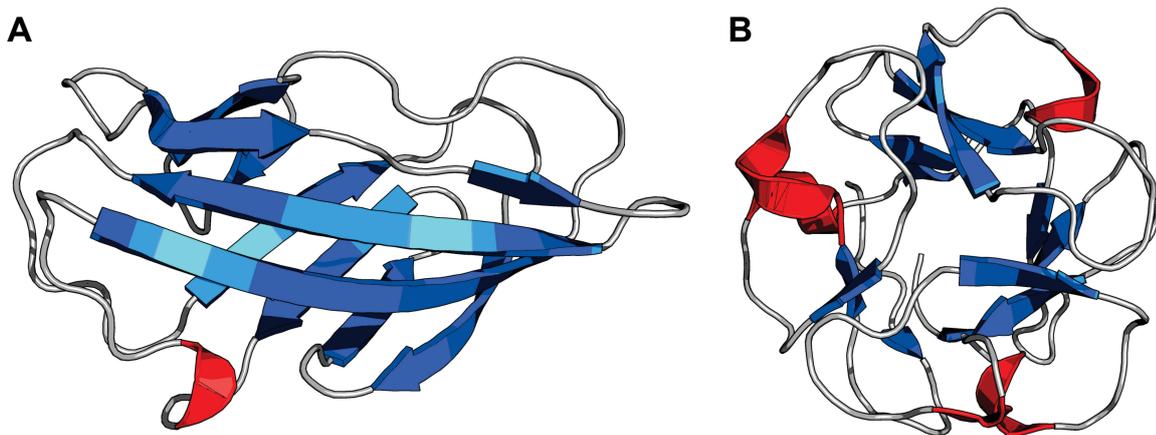


Abb. 7: Exemplarische dreidimensionale Darstellung der häufigen Faltungsmotive β -Sandwich und β -*trefoil* von CBMs. **A** Das Familie-2 carboxy-terminale CBM der Exoglucanase/Xylanase Cex aus *Cellulomonas fimi* (PDB-ID: 1EXG [139]) zeigt das β -Sandwich Faltungsmotiv. Es besteht aus 110 Aminosäuren und weist neben einer kurzen α -Helix zwei β -Faltblätter auf, die aus jeweils fünf β -Strängen aufgebaut sind. **B** Das 130 Aminosäuren lange Familie-13 carboxy-terminale CBM der Xylanase 10A aus *Streptomyces lividans* (PDB-ID: 1MC9 [134]) zeigt das β -*trefoil* Faltungsmotiv. Dabei ordnen sich jeweils vier β -Stränge in einer dreifachen Symmetrie an. In der dreidimensionalen Darstellung sind β -Stränge blau, α -Helices rot und unstrukturierte Loops grau eingefärbt.

CBMs lassen sich jedoch ebenfalls anhand der dreidimensionalen Struktur ihrer Ligandenbindungsstelle bzw. der Art ihrer Ligandenerkennung in die drei Typen A, B und C unterteilen [124]. Generell spielen bei der Ligandenbindung aromatische Aminosäurereste wie Tryptophan und Tyrosin sowie eher selten Phenylalanin eine große Rolle. Diese oberflächenexponierten Aminosäurereste gehen hydrophobe Kontakte mit den Zuckerringen des Kohlenhydrat-Liganden ein [127].

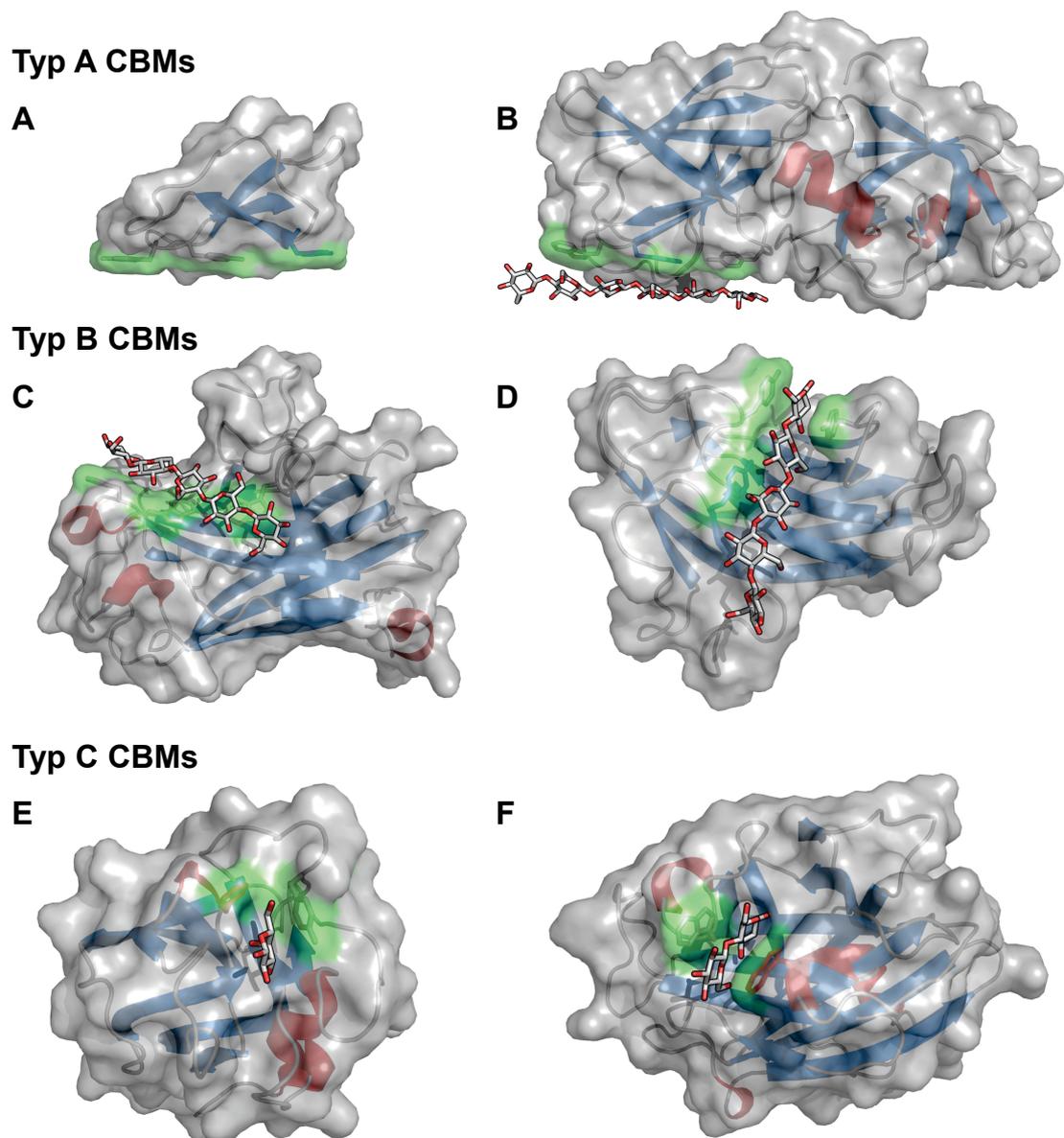


Abb. 8: Veranschaulichung der drei unterschiedlichen Bindungstypen von CBMs anhand der dreidimensionalen Oberflächendarstellung von jeweils zwei Beispiel-CBMs mit entsprechend gebundenem Kohlenhydrat-Liganden (bis auf A). **A** Das Familie-1 carboxy-terminale CBM der Exoglucanase 1 aus *Hypocrea jecorina* (PDB-ID: 1CBH [140]) ist 36 Aminosäuren lang. Die planar angeordneten Aminosäurereste Y5, Y31 und Y32 sind an der Bindung des Liganden beteiligt, wobei die Struktur ohne Liganden gelöst wurde. **B** Expansin 1 aus *Bacillus subtilis* (PDB-ID: 4FER [141]) ist 208 Aminosäuren lang und enthält ein carboxy-terminales Familie-63 CBM. Die planar angeordneten Aminosäurereste W125, W126 und Y157 binden Cellohexose als Liganden. **C** Die Endoglucanase Cel5A aus *Clostridium josui* enthält ein 203 Aminosäuren langes Familie-28 CBM (PDB-ID: 3ACI [142]), in dem die Aminosäurereste W78, F128 und W129 in einer Spalte liegen und Cellopentose als Liganden binden. **D** Das Familie-4 amino-terminale CBM (PDB-ID: 1GU3 [143]) der Endoglucanase C aus *Cellulomonas fimi* ist 149 Aminosäuren lang und kann mit den Aminosäureresten Y19, Y43 und Y85, die in einer Spalte angeordnet sind, Cellopentose als Liganden binden. **E** Die α -N-Acetylglucosaminidase aus *Clostridium perfringens* enthält fünf Familie-32 CBMs, wobei das 161 Aminosäuren lange CBM32-5 (PDB-ID: 4A41 [144]) dargestellt ist, in dem die Aminosäurereste Y1395 und F1483 eine Bindungstasche bilden und mit dem Liganden Galactose interagieren. **F** Das Familie-9 carboxy-terminale CBM (PDB-ID: 1I82 [145]) der Xylanase A aus *Thermotoga maritima* ist 189 Aminosäuren lang. Dabei bilden die Aminosäurereste W71 und W175 eine Bindungstasche, sodass die Interaktion mit Cellobiose ermöglicht wird. Die Liganden (grau: Kohlenstoff, rot: Sauerstoff) sowie die interagierenden Aminosäurereste (farblich nach Sekundärstrukturelement eingefärbt) sind jeweils als Stäbchen dargestellt, wobei die interagierende Oberfläche grün eingefärbt ist.

In Abb. 8 sind die drei CBM Bindungstypen anhand von Beispiel-CBM dargestellt, deren dreidimensionale Struktur in Anwesenheit von Kohlenhydrat-Liganden aufgeklärt wurde (Ausnahme Abb. 8 A). Bei Typ A CBMs bilden drei dieser an der Oberfläche exponierten, aromatischen Aminosäurereste eine planare Struktur aus. Somit werden parallele hydrophobe Wechselwirkungen mit den Zuckerringen von kristallinen Bereichen des Kohlenhydrats, wie beispielsweise Cellulose, ermöglicht (Abb. 8 A, B) [141]. In Typ B CBMs liegen die an der Ligandenbindung beteiligten aromatischen Aminosäurereste in einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Spalte an der Proteinoberfläche [124]. Dadurch sind Typ B CBMs in der Lage, einzelne, isolierte Polymerstränge des Kohlenhydrat-Liganden zu binden, wobei ebenfalls hydrophobe Wechselwirkungen mit den Zuckerringen des Liganden gebildet werden (Abb. 8 C, D). Typ C CBMs verfügen über eine sterisch eingeschränkte Ligandenbindungstasche, die aromatische Aminosäurereste enthält. Somit können Typ C CBMs entweder kurze Kohlenhydratmoleküle wie Mono-, Di- bzw. Trisaccharide oder aber das Ende eines Kohlenhydrat-Polymerstrangs binden (Abb. 8 E, F) [127]. Allgemein spiegelt die Art der Ligandenbindung des CBMs das von der fusionierten katalytischen Domäne akzeptierte Substrat wider. Das CBM ermöglicht somit die zielgerichtete Bindung des Enzyms an geeignete Bereiche von komplexen Kohlenhydratstrukturen, wie sie beispielsweise in pflanzlichen Zellwänden existieren. Durch diese CBM-vermittelte räumliche Nähe des Enzyms und des Substrats wird eine effiziente Verstoffwechslung gewährleistet [146].

Eine Vielzahl von CBMs kann an Cellulose binden [125], welche in allen höheren Pflanzen [147] sowie in bestimmten Spezies von marinen Manteltieren [148], Bakterien [149] und Algen [150] vorkommt und mit einer geschätzten jährlichen Produktion von etwa 10^{11} bis 10^{12} Tonnen das häufigste Biopolymer auf der Erde darstellt [151-153]. Cellulose besteht aus β -D-Glucosemolekülen, die miteinander verknüpft sind, wobei sich der Polymerisationsgrad je nach Herkunft und vorgenommener Behandlung der Cellulose unterscheidet (Abb. 9 A). So besitzen pflanzliche Fasern, wie beispielsweise Baumwolle, einen Polymerisationsgrad von 800 bis 10.000. Auch bakterielle Cellulose weist einen ähnlichen Polymerisationsgrad auf. Weiterhin kann durch partiellen Kettenabbau sogenannte mikrokristalline Cellulose gewonnen werden, die einen Polymerisationsgrad von 150 bis 300 zeigt [151].

In der Cellulose sind die β -D-Glucosemolekülen β -1,4-glycosidisch verknüpft, wodurch ein lineares Polymer entsteht. Dabei unterscheiden sich die Enden des

Polymers voneinander, da die Hydroxygruppe am C1-Atom des Glucosemoleküls an einem Ende an der glycosidischen Bindung beteiligt und am anderen Ende frei ist. Daher wird das Ende mit gebundener C1-Hydroxygruppe als nicht-reduzierende Endgruppe und das Ende mit freier C1-Hydroxygruppe als reduzierende Endgruppe bezeichnet, da dieses Ende in einem Gleichgewicht zwischen der zyklischen Halbacetal- und der offenen Aldehydform vorliegt. In der Cellulose sind die Glucosemoleküle abwechselnd um 180° gedreht, um die bevorzugten Winkel der β -1,4-Bindung und die thermodynamisch günstige 4C_1 Sesselkonformation der einzelnen Glucosemoleküle zu ermöglichen, sodass die Abfolge zweier Glucosemoleküle, die sogenannte Cellobiose, als kleinstes sich wiederholendes Strukturelement angesehen werden kann (Abb. 9 A) [151, 154].

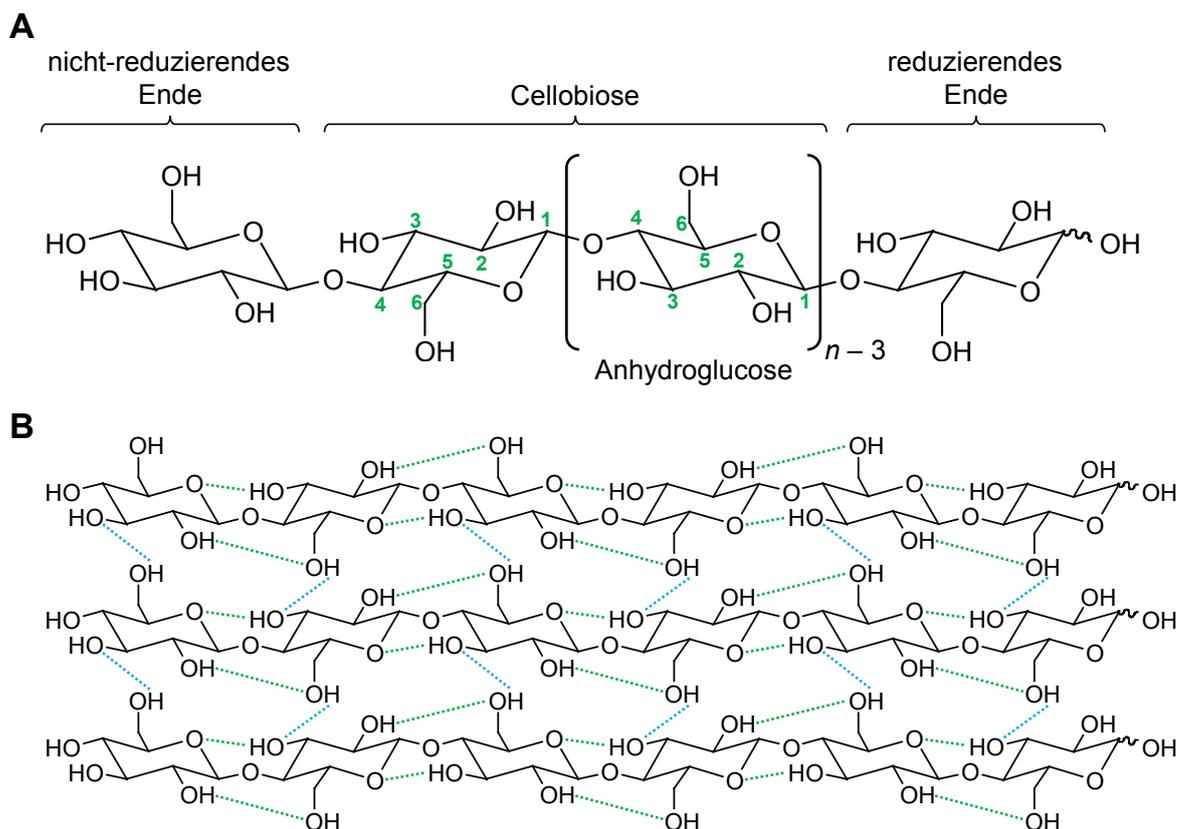


Abb. 9: Aufbau von Cellulose aus β -D-Glucosemolekülen und Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen drei Cellulosesträngen. A Cellulose besteht aus Wiederholungen von Anhydroglucose-Einheiten, die sich aus β -D-Glucosemolekülen herleiten, welche β -1,4-glycosidisch verknüpft sind. Dabei stellt die Cellobiose das kleinste sich wiederholende Strukturelement dar, in dem zwei Glucosemoleküle um 180° gegeneinander verdreht sind. Am nicht-reduzierenden Ende des Cellulosestrangs ist die Hydroxygruppe des C1-Atoms an der glycosidischen Bindung beteiligt, wohingegen sie am reduzierenden Ende frei ist und im Gleichgewicht mit der offenen Aldehydform vorliegt [151]. n: Polymerisationsgrad. **B** Native Cellulose bildet sowohl intra- (grün) als auch intermolekulare (blau) Wasserstoffbrückenbindungen aus. Die intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen sind zwischen C2-OH und C6-OH sowie zwischen C3-OH und C5-O, wohingegen die intermolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen C3-OH und C6-OH ausgebildet wird [155, 156].

In der Cellulose sind pro Glucosemolekül drei Hydroxygruppen vorhanden, die ausgeprägte Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können, welche sich in verschiedenen Formen der Cellulose unterscheiden [157]. Die Wasserstoffbrückenbindungen können sowohl intra- als auch intermolekular, bezogen auf einen einzelnen Cellulosestrang, gebildet werden und tragen maßgeblich zu der Zusammenlagerung einzelner Cellulosestränge bei. Beispielsweise kommt es in nativer Cellulose, wie sie z. B. in Pflanzen und Algen vorkommt, zur Ausbildung zweier intra- und einer intermolekularen Wasserstoffbrückenbindung (Abb. 9 B) [155, 156].

Cellulose weist eine Vielzahl von Eigenschaften auf, die sie als Trägermaterial zur Immobilisierung von Enzymen attraktiv macht. So ist Cellulose beispielsweise erneuerbar, biologisch abbaubar, sehr preisgünstig und inert [158]. Des Weiteren sind Cellulosen bzw. Cellulosederivate in verschiedenen Formen und Polymerisationsgraden erhältlich, z. B. als Fasern, Pulver, Kugeln oder Filterpapier [151, 152]. Die Kombination von Cellulose und einem Cellulose-spezifischen CBM stellt demnach eine interessante Immobilisierungsstrategie für Enzyme dar.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Eignung von Cellulose-Bindemodulen als alternative Immobilisierungsträger für Enzyme evaluiert werden. Dabei stand vor allem eine einfache Immobilisierung mittels spezifischer, affinitätsbasierter und gerichteter Adsorption an Cellulose aus Ganzzellextrakt im Vordergrund. Dazu sollten zunächst zwei CBMs, für die eine Bindung an Cellulose bereits beschrieben wurde, ausgewählt und mit einem einfach nachweisbaren Protein fusioniert werden. Anhand des fusionierten Proteins, hier ein Fluoreszenzreporterprotein, wurde die heterologe Produktion des Fusionsproteins in *E. coli* und die anschließende Adsorption an Cellulose vergleichend untersucht, um ein geeignetes Fusionsmodul zu identifizieren. Das Fusionsmodul, bestehend aus dem ausgewählten CBM und dem Fluoreszenzreporter, sollte anschließend mit dem Modellenzym *A β HNL* fusioniert und heterolog produziert werden. In Interaktionstests wurde die spezifische Adsorption des resultierenden Fusionsproteins direkt aus Ganzzellextrakt an unterschiedliche Cellulosematerialien untersucht. Die geeignetsten Trägermaterialien sollten daraufhin in Hinblick auf ihre Adsorptionseigenschaften gegenüber dem Fusionsprotein analysiert werden, wobei besonders die Geschwindigkeit der Adsorption, die Affinität

und die maximale Bindungskapazität evaluiert wurden. In weiteren Versuchen sollte die *A β HNL*-Aktivität und Stabilität des freien bzw. immobilisierten Fusionsproteins im schwach sauren pH-Bereich vergleichend untersucht werden. Für eine sinnvolle Anwendung des immobilisierten Fusionsproteins wurde des Weiteren die mögliche Desorption des adsorbierten Proteins im schwach sauren pH-Bereich analysiert. Mit den Cellulose-basierten Immobilisaten sollten Cyanhydrin-Synthesereaktionen in einem organischen, mikrowässrigen Reaktionssystem durchgeführt werden, wobei verschiedene Trägermaterialien verglichen wurden. Dazu wurde ebenfalls die Wiederverwendbarkeit des jeweiligen Immobilisats evaluiert.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bakterienstämme

Tab. 2: Genotypen der verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U196 (Φ 80 Δ <i>lacZM15</i>) <i>hsdR17 recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Woodcock <i>et al.</i> , 1989 [159]
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dem</i> (λ <i>Its857 ind1 Sam7 nin5 lavUV5-</i> <i>T7gene1</i>)	Studier und Moffatt, 1986 [160]

2.2 Plasmide

Tab. 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Vektor	Genotyp	Quelle/Referenz
pET28a	<i>ColE1 lacZ' Kan^R P_{T7} P_{lac}</i>	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
pET22b	<i>ColE1 lacZ' Amp^R P_{T7} P_{lac}</i>	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
pCR2.1	<i>pUC ori lacZ' Amp^R Kan^R P_{T7} P_{lac}</i>	life technologies, Darmstadt, Deutschland
pETnFbFP- <i>AthNL</i>	1155 bp <i>nfbfp-athnl</i> in pET28a	Kathrin Scholz, Dissertation 2012 [161]
pCR2.1_CBM-FbFP	729 bp <i>cbm-fbfp</i> (Gensynthese) in pCR2.1, TOPO-TA kloniert	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
pCR2.1_FbFP-CBM	705 bp <i>fbfp-cbm</i> (Gensynthese) in pCR2.1, TOPO-TA kloniert	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
pCBM-FbFP	723 bp <i>cbm-fbfp</i> (<i>NdeI/XhoI</i>) aus pCR2.1_CBM-FbFP in pET22b	diese Arbeit
pFbFP-CBM	699 bp <i>fbfp-cbm</i> (<i>NdeI/SalI</i>) aus pCR2.1_FbFP-CBM in pET28a	diese Arbeit
p_ <i>AthNL</i> -FbFP-CBM	805 bp <i>athnl-gs</i> PCR-Fragment (<i>NcoI/NdeI</i>) in pFbFP-CBM	diese Arbeit
p <i>AthNL</i> -FbFP-CBM	29 bp <i>his-tag</i> DNA-Fragment mit <i>NcoI/NheI sticky ends</i> in p_ <i>AthNL</i> - FbFP-CBM	diese Arbeit
p <i>AthNL</i> -FbFP	Stoppkodon (CCT \rightarrow TAA Austausch) an Position 1144 in p <i>AthNL</i> -FbFP-CBM	diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

Die synthetischen Oligonukleotide (Tab. 4) wurden in HPLC-gereinigter, lyophilisierter Form von der Firma Thermo Fisher Scientific GmbH (Bonn, Deutschland) bezogen. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden in dem vom Hersteller angegebenen Volumen sterilem Milli-Q-Wasser gelöst, sodass sie in einer Konzentration von 100 pmol/µl vorlagen.

Tab. 4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen und Stoppkodons fett hervorgehoben. T_m : Schmelztemperatur.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	T_m [°C]	Verwendung
<i>AtHNL_NcoI_NheI_f</i>	ATA <u>TCC</u> ATG <u>GCA</u> GCG <u>GCT</u> <u>AGC</u> ATG GAG AGG AAA CAT CAC T	68,0	PCR-Amplifikation von <i>athnl-gs</i>
<i>AtHNL_GS_NdeI_r</i>	ATA <u>TCA</u> <u>TAT</u> <u>GGC</u> TAC CGC CAC CGC <u>TAC</u> CGC CGC CCA TAT AAT CGG TG	70,7	PCR-Amplifikation von <i>athnl-gs</i>
<i>NcoI_His_f</i>	CAT GGC ACA TCA TCA TCA TCA TCA CGC GG	63,0	Generierung des kurzen <i>his-tag</i> DNA- Fragments
<i>NheI_His_r</i>	CTA GCC GCG TGA TGA TGA TGA TGA TGT GC	62,6	Generierung des kurzen <i>his-tag</i> DNA- Fragments
QC_FbFP_Stop_CBM_f	TCA GAA CGA CAT CTA AAC TCC GAC TCC TAC CAC	62,8	Generierung eines Stoppkodons in p <i>AtHNL</i> -FbFP-CBM
QC_FbFP_Stop_CBM_r	GGA GTC GGA GTT TAG ATG TCG TTC TGA ATA CCC	62,1	Generierung eines Stoppkodons in p <i>AtHNL</i> -FbFP-CBM
Seq_FbFP_r	TAA CCG GTT CTT TGT TCT GC	53,1	Sequenzierung von <i>AtHNL</i> -FbFP-CBM und <i>AtHNL</i> -FbFP

2.4 Enzyme

Die T4-DNA-Ligase, die *Pfu*-DNA-Polymerase und die verwendeten Restriktionsendonukleasen sowie deren zugehörige Puffer wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen.

2.5 Chemikalien

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Firma
Antibiotika	Sigma, Serva
Avicel PH-101	Sigma
Benzaldehyd	Sigma
DNA-Molekulargewichtsstandard	Thermo Fisher Scientific
dNTP-Mix (Desoxynukleotid-Triphosphate)	Thermo Fisher Scientific
LB-Medium	Roth
<i>rac</i> -Mandelonitril	Fluka
Methyl- <i>tert</i> -Butylether (MTBE)	Roth
<i>ortho</i> -Phosphorsäure	Roth
Protein-Molekulargewichtsstandard	Thermo Fisher Scientific
TB-Medium	Roth

Alle übrigen Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe, Deutschland), Applichem (Darmstadt, Deutschland) und Sigma (München, Deutschland) im analytischen Reinheitsgrad bezogen.

2.6 Anzucht von Bakterien

Flüssigmedien

LB-Medium [162]

10	g/l	Trypton
5	g/l	Hefeextrakt
10	g/l	NaCl

Das *lysogeny broth* (LB)-Medium wurde von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

TB-Medium [162]

12	g/l	Caseinhydrolysat, enzymatisch verdaut
24	g/l	Hefeextrakt
9,4	g/l	K ₂ HPO ₄
2,2	g/l	KH ₂ PO ₄

Das *terrific broth* (TB)-Medium wurde von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und nach Herstellerangaben vor dem Autoklavieren mit 4 ml/l Glycerin versetzt.

Autoinduktionsmedium [121]

Zur Herstellung von Autoinduktionsmedium wurde TB-Flüssigmedium mit einer sterilen Glucose- (5 % (w/v)) bzw. Lactoselösung (2 % (w/v)) versetzt, sodass sich eine Endkonzentration von 0,05 % (w/v) Glucose bzw. 0,2 % (w/v) Lactose ergab.

Festmedien

Zur Herstellung von Festmedien wurden den Flüssigmedien 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

Die Konzentration, in der das Antibiotikum Kanamycin zur Selektion den Medien zugesetzt wurde, betrug 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml im Falle des Antibiotikums Ampicillin.

2.6.1 Kultivierung von Flüssigkulturen

Die Kultivierung aller verwendeten *Escherichia coli*-Stämme erfolgte bei 37 °C in LB-, TB- oder in Autoinduktions-Medium (2.6). Dabei wurden Stämme mit plasmid-kodierten Antibiotikaresistenzen unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert. Als Übernachtskulturen (ÜK) wurden Ansätze bezeichnet, die mindestens 16 h bebrütet worden waren. Kulturen bis zu einem Volumen von 5 ml wurden in Reagenzgläsern auf einem Brutroller angezogen (160 UpM), wohingegen größere Kulturen in Erlenmeyerkolben (Kulturvolumen 10 % des Gefäßvolumens) auf einem Rundschüttler (Infors HT Multitron, Infors GmbH, Einsbach, Deutschland) bei 120 UpM bebrütet wurden. ÜK wurden zunächst mit Einzelkolonien von Transformationsplatten (2.9.2) angeimpft, wohingegen Hauptkulturen mit einer entsprechenden ÜK auf eine Zelldichte inokuliert wurden, die einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) von 0,05 entsprach. Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde in einem Spektralphotometer (DU 650 Spectrophotometer, Beckman, Krefeld, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen das entsprechende Medium als Referenz ermittelt. Dabei entspricht eine OD_{600nm} von 1 einer Anzahl von ca. 2×10^9 Zellen pro ml.

2.6.2 Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) in Überexpressionskulturen

Die Überexpression der für die entsprechenden Proteine kodierenden Gene wurde in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) mittels Autoinduktion unter Verwendung eines speziellen Nährmediums durchgeführt. Dabei wurde eine *E. coli* BL21(DE3)-Hauptkultur, die zuvor mit einer ÜK auf eine OD_{600nm} von 0,05 angeimpft worden war, zunächst bei 37 °C unter Selektionsdruck in Autoinduktionsmedium (2.6) für 3 h inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur auf 15 °C gesenkt und die Kultur für weitere 72 h schüttelnd inkubiert. Da Glucose und Lactose in dem Autoinduktionsmedium enthalten sind, wird die Überexpression der Gene induziert, sobald die Glucose im Medium verbraucht ist und die Lactose verstoffwechselt wird [121]. Die Analyse der Proteinzusammensetzung erfolgte anschließend mittels SDS-PAGE (2.12.5).

2.7 Nukleinsäureisolierung und -reinigung

2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* DH5 α wurde mithilfe des „innuPREP Plasmid Mini“ Kits der Firma Analytik Jena (Jena, Deutschland) nach Herstellerangaben unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. Dabei wurde die Plasmid-DNA abweichend vom Herstellerprotokoll mit 50 μ l Milli-Q-Wasser eluiert.

2.7.2 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem „Agarose Gelextract Mini Kit“ der Firma 5 Prime (Hilden, Deutschland) unter Verwendung der mitgelieferten Puffer nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte abweichend vom Herstellerprotokoll in Milli-Q-Wasser.

2.7.3 PCR-Produktreinigung

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte durch Elution aus einem Agarosegel (2.7.2).

2.8 *In vitro* Rekombination von DNA

2.8.1 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen katalysieren die hydrolytische Spaltung von DNA, wobei jedes Enzym eine spezifische Sequenz erkennt. Für die Restriktion wurden 1 – 2 µg DNA mit 1 – 2 Einheiten (*units*, U) der jeweiligen Restriktionsendonuklease in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer 1 bis 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Analyse der Restriktionsfragmente erfolgte anschließend über ihre gelelektrophoretische Auftrennung (2.10).

2.8.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch die T4-DNA-Ligase (2.4) kann die Ligation von DNA-Fragmenten und entsprechend hydrolysierter Vektor-DNA katalysiert werden. Die Ligase ist dabei in der Lage, eine kovalente Verknüpfung benachbarter 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden sowohl zwischen kompatiblen, überhängenden (*sticky ends*) als auch zwischen glatten Enden (*blunt ends*) doppelsträngiger DNA-Moleküle unter Hydrolyse von Adenosintriphosphat zu katalysieren. In einem Reaktionsvolumen von 20 µl wurden die Fragment- (*insert*) und die Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von mindestens drei zu eins eingesetzt. Nach Zugabe des vom Hersteller mitgelieferten T4-DNA-Ligasepuffers und von 1 U Ligase wurden die Ansätze für 30 bis 60 min bei RT inkubiert. Zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen (2.9) wurden anschließend 10 µl des Ligationsansatzes verwendet.

2.8.3 Generierung von kurzen DNA-Fragmenten

Für die Generierung von kurzen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten wurden zwei teilweise komplementäre Oligonukleotide (2.3) verwendet. Dazu wurde in einem Ansatz von 50 µl je 1 µg jeden Oligonukleotids mit 1 x T4-DNA-Ligase-Puffer (2.4) vermischt und für 10 min bei 85 °C in dem PCR-Gerät „TProfessional Basic Gradient“ der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz über einen Zeitraum von etwa 30 min auf 10 °C abgekühlt. Während der Inkubation bei 85 °C und dem darauffolgenden Abkühlen lagern sich die komplementären DNA-Einzelstränge zu einem DNA-Doppelstrang zusammen, der – je nach Wahl der

verwendeten Oligonukleotide – über kompatible überhängende Enden verfügt. Die überhängenden Enden erlauben anschließend eine Ligation (2.8.2) mit entsprechend hydrolysiertes Plasmid-DNA (2.8.1). Dazu wurden unterschiedliche Volumina des generierten DNA-Fragments (1, 2 und 3 μl) verwendet, wobei eine Kontrolle ohne DNA-Fragment durchgeführt wurde.

2.9 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA (modifiziert nach [163])

2.9.1 Herstellung von chemisch transformationskompetenten *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung von transformationskompetenten *E. coli*-Zellen wurde LB-Medium (2.6) mit 0,02 Volumen Mg^{2+} -Mix versetzt und mit einer *E. coli*-ÜK auf eine Zelldichte entsprechend einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,05 angeimpft. Diese Kultur wurde bei 37 °C bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,5 - 0,7$) auf einem Rundschtüttler (Infors HT Multitron, Infors GmbH, Einsbach, Deutschland) bei 120 UpM angezogen (2.6.1). Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (4.610 g, 15 min, 4 °C) geerntet. Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das Zellpellet im Ausgangsvolumen eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (4.610 g, 15 min, 4 °C) wurde das Pellet vorsichtig in 0,08 Ausgangsvolumen eiskaltem Transformationspuffer aufgenommen und nach Zugabe von sterilem Glycerin (Endkonzentration 20 % (v/v)) in 200 μl Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert.

Mg^{2+} -Mix:

500	mM	MgCl_2
500	mM	MgSO_4

Transformationspuffer:

100	mM	CaCl_2
50	mM	RbCl_2
40	mM	MnCl_2

2.9.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Zur Transformation wurden 100 µl transformationskompetente Zellen (2.9.1) mit 10 µl des Ansatzes einer vorausgegangenen Ligation (2.8.2) oder ca. 100 ng isolierter Plasmid-DNA (2.7.1) vermischt, mindestens für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 90 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Nach direkter Zugabe von 900 µl LB-Medium (2.6) wurde der Ansatz für 1 h auf einem Brutroller (160 UpM) bei 37 °C inkubiert, um die entsprechende Antibiotikaresistenz auszuprägen. Daraufhin wurden bis zu 100 µl dieses Ansatzes auf entsprechendem Selektivagar ausplattiert (2.6). Wurde ein Ligationsansatz zur Transformation eingesetzt, folgte davon abweichend eine Zentrifugation (18.890 g, 1 min, RT). Vom Überstand wurden anschließend 900 µl verworfen, das Pellet in den restlichen 100 µl resuspendiert und auf einer Selektivagarplatte (2.6) ausplattiert.

2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden verschieden große, geladene Moleküle im elektrischen Feld anhand ihrer unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten getrennt. Aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats besitzen Nukleinsäuren eine negative Ladung und wandern daher im elektrischen Feld zur Anode. Dabei hängt ihre Laufgeschwindigkeit vom Molekulargewicht der DNA-Fragmente, ihrer Konformation, der Konzentration des Agarosegels und der Stärke des elektrischen Felds ab. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA-Restriktionen (2.8.1) und PCR-Ansätzen (2.11), zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten (2.7.2) und bei der Mengenabschätzung von DNA (2.10.1) angewendet. Für die Gelmatrix wurde eine Agarosekonzentration von 1 % (w/v) in 0,5 × TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA) verwendet. Zur späteren Anfärbung der DNA im Gel wurde 0,1 µl Ethidiumbromid-Färbelösung pro ml der Agarose-Lösung zugesetzt. Die DNA-haltigen Proben wurden vor dem Auftragen auf das Agarosegel mit 0,1 Volumen 10 × DNA-Probenpuffer versetzt, woraufhin die Elektrophorese in horizontalen Gelkammern bei einer Spannung von etwa 120 V in 0,5 × TBE-Puffer erfolgte. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert und bei ultravioletter (UV) Bestrahlung ($\lambda = 254 - 366 \text{ nm}$) Licht im sichtbaren Bereich ($\lambda = 590 \text{ nm}$) emittiert, sodass nach der Elektrophorese die Visualisierung der DNA durch

Bestrahlung mit UV-Licht erfolgen konnte. Die Dokumentation der mit UV-Licht bestrahlten Gele erfolgte mithilfe einer Videodokumentationsanlage (EagleEye II, Stratagene, La Jolla, CA, USA) (2.17).

TBE-Puffer (pH 8,3):

89	mM	Tris-Base
89	mM	Borsäure
2,5	mM	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

DNA-Probenpuffer (10 ×):

100	mM	EDTA
30	% (v/v)	Glycerin
0,25	% (w/v)	Bromphenolblau
1	% (w/v)	Natriumdodecylsulfat (SDS)

Ethidiumbromid-Färbelösung:

0,5	% (w/v)	Ethidiumbromid
-----	---------	----------------

DNA-Molekulargewichtsstandard:

„GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder“, Thermo Fisher Scientific
0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6; 8; 10 kb

2.10.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Eine Mengenabschätzung von DNA-Proben erfolgte in Agarosegelen (2.10) durch einen Vergleich mit einer ähnlichen Bande des Molekulargewichtsstandards (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific). Alle Banden des Standards enthalten hierbei eine vom Hersteller definierte Menge an DNA.

2.11 Polymerasekettenreaktion (PCR) (modifiziert nach [164])

Bei der Polymerasekettenreaktion können bestimmte DNA-Bereiche *in vitro* aus einem Gemisch von DNA-Molekülen selektiv amplifiziert werden. Dazu werden eine thermostabile DNA-Polymerase, die Ausgangs-DNA als Matrize, zwei kurze Oligonukleotide, welche am 5'- bzw. 3'-Ende komplementär zu der zu amplifizierenden

Sequenz sind, sowie DNA-Polymerasepuffer und ein dNTP-Mix (Desoxynukleotid-Triphosphate) benötigt (Tab. 6).

Tab. 6: Konzentrationen der Reaktionskomponenten bei einer PCR.

Reaktionskomponente	Konzentration/Menge
Oligonukleotid (vorwärts)	0,2 pmol/µl
Oligonukleotid (rückwärts)	0,2 pmol/µl
Polymerase Puffer	1 x Puffer
dNTP-Mix	0,2 mM
DNA-Polymerase	2,5 U
Matrizen-DNA	5 – 50 ng
Milli-Q-Wasser	ad 50 µl

Das Prinzip der PCR beruht auf einer sich wiederholenden Abfolge von drei Schritten. Als erstes wird die DNA-Matrize denaturiert. Während der darauffolgenden Hybridisierung lagern sich die Oligonukleotide an komplementäre Sequenzbereiche der Ausgangs-DNA-Matrize an. Im Elongationsschritt verlängert die DNA-Polymerase die angelagerten Oligonukleotide und kopiert auf diese Weise die Matrize. Die Hybridisierung erfolgt an beiden Strängen der DNA-Matrize, wodurch sich die DNA in jedem Zyklus verdoppelt. Durchschnittlich 20 bis 30 Zyklen liefern ausreichende Mengen des gewünschten DNA-Fragments. Zur Amplifizierung wurde die in Kapitel 2.4 angegebene Polymerase verwendet. Alle PCR-Reaktionen wurden in dem PCR-Gerät „TProfessional Basic Gradient“ der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

2.11.1 *Touchdown* PCR

Die sogenannte *touchdown* PCR [165] ist eine spezielle PCR-Methode, bei der die Hybridisierungstemperatur zunächst höher gewählt wird als die zu erwartende Schmelztemperatur (T_m) der Oligonukleotide (2.3, Tab. 4). Die Temperatur wird anschließend zyklusweise abgesenkt und somit der T_m der Oligonukleotide angenähert (Tab. 7), wodurch unspezifische Bindungen der Oligonukleotide an die Matrize während der ersten PCR-Zyklen verringert werden. Anschließend erfolgten mehrere Zyklen mit einer niedrigeren Temperatur. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch analysiert (2.10).

Tab. 7: Programm zur Durchführung einer *touchdown* PCR.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Wiederholung
vollständige Denaturierung	98	5	
Denaturierung	95	0,75	
Hybridisierung (<i>touchdown</i>)	69 ↓ (-1 °C/Zyklus)	1	x 15
Elongation	72	x*	
Denaturierung	95	0,75	
Hybridisierung	54	1	x 20
Elongation	72	5	
finale Elongation	72	1	

* die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der Geschwindigkeit der eingesetzten Polymerase

2.11.2 Austausch von Basen mittels ortsgerichteter Mutagenese

Zum gezielten Austausch von Nukleotidbasen in einer Gensequenz wurde die QuikChange[®]-Methode (Stratagene, La Jolla, CA, USA) verwendet, die auf dem Einsatz von zwei Oligonukleotiden beruht, welche komplementär zueinander sind und den gewünschten Basenaustausch enthalten. Diese beiden Oligonukleotide wurden mit dem Plasmid, das die Matrizen-DNA darstellt, in welcher der Basenaustausch vorgenommen werden soll, in eine *touchdown* PCR (2.11.1) eingesetzt. Dabei verlängert die verwendete Polymerase ausgehend von beiden Oligonukleotiden das komplette Plasmid und erzeugt so den entsprechenden Austausch durch den Einbau der Oligonukleotide. Anschließend wurde das PCR-Produkt gelelektrophoretisch gereinigt (2.7.2) und einer Restriktion mit der Endonuklease *DpnI* (2.8.1) unterzogen, welche die methylierte Plasmid-DNA der Matrize verdaut, sodass lediglich die nicht-methylierte, PCR-amplifizierte DNA zurückbleibt. Daraufhin wurden kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen (2.9.1) mit dem PCR-Produkt transformiert (2.9.2). Der korrekte Basenaustausch wurde mittels Sequenzierung (2.14) von Plasmid-DNA, die aus Transformanden isoliert wurde (2.7.1), verifiziert.

2.12 Proteinchemische Methoden

2.12.1 Zellaufschluss

Nach erfolgter Überexpression der jeweiligen Zielgene in *E. coli* BL21(DE3) (2.6.2) wurden die Zellen durch Zentrifugation (6.750 g, 30 min, 4 °C) geerntet. Daraufhin wurde das Zellpellet in Zellaufschlusspuffer resuspendiert, sodass sich eine 20 %ige (w/v) Zellsuspension ergab. Der Zellaufschluss erfolgte entweder durch Ultraschall (3 x 5 min, 5 Zyklen, 50 % Leistung) mit einem Ultraschall-Homogenisator (Bandelin Sonopuls HD 2070, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland), wobei die Proben zwischen den Ultraschallbehandlungen für 5 min auf Eis gekühlt wurden, oder mithilfe der *French Pressure Cell* (40K Cell, Thermo Electron Corporation, Bonn, Deutschland) in drei Durchgängen bei 1500 *pound-force per square inch* (300 bar Zellinnendruck).

Im Anschluss an den Zellaufschluss wurden nicht lösliche Bestandteile von den löslichen (Ganzzelleextrakt, GZE) durch einen Zentrifugationsschritt (18.000 g, 30 min, 4 °C) getrennt. Der Überstand wurde auf seinen Proteingehalt mittels Bradford-Test (2.12.3) überprüft und sowohl von löslicher als auch nicht löslicher Fraktion wurden Proben für eine Analyse mittels SDS-PAGE entnommen (2.12.5).

Zellaufschlusspuffer:

50 mM Triethanolamin (TEA) pH 8

Natriumphosphat-Zellaufschlusspuffer:

50 mM NaH₂PO₄ (pH 8)

200 mM NaCl

2.12.2 Immobilisierung von Proteinen auf Cellulose

Für die Immobilisierung von Proteinen, die ein Cellulose-Bindemodul (Untergruppe der Kohlenhydrat-Bindemodule, CBM) enthalten, wurden unterschiedliche Cellulose-Trägermaterialien verwendet. So wurden beispielsweise die kommerziell erhältliche mikrokristalline Cellulose Avicel PH-101 (50 µm Partikelgröße), die daraus präparierte regenerierte amorphe Cellulose (RAC) (2.12.2.3) und Disks aus Celluloseacetat-Filtern (CA) (2.12.2.1) zur Immobilisierung getestet. Weiterhin wurde ein

Elektrophoresepapier (Whatman Chr 1, GE Healthcare, München, Deutschland) und ein Baumwollstoff (unbehandelte Biobaumwolle, bereitgestellt von Henkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf, Deutschland) verwendet. Als Ausgangsmaterial für die Immobilisierung dienten dabei entweder die lösliche Fraktion (GZE) nach einem Zellaufschluss (2.12.1) oder gereinigte Proteinproben (2.12.6.1).

Im Falle von GZE wurden etwa pro 15 ml GZE 0,5 g Avicel, 1,5 ml RAC-Suspension (2.12.2.3, entspricht 15 mg RAC) bzw. 50 CA-Disks (2.12.2.2) verwendet. Der mit dem jeweiligen Cellulosematerial versetzte GZE wurde bei 4 °C über Nacht unter Schütteln (etwa 200 UpM) inkubiert, wonach das Cellulosematerial mittels Zentrifugation (2.915 g, 5 min, 4 °C) bzw. Dekantieren von dem Überstand getrennt wurde, der verworfen wurde. Das resultierende Cellulose-Pellet wurde daraufhin viermal im jeweils doppelten Ausgangsvolumen Zellaufschlusspuffer (2.12.1) durch erneute Zentrifugations- bzw. Dekantierschritte gewaschen. Je nach Verwendung wurde das Cellulose-basierte Immobilisat anschließend nass oder als Suspension kurzzeitig bei 4 °C gelagert. CA-basierte Immobilisate wurden dagegen unter Argon getrocknet.

Im Falle von gereinigten Proteinproben (2.12.6) wurden etwa pro 1,6 ml Proteinlösung 100 mg Avicel oder 800 µl RAC-Suspension (2.12.2.3, entspricht 8 mg), die zuvor pelletiert worden war, verwendet. Die so erhaltenen Suspensionen wurden bei 4 °C unter Schütteln (etwa 200 UpM) über Nacht inkubiert und anschließend zentrifugiert (18.890 g, 2 min, 4 °C), um die Cellulose vom Überstand zu trennen. Daraufhin wurde das Cellulose-Pellet viermal im Ausgangsvolumen Zellaufschlusspuffer (2.12.1) durch erneute Zentrifugationsschritte gewaschen. Das Cellulose-basierte Immobilisat wurde als Suspension auf die gewünschte Proteinkonzentration eingestellt (2.12.3.1) und bei 4 °C gelagert.

2.12.2.1 Qualitative Adsorption an CA-Membranfilter

Die qualitative Adsorption von CBM-Fusionsproteinen wurde durch eine Interaktionsanalyse mit CA-Membranfiltern (0,2 µm Porengröße, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) evaluiert. Dazu wurden 10 µl der entsprechenden Proteinprobe (2.12.6) auf einen CA-Filter getropft und kurz einziehen gelassen. Das Kontrollprotein FbFP_K, das lediglich aus der FbFP-Domäne besteht, wurde von Frau Kathrin Scholz (Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) bereitgestellt. Der Filter wurde daraufhin unter UV-Licht analysiert

(2.13.1) und im Anschluss für 30 min unter leichtem Schütteln bei RT in einer Petrischale mit Puffer (10 mM NaH₂PO₄, 20 mM NaCl, pH 8) gewaschen. Nach dem Waschschrift wurde der Filter erneut unter UV-Licht analysiert (2.13.1).

2.12.2.2 Herstellung von CA-Disks

CA-Disks wurden aus kommerziell erhältlichen CA-Membranfiltern (0,2 µm Porengröße, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) mithilfe eines Lochers hergestellt. Dazu wurde der Filter zunächst in Milli-Q-Wasser gewaschen und anschließend gelocht, um Disks mit einem Durchmesser von 6 mm zu produzieren. Die CA-Disks wurden daraufhin mehrfach in Milli-Q-Wasser gewaschen und unter Argon getrocknet.

2.12.2.3 Präparation von regenerierter amorpher Cellulose (RAC) [166]

Als Ausgangsmaterial für die Präparation von regenerierter amorpher Cellulose (RAC) wurde die mikrokristalline Cellulose Avicel PH-101 (Sigma, München, Deutschland) verwendet, die einen mittleren Durchmesser von 50 µm besitzt. Für die Herstellung von RAC wurde die verwendete Cellulose in *ortho*-Phosphorsäure gelöst und anschließend mit Wasser gefällt. Dabei werden die Hydroxygruppen der Cellulose zunächst mit der Phosphorsäure verestert, wodurch die Cellulose gelöst wird. Durch Zugabe von Wasser wird die Reaktion umgedreht, sodass die Cellulose präzipitiert.

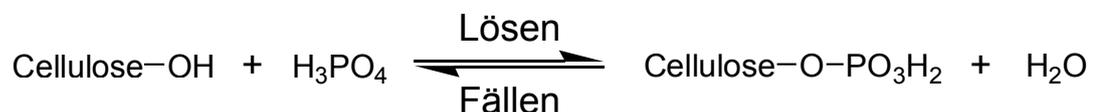


Abb. 10: Präparation von regenerierter amorpher Cellulose (RAC). Die Cellulose wird durch Zugabe von *ortho*-Phosphorsäure gelöst, indem die Hydroxygruppen reversibel verestert werden. Durch anschließende Zugabe von Wasser wird die Reaktion umgedreht und die Cellulose fällt aus.

Für die Präparation von RAC wurden 0,2 g Avicel mit 0,6 ml Milli-Q-Wasser befeuchtet bevor 10 ml eiskalte 85 %ige (v/v) *ortho*-Phosphorsäure in 2 ml Schritten unter Rühren langsam dazugegeben wurde. Die weiße Suspension wurde unter Rühren für 1 h auf Eis inkubiert, wobei sie innerhalb weniger Minuten transparent wurde. Anschließend wurden unter Rühren 40 ml eiskaltes Milli-Q-Wasser langsam in 10 ml Schritten hinzugegeben, wodurch sich ein weißes Präzipitat bildete. Nach einem

Zentrifugationsschritt (2.915 g, 20 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das weiße RAC-Pellet in etwa 45 ml eiskaltem Milli-Q-Wasser resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde von einer erneuten Zentrifugation gefolgt und insgesamt viermal durchgeführt, um Reste der *ortho*-Phosphorsäure aus dem Überstand zu entfernen. Um eventuelle Säurereste zu neutralisieren, wurde das RAC-Pellet in 45 ml eiskaltem Milli-Q-Wasser resuspendiert und 0,5 ml 2 M Na₂CO₃ dazugegeben. Die Suspension wurde daraufhin zentrifugiert (2.915 g, 20 min, 4 °C), der Überstand abgenommen und das Pellet in eiskaltem Milli-Q-Wasser resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (2.915 g, 20 min, 4 °C) wurde der Überstand mittels pH-Teststäbchen analysiert. War der pH-Wert nicht im Bereich von pH 5 – 7, wurde das RAC-Pellet erneut in Milli-Q-Wasser gewaschen. Die hergestellte Cellulose wurde als 10 g/l Suspension bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Struktur der verwendeten Cellulosen Avicel und RAC wurde zudem mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) analysiert. Dazu wurde ein ca. 50 µl Tropfen einer 10 g/l Suspension der entsprechenden Cellulose auf eine polierte Siliziumscheibe gegeben und unter Stickstoff getrocknet. Die REM-Aufnahmen wurden als Auftragsarbeit (Karlsruhe Institut für Technologie, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt.

2.12.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

2.12.3.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach Bradford [167] mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard. Das Bradford-Reagenz wurde vor Licht geschützt über Nacht gerührt, anschließend filtriert und lichtgeschützt bei RT aufbewahrt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Probe wurden 900 µl Bradford-Reagenz mit 100 µl Probe in einer Halbmikro-Küvette vermischt und 10 min abgedunkelt bei RT inkubiert. Als Referenz dienten 900 µl Bradford-Reagenz mit 100 µl des entsprechenden Puffers. Die Konzentration des entstandenen Protein-Farbstoffkomplexes wurde photometrisch bei 595 nm bestimmt (DU 650 Spectrophotometer, Beckman, Krefeld, Deutschland). Anhand einer Kalibrierung mit bekannten Mengen BSA konnte der Proteingehalt der Proben über eine entsprechend erstellte Kalibrierungsgerade (0,01 – 0,1 mg/ml) errechnet werden.

Um die Proteinkonzentration von Immobilisaten (2.12.2) zu bestimmen, wurde ein nach Bonde *et al.* modifizierter Bradford-Assay verwendet [168]. Dabei wird die Proteinkonzentration nicht anhand der Absorption bei 595 nm ermittelt, sondern über die Absorption des ungebundenen Coomassie-Farbstoffs bei 465 nm errechnet. Dazu wurden 100 µl der Immobilisat-Suspension in einem Reaktionsgefäß mit 900 µl Bradford-Reagenz vermischt und 5 min unter gelegentlichem Invertieren bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (18.890 g, 1 min, RT) wurden 700 µl des Überstands in eine Küvette überführt und die Absorption bei 465 nm photometrisch bestimmt (DU 650 Spectrophotometer, Beckman, Krefeld, Deutschland). Als Referenz diente dabei eine analoge Suspension des entsprechenden Trägermaterials, die ebenfalls mit Bradford-Reagenz versetzt, inkubiert und zentrifugiert worden war. Mithilfe einer Kalibrierung mit bekannten Mengen BSA wurde der Proteingehalt der Proben über eine entsprechend erstellte Kalibrierungsgerade (0,01 – 0,1 mg/ml) errechnet.

Bradford-Reagenz:

100	mg	Coomassie-Brillant-Blau G-250
100	ml	85 % (v/v) <i>ortho</i> -Phosphorsäure
50	ml	Ethanol (absolut)
ad 1000	ml	Milli-Q-Wasser

2.12.3.2 Konzentrationsbestimmung anhand der Absorption bei 280 nm

Für die Konzentrationsbestimmung von gereinigten Proteinlösungen wurde zunächst der theoretische Extinktionskoeffizient bei 280 nm anhand der Aminosäuresequenz mithilfe des Webtools „ProtParam“ (2.16) ermittelt. Anschließend wurde die Absorption bei 280 nm photometrisch in einer 10 mm Quarzküvette mit dem jeweiligen Puffer als Referenz bestimmt (DU 650 Spectrophotometer, Beckman, Krefeld, Deutschland). Über das Lambert-Beer-Gesetz konnte daraufhin mithilfe des theoretischen Extinktionskoeffizienten des jeweiligen Proteins (Tab. 8) die Proteinkonzentration errechnet werden [169].

Tab. 8: Verwendete Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichte. Die theoretischen Parameter wurden anhand der Aminosäuresequenz mit dem Webtool „ProtParam“ (2.16) ermittelt.

Protein	Molekulargewicht [g mol⁻¹]	Extinktionskoeffizient (280 nm) [Liter mol⁻¹ cm⁻¹]
FbFP-CBM	26803,4	39085
AtHNL-FbFP-CBM	55746,2	70610
AtHNL-FbFP	42855,8	42885
AtHNL	29216,6	31525

2.12.4 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Konzentrierung von Proteinlösungen erfolgte in Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren (Sartorius, Göttingen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers, wobei die Ausschlussgröße der Membran 10 kDa betrug.

2.12.5 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht. Um die Proteine zu denaturieren, wurden sie zunächst mit Dithiothreitol (DTT) und Natriumdodecylsulfat (SDS) behandelt. Das negativ geladene SDS bindet an die Proteine, wobei sich SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Masse-zu-Ladungsverhältnis ausbilden. Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem, wie es von Laemmli [170] beschrieben wurde. Dabei wurden die benötigten Gele entweder selbst gegossen (Tris-Glycin Gele; die unten genannten Volumenangaben von Trenn- und Sammelgel beziehen sich auf das Volumen von zwei Minigelen) oder als fertige Gradientengele (NuPAGE[®] Novex[®] 4 – 12 % Bis-Tris Mini Gel) von der Firma life technologies (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Alle Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel durch eine 10-minütige Inkubation bei 65 °C denaturiert. Anschließend wurden pro Tasche des Gels 3 – 5 µg gereinigtes Protein oder 10 µg von nicht gereinigten Proteinproben aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug zunächst 100 V (PowerPAC 300, BioRad, München, Deutschland) und wurde nach Eintritt der Lauffront in das Trenngel auf 150 – 200 V erhöht. Die Elektrophorese von selbst gegossenen Gelen wurde in der vertikalen Gelapparatur „Mini-Protean Gelkammer II“ der Firma BioRad (München, Deutschland) mit Elektrophorese-Laufpuffer durchgeführt, wohingegen für

Fertiggele die vertikale Gelapparatur „XCell SureLock® Mini“ der Firma life technologies (Darmstadt, Deutschland) und MES-Laufpuffer verwendet wurde.

SDS-Probenpuffer (5 ×):

225	mM	Tris/HCl (pH 6,8)
50	% (v/v)	Glycerin
5	% (w/v)	SDS
250	mM	DTT
0,05	% (w/v)	Bromphenolblau

Elektrophorese-Laufpuffer (pH 8,8):

25	mM	Tris/HCl
192	mM	Glycin
0,1	% (w/v)	SDS

MES-Laufpuffer (pH 7,3):

50	mM	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure (MES)
50	mM	Tris Base
0,1	% (w/v)	SDS
1	mM	EDTA

Sammelgel (5 %):

0,83	ml	Acrylamid-Lösung (Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1))
1,23	ml	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)
50	µl	10 % (w/v) SDS
50	µl	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat
10	µl	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
2,8	ml	vollentsalztes Wasser (VE)

Trenngel (12 %):

4	ml	Acrylamid-Lösung (Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1))
2,5	ml	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)
100	µl	10 % (w/v) SDS
100	µl	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat
10	µl	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
3,4	ml	VE-Wasser

Molekulargewichtsstandard:

„PageRuler™ Prestained Protein Ladder“, Thermo Fisher Scientific
10; 15; 25; 35; 40; 55; 70; 100; 130; 170 kDa (12 % Tris-Glycin Gel)
10; 15; 25; 30; 40; 50; 70; 80; 115; 170 kDa (4 – 12 % Bis-Tris Gel)

2.12.5.1 Kolloidal Coomassie-Brillant-Blau-Färbung von SDS-Gelen [171]

Die Färbung von SDS-Gelen mit kolloidaler Coomassie-Brillant-Blau-Färbungslösung erfolgte nach der Elektrophorese (2.12.5) bei RT. Das Gel wurde dazu über Nacht in der Färbungslösung schüttelnd inkubiert und anschließend mehrmals mit VE-Wasser gewaschen. Die Dokumentation der gefärbten Gele erfolgte mithilfe der Videodokumentationsanlage Stella (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) (2.17).

Färbungslösung:

0,12	% (w/v)	Coomassie-Brillant-Blau G-250
10	% (w/v)	Ammoniumsulfat
10	% (v/v)	85 % (v/v) <i>ortho</i> -Phosphorsäure
20	% (v/v)	Methanol

2.12.5.2 Ethanolfällung von Proteinen aus Guanidinhydrochlorid-haltigen Lösungen [172]

Da Guanidinhydrochlorid mit SDS ein Präzipitat bildet, musste es zunächst entfernt werden, bevor aus der Lösung Proben für eine SDS-PAGE (2.12.5) hergestellt werden konnten. Dazu wurden die Proteine mit Ethanol gefällt, indem 40 µl der Guanidinhydrochlorid-haltigen Probe mit 360 µl 4 °C kaltem Ethanol (100 %) versetzt wurden, was einer Endkonzentration von 90 % (v/v) Ethanol entspricht. Die Probe wurde kurz gevortext und für 10 min bei – 20 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation (18.890 g, 5 min, 4 °C), bevor der Überstand verworfen wurde. Das entstandene, farblose Pellet wurde in 400 µl 4 °C kaltem Ethanol (90 %) resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Daraufhin konnte das Pellet in 40 µl 1 x SDS-Probenpuffer (2.12.5) resuspendiert und einer SDS-PAGE unterzogen werden.

2.12.6 Reinigung von Fusionsproteinen

2.12.6.1 Affinitätschromatographische Reinigung mittels IMAC

Die Isolierung und Reinigung von Fusionsproteinen wurde in dieser Arbeit mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (*immobilized metal ion affinity chromatography*, IMAC [13]) durchgeführt, da alle Proteine mit einem Hexahistidin-Affinitätstag (His-Tag) versehen sind. Dieser His-Tag kann spezifisch mit Metallionen interagieren, welche über spezielle chelatisierende Reste an einer stationären Phase immobilisiert sind, sodass die Isolierung des Zielproteins aus dem löslichen Überstand eines Zellaufschlusses (2.12.1) ermöglicht wird. Die Elution des Zielproteins kann anschließend mit einem Imidazol-haltigen Puffer erfolgen, da das enthaltene Imidazol das Protein kompetitiv aus dem zuvor mit den immobilisierten Metallionen gebildeten Chelat-Komplex verdrängt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Gelmaterialien zur Reinigung von Fusionsproteinen verwendet. Die genutzten Materialien unterscheiden sich in der Art der immobilisierten Metallionen und der stationären Phasen sowie den jeweils benötigten Puffern. Alle Reinigungen wurden im Tropfsäulenformat mit einer von der Schwerkraft abhängigen Flussrate durchgeführt, wobei ein Säulenvolumen (SV) von 3 – 5 ml des jeweiligen Materials verwendet wurde. Dabei wurde das Material zunächst mit dem dreifachen SV an Zellaufschlusspuffer (2.12.1) equilibriert, bevor die Proteinprobe in Form des löslichen Überstandes eines Zellaufschlusses (2.12.1) auf die Säule aufgetragen und der Durchlauf aufgefangen wurde. Nach dem Auftragen wurde das Material mit dem zehnfachen SV Zellaufschlusspuffer gespült, um alle unspezifisch gebundenen Proteine zu entfernen. Darauf folgten gegebenenfalls ein Waschschrift mit Waschpuffer (3 SV), der aufgefangen wurde, und ein erneutes Spülen des Materials mit 10 SV Waschpuffer. Zur Elution des Zielproteins wurden 5 SV Elutionspuffer verwendet.

Von den einzelnen Fraktionen des Durchlaufs, sowie des Wasch- und Elutions-schritts wurden jeweils Proben entnommen und im Hinblick auf ihre Protein-zusammensetzung mittels SDS-PAGE (2.12.5) untersucht. Die Elutionsfraktion mit enthaltenem Zielprotein wurde entsalzt (2.12.6.2) und konzentriert (2.12.3.2).

2.12.6.1.1 HisLink™

Das Gelmaterial HisLink™ der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) enthält Ni²⁺-Ionen, die über einen speziellen chelatisierenden Rest an das makroporöse Trägermaterial Silica immobilisiert sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Material zur Reinigung von CBM-Fusionsproteinen verwendet.

Waschpuffer (pH 8):

50	mM	TEA
5	mM	Imidazol

Elutionspuffer (pH 8):

50	mM	TEA
250	mM	Imidazol

2.12.6.1.2 TALON® Superflow™

Das Gelmaterial TALON® Superflow™ der Firma Clontech (Mountain View, CA, USA) enthält Co²⁺-Ionen, die über einen speziellen chelatisierenden Rest an das Trägermaterial Sepharose™ immobilisiert sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Material zur Reinigung von Fusionsproteinen verwendet.

Elutionspuffer (pH 8):

50	mM	TEA
150	mM	Imidazol

2.12.6.2 Entsalzung und Reinigung mittels Gelfiltration

Bei der Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC), die auch Gelfiltration genannt wird, werden Moleküle anhand der Unterschiede in ihrer Größe getrennt. Dabei werden zwei grundlegende Anwendungsgebiete unterschieden. Zum einen die Gruppentrennung anhand von Größenbereichen in hoch- und niedrigmolekulare Bestandteile, welche Anwendung in der Entsalzung von Proteinproben und beim Pufferwechsel findet, und zum anderen die hochauflösende Trennung von Proteinen aus einem Proteingemisch. Die zur SEC verwendeten

Gelmaterialien weisen eine poröse Matrix auf, wobei die Trennung eines Gemisches auf der Diffusion der einzelnen Bestandteile in die Gelporen und wieder heraus basiert. Kleinere Moleküle können weiter in die Matrix wandern und verweilen somit länger auf der Säule als größere Moleküle, was zu einer späteren Elution führt.

Für die Entsalzung von Proteinproben bzw. deren Pufferwechsel wurde das Material Sephadex™ G-25 verwendet, das im Tropfsäulenformat in Form von PD-10-Säulen (GE Healthcare, München, Deutschland) mit einer von der Schwerkraft abhängigen Flussrate genutzt wurde. Die SEC wurde nach Herstellerangaben mit Zellaufschlusspuffer (2.12.1) durchgeführt und die erhaltene Proteinprobe gegebenenfalls konzentriert (2.12.4).

2.12.7 Bestimmung der A β HNL-Aktivität mittels Mandelonitril-Spaltungsassay

Die A β HNL-Aktivität wurde über die Spaltung von (*R*)-Mandelonitril zu Blausäure und Benzaldehyd bestimmt, wobei die Zunahme von Benzaldehyd anhand der Absorption bei 280 nm verfolgt wurde. Dazu wurden 100 μ l einer A β HNL-haltigen Probe (0,5 μ M A β HNL bzw. Fusionsprotein, 1:20 in Assaypuffer verdünnt) in einer 10 mm Quarzküvette vorgelegt, mit 700 μ l auf 25 °C temperiertem Assaypuffer vermischt und die Reaktion durch Zugabe von 200 μ l Substratlösung gestartet (1 ml Gesamtvolumen). Daraus ergab sich eine Endkonzentration von 0,05 μ M Enzym und 13,4 mM *rac*-Mandelonitril im Assay. Mithilfe eines Photometers (Spectramax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) wurde die Zunahme der Absorption bei 280 nm über einen Zeitraum von 1 min verfolgt. Da das Substrat Mandelonitril in der Substratlösung bzw. im Assaypuffer ebenfalls nicht-enzymatisch gespalten wird, musste eine Kontrolle ohne Enzym, d. h. nur mit Puffer, durchgeführt werden, wobei der nicht-enzymatische Umsatz von der enzymatischen Reaktion subtrahiert wurde. Sowohl die Messungen mit Enzym als auch die Kontrollmessungen wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Anhand der gemessenen Steigung der Absorption bei 280 nm pro Minute und dem Extinktionskoeffizienten von Benzaldehyd bei 280 nm wurde die volumetrische A β HNL-Aktivität errechnet [173]. Dabei bezeichnet 1 *unit* (Einheit) die Menge A β HNL, die 1 μ mol (*R*)-Mandelonitril pro Minute im beschriebenen Puffersystem bei 25 °C umsetzt.

$$\text{Aktivität [U/ml]} = \frac{(\Delta A/\text{min}_{\text{Probe}} - \Delta A/\text{min}_{\text{Leerwert}}) \times \text{Küvettenvolumen [ml]}}{\epsilon_{\text{Benzaldehyd (280 nm)}} \times \text{Probenvolumen [ml]} \times \text{Schichtdicke [cm]}} \times f$$

$\Delta A/\text{min}$	Steigung der Absorptionszunahme bei 280 nm (min^{-1})
$\epsilon_{\text{Benzaldehyd (280 nm)}}$	Extinktionskoeffizient von Benzaldehyd bei 280 nm (1,376 Liter $\text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
f	Verdünnungsfaktor der Enzymlösung (hier: 20)

Unter Berücksichtigung der Konzentration der eingesetzten Enzymlösung (2.12.3) kann aus der volumetrischen Aktivität die spezifische Aktivität errechnet werden. Für den Vergleich der Aktivitäten unterschiedlich komplexer Proteine wurde das jeweilige Molekulargewicht eines Monomers (Tab. 8, 2.12.3.2) miteinbezogen, indem die Wechselzahl k_{cat} (s^{-1}) berechnet wurde, welche die Aktivität pro aktivem Zentrum widerspiegelt.

Die wildtypische *A*tHNL wurde als Lyophilisat von Frau Aischarya Brahma (Institut für Bio- und Geowissenschaften, IBG-1: Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich) bereitgestellt und zunächst mittels Gelfiltration (2.12.6.2) in Zellaufschlusspuffer (50 mM TEA pH 8, 2.12.1) überführt.

Für die Aktivitätsmessung von immobilisierten *A*tHNL-FbFP-CBM Präparationen (2.12.2) wurde der Mandelonitril-Spaltungsassay als Endpunktbestimmung durchgeführt. Da die zur Immobilisierung verwendeten Cellulose-Trägermaterialien in Wasser unlöslich sind, mussten alle benötigten Reaktionsgefäße konstant mit 1000 UpM in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) geschüttelt werden. Für den Endpunkt-Assay wurde das resuspendierte Immobilisat (2.12.2) in Assaypuffer verdünnt (0,5 μM Enzym) und bei 25 °C inkubiert. 100 μl dieser Lösung wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem sich 700 μl Assaypuffer befanden, woraufhin die Reaktion durch Zugabe von 200 μl Substratlösung gestartet wurde. Nach 2 min wurde das Reaktionsgefäß zentrifugiert (18.890 g, 1 min, RT), sodass sich eine gesamte Reaktionszeit von 3 min ergab. 700 μl des Überstands wurden sofort in eine Quarzküvette überführt, die Absorption bei 280 nm für 30 s gemessen und der Mittelwert gebildet (A_{Probe}). Dieser Wert repräsentiert die Menge des in 3 min Reaktionszeit freigesetzten Benzaldehyds. Um die nicht-enzymatische Spaltung des Substrats zu berücksichtigen, wurden Kontrollen mit Trägermaterial ohne Enzym durchgeführt, deren Absorptionswerte von den Messungen mit Enzym

subtrahiert wurden. Da das Substrat Mandelonitril in der Substratlösung sehr langsam nicht-enzymatisch gespalten wird, musste dieser Zerfall jedoch zeitaufgelöst gemessen und in die Aktivitätsberechnung miteinbezogen werden. Dazu wurden über einen Zeitraum von mindestens 30 min mehrfach Messungen mit Trägermaterial ohne Enzym durchgeführt ($A_{\text{Korrektur}}$). Darüber hinaus musste sichergestellt werden, dass die gemessene Absorption bei 280 nm nicht durch desorbiertes Enzym verursacht wurde, indem Kontrollen mit Immobilisat ohne Substrat (dafür Substratpuffer: 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 3,5) gemessen wurden ($A_{\text{Probe ohne Substrat}}$). Durch eine Kombination aller Kontrollen konnte die Aktivität von Immobilisaten mithilfe des Extinktionskoeffizienten von Benzaldehyd errechnet werden. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

$$\text{Aktivität [U/ml]} = \frac{(A_{\text{Probe}} - A_{\text{Probe ohne Substrat}} - A_{\text{Korrektur}}) \times \text{Küvettenvolumen [ml]}}{\epsilon_{\text{Benzaldehyd (280 nm)}} \times \text{Probenvolumen [ml]} \times \text{Schichtdicke [cm]} \times \text{Reaktionszeit [min]}} \times f$$

A	Absorption bei 280 nm (min^{-1})
$\epsilon_{\text{Benzaldehyd (280 nm)}}$	Extinktionskoeffizient von Benzaldehyd bei 280 nm (1,376 Liter $\text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
f	Verdünnungsfaktor der Enzymlösung (hier: 20)

Assaypuffer

50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5)

Substratlösung

50 mM Citrat-Phosphat-Puffer (pH 3,5)

67 mM *rac*-Mandelonitril

2.12.7.1 Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität

Zur Bestimmung des Einflusses des pH-Werts auf die Aktivität der verwendeten A β HNL Fusionsproteine wurde der Mandelonitril-Spaltungsassay (2.12.7) mit Assaypuffer verschiedener pH-Werte durchgeführt (pH 4 – 5, in 0,25 pH-Schritten). Das experimentelle Vorgehen war dabei analog zu Kapitel 2.12.7, wobei die verdünnte Enzymlösung (0,5 μM A β HNL bzw. Fusionsprotein, 1:20 in Assaypuffer des jeweiligen pH-Werts verdünnt) zunächst 5 min bei 25 °C inkubiert wurde, bevor 100 μl zur

Durchführung des Assays entnommen wurden. Da die nicht-enzymatische Spaltung des Substrats Mandelonitril mit steigendem pH-Wert zunahm, wurde für jeden pH-Wert eine Kontrollmessung in Dreifachbestimmung durchgeführt, deren Steigung von der Messung mit Enzym subtrahiert wurde. Messungen mit Enzym wurden ebenfalls in Dreifachbestimmung durchgeführt. Das Vorgehen für die Bestimmung des Einflusses des pH-Werts auf die Aktivität von immobilisierten *AfHNL* Präparaten (2.12.2) war analog zu Kapitel 2.12.7, d. h. die Messungen wurden mit Assaypuffer des jeweiligen pH-Werts und einer 5-minütigen Inkubation (1000 UpM, 25 °C) vor dem Assay durchgeführt. Die Kontrollen für den Endpunkt-Assay wurden ebenfalls wie in Kapitel 2.12.7 beschrieben durchgeführt.

Assaypuffer

50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 4 – 5)

2.12.7.2 Bestimmung der pH-Stabilität

Für die Bestimmung der pH-Stabilität wurde der Mandelonitril-Spaltungsassay (2.12.7) mit Assaypuffer des zu untersuchenden pH-Werts durchgeführt. Dazu wurde die verdünnte *AfHNL*-haltige Lösung (0,5 µM *AfHNL* bzw. Fusionsprotein, 1:20 in Assaypuffer des jeweiligen pH-Werts verdünnt) in einem Reaktionsgefäß über einen Zeitraum von 0 bis zu 5 h inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurde 100 µl Probe entnommen und die Restaktivität mit dem Mandelonitril-Spaltungsassay bestimmt (2.12.7). Alle Messungen und Kontrollen wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt, wobei im Falle von Immobilisaten (2.12.2) der Endpunkt-basierte Assay genutzt wurde. Die Halbwertszeiten wurden durch Anpassung der experimentellen Daten mit einer exponentiellen Funktion erster Ordnung ermittelt.

2.12.8 Synthese von (*R*)-Mandelonitril

Für die Synthese von (*R*)-Mandelonitril [163] wurden 400 mg (Nassgewicht) von Cellulose-basierten *AfHNL*-FbFP-CBM-Immobilisaten bzw. 30 CA-Disks (2.12.2) eingesetzt. Dazu wurde das jeweilige Immobilisat in einem fest verschließbaren Glasgefäß, ausgerüstet mit einem Septum und einem Magnetrührstäbchen, vorgelegt und mit Argon begast. Daraufhin wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 2 M

HCN-Methyl-*tert*-Butylether (MTBE)-Lösung (2.12.8.1), 0,1 mmol Dodecan (0,1 M Endkonzentration) als internen Standard und 0,5 mmol Benzaldehyd (0,5 M Endkonzentration) gestartet. Die enzymatische (*R*)-Mandelonitril-Synthese wurde bei RT unter Rühren für mindestens 60 min verfolgt, wobei zu definierten Zeitpunkten Proben zur Analyse des Reaktionsverlaufs mittels chiraler Gaschromatographie (GC) entnommen wurden. Dazu wurden 20 μ l der Probe mit 1,5 ml Dichlormethan vermischt und anschließend 40 μ l Pyridin sowie 40 μ l Essigsäureanhydrid zur Derivatisierung der Reaktionsprodukte hinzugegeben. Dadurch wird das Mandelonitril acyliert und in den Ethylester überführt, sodass eine Trennung der (*R*)- und (*S*)-Enantiomere ermöglicht wurde. Die vorbereiteten GC-Proben wurden für mindestens 3 h bei RT inkubiert, um eine ausreichende Derivatisierung zu gewährleisten, bevor die GC-Analyse mithilfe eines Agilent 6890N Network GC-Systems mit Flammenionisationsdetektor (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) durchgeführt wurde. Dabei wurde eine CP-Chirasil-Dex CB Säule (25 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) und Wasserstoff als Trägergas verwendet. Die Probe wurde bei 120 °C auf die Säule injiziert und die Temperatur für 3 min konstant gehalten. Anschließend wurde der Säulenofen durch einen Gradienten (15 °C/min) auf 200 °C aufgeheizt. Der Umsatz wurde aus dem Verbrauch des Substrats Benzaldehyd anhand von relativen Peakflächen berechnet. Aus dem Verhältnis der relativen Peakflächen der Reaktionsprodukte wurde weiterhin der Enantiomerenüberschuss errechnet.

2.12.8.1 Herstellung von 2 M HCN-MTBE-Lösung

Für die Herstellung von 2 M HCN-MTBE-Lösung wurden 0,1 mol Natriumcyanid (4,9 g), 10 ml Milli-Q-Wasser und 25 ml MTBE in einem 100 ml Rundkolben gemischt und für mindestens 15 min auf Eis gerührt. Daraufhin wurden 10 ml 30 % (v/v) HCl-Lösung mit einem Tropftrichter langsam über einen Zeitraum von 15 min hinzugegeben, wobei sich das HCN löste. Anschließend wurde das Eis entfernt, wodurch sich die Lösung langsam auf RT erwärmte. Mit einem Scheidetrichter wurde die organische von der wässrigen Phase getrennt, wobei die wässrige Phase zweimal mit je 5 ml MTBE gewaschen wurde, um enthaltenes HCN zu extrahieren. Die organischen, HCN-haltigen Phasen wurden vereint und in einer dichtschießenden 100 ml Braunglasflasche über 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,5 gelagert [118].

Da die 2 M HCN-MTBE-Lösung und alle entstehenden Abfälle hochgradig giftig sind, musste die Herstellung unter großer Vorsicht in einem mit einer HCN-Warnanlage ausgerüsteten Abzug durchgeführt werden. Weiterhin wurden alle verwendeten Gefäße und Abfälle mit Natriumhypochlorid behandelt, wobei das giftige HCN in Stickstoff und CO₂ oxidiert wird. Alle flüssigen Abfälle wurden gesammelt und entsorgt.

2.12.8.2 MTBE-Vorbehandlung von Immobilisaten

Vor dem Einsatz von RAC-basierten (2.12.2.3) Immobilisaten (2.12.2) in die (*R*)-Mandelonitril-Synthese (2.12.8) wurde eine Behandlung mit MTBE getestet. Dazu wurden zunächst drei Bedingungen mit je 400 mg (Nassgewicht) eines Immobilisats aus Ganzzellextrakt (2.12.2), entsprechend einer Enzymmenge von 2,1 mg AtHNL-FbFP-CBM, untersucht. Im ersten Fall wurde das Immobilisat direkt im Glasgefäß vorgelegt, im zweiten Fall mithilfe einer Einwegspritze in das vorgelegte Reaktionsmedium gegeben und im dritten Fall zunächst einer MTBE-Vorbehandlung unterzogen. Dabei wurde das Immobilisat im Glasgefäß viermal je 5 min mit 1 ml trockenem MTBE (mit MgSO₄ getrocknet) gewaschen. Aufgrund von guter Handhabbarkeit und der potentiellen Wiederverwendbarkeit des Immobilisats wurde das RAC-basierte Immobilisat für spätere Synthesereaktionen in einem Beutel aus lösungsmittelresistenter Nylonmembran (Porengröße 40 µm, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) eingeschweißt. Der Nylonbeutel mit Immobilisat wurde vor dem Einsatz in die Synthesereaktion einer unterschiedlich langen Inkubation in MTBE unterzogen. So wurde eine Inkubationsdauer von 10 min in 10 ml trockenem MTBE gewählt, wobei die Inkubation ein-, zwei- oder dreimal wiederholt wurde.

Für die Recyclingexperimente (2.12.8.4) von RAC-basierten Immobilisaten wurde schließlich eine längere MTBE-Vorbehandlung angewendet. So wurde der Nylonbeutel zunächst 30 min in 20 ml trockenem MTBE und anschließend erneut 3 x 10 min in 10 ml trockenem MTBE inkubiert.

2.12.8.3 Vorbehandlung von Immobilisaten mit verschiedenen pH-Werten

Die Analyse, ob der pH-Wert des Puffers, mit dem das Cellulose-basierte Immobilisat vor dem Einsatz in die Synthesereaktion gewaschen wurde, einen Einfluss auf den

Reaktionsverlauf hatte, wurde mit CA-basiertem Immobilisat (2.12.2.2) durchgeführt. Dazu wurde das nasse Immobilisat (2.12.2) mit 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5,5 bzw. pH 6,5), wie in Kapitel 2.12.2 angegeben, gewaschen und anschließend unter Argon getrocknet. Mit dem so erhaltenen Immobilisat wurden (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktionen durchgeführt (2.12.8).

2.12.8.4 Recycling von Immobilisaten zur (*R*)-Mandelonitril-Synthese

Das Recycling von RAC-basierten Immobilisaten (2.12.2.3) wurde mit ca. 2,9 mg immobilisierter A β HNL-FbFP-CBM Präparation (2.12.2) durchgeführt. Dazu wurde das Immobilisat in einem Beutel aus lösungsmittelresistenter Nylonmembran (Porengröße 40 μ m, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) eingeschweißt, mit MTBE vorbehandelt (2.12.8.2) und in die erste Synthesereaktion eingesetzt (2.12.8). Nach der ersten Reaktion wurde der Beutel für 10 min in 10 ml MTBE gewaschen, um eventuelle Reste der Edukte und Produkte zu entfernen. Für diesen Waschschrift wurde entweder trockener MTBE (mit MgSO₄ getrocknet) oder Puffer-gesättigter (50 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,5) MTBE verwendet. Auf diese Weise wurden drei Synthesereaktionen nacheinander mit einem Waschschrift dazwischen durchgeführt. Im Falle von CA-basierten Immobilisaten (2.12.2.1) wurden zum Recycling 30 bzw. 20 CA-Disks (2.12.2), entsprechend einer Enzymmenge von 1,6 bzw. 1 mg, verwendet. Der Waschschrift zwischen den drei aufeinanderfolgenden Synthesereaktionen wurde mit 1 ml Puffer-gesättigtem MTBE für 1 min im Glasgefäß durchgeführt.

2.12.9 Cellulose-Bindungsassays

2.12.9.1 Zeitlicher Verlauf der Adsorption

Der Assay zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Adsorption von Fusionsproteinen an Cellulose-Trägermaterialien (Avicel PH-101 und RAC (2.12.2.3)) wurde mit gereinigtem Enzym (2.12.6.1) in Zellaufschlusspuffer (2.12.1) bei 25 °C durchgeführt. Dazu wurden 400 μ l Enzym (10 μ M) mit 400 μ l der jeweiligen Cellulose-Suspension (4 mg/ml Avicel bzw. 0,5 mg/ml RAC) vermischt und schüttelnd in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 1200 UpM inkubiert, sodass sich Endkonzentrationen von 5 μ M Enzym und 2 mg/ml Avicel bzw. 0,25 mg/ml RAC

ergaben. Die Inkubationszeit betrug zwischen 0 und 120 min. Danach wurde das Reaktionsgefäß zentrifugiert (18.890 g, 1 min, RT) und 600 µl des Überstands wurden sofort abgenommen, um die Absorption bei 280 nm in einer 10 mm Quarzküvette photometrisch (DU 650 Spectrophotometer, Beckman, Krefeld, Deutschland) zu bestimmen, wobei Aufschlusspuffer als Referenz diente. Als Kontrolle diente dabei ein Reaktionsgefäß mit 400 µl Aufschlusspuffer statt Cellulose-Suspension, das analog behandelt wurde. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Anhand der gemessenen Absorption bei 280 nm wurde die Proteinkonzentration mithilfe des entsprechenden theoretischen Extinktionskoeffizienten errechnet (2.12.3.2). Mit den berechneten Proteinkonzentrationen wurde die Menge adsorbiertes Protein als Differenz aus der Kontrollmessung ohne Cellulose und der Messung mit Cellulose ermittelt und auf die verwendete Menge Cellulose bezogen. Mithilfe folgender Formel konnten so die Parameter des zeitlichen Verlaufs der Adsorption berechnet werden [174].

$$A(t) = A_{\max} \times (1 - e^{(-k_{\text{ad}} \times t)})$$

$A(t)$	Menge adsorbiertes Protein ($\mu\text{mol}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{Cellulose}}$) zum Zeitpunkt t (min)
A_{\max}	maximale Menge adsorbiertes Protein ($\mu\text{mol}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{Cellulose}}$)
k_{ad}	Adsorptionsrate (min^{-1})

2.12.9.2 Bestimmung von Adsorptionsisothermen

Für die Bestimmung von Adsorptionsisothermen wurde analog zu Kapitel 2.12.9.1 vorgegangen, wobei die Protein-Endkonzentrationen zwischen 0,15 und 25 µM variierten und die Inkubationszeit 90 min für Avicel PH-101 bzw. 60 min für RAC betrug. Die ermittelte Differenz der Proteinkonzentration wurde gegen die freie Proteinkonzentration der Proben nach Inkubation mit Cellulose aufgetragen. Mit der folgenden Langmuir-Gleichung [175] konnten so die charakteristischen Parameter errechnet werden. Die Dissoziationskonstante K_D stellt dabei den Kehrwert der in der Literatur häufig verwendeten Assoziationskonstante K_a ($\text{Liter}/\mu\text{mol}_{\text{Protein}}$) dar.

$$A = \frac{A_{\max} \times E}{K_D + E}$$

A	Menge adsorbiertes Protein ($\mu\text{mol}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{Cellulose}}$)
A_{\max}	maximale Menge adsorbiertes Protein ($\mu\text{mol}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{Cellulose}}$)
K_D	Dissoziationskonstante ($\mu\text{mol}_{\text{Protein}}/\text{Liter}$)

2.12.9.3 pH-abhängige Desorption von Protein aus RAC-Immobilisaten

Zur Analyse der pH-abhängigen Desorption von adsorbiertem Protein aus dem Cellulosematerial RAC wurde zunächst AtHNL-FbFP-CBM aus *E. coli* BL21(DE3)-GZE auf RAC immobilisiert (2.12.2). Aus dem erhaltenen Immobilisat wurde eine 1 mg/ml Suspension, bezogen auf RAC, in Zellaufschlusspuffer (50 mM TEA pH 8, 2.12.1) hergestellt und in 1 ml auf Reaktionsgefäße aufgeteilt (entspricht 0,5 mg RAC). Die Reaktionsgefäße wurden anschließend zentrifugiert (18.890 g, 1 min, RT) und der Überstand möglichst vollständig abgenommen. Daraufhin wurde 1 ml AtHNL-Assaypuffer pH 4,75, pH 4,5 bzw. pH 4,25 (50 mM Natriumacetat-Puffer, 2.12.7) zu dem vorbereiteten RAC-Pellet im Reaktionsgefäß gegeben, welches kurz gevortext und schüttelnd (1000 UpM, 25 °C) in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert wurde. Nach einer definierten Zeit wurde das Reaktionsgefäß zentrifugiert (18.890 g, 1 min, RT), 600 μl des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der restliche Überstand möglichst genau verworfen. Das Pellet wurde daraufhin in 1 ml Zellaufschlusspuffer resuspendiert und zusammen mit dem Pellet für eine Messung des Fluoreszenzemissionsspektrums verwendet (2.13.2).

Um Aussagen über die maximale Menge an enthaltenem Protein treffen zu können, wurden entsprechend vorbereitete RAC-Pellets in 1 ml 6 M Guanidinhydrochlorid resuspendiert und bis zu 120 min schüttelnd inkubiert, bevor wie beschrieben der Überstand zur Messung von Fluoreszenzemissionsspektren gewonnen wurde (2.13.2). Für die benötigten Riboflavin-Kalibrierungsreihen wurde zunächst eine Riboflavin-Stammlösung (56,5 μM) in Milli-Q-Wasser angesetzt, die daraufhin in Puffer des entsprechenden pH-Werts verdünnt wurde (5,65 μM). Aus dieser Lösung wurden wiederum Verdünnungsreihen in Puffer des jeweiligen pH-Werts bzw. in 6 M Guanidinhydrochlorid hergestellt (pH 4,75, pH 4,5, pH 4,25: 1,13 – 0 μM , Guanidin-

hydrochlorid: 2,26 – 0 μM). Die Lösungen wurden zur Messung von Fluoreszenz-emissionsspektren verwendet (2.13.2).

Weiterhin wurde von der RAC-Suspension in Zellaufschlusspuffer sowie von den Überständen zum Zeitpunkt $t = 0$ min und zur maximalen Inkubationsdauer Proben für eine SDS-PAGE Analyse hergestellt (2.12.5). Guanidinhydrochlorid-haltige Proben wurden zuvor mit Ethanol gefällt (2.12.5.2).

2.13 Spektroskopische Messungen

2.13.1 Qualitativer Nachweis von FbFP-Fluoreszenz

Zum qualitativen Nachweis der FbFP-Fluoreszenz in Cellulose-Immobilisaten von Proteinen (2.12.2) wurde ein Blau-Licht/UV-Dünnschicht-Illuminator (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée Cedex, Frankreich) (2.16) verwendet. Die Probe konnte auf diese Weise mit Licht der Wellenlänge 365 nm angeregt und die resultierende Fluoreszenz qualitativ betrachtet werden.

2.13.2 Messung von Fluoreszenzemissionsspektren

Die Fluoreszenzemissionsspektren der Fusionsproteine CBM-FbFP und FbFP-CBM wurden mit einem Fluoreszenzphotometer (LS-50B, Perkin-Elmer, Rodgau, Deutschland) (2.17) aufgenommen. Dazu wurde die jeweilige Proteinprobe (2.12.6) mit Licht einer Wellenlänge von 450 nm angeregt und das resultierende Emissionsspektrum im Wellenlängenbereich von 480 bis 600 nm (Spalt auf Emissions- und Anregungsseite: 5 nm) aufgezeichnet. Alle Fluoreszenz-Messungen wurden in einer 10 mm Quarzküvette bei 25 °C mit dem jeweiligen Puffer als Referenz durchgeführt.

Die Fluoreszenzemissionsspektren des Fusionsproteins *AtHNL-FbFP-CBM* sowie von Riboflavin-Lösungen wurden mithilfe eines Mikrotiterplatten-Fluoreszenzphotometers (infinite M1000 PRO, Tecan, Männedorf, Schweiz) (2.17) aufgenommen. Dazu wurden schwarze 96-well Mikrotiterplatten (Nunclo 96 *flat bottom black*, Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) mit einem Füllvolumen von 100 μl verwendet (z-Position 18.909 μm). Die Proben wurden mit Licht einer Wellenlänge von 450 nm angeregt (25 Lichtblitze, 400 Hz) und das resultierende Emissionsspektrum in 1 nm Schritten im Wellenlängenbereich von 460 bis 600 nm (Spalt auf Emissions- und Anregungsseite: 5 nm) mit einer Verstärkung von 150 aufgezeichnet,

wobei die Platte vor jeder Messung geschüttelt wurde (2 s, orbital, 1 mm Amplitude). Alle Fluoreszenz-Messungen wurden bei 25 °C mit dem jeweiligen Puffer als Referenz durchgeführt.

2.14 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierung wurde als Auftragsarbeit von der Firma SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Zur Sequenzierung wurden die vektorspezifischen Oligonukleotide T7 und T7-Term eingesetzt. Die Sequenzierung von pA θ HNL-FbFB-CBM und pA θ HNL-FbFP erfolgte weiterhin mit dem Oligonukleotid Seq_FbFP_r (2.3, Tab. 4).

2.15 Gensynthese

Die Synthese von Genen wurde als Auftragsarbeit von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde die Gensequenz zunächst an den Kodongebrauch von *E. coli* angepasst.

2.16 Computerprogramme und Webtools

Die Erstellung von Klonierungsstrategien und Plasmidkarten erfolgte unter Verwendung des Programms „Clone Manager“ (Scientific & Educational Software, Cary, NC, USA). Für die Anpassung von experimentellen Messdaten wurde das Programm „Origin 7.0“ (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) verwendet. Dreidimensionale Strukturen von Proteinen wurden mit dem Programm „PyMol“ (Schrödinger Inc., New York, NY, USA) visualisiert und dargestellt. Die Ermittlung der theoretischen Parameter (z. B. Molekulargewicht, Extinktionskoeffizient bei 280 nm) von Proteinen erfolgte mithilfe des Webtools „ProtParam“ (<http://web.expasy.org/protparam/>).

2.17 Geräte

Tab. 9: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blaulicht-/UV-Dünnschicht-Illuminator	CN-6 Dunkelkammer	Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée Cedex, Frankreich
Elektrophoreseapparaturen	Mini-PROTEAN Gelkammer II	BioRad, München, Deutschland
	XCell SureLock™ Mini-Cell	life technologies, Darmstadt, Deutschland
Feinwaage	2004 MP	Sartorius, Göttingen, Deutschland
<i>French Pressure Cell</i>	French Press 40K Cell	Thermo Electron Corporation, Bonn, Deutschland
Inkubationsschüttler	Infors HT Multitron	Infors GmbH, Einsbach, Deutschland
PCR-Automat	TProfessional Basic Gradient	Biometra, Göttingen, Deutschland
Spektralphotometer	DU 650 Spectrophotometer	Beckman, Krefeld, Deutschland
Fluoreszenzphotometer	LS-50B	Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland
	infinite M1000 PRO	Tecan, Männedorf, Schweiz
Thermoblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultraschallgerät	Sonopuls HD2070	Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland
Videodokumentation	EagleEye II	Stratagene, La Jolla, CA, USA
	Stella	Raytest, Straubenhardt, Deutschland
Kühlzentrifugen	Rotina 35 R	Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
	Mikro 200R	Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
	RC-6 Plus	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, Deutschland

Alle nicht aufgeführten Kleingeräte entsprachen den allgemeinen Laborstandards.

3 ERGEBNISSE

Für biotechnologische Prozesse werden Enzyme als Biokatalysatoren häufig in immobilisierter Form verwendet, da sie auf diese Weise oftmals über verbesserte Eigenschaften (z. B. Stabilität) verfügen und sich einfach aus dem Reaktionssystem abtrennen sowie wiederverwenden lassen. Die Immobilisierung erfolgt dabei häufig unter Verwendung eines Trägermaterials (siehe Kapitel 1.3).

In dieser Arbeit wurden Cellulose-Bindemodule als Unterkategorie der Kohlenhydrat-Bindemodule (*carbohydrate-binding modules*, CBMs) hinsichtlich ihrer Eignung als alternative Immobilisierungstags für ein Modellenzym evaluiert. CBMs kommen als Domänen in einer Vielzahl von Enzymen (z. B. Cellulasen) vor, die beispielsweise bei der Verstoffwechslung von Cellulose beteiligt sind (siehe Kapitel 1.5). Dabei weisen CBMs unter anderem eine hohe Affinität und Spezifität zur entsprechenden Cellulose auf, was CBMs als potentielle Immobilisierungstags für Enzyme attraktiv macht.

3.1 Fusionen von CBMs mit dem Fluoreszenzreporter FbFP

Für den direkten, nicht-invasiven Nachweis der Adsorption von CBM-enthaltenden Fusionsproteinen an Cellulose wurde ein Fluoreszenzreporterprotein verwendet. Dabei wurde ein neuartiger Reporter, ein sogenanntes Flavin-basiertes Fluoreszenzprotein (FbFP), ausgewählt [176]. Dieses FbFP basiert auf der *light, oxygen, voltage* (LOV)-Domäne des Blaulichtrezeptors YtvA aus *Bacillus subtilis*, welcher modular aufgebaut ist (Abb. 11) und über eine carboxy-terminale STAS-Domäne (*sulfate transporter anti-sigma factor antagonist*) sowie verschiedene Linkerelemente verfügt. Die LOV-Domäne enthält dabei Flavinmononukleotid (FMN) als für die Fluoreszenz essentiellen, nicht-kovalent gebundenen Chromophor [177]. Nach Blaulichtbestrahlung der wildtypischen LOV-Domäne kommt es zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen einem konservierten Cysteinrest und dem FMN-Molekül, die anschließend in der Dunkelheit thermisch über einen gewissen Zeitraum gelöst wird [178]. Durch den Austausch des photoaktiven Cysteins gegen ein Alanin kann eine Autofluoreszenz nach Blaulichtbestrahlung gewährleistet werden, da die kovalente Bindung nicht ausgebildet werden kann und somit die durch Absorption aufgenommene Lichtenergie in Form von Fluoreszenz emittiert wird [176].

3.1.1 Auswahl geeigneter CBMs zur Erzeugung von Fusionsproteinen

Für die Fusion eines CBM an ein Zielenzym und die Evaluierung der Nutzbarkeit der CBM als Immobilisierungstag wurde zunächst ein geeignetes Cellulose-bindendes CBM aus zwei Familie-2, Typ A CBMs ausgewählt. Familie-2 CBMs kommen in einer Vielzahl bakterieller Enzyme vor, bestehen aus etwa 110 Aminosäuren und viele ihrer Vertreter wurden bereits ausgiebig in der Literatur beschrieben [123, 179-181]. Weiterhin weisen viele Mitglieder der Familie-2 CBMs eine irreversible Bindung an Cellulose auf [182, 183], was eine wichtige Rolle für die Nutzung als potentieller Immobilisierungstag spielt. Daher wurden zwei CBMs aus dem grampositiven Bodenbakterium *Cellulomonas fimi* ausgewählt; zum einen das CBM der Endoglucanase CenA [184] und zum anderen das CBM der Exoglucanase/Xylanase Cex [183]. In CenA ist das CBM amino- und in Cex carboxy-terminal in Bezug auf die katalytische Domäne lokalisiert (Abb. 11) [185]. Die beiden ausgesuchten CBMs boten daher Möglichkeiten zur amino- bzw. carboxy-terminalen Fusion einer weiteren Protein-domäne unter Ausnutzung des natürlich vorkommenden jeweiligen Prolin-Threonin-Linkers [186]. Als Fusionspartner wurde das beschriebene FbFP (3.1) verwendet, sodass sich die beiden Fusionsproteine CBM-FbFP und FbFP-CBM ergaben.

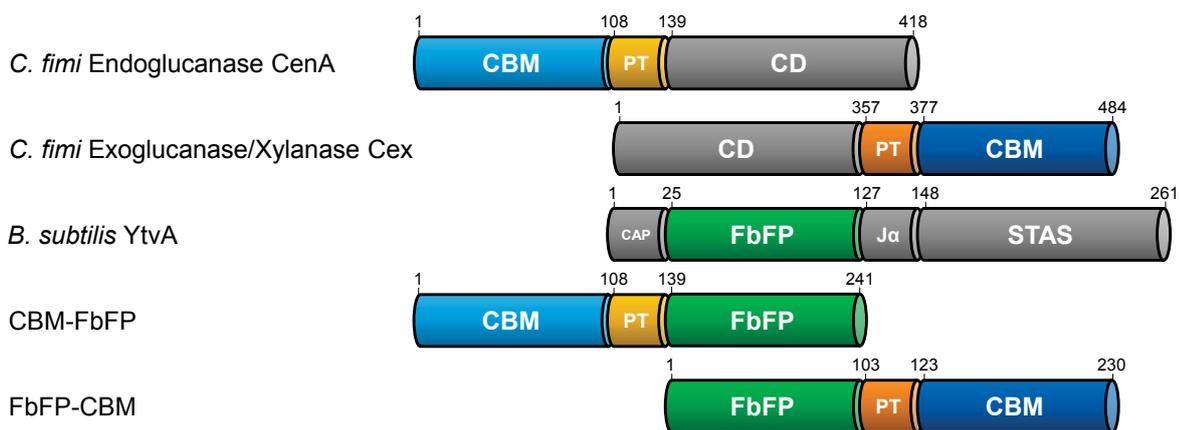


Abb. 11: Schematischer Aufbau der Ursprungsproteine CenA, Cex und YtvA sowie der Fusionsproteine CBM-FbFP und FbFP-CBM. Die Zahlen geben die Aminosäureposition im jeweiligen Vollängenprotein an und illustrieren den modularen Aufbau des entsprechenden Proteins bzw. Fusionsproteins. CBM: Cellulose-Bindemodul, PT: Prolin-Threonin-Linker, CD: katalytische Domäne, CAP: amino-terminales, α -helikales *cap*, FbFP: Flavin-basiertes Fluoreszenzprotein, $J\alpha$: carboxy-terminaler, α -helikaler Linker, STAS: *sulfate transporter anti-sigma factor antagonist* Domäne. Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

Die Fusionsproteine wurden heterolog in *E. coli* BL21(DE3) produziert und hinsichtlich ihrer Fluoreszenz sowie Adsorption an Cellulose charakterisiert, um das geeignetste Protein zu identifizieren, das im Folgenden als Fusionsmodul für ein Modellenzym dienen sollte.

3.1.2 Erzeugung der Expressionsvektoren pCBM-FbFP und pFbFP-CBM

Zur Untersuchung der Fusionsproteine CBM-FbFP und FbFP-CBM mussten zunächst die entsprechenden Expressionsvektoren erzeugt werden. Dazu wurden die kodierenden Sequenzen für CBM-FbFP und FbFP-CBM an den *E. coli*-Kodongebrauch angepasst und als synthetisches Gen hergestellt (2.15). Dabei wurden am 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyende der Sequenz Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen angefügt (CBM-FbFP: *Nde*I/*Xho*I, FbFP-CBM: *Nde*I/*Sal*I). In Abb. 12 ist die verwendete Klonierungsstrategie schematisch dargestellt. Die erhaltenen Vektoren pCR2.1_CBM-FbFP und pCR2.1_FbFP-CBM (2.2, Tab. 3) wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert (2.8.1), die entstandenen DNA-Fragmente *cbm-fbfp* und *fbfp-cbm* aus einem Agarosegel isoliert (2.7.2) und mit einem analog hydrolysierten Leervektor (CBM-FbFP: pET22b, FbFP-CBM: pET28a) (2.2, Tab. 3) ligiert (2.8.2).

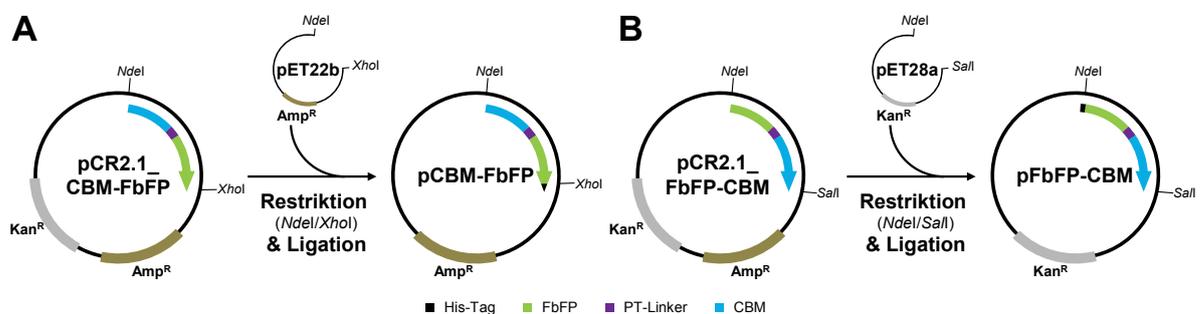


Abb. 12: Schematische Darstellung der verwendeten Klonierungsstrategie zur Erzeugung der Vektoren pCBM-FbFP (A) und pFbFP-CBM (B). Mittels Restriktion mit den entsprechenden Endonukleasen wurden die Vektoren pCR2.1_CBM-FbFP und pCR2.1_FbFP-CBM sowie die Leervektoren pET22b bzw. pET28a hydrolysiert. Durch Ligation mit dem entsprechenden Leervektor wurden die Vektoren pCBM-FbFP und pFbFP-CBM erhalten, wobei die jeweils verwendeten Restriktionsendonukleasen der Abbildung zu entnehmen sind. Die Bedeutung der farblichen Hervorhebung der einzelnen DNA-Abschnitte ist in der Legende zusammengefasst.

Nach der Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* DH5 α -Zellen (2.9), wurde die Plasmid-DNA aus den Transformanden isoliert (2.7.1) und die Korrektheit der DNA-Sequenzen mittels Sequenzierung verifiziert (2.14). Die Plasmide wurden daraufhin als pCBM-FbFP und pFbFP-CBM bezeichnet (2.2, Tab. 3).

Die Expressionsvektoren pCBM-FbFP und pFbFP-CBM konnten erfolgreich mithilfe von molekularbiologischen Methoden erzeugt werden.

3.1.3 Heterologe Produktion und Charakterisierung der Fusionsproteine FbFP-CBM und CBM-FbFP

Die Fusionsproteine wurden zunächst in *E. coli* BL21(DE3) heterolog produziert, um eine anschließende vergleichende Charakterisierung hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften und ihrer Adsorption an Cellulose zu ermöglichen. Dazu wurden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen (2.1) mit den erzeugten Vektoren pCBM-FbFP bzw. pFbFP-CBM transformiert (2.9) und eine Kultivierung in Autoinduktionsmedium (2.6) zur heterologen Produktion der entsprechenden Fusionsproteine durchgeführt (2.6.2). Die erhaltenen Zellen wurden daraufhin in Natriumphosphat-Zellaufschlusspuffer resuspendiert und mithilfe einer *French Pressure Cell* aufgeschlossen (2.12.1). Anschließend wurden die Fusionsproteine mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC, 2.12.6.1) über den amino- (FbFP-CBM) bzw. carboxy-terminalen (CBM-FbFP) His-Tag gereinigt. Von den löslichen sowie den unlöslichen Bestandteilen und der entsprechenden Elutionsfraktion wurde eine Untersuchung der Proteinzusammensetzung mittels SDS-PAGE Analyse (2.12.5) durchgeführt, wobei die jeweilige Elutionsfraktion ebenfalls zur Aufnahme von Fluoreszenzemissionsspektren nach einer Anregung bei 450 nm verwendet wurde (2.13.2).

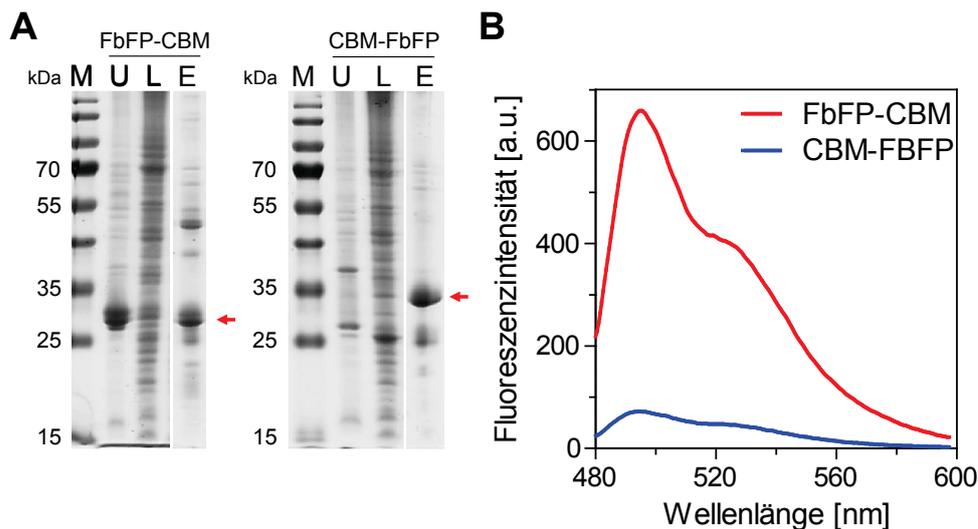


Abb. 13: Vergleichende Untersuchung der Fusionsproteine FbFP-CBM und CBM-FbFP hinsichtlich ihrer Produktion und Fluoreszenzeigenschaften. **A** SDS-PAGE Analyse der beiden Fusionsproteine. Das jeweilige Fusionsprotein überproduzierende *E. coli* BL21(DE3)-Zellen wurden mittels *French Pressure Cell* aufgeschlossen und die lösliche Fraktion über Talon-Material gereinigt. Pro Spur wurden etwa 10 µg bzw. ein entsprechendes Volumen der unlöslichen Fraktion oder 5 µg (gereinigtes) Protein auf das 12 % Gel aufgetragen, das zur Visualisierung der Proteine mit kolloidaler Coomassie-Brillant-Blau-Färbungslösung gefärbt wurde. Der rote Pfeil kennzeichnet die zu erwartende Größe des jeweiligen Fusionsproteins (FbFP-CBM 27 kDa, CBM-FbFP 28 kDa). M: Marker („Prestained Protein Ladder“), U: unlösliche Fraktion, L: lösliche Fraktion, E: Elution nach IMAC-Reinigung. **B** Fluoreszenzemissionsspektren der entsprechenden Elutionsfraktion nach IMAC-Reinigung. Die jeweilige Proteinprobe wurde mit Licht der Wellenlänge 450 nm angeregt, bevor Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen wurden (2.13.2), wobei die Proteinkonzentration jeweils 0,4 mg/ml betrug.

In der SDS-PAGE Analyse (Abb. 13 A) war bei beiden Proteinen sowohl in der unlöslichen als auch in der löslichen Fraktion eine Vielzahl von Banden sichtbar, die Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts repräsentieren. Im Falle von FbFP-CBM war in beiden Fraktionen und in der Elution der Reinigung mittels IMAC eine Bande zu erkennen, die einem Protein mit einer ungefähren molekularen Masse von 27 kDa entsprach, wobei die Intensität der Bande in der unlöslichen Fraktion deutlich ausgeprägter war. In der Elutionsfraktion waren neben dieser ausgeprägten Bande weitere Banden sichtbar. Die Größe der ausgeprägten Bande stimmte mit der theoretischen molekularen Masse des Fusionsproteins FbFP-CBM von ca. 27 kDa überein. In der SDS-PAGE Analyse für das Fusionsprotein CBM-FbFP war in allen drei Fraktionen eine Bande zu beobachten, die einem Protein mit einer molekularen Masse von ungefähr 28 kDa entsprach, was mit der theoretisch ermittelten Masse des Fusionsproteins übereinstimmte. Die Fluoreszenzemissionsspektren der jeweiligen Elutionsfraktion nach Reinigung mittels IMAC (Abb. 13 B) zeigten ein Bandenmuster, das für LOV-Proteine – und somit FbFPs – charakteristisch ist. Diese besitzen ein Maximum bei 495 nm sowie eine Schulter bei 520 nm [188]. Dabei war die Fluoreszenzintensität bei gleicher Proteinkonzentration im Falle von FbFP-CBM etwa um den Faktor 10 höher als für CBM-FbFP. Beide Analysen legten demnach nahe, dass die beiden Fusionsproteine heterolog in *E. coli* BL21(DE3) in fluoreszenter Form produziert und mittels IMAC gereinigt werden konnten.

Die Fusionsproteine CBM-FbFP und FbFP-CBM ließen sich erfolgreich heterolog in fluoreszenter Form in *E. coli* BL21(DE3) produzieren und mittels IMAC reinigen. Dabei zeigte FbFP-CBM eine etwa 10-fach höhere Fluoreszenzintensität als CBM-FbFP.

3.1.3.1 Interaktion der Fusionsproteine FbFP-CBM und CBM-FbFP mit Cellulose

Im Folgenden wurde die Adsorption der Fusionsproteine FbFP-CBM und CBM-FbFP an Cellulosematerialien untersucht, wobei eine direkte Visualisierung der Bindung anhand der FbFP-Fluoreszenz durchgeführt wurde. Als Cellulosematerial wurde ein Celluloseacetat-Membranfilter (CA) gewählt. Dazu wurden die Fusionsproteine in *E. coli* BL21(DE3) heterolog produziert (2.6.2) und nach dem Zellaufschluss (2.12.1)

mittels IMAC (2.12.6.1) gereinigt (vgl. Abb. 13 A). Die so erhaltenen gereinigten Fusionsproteine wurden auf einen CA-Filter getropft (2.12.2.1), welcher direkt unter ultraviolettem (UV) Licht analysiert (2.13.1) wurde. Als Kontrollen dienten Puffer, die lösliche Fraktion von *E. coli* BL21(DE3), welche den jeweiligen Leervektor enthielten, sowie das gereinigte Protein FbFP_K, das lediglich aus der FbFP-Domäne besteht. Der CA-Filter wurde anschließend 30 min in Puffer gewaschen, bevor er erneut unter UV-Licht analysiert wurde (Abb. 14).

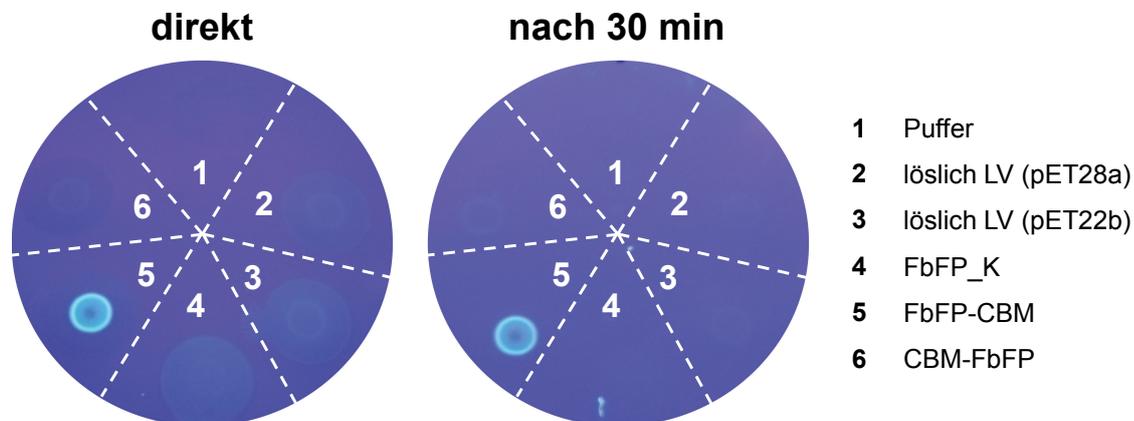


Abb. 14: Visualisierung der Interaktion der Fusionsproteine FbFP-CBM und CBM-FbFP mit einem CA-Filter unter UV-Licht. Es wurden 10 µl der jeweiligen Proteinprobe auf einen CA-Filter gegeben, was 21,2 µg Protein in den Leervektor-Kontrollen (LV) bzw. 4,6 µg im Falle von gereinigten Proteinen (FbFP_K, FbFP-CBM, CBM-FbFP) entspricht. Nach dem Einziehen der Lösung wurde der CA-Filter unter UV-Licht (365 nm) analysiert, bevor er für 30 min in Puffer (10 mM NaH₂PO₄, 20 mM NaCl, pH 8) gewaschen und erneut visualisiert wurde.

Die direkte Betrachtung des CA-Filters unter UV-Licht nach dem Auftragen der verschiedenen Lösungen zeigte im Falle von Protein-haltigen Lösungen eine grünblaue Fluoreszenz, die unterschiedlich stark ausgeprägt war (Abb. 14). Bei den Leervektor-Kontrollen, dem Kontrollprotein FbFP_K sowie CBM-FbFP war die Fluoreszenz schwach ausgeprägt und über die gesamte Ausdehnung der eindiffundierten Probenlösung verteilt. Das Fusionsprotein FbFP-CBM zeigte dagegen eine stark ausgeprägte, grünblaue Fluoreszenz, welche deutlich begrenzt war und sich nicht über die gesamte Probenfläche ausdehnte. Nach dem 30-minütigen Waschen in Puffer war lediglich bei FbFP-CBM eine deutliche grünblaue Fluoreszenz zu beobachten, was auf eine Adsorption des Proteins an das Cellulosematerial CA hindeutete.

Anhand der ausgeprägten FbFP-Fluoreszenz konnte eine Interaktion des Fusionsproteins FbFP-CBM mit Celluloseacetat nachgewiesen werden. Aufgrund dessen konnte FbFP-CBM als geeignetes Fusionsmodul für weitere Versuche identifiziert werden.

3.2 Fusion der AtHNL mit dem Modul FbFP-CBM

Die Hydroxynitril-Lyase aus *Arabidopsis thaliana* (AtHNL) [98] wurde als Modellenzym zur Generierung eines Fusionsprotein mit dem zuvor etablierten FbFP-CBM Modul gewählt, wobei die AtHNL amino-terminal an FbFP-CBM fusioniert wurde. Als Platzhalter zwischen der AtHNL und der angrenzenden FbFP-Domäne wurde ein flexibler GS-Linker ((Gly-Gly-Gly-Ser)₂) verwendet [189]. Zusätzlich zum Fusionsprotein AtHNL-FbFP-CBM wurde AtHNL-FbFP, bei dem die CBM-Domäne entfernt wurde, als Kontrolle hergestellt. Der schematische Aufbau der verwendeten Proteine und geplanten Fusionsproteine ist in Abb. 15 dargestellt.

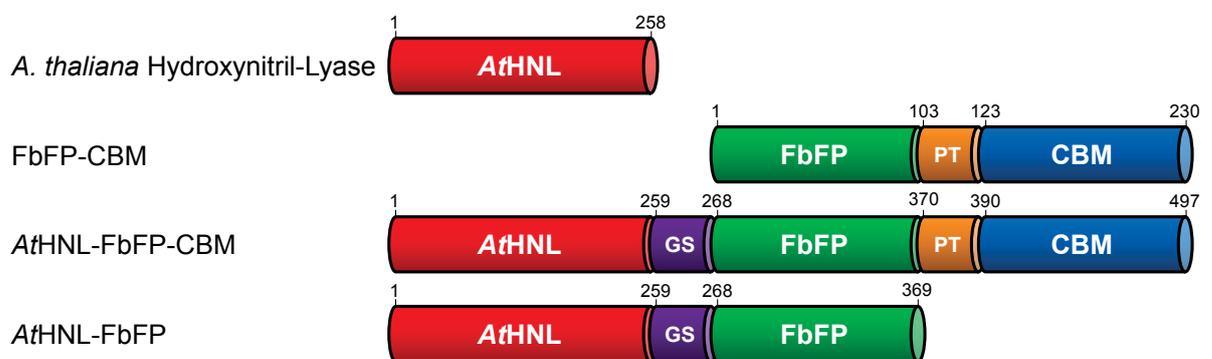


Abb. 15: Schematischer Aufbau der AtHNL, des Fusionsmoduls FbFP-CBM sowie der Fusionsproteine AtHNL-FbFP-CBM und AtHNL-FbFP. Die Zahlen über dem jeweiligen Protein bzw. Konstrukt definieren die Grenzen (Aminosäureposition in der Sequenz) der fusionierten Domänen im entsprechenden Protein. AtHNL: Hydroxynitril-Lyase aus *Arabidopsis thaliana*, FbFP: Flavin-basiertes Fluoreszenzprotein, PT: Prolin-Threonin-Linker, CBM: Cellulose-Bindemodul, GS: flexibler, zweifacher Gly-Gly-Gly-Ser Linker. Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

Die Fusionsproteine wurden heterolog in *E. coli* BL21(DE3) produziert und anschließend eingehend charakterisiert. Dabei wurde die Funktionalität jeder fusionierten Proteindomäne untersucht, d. h. die HNL-Aktivität (vermittelt durch die AtHNL), die Fluoreszenzeigenschaften (vermittelt durch die FbFP-Domäne) sowie die Adsorption an verschiedene Cellulosematerialien, die durch die CBM-Domäne vermittelt wird.

3.2.1 Erzeugung der Expressionsvektoren p*AtHNL*-FbFP-CBM und p*AtHNL*-FbFP

Zur Untersuchung des Fusionsproteins *AtHNL*-FbFP-CBM musste zunächst ein entsprechender Expressionsvektor konstruiert werden, dessen Klonierungsstrategie in Abb. 16 schematisch dargestellt ist. Dazu wurde eine *touchdown* PCR (2.11.1) mit den Oligonukleotiden *AtHNL*_NcoI_NheI_f und *AtHNL*_GS_NdeI_r (2.3, Tab. 4) sowie pETnFbFP-*AtHNL* (2.2, Tab. 3) als Matrize durchgeführt. Dabei wurde am 5'-Phosphatende der DNA die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *NheI* angefügt. Darüber hinaus wurde am 3'-Hydroxyende die für einen flexiblen GS-Linker ((Gly-Gly-Gly-Ser)₂) kodierende Sequenz sowie die Schnittstelle für die Endonuklease *NdeI* hinzugefügt. Das resultierende Genfragment *athnl-gs* wurde nach einer gelelektrophoretischen Reinigung (2.7.2) isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *NdeI* hydrolysiert (2.8.1). Dieses Fragment wurde mit dem entsprechend hydrolysierten Plasmid pFbFP-CBM (2.2, Tab. 3) ligiert (2.8.2), sodass eine Transformation (2.9.2) von kompetenten *E. coli* DH5α-Zellen (2.9.1) und die Isolierung von Plasmid-DNA (2.7.1) aus den erhaltenen Transformanden ermöglicht wurde. Durch die Restriktion des Ursprungsvektors pFbFP-CBM mit *NcoI* und *NdeI* wurde die Sequenz entfernt, welche für den His-Tag kodiert. Um eine spätere affinitätschromatographische Reinigung mittels IMAC zu ermöglichen, musste daher die für einen His-Tag kodierende Sequenz erneut eingefügt werden. Dazu wurde über Anlagerung der zwei teilweise komplementären Oligonukleotide *NcoI*_His_f und *NheI*_His_r (2.3, Tab. 4) ein entsprechendes kurzes doppelsträngiges DNA-Fragment erzeugt (2.8.3), das am 5'-Ende kompatible *NcoI*- und am 3'-Ende *NheI*-Überhänge besaß. Dadurch konnte das kurze DNA-Fragment in den entsprechend mit *NcoI* und *NheI* hydrolysierten (2.8.1) Vektor p_*AtHNL*-FbFP-CBM ligiert werden. Nach der Transformation von *E. coli* DH5α-Zellen (2.9) und einer Plasmid-Isolierung (2.7.1) wurde die Plasmid-DNA sequenziert (2.14), um die korrekte Sequenz nachzuweisen. Das Plasmid wurde anschließend als p*AtHNL*-FbFP-CBM bezeichnet.

Für spätere Experimente wurde ebenfalls ein *AtHNL*-FbFP Kontrollkonstrukt erzeugt, indem mittels ortsgerichteter Mutagenese (2.11.2) ein Basenaustausch in p*AtHNL*-FbFP-CBM vorgenommen wurde, der in der Generierung eines Stoppkodons nach dem *fbfp* Genfragment resultierte. Dazu wurden die Oligonukleotide QC_FbFP_Stop_CBM_f und QC_FbFP_Stop_CBM_r (2.3, Tab. 4) verwendet. Nach der

Sequenzierung (2.14) der isolierten Plasmid-DNA (2.7.1) zum Nachweis der korrekten Sequenz, wurde der Vektor als pA*t*HNL-FbFP bezeichnet.

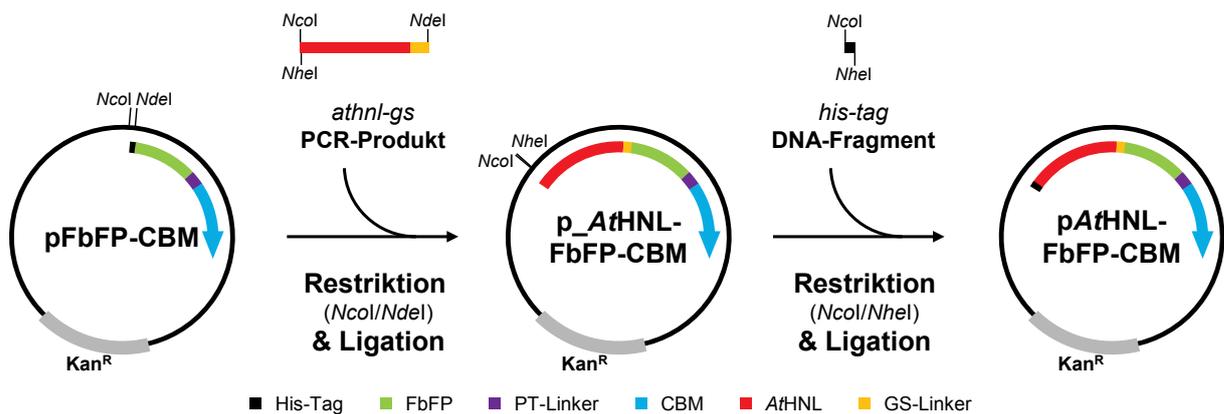


Abb. 16: Schematische Darstellung der verwendeten Klonierungsstrategie zur Erzeugung des Vektors pA*t*HNL-FbFP-CBM. Mittels einer *touchdown* PCR wurde das PCR-Produkt *athnl-gs* generiert, welches anschließend einer Restriktion mit *NcoI* und *NdeI* unterzogen wurde. Durch die Ligation mit dem entsprechend hydrolysierten Vektor pFbFP-CBM wurde auf diese Weise der Vektor p_A*t*HNL-FbFP-CBM erhalten, welcher am 5'-Phosphatende der Genfusion über keine für einen His-Tag kodierende Sequenz verfügte. Diese wurde im nächsten Schritt wieder eingeführt, indem ein kurzes doppelsträngiges DNA-Fragment durch Zusammenlagerung geeigneter Oligonukleotide generiert wurde. Dieses Fragment wurde in den mit *NcoI* und *NheI* hydrolysierten Vektor ligiert, um den Vektor pA*t*HNL-FbFP-CBM zu erhalten. Die für die Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen sind der jeweiligen Abbildung zu entnehmen.

Die Expressionsvektoren pA*t*HNL-FbFP-CBM und pA*t*HNL-FbFP konnten erfolgreich mithilfe von molekularbiologischen Methoden erzeugt werden.

3.2.2 Interaktion von A*t*HNL-FbFP-CBM mit Cellulose

Für die Analyse der Interaktion des Fusionsproteins A*t*HNL-FbFP-CBM mit Cellulose wurden unterschiedliche Materialien gewählt. So wurde kommerziell erhältliche mikrokristalline Cellulose (Avicel PH-101, im Folgenden Avicel genannt, Sigma, München, Deutschland), Elektrophoresepapier (Whatman Chr 1, GE Healthcare, München, Deutschland), Celluloseacetat-Filterpapier (CA-Filter, 0,2 µm Porengröße, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) sowie Baumwollstoff als mögliches Trägermaterial getestet. Zusätzlich zu den kommerziell erhältlichen Materialien wurde ausgehend von Avicel eine sogenannte regenerierte amorphe Cellulose (RAC) präpariert, indem Avicel zunächst befeuchtet, in *ortho*-Phosphorsäure gelöst und schließlich mit Wasser gefällt wurde (2.12.2.3). Die so produzierte RAC wurde einer rasterelektronenmikroskopischen (REM) Untersuchung unterzogen (Abb. 17), wobei Avicel als Vergleich diente.

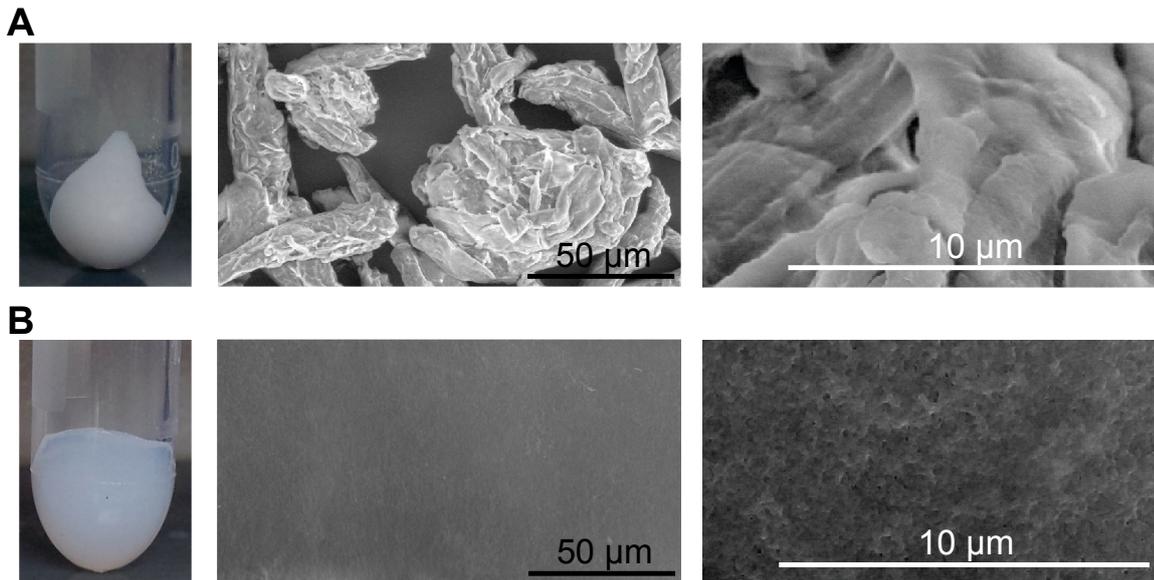


Abb. 17: Vergleich der Cellulosematerialien Avicel (A) und RAC (B). Der makroskopische Vergleich wurde ausgehend von einer Suspension der jeweiligen Cellulose durchgeführt, die zentrifugiert und deren Überstand abgenommen wurde. Für die REM-Bilder wurde ein Tropfen einer 10 g/l Suspension der entsprechenden Cellulose auf eine polierte Siliziumscheibe getropft und mit Stickstoff getrocknet, bevor die Bilder als Auftragsarbeit am Karlsruhe Institut für Technologie aufgenommen wurden (2.12.2.3). Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

Wie in Abb. 17 zu erkennen ist, zeigten sich bereits deutliche Unterschiede im makroskopischen Vergleich von zentrifugierten Cellulosesuspensionen. Avicel (Abb. 17 A) lag als dicht gepacktes, nasses Pulver vor, wohingegen RAC (Abb. 17 B) eine gelartige Konsistenz besaß. In den REM-Aufnahmen war des Weiteren zu erkennen, dass Avicel eine definierte Struktur mit mittleren Partikelgrößen von etwa 50 µm besaß. Im Gegensatz dazu ließ sich bei RAC keine definierte Struktur beobachten.

3.2.2.1 Adsorption aus Ganzzellextrakt

Die beschriebenen Cellulosematerialien Avicel, RAC, Elektrophoresepapier, CA-Filter und Baumwollstoff wurden im Weiteren auf ihre Eignung zur Adsorption des Fusionsproteins AtHNL-FbFP-CBM direkt aus Ganzzellextrakt (GZE) getestet. Dazu wurden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen (2.1), die das Plasmid pAtHNL-FbFP-CBM (2.2) enthielten, nach einer Überexpression in Autoinduktionsmedium (2.6.2) durch Zentrifugation geerntet und mittels Ultraschall aufgeschlossen (2.12.1). Der lösliche Überstand nach dem Zellaufschluss, der den GZE darstellt, wurde daraufhin mit den verschiedenen Cellulosematerialien über Nacht inkubiert, um eine Adsorption und somit Immobilisierung zu ermöglichen (2.12.2). Die Cellulosematerialien wurden nach der Inkubation in GZE mehrfach mit Puffer (2.12.1) gewaschen und schließlich unter

UV-Licht der Wellenlänge 365 nm analysiert (2.13.1). Licht dieser Wellenlänge dient dabei der Anregung des FbFPs, was eine sichtbare Fluoreszenz beim Vorhandensein des FbFPs zur Folge haben sollte. Als Kontrolle diente das entsprechende Cellulosematerial, welches lediglich in Puffer inkubiert wurde (Abb. 18).

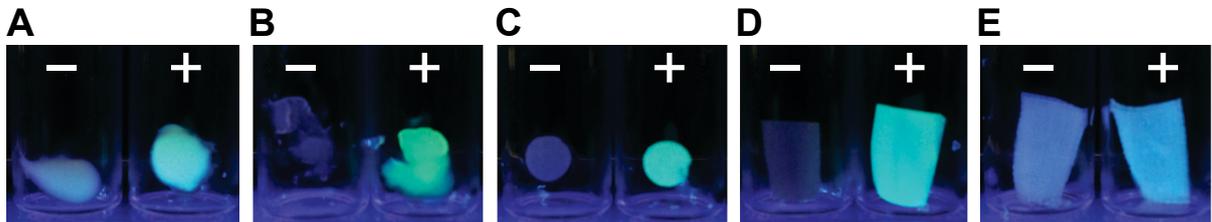


Abb. 18: Qualitativer Fluoreszenz-Nachweis der Adsorption von *AtHNL-FbFP-CBM* aus *E. coli* BL21(DE3)-GZE an verschiedene Cellulosematerialien. Der GZE einer entsprechenden Überexpressionskultur wurde mit Avicel (A), RAC (B), Elektrophoresepapier (C), CA-Filter (D) oder Baumwollstoff (E) über Nacht inkubiert, mehrfach in Puffer (50 mM TEA pH 8) gewaschen und anschließend unter UV-Licht (365 nm) visualisiert (+). Als Kontrolle diente die jeweilige Cellulose, welche in identischer Weise mit Puffer behandelt wurde (-). Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

Alle verwendeten Cellulosematerialien, die zuvor mit dem GZE inkubiert worden waren, zeigten eine deutlich erkennbare grünblaue Fluoreszenz im qualitativen Nachweis unter UV-Licht Bestrahlung. Im Gegensatz dazu konnte bei den Kontrollen, in denen die Cellulose mit Puffer behandelt wurde, keine grünblaue Fluoreszenz beobachtet werden. Im Fall des Baumwollstoffs war die Fluoreszenz nach Inkubation mit GZE lediglich schwach ausgeprägt und die Kontrolle zeigte eine bläuliche Fluoreszenz. Die beobachtete grünblaue Fluoreszenz spricht für die Adsorption des Fusionsprotein *AtHNL-FbFP-CBM* aus dem *E. coli* BL21(DE3)-GZE an das jeweilige Cellulosematerial. Insgesamt betrachtet zeigte RAC die stärkste grünblaue Fluoreszenz nach Inkubation mit GZE von allen getesteten Cellulosematerialien. Daher wurden die Materialien Avicel, RAC und CA-Filter für eine nähere Analyse ausgewählt. Das Elektrophoresepapier wurde nicht weiter untersucht, da es zu starkem Ausfransen während der Waschschriffe neigte und somit kein geeignetes, stabiles Trägermaterial darstellte.

In einer darauffolgenden SDS-PAGE (2.12.5) wurde die Proteinzusammensetzung der erzeugten Cellulose-basierten Immobilisate analysiert. Dazu wurden die Cellulosematerialien Avicel, RAC und CA-Filter nach der Inkubation mit GZE in SDS-Probenpuffer resuspendiert, um die gebundenen Proteine zu denaturieren und eine Analyse ihrer Zusammensetzung zu ermöglichen. Die so erhaltenen Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen (2.12.5), deren Ergebnis in Abb. 19 dargestellt ist.

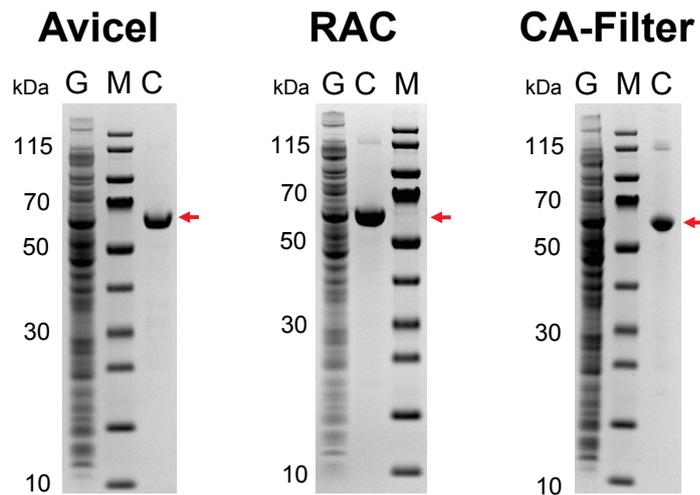


Abb. 19: SDS-PAGE Analyse der verschiedenen Cellulosematerialien nach der Adsorption von *AtHNL-FbFP-CBM* aus *E. coli* BL21(DE3)-GZE. Das jeweilige Cellulosematerial wurde über Nacht mit dem GZE inkubiert und anschließend mehrfach in Puffer (50 mM TEA pH 8) gewaschen. Pro Spur wurden etwa 10 μg (GZE) bzw. 3 μg (adsorbiert an Cellulose) Protein auf das 4 – 12 % Gradientengel aufgetragen, das zur Visualisierung der Proteine mit kolloidaler Coomassie-Brillant-Blau-Färbungslösung gefärbt wurde. Der rote Pfeil kennzeichnet die zu erwartende Größe des Fusionsproteins *AtHNL-FbFP-CBM* von etwa 56 kDa. M: Marker („Prestained Protein Ladder“), G: *E. coli* BL21(DE3)-GZE, C: Cellulosematerial nach Adsorption von *AtHNL-FbFP-CBM*. Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

Wie in Abb. 19 zu erkennen ist, enthielt der *E. coli* BL21(DE3)/p*AtHNL-FbFP-CBM*-GZE die erwartete Vielfalt von Proteinen. Darunter war auch eine ausgeprägte Proteinbande mit einer Größe von etwa 56 kDa. Die Proben der verschiedenen Cellulosematerialien zeigten dagegen lediglich eine Bande in der SDS-PAGE Analyse, die ein Protein mit einer Größe von ca. 56 kDa repräsentiert. Diese Größe stimmt mit der theoretisch anhand der Aminosäuresequenz berechneten Masse des Fusionsproteins *AtHNL-FbFP-CBM* überein. Dies spricht dafür, dass sowohl die heterologe Produktion des Fusionsproteins als auch die Adsorption an Cellulosematerial direkt aus *E. coli* BL21(DE3)-GZE erfolgreich waren.

Das Fusionsprotein *AtHNL-FbFP-CBM* konnte erfolgreich heterolog in *E. coli* BL21(DE3) produziert, direkt nach dem Zellaufschluss aus der löslichen Fraktion an verschiedene Cellulosematerialien adsorbiert und anhand der FbFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die erzeugten Cellulose-basierten Immobilisate wiesen einen hohen Reinheitsgrad in Bezug auf das adsorbierte Fusionsprotein *AtHNL-FbFP-CBM* auf.

3.2.2.2 Analyse der Adsorptionseigenschaften

Die Analyse der Adsorptionseigenschaften des Fusionsproteins *At*HNL-FbFP-CBM gegenüber Cellulose wurde vergleichend zum Fusionsprotein FbFP-CBM mit gereinigtem Protein durchgeführt. Dazu wurden die Fusionsproteine zunächst in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, die das entsprechende Plasmid enthielten, mithilfe von Autoinduktionsmedium produziert (2.6.2) und nach dem Zellaufschluss (2.12.1) mittels IMAC gereinigt (2.12.6.1). In Abb. 20 ist das Ergebnis der IMAC-Reinigung der beiden Fusionsproteine anhand einer SDS-PAGE Analyse (2.12.5) dargestellt.

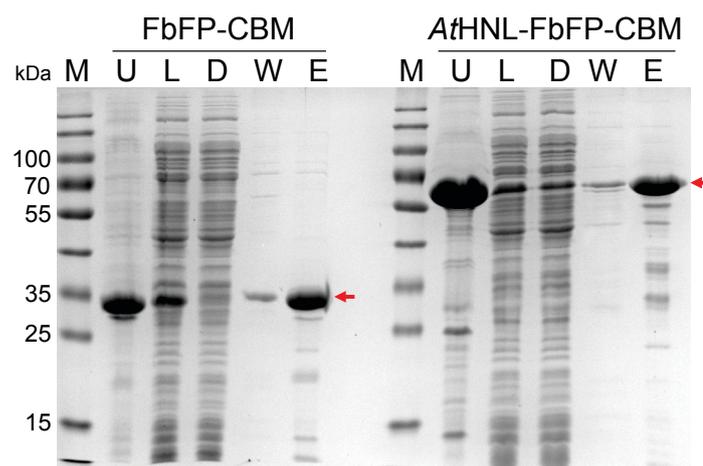


Abb. 20: SDS-PAGE Analyse der IMAC-Reinigung von FbFP-CBM und *At*HNL-FbFP-CBM mittels HisLink-Material. *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, die das jeweilige Fusionsprotein überproduzierten, wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und die erhaltene lösliche Fraktion über HisLink-Material gereinigt. Pro Spur wurden etwa 10 µg bzw. 3 µg (gereinigtes) Protein auf das 12 % Gel aufgetragen, das zur Visualisierung der Proteine mit kolloidaler Coomassie-Brillant-Blau-Färbungslösung gefärbt wurde. Der rote Pfeil kennzeichnet die zu erwartende Größe des jeweiligen Fusionsproteins (FbFP-CBM 27 kDa, *At*HNL-FbFP-CBM 56 kDa). M: Marker („Prestained Protein Ladder“), U: unlösliche Fraktion, L: lösliche Fraktion, D: Durchlauf, W: Waschfraktion mit 5 mM Imidazol, E: Elution mit 250 mM Imidazol.

In der SDS-PAGE Analyse waren bei beiden Fusionsproteinen sowohl in der unlöslichen als auch in der löslichen Fraktion nach dem Zellaufschluss eine Vielzahl von Banden zu erkennen, die Proteine repräsentieren (Abb. 20). Eine besonders ausgeprägte Bande von etwa 27 kDa (FbFP-CBM) bzw. 56 kDa (*At*HNL-FbFP-CBM) konnte in der jeweiligen unlöslichen und löslichen Fraktion beobachtet werden. Diese Bande war weniger deutlich oder fehlte in der Fraktion des Durchlaufs und war erneut in der Waschfraktion vertreten. In den jeweiligen Elutionsfraktionen war die 27 kDa bzw. 56 kDa Bande deutlich ausgeprägt. Die beobachtete Bande besaß eine Größe, die mit der jeweiligen theoretischen molekularen Masse der Fusionsproteine

FbFP-CBM bzw. AtHNL-FbFP-CBM übereinstimmte. Die gereinigten Fusionsproteine wurden anschließend für die Analyse der Adsorption an Cellulose genutzt.

Für die Untersuchung der Adsorptionseigenschaften der Fusionsproteine musste das verwendete Cellulosematerial gewisse Voraussetzung erfüllen. So musste es unter anderem einfach und reproduzierbar aus einer Stammlösung auf viele kleine Reaktionsansätze (400 µl) aufgeteilt werden können. Daher wurde als zu untersuchendes Cellulosematerial sowohl Avicel als auch RAC ausgewählt, die sich beide einfach in Form von Suspensionen handhaben ließen. Für CA-Filter war dies nicht der Fall, sodass dieses Material nicht auf seine Adsorptionseigenschaften für die Fusionsproteine untersucht werden konnte.

Zunächst wurde die Adsorptionskinetik der beiden Fusionsproteine FbFP-CBM und AtHNL-FbFP-CBM gegenüber Avicel und RAC untersucht, d. h. die Geschwindigkeit mit der die Proteine an das jeweilige Cellulosematerial adsorbieren. Dazu wurden Avicel- bzw. RAC-Suspensionen hergestellt und auf einzelne Reaktionsgefäße aufgeteilt. Als Kontrollen dienten Reaktionsgefäße, die mit demselben Volumen Puffer (50 mM TEA pH 8) gefüllt wurden. Anschließend wurde eine Lösung des jeweiligen Fusionsproteins, die eine bekannte Konzentration besaß, zu einem Reaktionsansatz gegeben und für eine definierte Zeit (0 – 120 min) schüttelnd inkubiert. Dieser Ansatz wurde daraufhin zentrifugiert und die Proteinkonzentration des Überstands photometrisch bestimmt (2.12.9.1). Aus der Konzentrationsdifferenz zwischen Reaktionsgefäßen mit Cellulose und den Kontrollgefäßen ohne Cellulose konnte die Menge an gebundenem Protein bezogen auf die verwendete Menge Cellulosematerial berechnet werden. Die Auftragung des gebundenen Proteins gegen die Inkubationsdauer lieferte charakteristische Adsorptionskinetiken, die in Abb. 21 dargestellt sind. Um eventuelle Einflüsse der unterschiedlichen molaren Massen der beiden Fusionsproteine aufzuzeigen, wurde die gebundene Proteinmenge sowohl in µmol pro g Cellulose als auch in mg pro g Cellulose ausgedrückt.

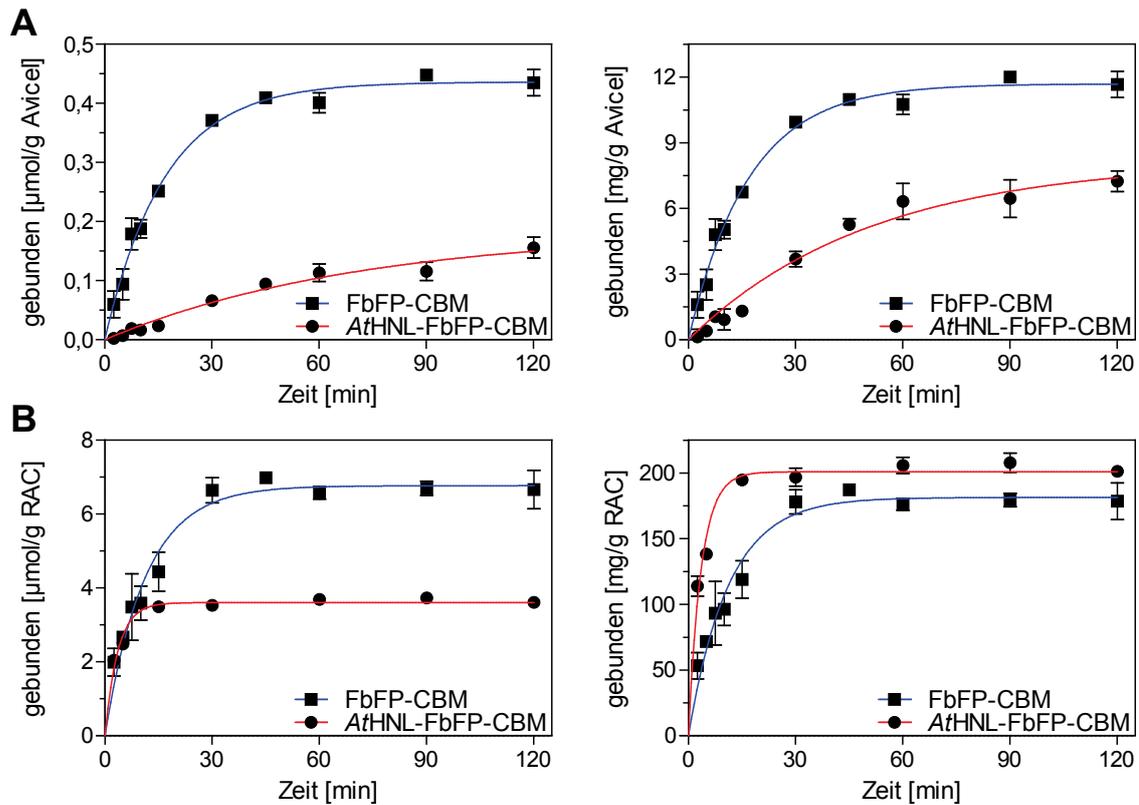


Abb. 21: Adsorptionskinetik der Fusionsproteine FbFP-CBM (blau) und A θ HNL-FbFP-CBM (rot) an Avicel (A) bzw. RAC (B). Die Fusionsproteine wurden in einer Konzentration von 5 μM mit 2 mg/ml Avicel bzw. 0,25 mg/ml RAC schüttelnd inkubiert und anschließend zentrifugiert, um eine photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand zu ermöglichen. Aus der Differenz mit Kontrollen, die kein Cellulosematerial enthielten, konnte die Menge des gebundenen Proteins errechnet und auf die eingesetzte Cellulosemenge bezogen werden. Im linken Diagramm ist die Proteinmenge jeweils in μmol pro g Cellulosematerial und im rechten in mg pro g Cellulosematerial dargestellt, wobei die berechneten Werte jeweils gegen die Inkubationsdauer aufgetragen sind. Die angegebenen Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Dreifachbestimmung dar. Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

Für beide Cellulosematerialien nahm die Menge an adsorbiertem Fusionsprotein im Laufe der Zeit zu (Abb. 21). Die Adsorption von FbFP-CBM an Avicel verlief dabei deutlich schneller als die Adsorption von A θ HNL-FbFP-CBM. Dies spiegelt sich auch in den Adsorptionsraten k_{ad} wider (Tab. 10), die aus der Anpassung der experimentellen Daten mit einer exponentiellen Funktion erster Ordnung ermittelt wurden. Demnach adsorbiert FbFP-CBM dreimal schneller als A θ HNL-FbFP-CBM an Avicel. Im Falle von RAC unterschieden sich die Adsorptionsraten k_{ad} ebenfalls und zeigten eine dreimal schnellere Adsorption von A θ HNL-FbFP-CBM an RAC im Vergleich zu FbFP-CBM. Für beide Cellulosematerialien und beide Fusionsproteine konnte weiterhin beobachtet werden, dass nach etwa 60 min Inkubationsdauer (bzw. 90 min für A θ HNL-FbFP-CBM und Avicel) keine weitere Zunahme der gebundenen Proteinmenge festzustellen war. Daher wurde diese Inkubationszeit für weitere

Adsorptionsversuche verwendet. Bei der Adsorptionskinetik unterschieden sich die errechneten maximal adsorbierten Proteinmengen pro g Cellulosematerial ebenfalls deutlich zwischen Avicel und RAC (Tab. 10). So konnte an RAC etwa 20-mal mehr Protein adsorbieren als an Avicel. Dabei wies die maximale Menge adsorbierten Proteins (A_{\max}) für FbFP-CBM und AtHNL-FbFP-CBM jeweils ungefähr dieselbe Größenordnung in mg Protein pro g Cellulose auf.

Tab. 10: Adsorptionsparameter der Adsorptionskinetik von FbFP-CBM und AtHNL-FbFP-CBM an Avicel bzw. RAC. Das jeweilige Protein (5 μM) wurde mit Avicel (2 mg/ml) bzw. RAC (0,25 mg/ml) über 120 min schüttelnd inkubiert, wobei zu definierten Zeitpunkten die Proteinkonzentration des Überstands photometrisch bestimmt wurde. k_{ad} : Adsorptionsrate, A_{\max} : maximale Menge adsorbiertes Protein. Mithilfe einer Anpassung der experimentellen Daten an eine exponentielle Funktion erster Ordnung konnten die Parameter k_{ad} und A_{\max} ermittelt werden, wobei der angegebene Fehler die Standardabweichung vom Mittelwert einer Dreifachbestimmung darstellt. Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

Cellulose	k_{ad} [min^{-1}]		A_{\max} [$\text{mg}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{Cellulose}}$]	
	FbFP-CBM	AtHNL-FbFP-CBM	FbFP-CBM	AtHNL-FbFP-CBM
Avicel	$0,059 \pm 0,004$	$0,019 \pm 0,004$	$11,7 \pm 0,3$	$8,2 \pm 0,8$
RAC	$0,089 \pm 0,007$	$0,278 \pm 0,017$	$181,4 \pm 4,0$	$200,9 \pm 2,6$

Für die weitere Charakterisierung der Adsorptionseigenschaften wurden Adsorptionsisothermen der beiden Fusionsproteine für die Cellulosematerialien Avicel und RAC aufgenommen. Dabei wurden Proteinlösungen unterschiedlicher Konzentration (0,15 – 25 μM) verwendet, um Aufschluss über die Affinität des untersuchten Proteins zur Cellulose und die maximal adsorbierte Proteinmenge zu erhalten. Die Proteinlösung wurde dabei solange mit dem Cellulosematerial (bzw. mit Puffer, im Falle der Kontrollen) inkubiert, dass ein Erreichen des Adsorptionsgleichgewichts gewährleistet war (2.12.9.2). Diese Zeit war anhand der Adsorptionskinetik-Messung nach ungefähr 60 min für RAC bzw. nach 90 min für Avicel erreicht. Die Auftragung des gebundenen Proteins gegen die freie Proteinkonzentration nach Inkubation mit Cellulose lieferte charakteristische Adsorptionsisothermen, die in Abb. 22 dargestellt sind. Um eventuelle Einflüsse der unterschiedlichen molaren Massen der beiden Fusionsproteine aufzuzeigen, ist die gebundene Proteinmenge sowohl in μmol pro g Cellulose als auch in mg pro g Cellulose ausgedrückt und auf die freie Proteinkonzentration in μM bzw. mg/ml bezogen.

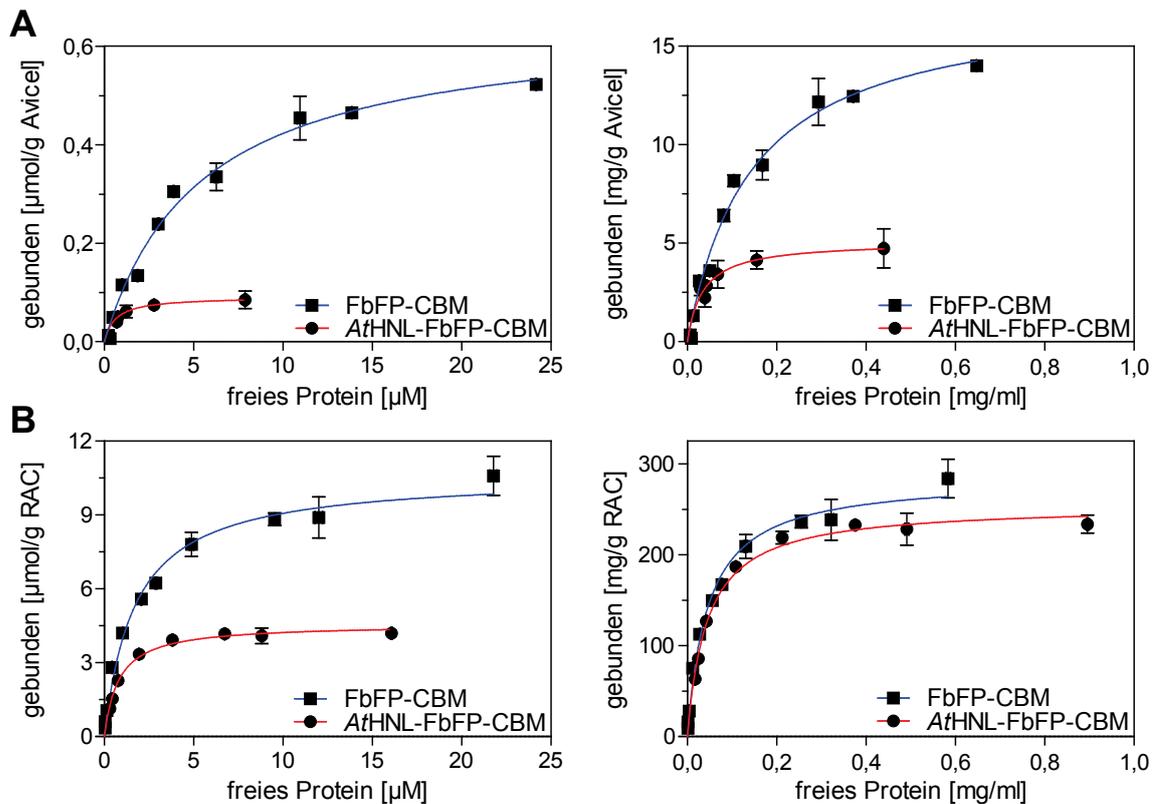


Abb. 22: Adsorptionsisothermen der Fusionsproteine FbFP-CBM (blau) und AtHNL-FbFP-CBM (rot) an Avicel (A) bzw. RAC (B). Die Fusionsproteine wurden in einer Konzentration von 0,15 – 25 μM mit 2 mg/ml Avicel bzw. 0,25 mg/ml RAC schüttelnd für 90 min bzw. 60 min inkubiert und anschließend zentrifugiert, um eine photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand zu ermöglichen. Aus der Differenz mit Kontrollen ohne Cellulosematerial konnte die Menge des gebundenen Proteins errechnet und auf die eingesetzte Cellulosemenge bezogen werden. Die Proteinmenge ist jeweils in μmol pro g Cellulosematerial (links) und in mg pro g Cellulosematerial (rechts) dargestellt, wobei die berechneten Werte jeweils gegen die Konzentration von freiem Protein nach der Inkubation mit Cellulose aufgetragen sind. Die angegebenen Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Dreifachbestimmung dar. Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

Bei beiden Fusionsproteinen und beiden Cellulosematerialien nahm die Menge an gebundenem Protein bezogen auf die Cellulosemenge im Bereich von geringen Proteinkonzentrationen stark zu und erreichte anschließend ein Plateau bei höheren Proteinkonzentrationen (Abb. 22). Im Falle von Avicel lag dieses Plateau, das die maximale adsorbierte Menge an Protein A_{max} darstellt, für FbFP-CBM höher als für AtHNL-FbFP-CBM (Abb. 22 A). Für RAC war dies bei Betrachtung der gebundenen Proteinmenge in μmol pro g Cellulose ebenfalls der Fall, wohingegen die Auftragung in mg Protein pro g Cellulose einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf und somit einen ähnlichen A_{max} -Wert für beide Fusionsproteine lieferte. Durch Anpassung der experimentellen Messdaten mithilfe der Langmuir-Gleichung (2.12.9.2) konnten die Parameter A_{max} sowie die Dissoziationskonstante K_D in μM als Maß für die Affinität der Fusionsproteine zum entsprechenden Cellulosematerial berechnet werden (Tab. 11).

Tab. 11: Adsorptionsparameter der Adsorptionsisotherme von FbFP-CBM und AtHNL-FbFP-CBM an Avicel bzw. RAC. Unterschiedliche Konzentrationen des jeweiligen Proteins wurden mit Avicel (2 mg/ml) bzw. RAC (0,25 mg/ml) über 90 min (Avicel) bzw. 60 min (RAC) schüttelnd inkubiert, wonach die Proteinkonzentration des Überstands photometrisch bestimmt wurde. K_D : Dissoziationskonstante, A_{max} : maximale Menge adsorbiertes Protein. Mithilfe einer Anpassung der experimentellen Daten an die Langmuir-Gleichung konnten die Parameter K_D und A_{max} ermittelt werden, wobei der angegebene Fehler die Standardabweichung vom Mittelwert einer Dreifachbestimmung darstellt. Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

Cellulose	K_D [μ M]		A_{max} [$\text{mg}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{Cellulose}}$]	
	FbFP-CBM	AtHNL-FbFP-CBM	FbFP-CBM	AtHNL-FbFP-CBM
Avicel	$5,38 \pm 0,54$	$0,62 \pm 0,17$	$18,0 \pm 0,8$	$5,2 \pm 0,6$
RAC	$1,72 \pm 0,14$	$0,80 \pm 0,05$	$318,6 \pm 7,3$	$269,7 \pm 6,7$

Die errechneten Dissoziationskonstanten für die beiden Proteine wiesen deutliche Unterschiede auf. Im Falle von FbFP-CBM war der K_D -Wert für Avicel etwa dreimal so groß wie für RAC, was für eine höhere Affinität des Proteins zu RAC hindeutet. Für AtHNL-FbFP-CBM wies die Dissoziationskonstante für beide Cellulosematerialien Werte einer vergleichbaren Größenordnung auf, die jeweils kleiner waren als die entsprechenden Werte von FbFP-CBM. Die maximale Menge adsorbiertes Protein A_{max} zeigte das bereits beschriebene Verhältnis zwischen den beiden Proteinen und Cellulosematerialien, mit ähnlichen Werten für RAC bei beiden Proteinen und etwa 3,5-fach höheren Werten für Avicel bei FbFP-CBM im Vergleich zu AtHNL-FbFP-CBM.

Die Fusionsproteine FbFP-CBM und AtHNL-FbFP-CBM adsorbieren schneller an RAC als an Avicel und weisen eine hohe Affinität zu RAC auf. Weiterhin konnte eine sehr hohe Bindungskapazität des Cellulosematerials RAC nachgewiesen werden.

3.2.3 Untersuchung der AtHNL-Aktivität des Fusionsproteins AtHNL-FbFP-CBM

Zur näheren Charakterisierung des Fusionsprotein AtHNL-FbFP-CBM wurde im Folgenden die Aktivität der AtHNL-Domäne untersucht. Da die wildtypische AtHNL bereits bei einem pH-Wert unter 5,5 stark inaktiviert wird [117], wurde eine Analyse des Einflusses des pH-Werts auf die Aktivität des Fusionsproteins im Bereich von pH 4 – 5 im Vergleich zur AtHNL und dem Fusionsprotein AtHNL-FbFP vorge-

nommen. Dabei wurde zunächst das freie, nicht immobilisierte Fusionsprotein AtHNL-FbFP-CBM analysiert. Für die vergleichende Untersuchung der Aktivität wurde der Mandelonitril-Spaltungsassay verwendet, bei dem racemisches (*rac*) Mandelonitril als Substrat eingesetzt wird. Die AtHNL katalysiert die Spaltung des (*R*)-Mandelonitrils zu Benzaldehyd und Blausäure, wobei die Zunahme des freigesetzten Benzaldehyds anhand der Absorption bei 280 nm photometrisch verfolgt werden kann und ein Maß für die AtHNL-Aktivität darstellt (2.12.7).

Für die Aktivitätsuntersuchung wurden sowohl das Fusionsprotein AtHNL-FbFP-CBM als auch das Kontrollprotein AtHNL-FbFP heterolog in *E. coli* BL21(DE3) produziert (2.6.2), die entsprechenden Zellen aufgeschlossen (2.12.1) und die Proteine mittels IMAC gereinigt (2.12.6.1). Alle Enzyme bzw. Fusionsproteine wurden auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt (2.12.3.2) und in den Mandelonitril-Spaltungsassay eingesetzt (2.12.7.1), wobei die Ergebnisse in Abb. 23 zusammengefasst sind.

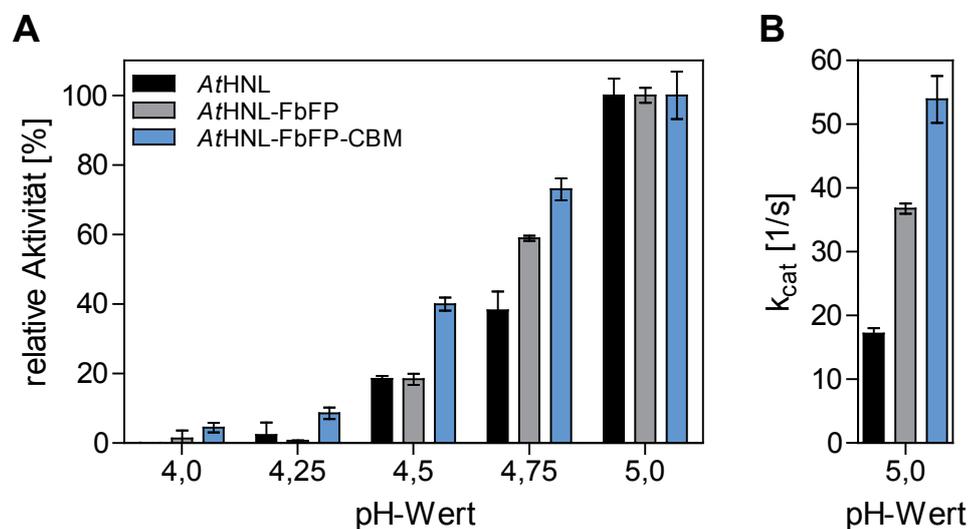


Abb. 23: Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität der wildtypischen AtHNL (schwarz) sowie der Fusionsproteine AtHNL-FbFP (grau) und AtHNL-FbFP-CBM (blau). **A** Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität der Enzyme bzw. Fusionsproteine. Die Enzyme wurden in einer Konzentration von 0,5 μ M in 50 mM Natriumacetat-Puffer des entsprechenden pH-Werts für 5 min bei 25 °C inkubiert, bevor die Aktivität im Mandelonitril-Spaltungsassay bestimmt wurde (2.12.7.1). Alle Messungen und Kontrollen ohne Enzym wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und die nicht-enzymatische Spaltung des Substrats wurde von der Messung mit Enzym subtrahiert. Die Aktivitäten sind auf den jeweiligen Wert der spezifischen Aktivität bei pH 5 bezogen (AtHNL: $35,3 \pm 1,7$ U/mg, AtHNL-FbFP: $51,8 \pm 1,1$ U/mg, AtHNL-FbFP-CBM: $58,0 \pm 4,0$ U/mg). **B** Vergleich der Wechselzahl k_{cat} aller untersuchten Enzyme bzw. Fusionsproteine bei pH 5. Die angegebenen Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Dreifachbestimmung dar. Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

Bei allen untersuchten Enzymen bzw. Fusionsproteinen nahm die Aktivität mit sinkendem pH-Wert ab (Abb. 23 A). Die wildtypische AtHNL wies schon bei pH 4,75

lediglich 40 % ihrer Aktivität bei pH 5 auf und besaß bei pH-Werten unter 4,25 kaum messbare Aktivität. Dagegen zeigte das Fusionsprotein *AfHNL-FbFP* über einen breiteren pH-Bereich Aktivität; so konnten bei pH 4,75 etwa 60 % und bei pH 4,5 ca. 40 % der Aktivität bei pH 5 nachgewiesen werden. Das Fusionsprotein *AfHNL-FbFP-CBM* besaß eine deutlich erhöhte Aktivität in einem breiteren pH-Bereich. Bei pH 4,75 zeigte es etwa 70 % seiner Aktivität bei pH 5 und es konnte auch bei pH 4 noch eine messbare Aktivität nachgewiesen werden.

Da die verglichenen Proteine unterschiedliche molekulare Massen besaßen und diese beim Vergleich in Form von spezifischen Aktivitäten nicht berücksichtigt wurden, wurde die Wechselzahl k_{cat} berechnet. Diese bezieht die molekulare Masse eines Monomers des Proteins mit ein und gibt die Aktivität als umgesetztes Substrat pro aktivem Zentrum pro Zeiteinheit (s) wider. In Abb. 23 B ist der Vergleich der mithilfe der theoretischen molekularen Massen der untersuchten Enzyme bzw. Fusionsproteine (2.12.3.2, Tab. 8) errechneten Wechselzahlen dargestellt. Die Wechselzahl der wildtypischen *AfHNL* betrug $17,2 \pm 0,8 \text{ s}^{-1}$, die des Kontrollproteins *AfHNL-FbFP* $36,8 \pm 0,8 \text{ s}^{-1}$ und die des Fusionsproteins *AfHNL-FbFP-CBM* $53,9 \pm 3,7 \text{ s}^{-1}$. Somit zeigte das Fusionsprotein *AfHNL-FbFP* eine im Vergleich zur wildtypischen *AfHNL* um den Faktor 2,2 erhöhte Aktivität bei pH 5. Die Aktivität des Fusionsproteins *AfHNL-FbFP-CBM* war dagegen um das 3,2-Fache gegenüber der wildtypischen *AfHNL* erhöht.

Die Messung des Einflusses des pH-Werts auf die *AfHNL*-Aktivität beinhaltet eine 5-minütige Inkubation des Enzyms in Assaypuffer des jeweiligen pH-Werts, bevor eine Enzymprobe für den Assay entnommen wird, um die Vergleichbarkeit mit bereits veröffentlichten Messwerten zu gewährleisten [190]. In diesem Zeitraum kann es bereits zur Inaktivierung kommen, sodass im nächsten Schritt der Charakterisierung des *AfHNL-FbFP-CBM* Fusionsproteins die Ermittlung der pH-abhängigen Stabilität in Form von Halbwertszeiten durchgeführt wurde (2.12.7.2). Dazu wurde die entsprechende Enzymprobe bis zu fünf Stunden in Assaypuffer des zu untersuchenden pH-Werts inkubiert (0,5 μM Enzymkonzentration) und zu definierten Zeitpunkten Proben zur Analyse der Restaktivität verwendet. Auf diese Weise wurden für die wildtypische *AfHNL*, für das Kontrollprotein *AfHNL-FbFP* sowie für das Fusionsprotein *AfHNL-FbFP-CBM* Restaktivitäten bei den pH-Werten 4,75, 4,5 und 4,25 gemessen und die jeweiligen Halbwertszeiten berechnet, indem die experimentellen Daten an eine exponentielle Funktion erster Ordnung angepasst wurden (Tab. 12).

Tab. 12: pH-abhängige Halbwertszeiten (min) der untersuchten Enzyme bzw. Fusionsproteine. Die Restaktivität wurde mittels Mandelonitril-Spaltungsassay nach Inkubation (0,5 µM Enzymkonzentration) in Assaypuffer (50 mM Natriumacetat-Puffer) des jeweiligen pH-Werts bestimmt. Mithilfe einer Anpassung der experimentellen Daten an eine exponentielle Funktion erster Ordnung konnte die Halbwertszeit ermittelt werden, wobei der angegebene Fehler die Standardabweichung vom Mittelwert einer Dreifachbestimmung darstellt. Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

pH-Wert	<i>AtHNL</i>	<i>AtHNL-FbFP</i>	<i>AtHNL-FbFP-CBM</i>
4,75	4,4 ± 0,4	5,5 ± 0,4	30,6 ± 4,3
4,50	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2	2,1 ± 0,2
4,25	n.b.	n.b.	1,4 ± 0,2

n.b. nicht bestimmt

Sowohl die wildtypische *AtHNL* als auch das Fusionsprotein *AtHNL-FbFP* zeigten eine vergleichbare Halbwertszeit bei pH 4,75 von etwa 4,4 – 5 min. Ähnliches galt auch für pH 4,5, wo beide Enzyme sehr schnell inaktiviert wurden, sodass bei pH 4,25 keine Restaktivität mehr messbar war. Im Gegensatz dazu zeigte das Fusionsprotein *AtHNL-FbFP-CBM* eine siebenfach erhöhte Halbwertszeit bei pH 4,75 im Vergleich zur wildtypischen *AtHNL*. Bei pH 4,5 konnte ebenfalls eine etwa 1,4-fach höhere Halbwertszeit festgestellt werden. Die erhöhte pH-Stabilität des Fusionsproteins *AtHNL-FbFP-CBM* ließ eine Restaktivitätsmessung bei pH 4,25 zu.

Das Fusionsprotein *AtHNL-FbFP-CBM* zeigte verglichen mit der wildtypischen *AtHNL* und dem Kontrollprotein *AtHNL-FbFP* eine verbesserte Aktivität im schwach sauren pH-Bereich und verfügte über eine deutlich erhöhte pH-Stabilität.

3.2.3.1 Etablierung eines Endpunkt-basierten Mandelonitril-Spaltungsassays

Die Charakterisierung der Fusionsproteine erfolgte mit einem Assay, der die *AtHNL*-Aktivität kontinuierlich durch die Zunahme der Absorption bei 280 nm nachwies. Für die Untersuchung von immobilisierten Fusionsproteinen mussten daher einige experimentelle Änderungen vorgenommen werden, da die eingesetzten Immobilisate schnell auf den Boden der Küvette absanken bzw. durch Streulicht eine kontinuierliche Messung störten. Daher wurde der Mandelonitril-Spaltungsassay modifiziert, um eine Endpunkt-basierte Messung der *AtHNL*-Aktivität zu ermöglichen. Für die Abtrennung des Immobilisats von dem Reaktionsmedium, welches das Substrat und die Produkte enthielt, wurde ein Zentrifugationsschritt gewählt, sodass

eine photometrische Bestimmung der Absorption bei 280 nm des Überstands durchgeführt werden konnte. Aus diesem Endwert wurde daraufhin mittels des Extinktionskoeffizienten von Benzaldehyd auf die freigesetzte Produktmenge geschlossen (2.12.7). Der schematische Ablauf des Assays ist in Abb. 24 A dargestellt.

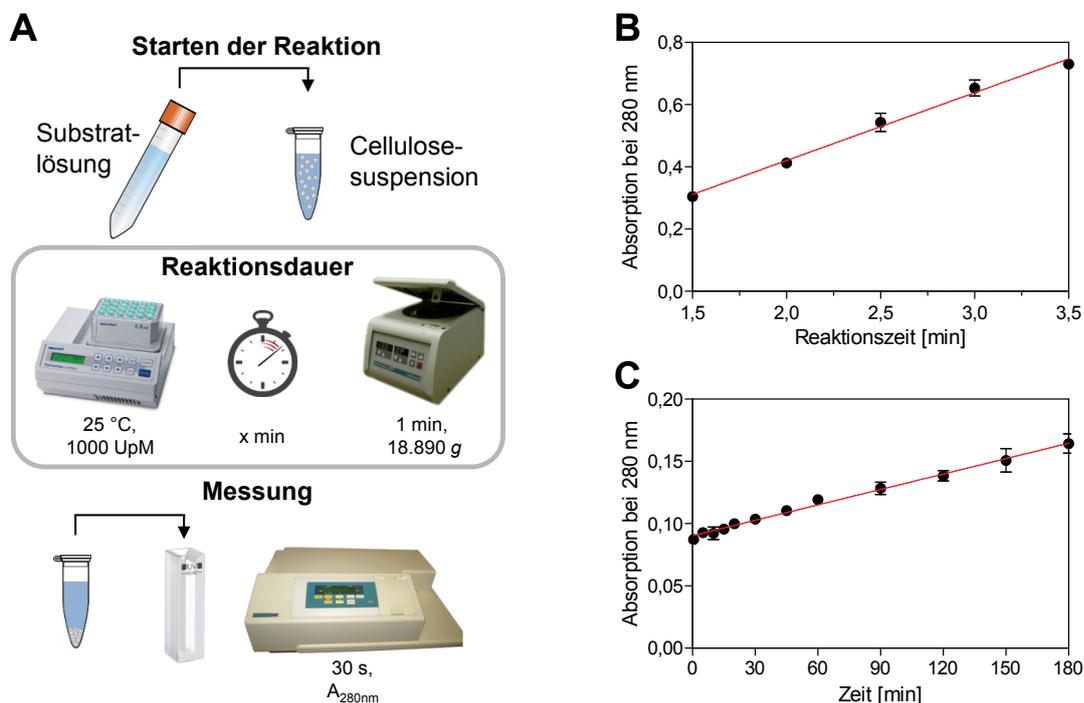


Abb. 24: Etablierung eines Endpunkt-basierten Mandelonitril-Spaltungsassays. **A** Schematische Darstellung des Ablaufs des Assays. **B** Linearer Zusammenhang zwischen der gemessenen Absorption und der Reaktionszeit. R^2 betrug 0,9833. **C** Zeitverlauf der nicht-enzymatischen Spaltung des Substrats *rac*-Mandelonitril in der Substratlösung (50 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 3,5). Dazu wurde der Endpunkt-basierte Assay mit Assaypuffer (50 mM Natriumacetat-Puffer) ohne Enzym über einen Zeitraum von 3 h durchgeführt. R^2 betrug 0,9938. Die Messungen erfolgten jeweils in Dreifachbestimmungen, wobei die angegebenen Fehlerbalken die Standardabweichung vom Mittelwert darstellen.

Wie in Abb. 24 A zu erkennen, wurden unterschiedlich lange Reaktionszeiten getestet. Dies war notwendig, um sicherzustellen, dass der modifizierte Assay Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten lieferte und ein linearer Zusammenhang zwischen der gemessenen Absorption und der Reaktionszeit bestand. Der vollständige enzymatische Umsatz des (*R*)-Enantiomers des racemischen Substrats würde zu einer theoretischen Absorption von 9,2 führen, sodass die gemessenen Absorptionswerte im Endpunkt-Assay unter 10 % der maximalen Absorption liegen sollten, um Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten ermitteln zu können [191]. Die verschiedenen Reaktionszeiten wurden bei pH 5 mit RAC-immobilisiertem *A*tHNL-FbFP-CBM Fusionsprotein (2.12.2) getestet (Abb. 24 B), wobei ein linearer

Zusammenhang zwischen gemessener Absorption und Reaktionszeit festgestellt wurde und die Absorptionswerte unter 10 % der theoretisch maximalen Absorption lagen. Für alle weiteren Messungen wurde eine Reaktionszeit von 3 min gewählt.

Im Laufe der Assayetablierung wurde festgestellt, dass das Substrat *rac*-Mandelonitril in der Substratlösung im Laufe der Zeit nicht-enzymatisch gespalten wird (Abb. 24 C), was zu einer Zunahme des gemessenen Endwerts führte, die nicht durch das Enzym hervorgerufen wurde. Dadurch resultierten Aktivitätswerte, die einen hohen Fehler aufwiesen. Dies machte eine zusätzliche Kontrolle notwendig, den sogenannten „Substratkorrekturfaktor“, der den zeitlichen Verlauf der nicht-enzymatischen Substratspaltung in der Substratlösung berücksichtigte. Dazu wurde Trägermaterial ohne immobilisiertes Enzym in den Endpunkt-basierten Assay eingesetzt, um Absorptionswerte zu erhalten, die durch die nicht-enzymatische Spaltung des Mandelonitrils hervorgerufen wurden. Diese Werte wurden zeitlich aufgelöst verfolgt, sodass anhand einer linearen Ausgleichsgerade ermittelt werden konnte, wie viel Absorption zu einem bestimmten Zeitpunkt auf das nicht-enzymatisch gespaltene Substrat zurückzuführen war. Anhand der Geradengleichung und dem Zeitpunkt der Messung mit Enzym konnte der nicht-enzymatische Anteil herausgerechnet werden, sodass verlässliche Aktivitätswerte ermittelt werden konnten.

Es konnte erfolgreich ein Endpunkt-basierter Mandelonitril-Spaltungsassay etabliert werden, der die unkomplizierte Messung der *AthNL*-Aktivität von Immobilisaten ermöglichte.

3.2.3.2 Bestimmung der *AthNL*-Aktivität von *AthNL*-FbFP-CBM Immobilisaten

Mithilfe des etablierten Endpunkt-basierten Mandelonitril-Spaltungsassays wurde im Folgenden die Charakterisierung des Avicel- bzw. RAC-immobilisierten Fusionsproteins *AthNL*-FbFP-CBM durchgeführt. Dazu wurde gereinigtes Fusionsprotein (2.12.6) auf Avicel bzw. RAC immobilisiert, indem es über Nacht mit dem entsprechenden Cellulosematerial inkubiert und anschließend mehrfach in Puffer (50 mM TEA pH 8) gewaschen wurde (2.12.2). Für einen Vergleich mit den ermittelten Aktivitäten der wildtypischen *AthNL* sowie der Fusionsproteine *AthNL*-FbFP und *AthNL*-FbFP-CBM (Abb. 23) wurde die Proteinkonzentration der Immobilisat-

Suspensionen mithilfe eines modifizierten Bradford-Assays (2.12.3.1) auf 10 μM eingestellt, sodass sich einheitliche Konzentrationen im Assay ergaben. Zunächst wurde der Einfluss des pH-Werts auf die *At*HNL-Aktivität der *At*HNL-FbFP-CBM-Immobilisate gemessen (Abb. 25).

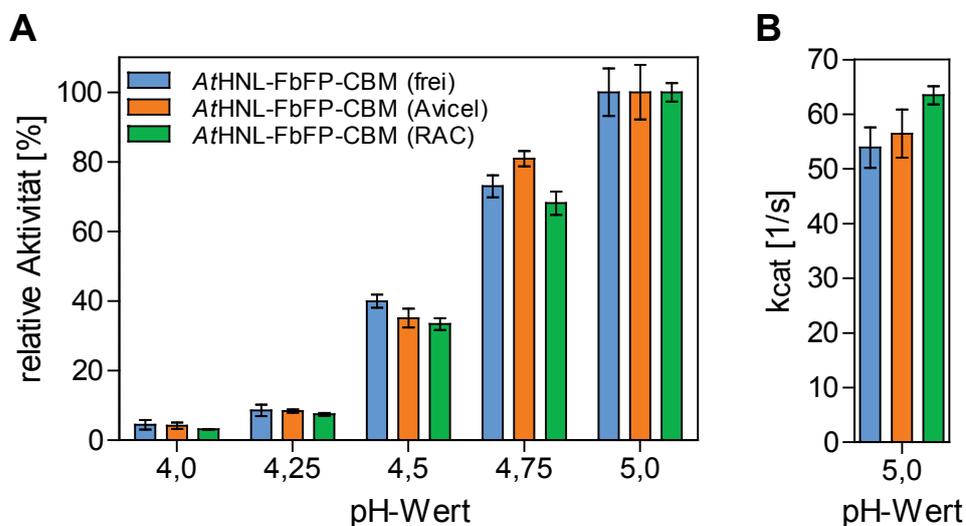


Abb. 25: Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität des Avicel- (orange) bzw. RAC-immobilisierten (grün) Fusionsproteins *At*HNL-FbFP-CBM im Vergleich zum freien Enzym (blau). **A** Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität der Fusionsproteine. Die Immobilisate wurden in einer Konzentration von 0,5 μM in 50 mM Natriumacetat-Puffer des entsprechenden pH-Werts für 5 min bei 25 °C inkubiert, bevor die Aktivität im Endpunkt-basierten Mandelonitril-Spaltungsassay bestimmt wurde (2.12.7.1). Alle Messungen und Kontrollen ohne Enzym wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Aktivitäten sind auf den jeweiligen Wert der spezifischen Aktivität bei pH 5 bezogen (frei: $58,0 \pm 4,0$ U/mg, Avicel: $60,7 \pm 4,7$ U/mg, RAC: $68,3 \pm 1,8$ U/mg). Die Aktivitätsmessung des freien Fusionsproteins wurde mit dem kontinuierlichen Assay durchgeführt. **B** Vergleich der Wechselzahl k_{cat} der untersuchten Präparationen bei pH 5. Die angegebenen Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Dreifachbestimmung dar. Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

Sowohl die Aktivität des Avicel- als auch des RAC-immobilisierten Fusionsproteins *At*HNL-FbFP-CBM nahm mit sinkendem pH-Wert deutlich ab (Abb. 25 A). Weiterhin ähnelten sich die Messwerte der Bestimmung des Einflusses des pH-Werts auf die Aktivität des immobilisierten Enzyms und des freien Enzyms stark. So betrug die relative spezifische Aktivität aller Präparationen bei pH 4,5 beispielsweise etwa 40 % der Aktivität bei pH 5. Für die Immobilisate wurde ebenfalls die jeweilige Wechselzahl k_{cat} bei pH 5 berechnet (2.12.7.1) und mit der Wechselzahl des freien Fusionsproteins verglichen (Abb. 25 B); dabei besaß Avicel-immobilisiertes *At*HNL-FbFP-CBM einen k_{cat} -Wert von $56,4 \pm 4,4$ s^{-1} und RAC-immobilisiertes einen k_{cat} -Wert von $63,5 \pm 1,7$ s^{-1} . Diese Werte waren in derselben Größenordnung wie die Wechselzahl des freien Fusionsproteins ($53,9 \pm 3,7$ s^{-1}); demnach zeigten sowohl die immobilisierten Präparationen als auch die freie Präparation eine vergleichbare Aktivität bei pH 5.

Den nächsten Schritt der Charakterisierung von Cellulose-basierten *AthNL-FbFP-CBM*-Immobilisaten stellte die Bestimmung von pH-abhängigen Halbwertszeiten dar. Dazu wurde analog zu der Messung von Halbwertszeiten des freien Fusionsproteins verfahren, wobei der Endpunkt-basierte Assay zur Ermittlung der Restaktivität verwendet wurde. Die Immobilisate wurden bis zu fünf Stunden schüttelnd in Assaypuffer des jeweiligen pH-Werts inkubiert, wobei zu definierten Zeitpunkten Proben für die Durchführung des Mandelonitril-Spaltungsassays entnommen wurden (2.12.7.2). Aus den gemessenen Restaktivitäten wurden anschließend die pH-abhängigen Halbwertszeiten errechnet, indem die experimentellen Daten an eine exponentielle Funktion erster Ordnung angepasst wurden (Tab. 13).

Tab. 13: pH-abhängige Halbwertszeiten (min) des Avicel- bzw. RAC-immobilisierten Fusionsproteins *AthNL-FbFP-CBM* im Vergleich zum freien Protein. Die Restaktivität wurde mittels Endpunkt-basiertem Mandelonitril-Spaltungsassay nach Inkubation (0,5 μ M Enzymkonzentration) in Assaypuffer (50 mM Natriumacetat-Puffer) des jeweiligen pH-Werts bestimmt. Mithilfe einer Anpassung der experimentellen Daten an eine exponentielle Funktion erster Ordnung konnte die Halbwertszeit ermittelt werden, wobei der angegebene Fehler die Standardabweichung vom Mittelwert einer Dreifachbestimmung darstellt. Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

pH-Wert	Avicel-immobilisiert	RAC-immobilisiert	frei*
4,75	34,7 \pm 3,4	40,5 \pm 4,3	30,6 \pm 4,3
4,50	7,0 \pm 0,5	8,7 \pm 1,1	2,1 \pm 0,2
4,25	2,5 \pm 0,2	2,5 \pm 0,3	1,4 \pm 0,2

* bestimmt mit dem kontinuierlichen Mandelonitril-Spaltungsassay

Sowohl das Avicel- als auch das RAC-immobilisierte Fusionsprotein *AthNL-FbFP-CBM* zeigten bei pH 4,75 Halbwertszeiten einer vergleichbaren Größenordnung, die lediglich leicht erhöht im Vergleich zur Halbwertszeit des freien Proteins waren. Bei pH 4,5 wiesen die analysierten Immobilisate eine höhere Stabilität auf als das freie Enzym. So war die Halbwertszeit des Avicel-Immobilisats um den Faktor 3,3 erhöht und die des RAC-Immobilisats um das 4,1-Fache. Auch bei pH 4,25 konnte eine Stabilisierung der Immobilisate beobachtet werden. Beide Immobilisate besaßen die etwa 1,7-fache Halbwertszeit des freien Enzyms.

Das auf Avicel bzw. RAC immobilisierte Fusionsprotein *AthNL-FbFP-CBM* zeigte eine zum freien Protein vergleichbare *AthNL*-Aktivität im schwach sauren pH-Bereich. Im Vergleich zum freien Enzym konnte die pH-Stabilität durch die Immobilisierung weiter erhöht werden.

3.2.4 Analyse der Desorption von RAC-immobilisiertem Fusionsprotein AtHNL-FbFP-CBM anhand der FbFP-Fluoreszenz

In weiteren Analysen wurde die Stabilität der Adsorption des Fusionsproteins AtHNL-FbFP-CBM am Trägermaterial Cellulose untersucht, wobei insbesondere analysiert werden sollte, ob es bei Inkubation in Lösungen mit niedrigen pH-Werten zur Desorption des Fusionsproteins kommt. Zum Nachweis wurde die FbFP-Domäne genutzt, die eine sensitive fluoreszenzspektroskopische Detektion erlaubt. Durch die Nutzung eines speziellen Fluoreszenzphotometers im Mikrotiterplatten-Format, das die Anregung sowie die anschließende Emissionsmessung von oben erlaubt, konnte die Fluoreszenzintensität von Cellulosesuspensionen, die immobilisiertes AtHNL-FbFP-CBM Fusionsprotein enthielten, ermittelt werden. Auf diese Weise wurden die FbFP-Fluoreszenzspektren in Puffern mit verschiedenen pH-Werten zeitlich aufgelöst verfolgt.

Dazu wurde zunächst ein Vorversuch mit aus einem entsprechenden *E. coli* BL21(DE3)-GZE (2.12.1) auf RAC immobilisiertem Fusionsprotein AtHNL-FbFP-CBM (2.12.2) durchgeführt. Das RAC-immobilisierte Protein wurde durch Zentrifugation pelletiert und anschließend in Assaypuffer pH 4,5 (50 mM Natriumacetat, 2.12.7) resuspendiert. Die Suspension wurde daraufhin entweder direkt zentrifugiert oder für 30 min schüttelnd inkubiert, um nach einer erneuten Zentrifugation den Überstand abzunehmen und das Pellet in Zellaufschlusspuffer (50 mM TEA pH 8, 2.12.1) zu resuspendieren. Mit den erhaltenen Suspensionen und den jeweiligen Überständen wurden Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei 450 nm aufgenommen (2.12.9.3), die in Abb. 26 dargestellt sind.

Wie zu erkennen, konnte für die Suspension von RAC-immobilisiertem AtHNL-FbFP-CBM ein Fluoreszenzemissionsspektrum mit dem für LOV-Proteine – und somit für FbFPs – charakteristischen Bandenmuster mit einem Maximum bei 495 nm und einer Schulter bei 520 nm nachgewiesen werden (Abb. 26 A), was auf korrekt gefaltetes FbFP mit gebundenem Chromophor Flavinmononukleotid (FMN) hindeutet. Dabei war die gemessene Intensität der Fluoreszenz in der RAC-Suspension nach 30-minütiger Inkubation in Natriumacetat-Puffer pH 4,5 deutlich niedriger als der Vergleichswert vor der Inkubation. Die Emissionsspektren der entsprechenden Überstände (Abb. 26 B) zeigten dagegen lediglich ein Maximum bei 520 nm, was auf freies FMN hindeutet.

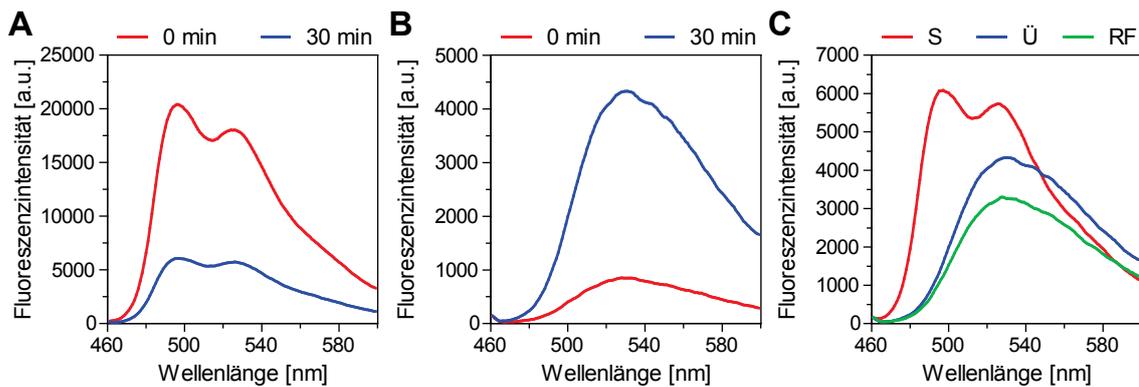


Abb. 26: Einfluss des pH-Werts auf die Fluoreszenzemission von RAC-immobilisiertem *AtHNL-FbFP-CBM* am Beispiel von Natriumacetat-Puffer pH 4,5. **A** Fluoreszenzemissionsspektren von Suspensionen (*AtHNL-FbFP-CBM* RAC-Immobilisat) vor (rot) und nach 30-minütiger Inkubation (blau). **B** Fluoreszenzemissionsspektren der Überstände vor (rot) und nach 30-minütiger Inkubation (blau). **C** Vergleich von Fluoreszenzemissionsspektren der Suspension (rot) und des Überstands nach 30-minütiger Inkubation (blau) sowie einer Riboflavin-Lösung (0,452 μM) (grün). S: Suspension, Ü: Überstand, RF: Riboflavin. Das *AtHNL-FbFP-CBM*-enthaltende Trägermaterial wurde in 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 4,5) schüttelnd inkubiert und direkt bzw. nach 30-minütiger Inkubation zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das RAC-Pellet in 50 mM TEA Puffer (pH 8) resuspendiert. Sowohl von der erhaltenen Suspension als auch von den Überständen wurden Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei 450 nm aufgenommen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind lediglich die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung dargestellt, wobei die Standardabweichung unter 5 % lag.

In dem Überstand nach 30-minütiger Inkubation war die gemessene Fluoreszenzintensität höher als in der Kontrolle. Eine direkte Überlagerung der Fluoreszenzemissionsspektren (Abb. 26 C) verdeutlicht die beobachteten Unterschiede im Bandenmuster der Suspension und des Überstands, wobei als Vergleich ein Emissionsspektrum von freiem Riboflavin dient, das ein identisches Spektrum besitzt wie FMN [192]. Der Vorversuch deutete demnach darauf hin, dass es zu einer Freisetzung des Chromophors FMN aus dem RAC-immobilisierten Fusionsprotein im Verlauf der Inkubation kam. Dies könnte auf ein Entfalten der FbFP-Domäne im Fusionsprotein *AtHNL-FbFP-CBM* hinweisen, sodass sich FMN löst, oder auf die Desorption des Fusionsproteins vom Trägermaterial zurückzuführen sein, die mit einer Entfaltung der FbFP-Domäne einhergeht.

Anhand der Ergebnisse des Vorversuchs wurde daher ein Experiment entworfen, welches die potentielle pH-abhängige Desorption des *AtHNL-FbFP-CBM* Fusionsproteins aus dem Trägermaterial RAC zeitaufgelöst näher untersuchen sollte, wobei zusätzlich eine Quantifizierung des freigesetzten Chromophors FMN mittels einer Riboflavin-Kalibrierungsreihe durchgeführt wurde. Darüber hinaus wurde eine Probe des Immobilisats mit Guanidinhydrochlorid denaturiert, um mithilfe einer entsprechenden Riboflavin-Kalibrierung Aussagen über die maximale FMN-Menge

zu treffen, welche aus dem Immobilisat freigesetzt werden kann. Die Protein-zusammensetzung der Überstände wurde des Weiteren mittels SDS-PAGE analysiert, um beurteilen zu können, ob durch die Inkubation in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten Protein vom Cellulosematerial desorbiert. Für die Analyse wurde jeweils *AtHNL*-Assaypuffer (50 mM Natriumacetat) gewählt, wobei die pH-Werte 4,75, 4,5 und 4,25 sowie die maximalen Inkubationsdauern 120 min, 30 min bzw. 15 min untersucht wurden (2.12.9.3). Von den Suspensionen wurde jeweils eine Probe zum Zeitpunkt $t = 0$ min und nach der jeweils maximalen Inkubationsdauer im entsprechenden pH-Wert bzw. Puffer für die Aufnahme eines Fluoreszenzemissionsspektrums verwendet. Zudem wurden Fluoreszenzemissionsspektren von allen Überständen aufgenommen. Alle Messungen wurden jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt und eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abb. 27 dargestellt.

Bei allen drei untersuchten pH-Werten wies eine Suspension des Fusionsproteins *AtHNL*-FbFP-CBM immobilisiert auf RAC zum Zeitpunkt $t = 0$ min und nach der maximalen Inkubationsdauer in Puffer des jeweiligen pH-Werts ein für FbFPs charakteristisches Fluoreszenzemissionsspektrum mit einem Maximum bei 495 nm und einer Schulter bei 520 nm auf (Abb. 27 A). Die Spektren nach der maximalen Inkubationszeit in Puffer des entsprechenden pH-Werts zeigten dabei jeweils eine geringere Fluoreszenzintensität als das Anfangsspektrum. Eine Betrachtung der Fluoreszenzemissionsspektren der Überstände, die zu definierten Zeitpunkten der Inkubation in Puffer des jeweiligen pH-Werts entnommen wurden, zeigte bei allen drei untersuchten pH-Werten ein für freies FMN charakteristisches Muster mit einem einzigen Maximum bei 520 nm (Abb. 27 B). Dabei nahm die Fluoreszenzintensität der vermessenen Überstände im zeitlichen Verlauf der Inkubation zu.

Anhand einer Riboflavin-Kalibrierungsreihe, die zuvor für jeden pH-Wert bzw. Puffer einzeln erstellt worden war und welche die Fluoreszenzintensität bei 520 nm mit der Konzentration korrelierte, konnte die enthaltene Riboflavin-Konzentration – die der FMN-Konzentration entspricht – im Überstand anhand der Fluoreszenzintensität bei 520 nm errechnet werden. Die ermittelten Konzentrationen wurden relativ auf die maximale FMN-Menge bezogen, welche aus den Fluoreszenzemissionsspektren einer in 6 M Guanidinhydrochlorid denaturierten RAC-Immobilisat Probe und einer entsprechenden Riboflavin-Kalibrierungsreihe errechnet worden war (Abb. 27 C).

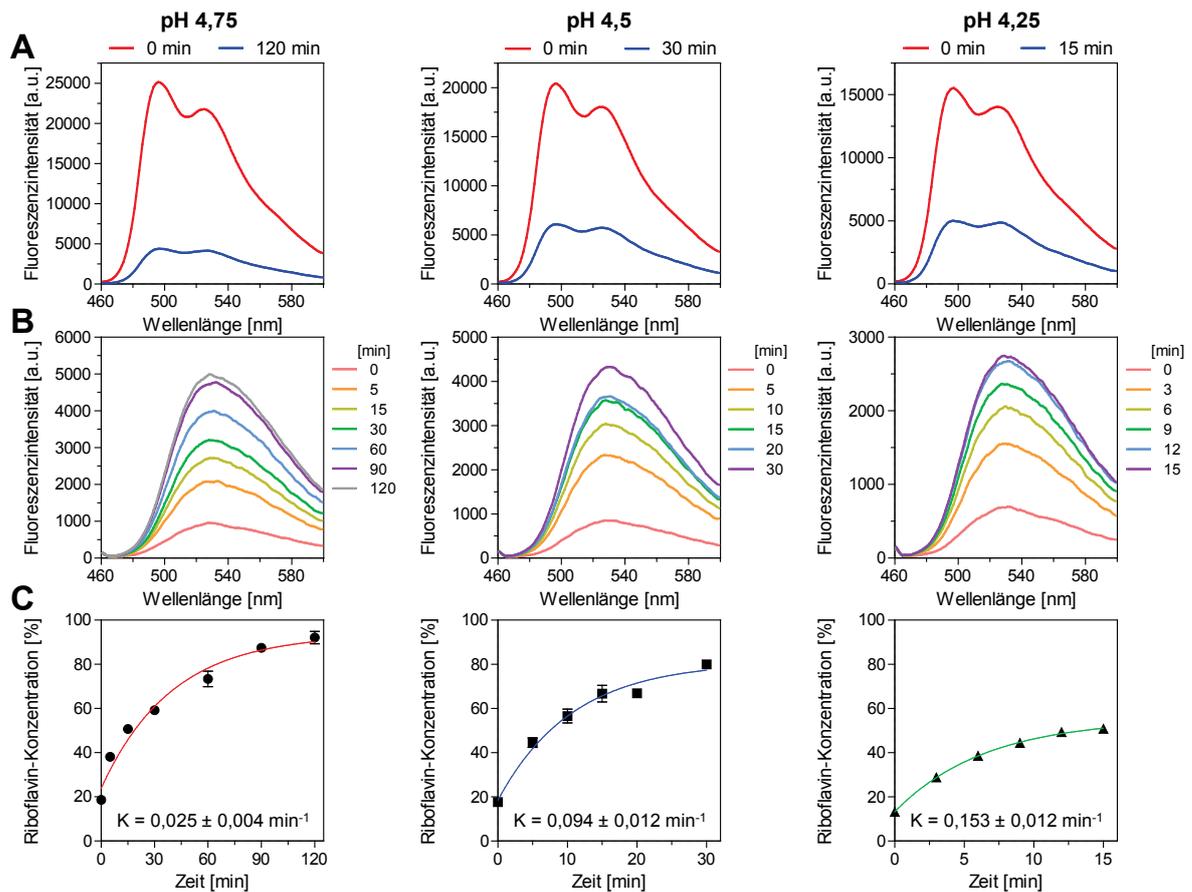


Abb. 27: pH-abhängige Freisetzung von Chromophor aus dem RAC-immobilisierten Fusionsprotein AtHNL-FbFP-CBM. **A** Fluoreszenzemissionsspektren der Suspensionen (AtHNL-FbFP-CBM RAC-Immobilisat) zu Beginn (rot) und nach der maximalen Inkubationsdauer (blau) in Puffer des jeweiligen pH-Werts. **B** Fluoreszenzemissionsspektren der Überstände, die während der Inkubation in Puffer des jeweiligen pH-Werts erhalten wurden. Das AtHNL-FbFP-CBM-enthaltende Trägermaterial wurde in 50 mM Natriumacetat-Puffer des jeweiligen pH-Werts schüttelnd inkubiert und direkt bzw. nach der angegebenen Inkubationsdauer zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das RAC-Pellet in 50 mM TEA Puffer (pH 8) resuspendiert. Sowohl von der erhaltenen Suspension als auch von den Überständen wurden Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei 450 nm aufgenommen. Bei allen Spektren ist aus Gründen der Übersichtlichkeit lediglich der Mittelwert einer Dreifachbestimmung angegeben, wobei die Standardabweichung unter 5 % lag. **C** Verlauf der aus der Fluoreszenzintensität der Überstände bei 520 nm und einer entsprechenden Riboflavin-Kalibrierungsreihe errechneten relativen Riboflavin-Konzentration. Dabei entsprechen 100 % $0,716 \pm 0,062 \mu\text{M}$ Riboflavin. K: Geschwindigkeitskonstante aus der Anpassung der experimentellen Daten an eine exponentielle Funktion erster Ordnung. Die angegebenen Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Dreifachbestimmung dar.

Bei allen drei pH-Werten bzw. Puffern nahm die Riboflavin-Konzentration in den Überständen im Verlauf der Inkubationszeit zu; bei pH 4,75 auf etwa 90 % nach 120 min, bei pH 4,5 auf ca. 80 % nach 40 min und bei pH 4,25 auf ungefähr 50 % nach 15 min. Aus der Anpassung der experimentellen Daten an eine exponentielle Funktion erster Ordnung konnte die Geschwindigkeitskonstante K erhalten werden, die eine Beurteilung der Geschwindigkeit der FMN-Freisetzung während der Inkubation des Immobilisats in Puffer des jeweiligen pH-Werts zuließ (Abb. 27 C). Dabei nahm die Geschwindigkeit der Freisetzung mit sinkendem pH-Wert deutlich zu. Von

pH 4,75 im Vergleich zu pH 4,5 um einen Faktor von etwa 3,8 sowie von pH 4,5 zu pH 4,25 um das ca. 1,6-Fache. Dies spricht für eine pH-abhängige Freisetzung von FMN aus dem RAC-immobilisierten Fusionsprotein *AtHNL-FbFP-CBM*.

Um eine mit der FMN-Freisetzung einhergehende potentielle Desorption von Protein zu überprüfen, wurde eine SDS-PAGE Analyse (2.12.5) der Überstände nach der maximalen Inkubationsdauer durchgeführt (Abb. 28). Als Kontrolle diente zum einen eine Probe der Enzym-haltigen RAC-Suspension (Abb. 28, Spur R) und zum anderen eine Probe derselben RAC-Suspension, wobei das enthaltene *AtHNL-FbFP-CBM* Fusionsprotein zunächst mittels Guanidinhydrochlorid denaturiert, vom Trägermaterial durch Zentrifugation getrennt und anschließend mit Ethanol gefällt (2.12.5.2) wurde (Abb. 28, Spur D).

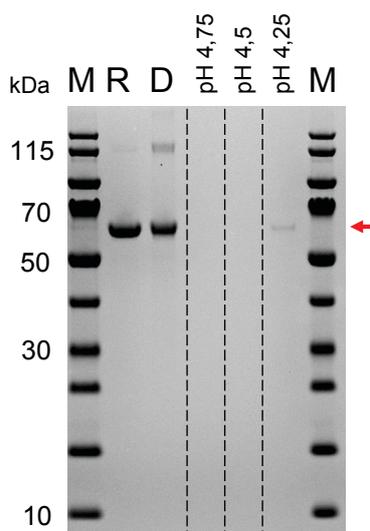


Abb. 28: SDS-PAGE Analyse der pH-abhängigen Desorption des Fusionsproteins *AtHNL-FbFP-CBM* vom Trägermaterial RAC. Es wurde etwa 1 µg Protein (R und D) bzw. 15 µl der entsprechenden Überstände auf das 4 – 12 % Gradientengel aufgetragen. Der rote Pfeil kennzeichnet die zu erwartende Größe des Fusionsproteins *AtHNL-FbFP-CBM* von etwa 56 kDa. M: Marker („Prestained Protein Ladder“), R: RAC-Suspension, D: mit 6 M Guanidinhydrochlorid denaturierte, zentrifugierte und anschließend mit Ethanol gefällte Probe der RAC-Suspension, pH 4,75: Überstand nach 120 min Inkubation, pH 4,5: Überstand nach 30 min Inkubation, pH 4,25: Überstand nach 15 min Inkubation.

Die SDS-PAGE Analyse zeigte in Spur R, welche RAC-Suspension enthielt, eine ausgeprägte Bande, die der theoretischen molekularen Masse des Fusionsproteins *AtHNL-FbFP-CBM* entspricht (Abb. 28). Auch in Spur D, welche die denaturierte *AtHNL-FbFP-CBM* Probe enthielt, konnte diese Bande in einer vergleichbaren Intensität beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass das Fusionsprotein *AtHNL-FbFP-CBM* auf dem Trägermaterial RAC mittels Guanidinhydrochlorid denaturiert, vom Trägermaterial durch Zentrifugation getrennt und anschließend mit Ethanol gefällt werden konnte. In den Spuren mit den Überständen der Inkubation in Puffer der pH-Werte 4,75 und 4,5 konnte die 56 kDa Bande nicht beobachtet werden, lediglich in der Probe des Puffer mit pH 4,25 war die Bande in schwacher Intensität zu erkennen. Dies spricht dafür, dass es bei Inkubation von RAC-immobilisiertem *AtHNL-FbFP-CBM* Fusionsprotein in Puffern mit pH-Werten im Bereich von pH 4,75

wurde aus *E. coli* BL21(DE3)-GZE auf verschiedenen Cellulosematerialien immobilisiertes Fusionsprotein in eine Mandelonitril-Synthesereaktion eingesetzt. Als Material wurde Avicel und RAC (2.12.2.3) sowie CA, in Form von CA-Disks (2.12.2.1), verwendet. Das entsprechende Cellulosematerial wurde mit dem GZE über Nacht inkubiert und anschließend mehrfach in Zellaufschlusspuffer (50 mM TEA pH 8, 2.12.1) gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen (2.12.2). Ein Teil der Cellulose wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration mithilfe eines modifizierten Bradford-Assays verwendet (2.12.3.1). Im Falle von Avicel und RAC wurde das erhaltene Immobilisat nass in einem entsprechenden Glasgefäß vorgelegt (400 mg Nassgewicht). Die CA-Disks wurden zuvor unter Argon getrocknet und anschließend in ein Glasgefäß gegeben (30 Disks). Alle Glasgefäße wurden mit einem geeigneten Magnetrührstäbchen ausgerüstet, luftdicht verschlossen und mit Argon begast. Daraufhin wurde je 1 ml des organischen, mikrowässrigen Reaktionsmediums Methyl-*tert*-Butylether (MTBE) eingespritzt, in dem 2 M HCN enthalten war (2.12.8.1), bevor die Reaktion durch Zugabe von Benzaldehyd gestartet wurde. Unter Rühren wurde die Reaktion für einen Zeitraum von 60 min verfolgt, indem zu definierten Zeitpunkten Proben entnommen, derivatisiert und mittels chiraler Gaschromatographie (GC) analysiert wurden (2.12.8). Anhand der GC-Ergebnisse konnte der Umsatz des Benzaldehyds zu Mandelonitril sowie der Enantiomerenüberschuss (*enantiomeric excess*, *ee*), der das Verhältnis von (*R*)- zu (*S*)-Mandelonitril darstellt, berechnet werden (2.12.8). Die Umsatzkurven und eine Darstellung der Cellulose-basierten *A*tHNL-FbFP-CBM Immobilisate vor ihrem Einsatz in die Synthesereaktion unter UV-Licht (2.13.1) sind in Abb. 30 zusammengestellt.

Alle verwendeten Immobilisate zeigten die erfolgreiche Bildung von Mandelonitril. Die Reaktionen mit Avicel- bzw. RAC-immobilisiertem *A*tHNL-FbFP-CBM Fusionsprotein resultierten in einem Umsatz von etwa 80 % nach 60 min, während das CA-basierte Immobilisat die Reaktion im Vergleich deutlich schneller katalysierte und bereits nach 20 min etwa 100 % Umsatz ergab (Abb. 30 C). Die eingesetzten Immobilisate unterschieden sich in der enthaltenen Proteinmenge (Avicel: 0,6 mg, RAC: 2,1 mg, CA: 1,6 mg). Allerdings korrelierte die eingesetzte Menge des Biokatalysators nicht mit der Reaktionsgeschwindigkeit.

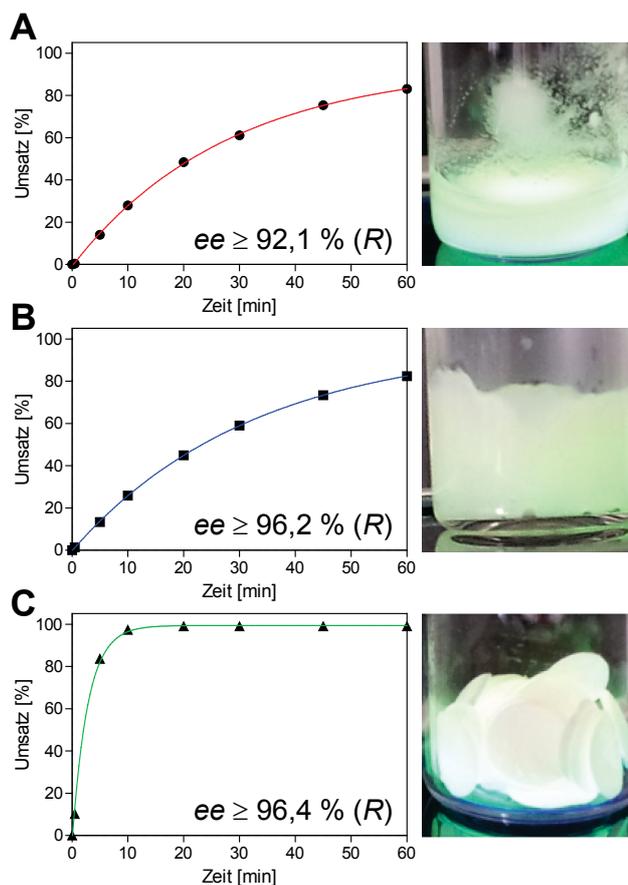


Abb. 30: (R)-Mandelonitril-Synthese mit auf Avicel (A), RAC (B) bzw. CA-Disks (C) immobilisiertem AtHNL-FbFP-CBM Fusionsprotein. Es wurden 400 mg (Nassgewicht) des Immobilisats bzw. 30 CA-Disks in einem Glasgefäß vorgelegt, dies entsprach einer Enzymmenge von 0,6 mg (Avicel), 2,1 mg (RAC) bzw. 1,6 mg (CA-Disks). Alle Reaktionen wurden unter Argon-Atmosphäre mit 1 ml 2 M HCN-MTBE, 0,5 M Benzaldehyd und 0,1 M Dodecan als internen Standard durchgeführt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, derivatisiert und mittels chiraler GC auf Produktbildung sowie Enantiomerenüberschuss analysiert. Die verwendeten Immobilisate wurden vor der Reaktion unter UV-Licht (365 nm) analysiert. Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

Alle verwendeten Immobilisate lieferten (R)-Mandelonitril, wobei für das Avicel-Immobilisat ein ee-Wert von 92,1 % bestimmt wurde, während sowohl das RAC- als auch das CA-Immobilisat ähnliche ee-Werte von 96,2 % bzw. 96,4 % ergaben. Unter UV-Licht konnte bei allen Cellulose-basierten Immobilisaten vor dem Einsatz in die Synthesereaktion eine deutliche, grünblaue Fluoreszenz beobachtet werden.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die Art der Einbringung des Immobilisats in das Reaktionsgefäß die Reaktion beeinflusst. Dies wurde anhand des RAC-basierten AtHNL-FbFP-CBM-Immobilisats analysiert, da es eine gelartige Konsistenz besaß und sich einfach mithilfe einer Spritze handhaben ließ. So wurde das Immobilisat zum einen direkt im Reaktionsgefäß vorgelegt oder in das vorbereitete Reaktionsmedium eingespritzt. In beiden Fällen wurden etwa 400 mg (Nassgewicht) des Immobilisats verwendet. Weiterhin wurde untersucht, ob eine

Vorbehandlung in MTBE zu einer Aktivitätsverbesserung führte, wie bereits für andere *At*HNL-Immobilisate beobachtet wurde (Dissertation Martin Diener, Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, unveröffentlicht). Dazu wurden 400 mg (Nassgewicht) des RAC-basierten *At*HNL-FbFP-CBM-Immobilisats in einem Glasgefäß vorgelegt und 4 x 5 min mit je 1 ml mit MgSO_4 getrocknetem MTBE gewaschen (2.12.8.2). Anschließend wurde eine (*R*)-Mandelonitril-Synthese durchgeführt (2.12.8), wobei in allen drei Bedingungen die gleiche Enzymmenge eingesetzt wurde.

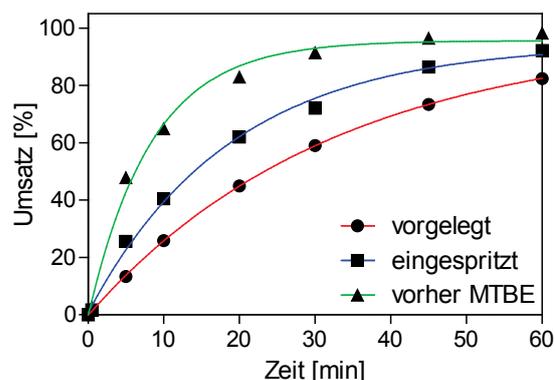


Abb. 31: Einfluss der Einbringung (rot, blau) bzw. der Vorbehandlung (grün) des RAC-immobilisierten *At*HNL-FbFP-CBM Fusionsproteins auf die (*R*)-Mandelonitril-Synthese. Es wurden entweder 400 mg (Nassgewicht) des Immobilisats im Reaktionsgefäß vorgelegt bzw. direkt in das Reaktionsmedium eingespritzt oder vor der Reaktion viermal mit je 1 ml getrocknetem MTBE für 5 min gewaschen. In allen Fällen wurde eine Enzymmenge von 1,6 mg verwendet. Alle Reaktionen wurden unter Argon-Atmosphäre mit 1 ml 2 M HCN-MTBE, 0,5 M Benzaldehyd und 0,1 M Dodecan als internen Standard durchgeführt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, derivatisiert und mittels chiraler GC auf Produktbildung sowie Enantiomerenüberschuss analysiert. Der *ee* betrug 96,2 % (vorgelegt), 96,4 % (eingespritzt) bzw. 97,3 % (vorher MTBE) (*R*).

Wie in Abb. 31 zu erkennen, konnte bei allen drei Bedingungen der Umsatz von Benzaldehyd und HCN zu (*R*)-Mandelonitril mit unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten nachgewiesen werden. Das vorgelegte RAC-basierte Immobilisat erreichte nach 60 min einen Umsatz von etwa 80 %, während das eingespritzte Immobilisat einen Umsatz von ungefähr 90 % ergab. Die MTBE-Vorbehandlung des Immobilisats hatte einen Umsatz von ca. 100 % im selben Zeitraum zur Folge. Auch die erzielten *ee*-Werte unterschieden sich zwischen den verschiedenen Bedingungen. Während sich die Enantiomerenüberschüsse mit vorgelegtem und eingespritztem Immobilisat mit 96,2 % und 96,4 % (*R*) sehr ähnlich waren, konnte bei dem mit MTBE vorbehandelten Immobilisat ein geringfügig höherer *ee*-Wert von 97,3 % (*R*) nachgewiesen werden. Demnach verbessert eine Vorbehandlung des

RAC-basierten *A*tHNL-FbFP-CBM-Immobilisats mit MTBE sowohl die erzielte Aktivität als auch den *ee*-Wert.

Die (*R*)-Mandelonitril-Synthese konnte erfolgreich mit Avicel- und RAC- bzw. CA-immobilisiertem *A*tHNL-FbFP-CBM Fusionsprotein im organischen, mikrowässrigen Reaktionssystem durchgeführt werden.

3.2.5.1 MTBE-Vorbehandlung von RAC-basierten Immobilisaten

Im Folgenden wurde die MTBE-Vorbehandlung von *A*tHNL-FbFP-CBM-Immobilisaten systematisch untersucht, indem unterschiedlich lange Inkubationsdauern getestet wurden. Aufgrund der guten Handhabbarkeit wurden die Versuche mit RAC-basiertem Immobilisat durchgeführt. Da diese Immobilisate dazu neigten, sich an den Wänden und am Boden des Glasgefäßes anzulagern, wurde ein Beutel aus einer lösungsmittelresistenten Nylonmembran verwendet, um das Immobilisat zurückzuhalten. Dies ermöglichte ebenfalls ein einfaches Abtrennen des Immobilisats vom Reaktionsmedium und somit ein Recycling des Biokatalysators.

Für die MTBE-Vorbehandlung wurden zunächst Beutel aus Nylonmembran hergestellt, in denen das RAC-basierte *A*tHNL-FbFP-CBM-Immobilisat, das aus *E. coli* BL21(DE3)-GZE gewonnen worden war (2.12.2), eingeschlossen wurde. Als Vorbehandlung wurde eine Inkubation von jeweils 10 min in 10 ml mit MgSO₄ getrocknetem MTBE gewählt. Dabei wurden drei Nylonbeutel mit gleichen Mengen Immobilisat bis zu dreimal der MTBE-Vorbehandlung unterzogen, bevor diese in eine (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktion eingesetzt wurden (2.12.8.2) (Abb. 32 A).

Es konnte festgestellt werden, dass die Dauer der MTBE-Vorbehandlung die Reaktionsgeschwindigkeit des RAC-basierten *A*tHNL-FbFP-CBM-Immobilisats in der (*R*)-Mandelonitril-Synthese beeinflusste (Abb. 32 A). Das Immobilisat, das einmal vorbehandelt worden war, erreichte nach 60 min einen Umsatz von ca. 35 %, wohingegen eine zweimalige MTBE-Behandlung 50 % und eine dreimalige 60 % Umsatz zur Folge hatte. Die durchgeführten Synthesereaktionen unterschieden sich weiterhin in ihrem erzielten Enantiomerenüberschuss. So resultierte die einmalige Vorbehandlung in einem *ee*-Wert von 94,0 %, die zweimalige in 96,3 % und die dreimalige in 97,0 % (*R*).

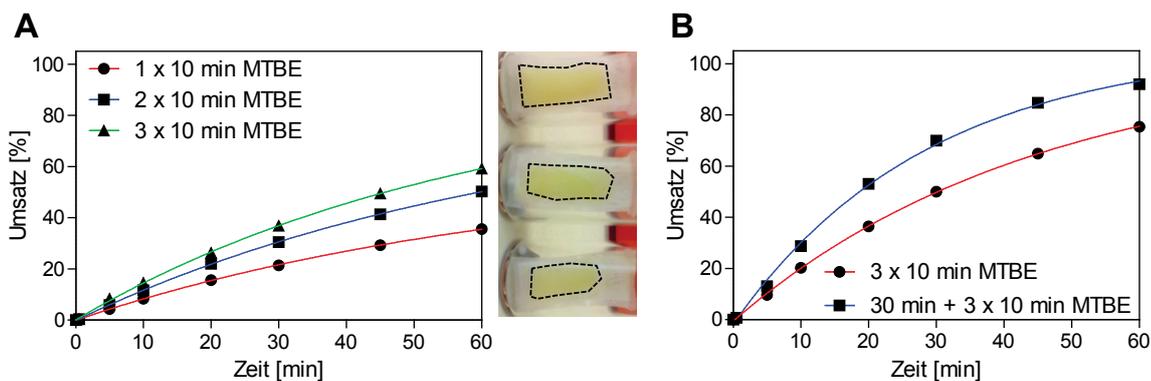


Abb. 32: Einfluss der MTBE-Vorbehandlung von RAC-immobilisiertem AtHNL-FbFP-CBM Fusionsprotein auf die (R)-Mandelonitril-Synthese. **A** Kurze MTBE-Vorbehandlung. Es wurden etwa 230 mg (Nassgewicht) des Immobilisats, was einer Enzymmenge von 1,4 mg entsprach, in einer Nylonmembran eingeschlossen und vor der Reaktion unterschiedlich oft in 10 ml getrocknetem MTBE inkubiert. Der ee betrug 94,0 % (1 x), 96,3 % (2 x) bzw. 97,0 % (3 x) (R). Das Foto zeigt die Immobilisat-enthaltenden Nylonbeutel nach der jeweiligen Vorbehandlung (von oben nach unten, 1 x bis 3 x), wobei die Umrisse des Immobilisats im Beutel zur Verdeutlichung mit schwarzen Linien gekennzeichnet sind. **B** Optimiertes Beuteldesign zum Einsatz größerer Immobilisatmengen und verlängerte MTBE-Vorbehandlung. Es wurden etwa 475 mg (Nassgewicht) des Immobilisats, was einer Enzymmenge von 2,9 mg entsprach, in einer Nylonmembran eingeschlossen und vor der Reaktion dreimal in 10 ml getrocknetem MTBE inkubiert, wobei ein Beutel zunächst für 30 min in 20 ml MTBE behandelt wurde. Alle Reaktionen wurden unter Argon-Atmosphäre mit 1 ml 2 M HCN-MTBE, 0,5 M Benzaldehyd und 0,1 M Dodecan als internen Standard durchgeführt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, derivatisiert und mittels chiraler GC auf Produktbildung sowie Enantiomerenüberschuss analysiert. Der ee betrug 96,6 % (kurze Behandlung) bzw. 97,6 % (lange Behandlung) (R). Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

Es konnte festgestellt werden, dass die Dauer der MTBE-Vorbehandlung die Reaktionsgeschwindigkeit des RAC-basierten AtHNL-FbFP-CBM-Immobilisats in der (R)-Mandelonitril-Synthese beeinflusste (Abb. 32 A). Das Immobilisat, das einmal vorbehandelt worden war, erreichte nach 60 min einen Umsatz von ca. 35 %, wohingegen eine zweimalige MTBE-Behandlung 50 % und eine dreimalige 60 % Umsatz zur Folge hatte. Die durchgeführten Synthesereaktionen unterschieden sich weiterhin in ihrem erzielten Enantiomerenüberschuss. So resultierte die einmalige Vorbehandlung in einem ee-Wert von 94,0 %, die zweimalige in 96,3 % und die dreimalige in 97,0 % (R). Die längere Vorbehandlungsdauer in MTBE steigerte demnach die Reaktionsgeschwindigkeit und den erzielten ee-Wert. Weiterhin konnten deutliche Unterschiede im Aussehen der verschieden lange vorbehandelten Nylonbeutel mit Immobilisat festgestellt werden (Abb. 32 A). Je länger die Inkubationsdauer in MTBE war, desto kleiner und kompakter erschien das RAC-basierte AtHNL-FbFP-CBM-Immobilisat im Beutel.

Aufgrund der nur geringen Proteinmenge von 1,4 mg, die in dem Nylonbeutel in Form von RAC-immobilisiertem Protein eingebracht werden konnte, wurde das Design des Beutels optimiert, um den Einsatz größerer Immobilisatmengen in die

(*R*)-Mandelonitril-Synthese zu ermöglichen. Mit RAC-basiertem Immobilisat im vergrößerten Nylonbeutel wurde daraufhin eine erneute MTBE-Vorbehandlung durchgeführt, die aus dem dreimaligen, 10-minütigen Waschen bestand. Zudem wurde ein verlängertes Vorbehandlungsprotokoll getestet, in dem vor dem dreimaligen, 10-minütigen Waschen in MTBE eine Inkubation für 30 min in 20 ml getrocknetem MTBE erfolgte (2.12.8.2) (Abb. 32 B). Mit beiden Immobilisat-enthaltenden Beuteln wurde ein deutlich erhöhter Umsatz im Vergleich zu den kleineren Beuteln erzielt. So konnte nach der kurzen MTBE-Vorbehandlung nach 60 min ein Umsatz von 75 % und bei dem verlängerten Protokoll sogar von 92 % nachgewiesen werden. Auch im erzielten ee-Wert war ein Unterschied zu beobachten; die Synthesereaktion mit dem Immobilisat-enthaltenden Nylonbeutel, der kurz mit MTBE behandelt worden war, lieferte (*R*)-Mandelonitril mit einem ee-Wert von 96,6 %, wohingegen das länger behandelte Immobilisat einen ee von 97,6 % erzielte. Die längere MTBE-Vorbehandlung verbesserte demnach die Reaktionsgeschwindigkeit und den ee-Wert.

Die Reaktionsgeschwindigkeit und der erzielte Enantiomerenüberschuss von RAC-immobilisiertem *At*HNL-FbFP-CBM Fusionsprotein in der (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktion konnte durch eine Vorbehandlung mit MTBE deutlich gesteigert werden.

3.2.5.2 Recycling von Cellulose-basierten *At*HNL-FbFP-CBM-Immobilisaten

Ein Vorteil der Nutzung von Immobilisaten zur Cyanhydrinsynthese ist die potentielle Wiederverwendbarkeit des eingesetzten Biokatalysators, da dieser von dem Reaktionsmedium abgetrennt werden kann. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob Cellulose-basierte Immobilisate des *At*HNL-FbFP-CBM Fusionsproteins für aufeinanderfolgende (*R*)-Mandelonitril-Synthesen verwendet werden konnten, d. h. ob ein Recycling des Biokatalysators möglich war.

3.2.5.2.1 Recycling von RAC-basierten Immobilisaten

Das Recycling wurde zunächst mit RAC-immobilisiertem *At*HNL-FbFP-CBM Fusionsprotein durchgeführt, wobei unterschiedliche Behandlungen zwischen den Synthesereaktionen getestet wurden. Dazu wurde das Fusionsprotein aus *E. coli* BL21(DE3)-GZE auf RAC immobilisiert (2.12.2), in einem Beutel aus Nylonmembran eingeschlossen und dem langen MTBE-Vorbehandlungsprotokoll unterzogen (2.12.8.2). Anschließend wurden die Immobilisate in die (*R*)-Mandelonitril-Synthese (2.12.8) eingesetzt und die Reaktion für 60 min verfolgt. Nach der ersten Reaktion wurde der Nylonbeutel entweder in getrocknetem MTBE (Abb. 33 A) oder in Puffer-gesättigtem MTBE (50 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,5) (Abb. 33 B) gewaschen, wobei das Volumen in beiden Fällen 10 ml und die Inkubationsdauer 10 min betrug (2.12.8.4). Anschließend wurde der Immobilisat-enthaltende Nylonbeutel erneut in eine Synthesereaktion eingesetzt. Auf diese Weise wurden jeweils drei aufeinanderfolgende Reaktionen durchgeführt (Abb. 33 A, B).

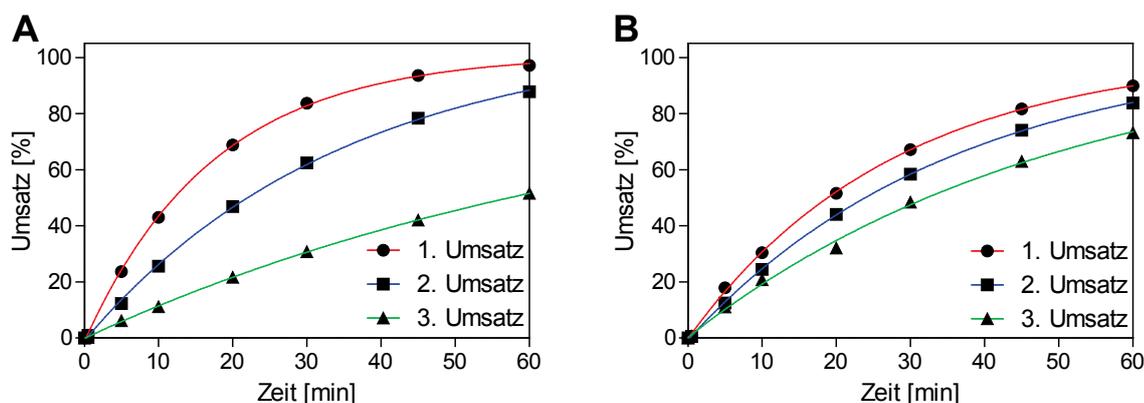


Abb. 33: Recycling des RAC-immobilisierten *At*HNL-FbFP-CBM Fusionsproteins zur (*R*)-Mandelonitril-Synthese. **A** Zwischen den Umsätzen mit getrocknetem MTBE gewaschen. Der ee betrug 98,0 % (1.), 97,8 % (2.) bzw. 93,8 % (3.) (*R*). **B** Zwischen den Umsätzen mit Puffer-gesättigtem MTBE (50 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,5) gewaschen. Es wurden etwa 475 mg (Nassgewicht) des Immobilisats, was einer Enzymmenge von 2,9 mg entsprach, in einer Nylonmembran eingeschlossen und vor der Reaktion dem langen MTBE-Vorbehandlungsprotokoll unterzogen. Alle Reaktionen wurden unter Argon-Atmosphäre mit 1 ml 2 M HCN-MTBE, 0,5 M Benzaldehyd und 0,1 M Dodecan als internen Standard durchgeführt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, derivatisiert und mittels chiraler GC auf Produktbildung sowie Enantiomerenüberschuss analysiert. Der ee betrug 97,5 % (1.), 98,0 % (2.) bzw. 97,8 % (3.) (*R*). Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

Die einzelnen Reaktionen unterschieden sich in der beobachteten Reaktionsgeschwindigkeit, die mit jedem Recyclingschritt abnahm, und dem erreichten ee-Wert. Im Falle der Behandlung des RAC-immobilisierten Fusionsproteins *At*HNL-FbFP-CBM mit getrocknetem MTBE zwischen den drei aufeinanderfolgenden (*R*)-

Mandelonitril-Synthesereaktionen (Abb. 33 A) betrug der Umsatz nach der ersten Reaktion 97 % und verringerte sich in der zweiten Reaktion auf 87 % bzw. auf 50 % in der dritten Reaktion. Dagegen lieferte die Behandlung mit Puffer-gesättigtem MTBE zwischen den Synthesen einen Umsatz von 90 %, 83 % und 73 % nach der ersten, zweiten bzw. dritten Reaktion (Abb. 33 B). Das RAC-basierte Immobilisat zeigte demnach bei der Behandlung mit Puffer-gesättigtem MTBE einen geringeren Aktivitätsverlust als das Immobilisat, welches mit trockenem MTBE inkubiert wurde. Das Behandlungsprotokoll zwischen den einzelnen Synthesereaktionen hatte ebenfalls unterschiedliche Auswirkungen auf den erzielten *ee*-Wert in den einzelnen Reaktionen. Im Falle der Behandlung mit trockenem MTBE wurden *ee*-Werte von 98,0 %, 97,8 % bzw. 93,8 % (*R*) in den aufeinanderfolgenden Reaktionen nachgewiesen. Bei der Behandlung mit Puffer-gesättigtem MTBE dagegen blieb der *ee* über den Verlauf des Recyclings mit 97,5 %, 98,0 % bzw. 97,8 % (*R*) nahezu konstant.

Das RAC-immobilisierte *At*HNL-FbFP-CBM Fusionsprotein konnte in drei aufeinanderfolgenden (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktionen wiederverwendet werden. Dabei erwies sich ein Waschschrift mit Puffer-gesättigtem MTBE zwischen den Synthesereaktionen als geeignet, um die Aktivität und die Stereoselektivität des Biokatalysators zu erhalten.

3.2.5.2.2 Recycling von CA-basierten Immobilisaten

Als zweites Immobilisat wurden CA-Disks, auf denen das *At*HNL-FbFP-CBM Fusionsprotein immobilisiert war, auf ihre Eignung in einem Recyclingversuch zur (*R*)-Mandelonitril-Synthese getestet. Für das CA-basierte Immobilisat konnten bereits sehr gute Umsätze in der Synthesereaktion nachgewiesen werden (3.2.5, Abb. 30 C) und im Gegensatz zum RAC-basierten Immobilisat war kein Beutel aus Nylonmembran notwendig, um das Abtrennen vom Reaktionsmedium zu ermöglichen. Daher wurde ein CA-basiertes *At*HNL-FbFP-CBM Immobilisat, das nach Inkubation von CA-Disks in einem entsprechenden *E. coli* BL21(DE3)-GZE gewonnen werden konnte (2.12.2), in drei aufeinanderfolgende (*R*)-Mandelonitril-Synthesen eingesetzt (2.12.8). Dazu wurden 30 *At*HNL-FbFP-CBM-enthaltende CA-Disks nach dem Waschen in Puffer (50 mM TEA pH 8, 2.12.1) unter Argon

getrocknet und in einem Glasgefäß vorgelegt. Anschließend wurde eine Synthesereaktion durchgeführt und das Reaktionsmedium nach 60 min Reaktionszeit mithilfe einer Spritze aus dem Reaktionsgefäß entfernt. Daraufhin folgte ein Waschschriff mit 1 ml Puffer-gesättigtem MTBE für 1 min, bevor die nächste (*R*)-Mandelonitril-Synthese gestartet wurde (2.12.8.4). Auf diese Weise wurden drei aufeinanderfolgende Reaktionen durchgeführt, wobei das Ergebnis in Abb. 34 dargestellt ist.

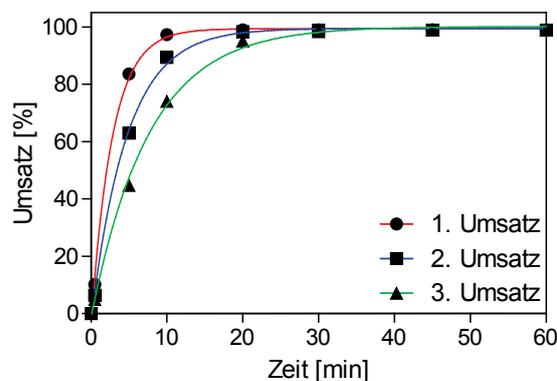


Abb. 34: Recycling des CA-immobilisierten AtHNL-FbFP-CBM Fusionsproteins zur (*R*)-Mandelonitril-Synthese. Es wurden 30 CA-Disks, was einer Enzymmenge von 1,6 mg entsprach, in die Reaktion eingesetzt. Alle Reaktionen wurden unter Argon-Atmosphäre mit 1 ml 2 M HCN-MTBE, 0,5 M Benzaldehyd und 0,1 M Dodecan als internen Standard durchgeführt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, derivatisiert und mittels chiraler GC auf Produktbildung sowie Enantiomerenüberschuss analysiert. Der ee betrug 96,4 % (1.), 96,7 % (2.) bzw. 96,7 % (3.) (*R*). Zwischen den Reaktionen wurden die CA-Disks mit 1 ml Puffer-gesättigtem MTBE (50 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,5) für 1 min gewaschen.

Wie zu erkennen ist, zeigten alle Reaktionen innerhalb von 60 min Reaktionszeit Vollumsatz des eingesetzten Benzaldehyds zu Mandelonitril. Dabei nahm die Reaktionsgeschwindigkeit beim wiederholten Einsatz des CA-immobilisierten Fusionsproteins AtHNL-FbFP-CBM in der Synthesereaktion leicht ab (Abb. 34). Der ee-Wert blieb in den drei aufeinanderfolgenden Reaktionen mit 96,4 %, 96,7 % und 96,7 % (*R*) konstant.

Im Folgenden wurde untersucht, ob der pH-Wert des Puffers, mit dem das CA-basierte Immobilisat vor dem Trocknen unter Argon gewaschen worden war, einen Einfluss auf den erzielten Umsatz oder den ee-Wert hatte. Dazu wurde zusätzlich zum Standard-Puffer (50 mM TEA pH 8) ein Puffer mit pH 6,5 bzw. pH 5,5 (beide 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer) getestet. Weiterhin wurde die verwendete Enzymmenge reduziert, indem lediglich 20 Enzym-haltige CA-Disks genutzt wurden. Die so erhaltenen Immobilisate wurden daraufhin in eine (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktion eingesetzt (Abb. 35).

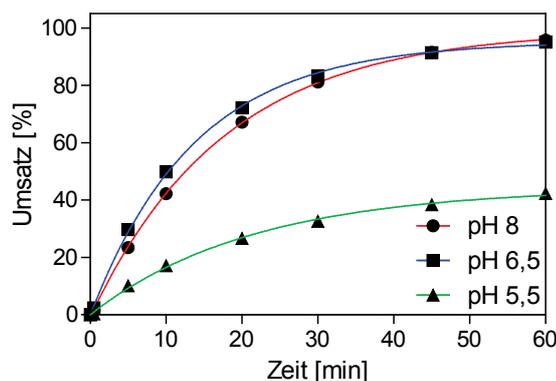


Abb. 35: Einfluss des pH-Werts des Puffers während der Vorbehandlung auf die (*R*)-Mandelonitril-Synthese katalysiert von CA-immobilisiertem AtHNL-FbFP-CBM Fusionsprotein. Es wurden 20 CA-Disks, was einer Enzymmenge von 1 mg entsprach, mit verschiedenen Puffern gewaschen, unter Argon getrocknet und in die Reaktion eingesetzt. Entweder wurde 50 mM TEA pH 8 oder 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 6,5 bzw. pH 5,5 verwendet. Die Reaktionen wurden in unabhängigen Messungen reproduziert, wobei sich ähnliche Umsätze und *ee*-Werte ergaben. Alle Reaktionen wurden unter Argon-Atmosphäre mit 1 ml 2 M HCN-MTBE, 0,5 M Benzaldehyd und 0,1 M Dodecan als internen Standard durchgeführt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, derivatisiert und mittels chiraler GC auf Produktbildung sowie Enantiomerenüberschuss analysiert. Der *ee* betrug 97,7 % (pH 8), 99,5 % (pH 6,5) bzw. 98,0 % (pH 5,5) (*R*). Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

Während sowohl die mit TEA-Puffer pH 8 als auch mit Citrat-Phosphat-Puffer pH 6,5 behandelten Immobilisate einen Umsatz von etwa 96 % im Laufe von 60 min erreichten, wies das Immobilisat, das zuvor in Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,5 inkubiert worden war, lediglich einen Umsatz von 42 % auf (Abb. 35). Auch im erzielten *ee*-Wert unterschieden sich die verschiedenen Immobilisate. So ergab das mit TEA-Puffer pH 8 vorbehandelte Immobilisat einen *ee* von 97,7 % (*R*), wohingegen die Vorbehandlung mit Citrat-Phosphat-Puffer pH 6,5 bzw. pH 5,5 in einem *ee* von 99,5 % bzw. 98,0 % für (*R*)-Mandelonitril resultierte. Das beste Ergebnis wurde demnach durch Vorbehandlung des CA-immobilisierten AtHNL-FbFP-CBM Fusionsproteins in Citrat-Phosphat-Puffer pH 6,5 erreicht.

Aus diesem Grund wurde ein erneutes Recycling des CA-basierten Immobilisats durchgeführt, wobei das Immobilisat vor dem Trocknen unter Argon mit Citrat-Phosphat-Puffer pH 6,5 gewaschen wurde. Das CA-immobilisierte AtHNL-FbFP-CBM Fusionsprotein wurde anschließend für drei aufeinanderfolgende (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktionen verwendet (Abb. 36).

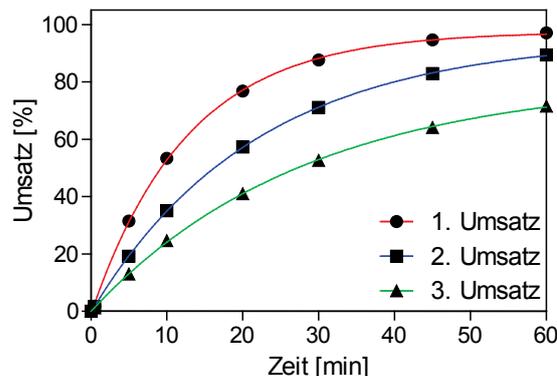


Abb. 36: Recycling des CA-immobilisierten AtHNL-FbFP-CBM Fusionsproteins zur (*R*)-Mandelonitril-Synthese unter optimierten Bedingungen. Es wurden 20 CA-Disks, was einer Enzymmenge von 1 mg entsprach, mit 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 6,5 gewaschen, unter Argon getrocknet und in die Reaktion eingesetzt. Alle Reaktionen wurden unter Argon-Atmosphäre mit 1 ml 2 M HCN-MTBE, 0,5 M Benzaldehyd und 0,1 M Dodecan als internen Standard durchgeführt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, derivatisiert und mittels chiraler GC auf Produktbildung sowie Enantiomerenüberschuss analysiert. Der ee betrug 99,4 % (1.), 99,1 % (2.) bzw. 98,3 % (3.) (*R*). Zwischen den Reaktionen wurden die CA-Disks mit Puffer-gesättigtem MTBE (50 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,5) gewaschen. Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

Die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit des CA-basierten Immobilisats nahm im Verlauf des Recyclings ab (Abb. 36). So betrug der Umsatz der ersten Reaktion etwa 97 %, während sich der Umsatz in der zweiten Reaktion auf 90 % und in der dritten auf 72 % verringerte. Der gemessene ee-Wert betrug für die drei aufeinanderfolgenden (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktionen 99,4 %, 99,1 % bzw. 98,3 % (*R*).

Das CA-immobilisierte AtHNL-FbFP-CBM Fusionsprotein konnte in drei aufeinanderfolgenden (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktionen wiederverwendet werden. Dabei konnte der erzielte Enantiomerenüberschuss durch eine Vorbehandlung des Immobilisats in Citrat-Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 6,5 deutlich verbessert werden gegenüber der Vorbehandlung in TEA-Puffer pH 8.

4 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde eine alternative Immobilisierungsstrategie evaluiert, bei der ein Cellulose-Bindemodul aus der Gruppe der Kohlenhydrat-Bindemodule (*carbohydrate-binding module*, CBM) als Immobilisierungstag und verschiedene Cellulosen als Trägermaterialien verwendet wurden. Zwei verschiedene CBMs wurden mit einem Flavin-basierten Fluoreszenzprotein (FbFP) fusioniert und das resultierende Fusionsprotein charakterisiert, um einen geeigneten Tag zur Fusion mit einem Modellenzym zu identifizieren. Das in dieser Weise als am besten geeignet identifizierte Modul wurde daraufhin zur Konstruktion eines Fusionsproteins mit der Hydroxynitril-Lyase aus *Arabidopsis thaliana* (AtHNL) eingesetzt, welches auf verschiedenen Cellulosematerialien immobilisiert und biochemisch charakterisiert wurde.

4.1 FbFP-CBM stellt ein geeignetes Modul zur Generierung weiterer Fusionsproteine dar

Für die Fusion an den Fluoreszenzreporter FbFP wurden zwei strukturell ähnliche (50 % Sequenzidentität) Familie-2, Typ A CBMs aus dem Bakterium *Cellulomonas fimi* ausgewählt, die eine amino- bzw. carboxy-terminale Fusion unter Ausnutzung natürlich vorkommender, flexibler Linker als Platzhalter zuließen (3.1.1, Abb. 11). Die entsprechenden Expressionsvektoren wurden ausgehend von einer an den *E. coli*-Kodongebrauch angepassten, synthetischen DNA-Sequenz konstruiert, die aus dem erhaltenen Vektor in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert wurde (3.1.2, Abb. 12). In einer Überexpressionskultur konnten beide Fusionsproteine in *E. coli* BL21(DE3) produziert werden, jedoch war das Produktionsniveau von CBM-FbFP laut einer SDS-PAGE Analyse (3.1.3, Abb. 13 A) sehr viel geringer als von FbFP-CBM. Allerdings konnte FbFP-CBM vermehrt in der unlöslichen Fraktion beobachtet werden. Dies spricht für Probleme bei der heterologen Expression des entsprechenden Gens, die beispielsweise zur Bildung von unlöslichem Protein, sogenannten *inclusion bodies*, führen könnten [193]. Für verbesserte Ausbeuten an löslichem Protein könnte eine Optimierung der Expressionsbedingungen, z. B. Medium, Temperatur, Art der Induktion, durchgeführt werden.

Die Reinigung mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) lieferte ausreichend Protein mit einem ähnlichen Reinheitsgrad für beide Fusionsproteine, wie in einer SDS-PAGE Analyse gezeigt werden konnte (3.1.3, Abb. 13 A). Für die gereinigten Fusionsproteine CBM-FbFP bzw. FbFP-CBM wurden charakteristische FbFP-Fluoreszenzemissionsspektren nachgewiesen, wobei die gemessene Fluoreszenzintensität – bei gleicher Proteinkonzentration – für CBM-FbFP etwa 10-fach geringer war als für FbFP-CBM (3.1.3, Abb. 13 B). Dies spricht für eine deutlich höhere Beladung der FbFP-Domäne des FbFP-CBM Fusionsproteins im Vergleich zu CBM-FbFP mit dem Chromophor FMN, ohne den keine charakteristische FbFP-Fluoreszenz möglich ist. Für eine verbesserte Beladung der FbFP-Domäne mit FMN könnte ein besonderer *E. coli*-Stamm zur Produktion der Proteine genutzt werden, beispielsweise *E. coli* CmpX131, der mithilfe des Transporterproteins RibM aus *Corynebacterium glutamicum* aktiv Riboflavin als Vorstufe von FMN aus dem Medium aufnehmen kann [194]. Dass das Fusionsprotein FbFP-CBM bei gleicher Proteinkonzentration eine höhere FMN-Beladung aufwies als CBM-FbFP, könnte des Weiteren auf Faltungsprobleme des Fusionsproteins CBM-FbFP hindeuten, welche eine Beladung mit FMN erschweren. Für eine Optimierung der FMN-Beladung von CBM-FbFP könnten daher Faltungshelfer, sogenannte Chaperone, eingesetzt werden. Diese Chaperone, z. B. das Hitzeschockprotein DnaK, können gezielt während der Produktion von rekombinanten Proteinen in *E. coli* produziert werden, um deren korrekte Faltung zu unterstützen [195, 196].

Die bessere Beladung des Fusionsproteins FbFP-CBM mit FMN ermöglichte den direkten visuellen Nachweis der Interaktion mit einem Celluloseacetat-Filter (CA, 0,2 µm Porengröße) anhand der deutlich beobachtbaren grünblauen Fluoreszenz (3.1.3, Abb. 14). Eine direkte Beurteilung der erfolgreichen Adsorption des Fusionsproteins CBM-FbFP war aufgrund der geringen Fluoreszenz nicht möglich, sodass eine weitere Analyse des CA-Filters, beispielsweise mit einer SDS-PAGE, nötig wäre. Aufgrund der besseren heterologen Produktion und Beladung mit FMN in einem direkten Vergleich der beiden Fusionsproteine wurde demnach FbFP-CBM als geeignetes Modul zur Fusion an ein Modellenzym identifiziert.

4.2 AtHNL-FbFP-CBM kann in einem Schritt aus *E. coli*-Ganzzellextrakt (GZE) immobilisiert werden

Die Hydroxynitril-Lyase aus *Arabidopsis thaliana* (AtHNL) wurde als Modellenzym zur Erzeugung eines komplexen Fusionsproteins mit dem Modul FbFP-CBM ausgewählt und der entsprechende Expressionsvektor kloniert (3.2.1, Abb. 16), sodass eine heterologe Produktion des Proteins in *E. coli* BL21(DE3) ermöglicht wurde. Im Anschluss an die heterologe Produktion von AtHNL-FbFP-CBM und den Zellaufschluss konnte die direkte Adsorption des Fusionsproteins an unterschiedliche Cellulosematerialien anhand der Fluoreszenz demonstriert werden. Dazu wurden die Cellulosematerialien Avicel PH-101 (mikrokristalline Cellulose, im Folgenden Avicel genannt), regenerierte amorphe Cellulose (RAC, präpariert aus Avicel, vgl. 3.2.2), CA-Filter, Elektrophoresepapier (Whatman Chr 1) und Baumwollstoff ausgewählt. Der erhaltene *E. coli* BL21(DE3)-GZE wurde mit den Cellulosematerialien inkubiert, die daraufhin mehrfach gewaschen und unter ultraviolettem (UV) Licht analysiert wurden, um die FbFP-Fluoreszenz qualitativ zu beobachten. Dabei war bei allen verwendeten Cellulosematerialien eine deutliche, grünblaue Fluoreszenz erkennbar (3.2.2.1, Abb. 18), welche die erfolgreiche heterologe Produktion und anschließende Adsorption von AtHNL-FbFP-CBM bestätigte. Lediglich bei dem Baumwollstoff war die grünblaue Fluoreszenz nur schwach ausgeprägt und der Stoff zeigte bereits in der Kontrolle ohne Protein eine bläuliche Fluoreszenz, was auf im Stoff enthaltene optische Aufheller hindeutet. Für weitere Analysen wurde daher lediglich Avicel, RAC und CA verwendet. Eine Analyse der Proteinzusammensetzung mittels SDS-PAGE konnte die ausgezeichnete Reinheit des auf Avicel, RAC bzw. CA immobilisierten Fusionsprotein demonstrieren (3.2.2.1, Abb. 19) und die spezifische Adsorption des Fusionsproteins aus *E. coli* BL21(DE3)-GZE an verschiedene Cellulosematerialien bestätigen. Im Vergleich zu dem durch IMAC gereinigten AtHNL-FbFP-CBM Fusionsprotein konnte für das auf Cellulose immobilisierte Protein ein deutlich höherer Reinheitsgrad nachgewiesen werden (Abb. 37).

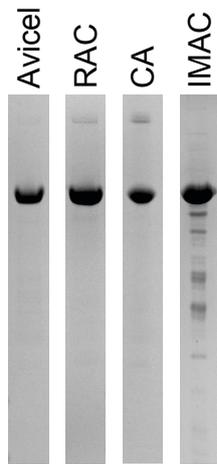


Abb. 37: Vergleich der Reinheitsgrade von Avicel-, RAC- bzw. CA-immobilisiertem und mittels IMAC-Methoden gereinigtem *Af*HNL-FbFP-CBM Fusionsprotein anhand von SDS-PAGE Analysen. Das jeweilige Cellulosematerial wurde über Nacht mit dem *E. coli* BL21(DE3)-GZE inkubiert und anschließend mehrfach in Puffer (50 mM TEA pH 8) gewaschen (vgl. 3.2.2.1, Abb. 19). Die IMAC-Reinigung wurde mit HisLink-Material durchgeführt (vgl. 3.2.2.2, Abb. 20). Pro Spur wurden etwa 3 µg Protein auf das Gel aufgetragen, das zur Visualisierung der Proteine mit kolloidaler Coomassie-Brillant-Blau-Färbungslösung gefärbt wurde. Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

Neben der höheren Reinheit des adsorbierten *Af*HNL-FbFP-CBM Fusionsproteins im Vergleich zum IMAC-gereinigten Protein, besitzt die direkte, spezifische Adsorption des Zielproteins aus einem *E. coli*-GZE weitere Vorteile. Dabei ist die Bindung zwischen CBM und Cellulose deutlich spezifischer als die Bindung des His-Tags an die Metallionen des IMAC-Materials und ermöglicht eine direkte Verwendung des an Cellulose adsorbierten Enzyms als Immobilisat. Da die Herstellung dieses Immobilisats in einem Schritt direkt aus dem GZE lysierter *E. coli*-Zellen erfolgen kann, keine zusätzlichen Schritte zur Reinigung des Proteins nötig sind und darüber hinaus Cellulose als Trägermaterial sehr günstig ist, stellt die Adsorption an Cellulose eine einfach umzusetzende, kostengünstige und Schwermetall-freie Alternative zur herkömmlichen Proteinreinigung mit anschließender Immobilisierung dar.

4.3 Regenerierte amorphe Cellulose (RAC) ist ein geeignetes Trägermaterial mit hoher Bindungskapazität

Das Cellulosematerial RAC konnte aus der mikrokristallinen Cellulose Avicel durch Lösen in *ortho*-Phosphorsäure und anschließender Fällung mit Wasser präpariert werden und ist somit ein sehr einfach herzustellendes sowie kostengünstiges Trägermaterial. Dabei unterscheidet sich RAC morphologisch deutlich von Avicel, wie in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der beiden Materialien gezeigt werden konnte (3.2.2, Abb. 17). Die kristalline Struktur wurde aufgelöst, was eine Vergrößerung der Oberfläche der Cellulose zur Folge hatte. Im direkten Vergleich mit Avicel weist RAC zudem Vorteile in der Handhabung auf. So sedimentiert es beispielsweise in einer Suspension langsamer, was die einfache und reproduzierbare Verteilung auf mehrere Ansätze ermöglicht.

Sowohl Avicel als auch RAC wurden in Hinblick auf die Adsorptionseigenschaften der gereinigten Fusionsproteine FbFP-CBM und *AthHNL*-FbFP-CBM untersucht. Dabei wurde die Geschwindigkeit der Adsorption (Adsorptionsrate k_{ad}), die Bindungskapazität des Trägermaterials (maximale Menge adsorbiertes Protein A_{max}) und die Affinität der Proteine zum Material (Dissoziationskonstante K_D) analysiert. Die Geschwindigkeit der Adsorption war bei beiden Proteinen für RAC höher als für Avicel (3.2.2.2, Tab. 10), was sich durch die vergrößerte Oberfläche von RAC im Vergleich zu Avicel erklären lässt. In diesem Zusammenhang spielt ebenfalls die Tatsache eine Rolle, dass bei Avicel die Bindungsstellen für CBMs innenliegend sind [197], während sie bei RAC außen liegen und schneller zugänglich sind [198]. Dies kann auch die deutlich höhere Bindungskapazität von RAC im Vergleich zu Avicel erklären (3.2.2.2, Tab. 11). Dabei hat die molekulare Masse des adsorbierenden Proteins anscheinend einen Einfluss auf die Bindungskapazität, wie aus der Bestimmung der Adsorptionsisotherme hervorgeht (3.2.2.2, Abb. 22). Beispielsweise ergab die Korrelation des gebundenen Proteins in $\mu\text{mol pro g RAC}$ für das Fusionsprotein *AthHNL*-FbFP-CBM eine deutlich niedrigere Bindungskapazität als für FbFP-CBM, wohingegen die Korrelation der Proteinmasse in mg pro g RAC eine vergleichbare Bindungskapazität ergab. Da *AthHNL*-FbFP-CBM eine etwa doppelt so große molekulare Masse besitzt wie FbFP-CBM, benötigt es zur Adsorption ein größeres Volumen auf der Oberfläche des Cellulosematerials, sodass weniger Moleküle *AthHNL*-FbFP-CBM als FbFP-CBM auf derselben Menge RAC gebunden werden können. Bei Proteinen mit unterschiedlichen molekularen Massen ist daher ein Vergleich der Bindungskapazitäten von Cellulosematerialien in $\text{mg Protein pro g Material}$ geeigneter als ein direkter Vergleich der Anzahl der gebundenen Proteinmoleküle. Im Falle von Avicel war die Bindungskapazität in mg pro g Avicel für *AthHNL*-FbFP-CBM jedoch deutlich geringer als für FbFP-CBM, was sich mit der unterschiedlichen Morphologie im Vergleich zu RAC erklären lässt. Da die Bindungsstellen in Avicel zum größten Teil innenliegend sind, könnte es sein, dass das größere Fusionsprotein *AthHNL*-FbFP-CBM nicht so viele Bindungsstellen erreichen kann, wie das kleinere Protein FbFP-CBM, was in einer geringeren Bindungskapazität resultieren würde.

Die Affinität der beiden Proteine zu den Cellulosematerialien Avicel und RAC wurde ebenfalls untersucht, wobei die Dissoziationskonstante K_D als Maß für die Affinität herangezogen wurde. Dabei wurden deutliche Unterschiede zwischen den

Materialien und Fusionsproteinen festgestellt (3.2.2.2, Tab. 11). Diese basierten jedoch auf einem Vergleich der K_D -Werte in μM . Werden die Dissoziationskonstanten in mg/ml ausgedrückt, so konnten die Affinitäten der beiden unterschiedlich großen Fusionsproteine besser verglichen werden (Tab. 14).

Tab. 14: Vergleich der berechneten Dissoziationskonstanten K_D von FbFP-CBM und AtHNL-FbFP-CBM an Avicel bzw. RAC. Unterschiedliche Konzentrationen des jeweiligen Proteins wurden mit Avicel (2 mg/ml) bzw. RAC (0,25 mg/ml) über 90 min (Avicel) bzw. 60 min (RAC) schüttelnd inkubiert, wonach die Proteinkonzentration des Überstands photometrisch bestimmt wurde. Mithilfe einer Anpassung der experimentellen Daten an die Langmuir-Gleichung konnte der Parameter K_D ermittelt werden, wobei der angegebene Fehler die Standardabweichung vom Mittelwert einer Dreifachbestimmung darstellt. Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

Cellulose	K_D [μM]		K_D [mg/ml]	
	FbFP-CBM	AtHNL-FbFP-CBM	FbFP-CBM	AtHNL-FbFP-CBM
Avicel	5,38 \pm 0,54	0,62 \pm 0,17	0,144 \pm 0,015	0,035 \pm 0,009
RAC	1,72 \pm 0,14	0,80 \pm 0,05	0,046 \pm 0,004	0,045 \pm 0,002

Während sich die K_D -Werte der beiden Proteine für RAC in μM deutlich unterscheiden, ergeben sich in mg/ml fast identische Werte. Auch im Falle von Avicel ändern sich die Größenordnungen der gemessenen Unterschiede in den K_D -Werten. So war die Affinität von AtHNL-FbFP-CBM ausgedrückt in mg/ml etwa viermal so hoch wie von FbFP, anstelle eines ungefähr achtfachen Unterschieds ausgedrückt in μM .

Insgesamt betrachtet konnte das Cellulosematerial RAC als geeignetes Trägermaterial für CBM-enhaltende Proteine identifiziert werden, da die Adsorption an RAC schneller und mit einer höheren Affinität im Vergleich zu Avicel erfolgt. Weiterhin zeichnet sich RAC durch eine sehr hohe Bindungskapazität aus.

4.4 AtHNL-FbFP-CBM besitzt eine hohe AtHNL-Aktivität und ist bei niedrigen pH-Werten stabil

Für die Untersuchung der AtHNL-Aktivität des Cellulose-immobilisierten Fusionsproteins AtHNL-FbFP-CBM wurde ein Endpunkt-basierter Mandelonitril-Spaltungsassay erfolgreich etabliert (3.2.3.1). Dieser Assay ermöglicht die einfache Bestimmung der AtHNL-Aktivität von Immobilisaten im diskontinuierlichen Modus, wobei lediglich eine zusätzliche Zentrifuge für die Durchführung benötigt wird. Mithilfe des

Assays konnte die *At*HNL-Aktivität des Avicel- bzw. RAC-immobilisierten Fusionsproteins *At*HNL-FbFP-CBM ermittelt werden.

Zunächst wurde die *At*HNL-Aktivität des Fusionsproteins *At*HNL-FbFP-CBM im schwach sauren pH-Bereich im Vergleich zur wildtypischen *At*HNL und dem Fusionsprotein *At*HNL-FbFP untersucht. Bei allen Aktivitätsmessungen wurde auf eine einheitliche Proteinkonzentration (in μM) aller untersuchten Proteine geachtet, um eventuelle stabilisierende Effekte bei höheren Konzentrationen ausschließen zu können, wie sie beispielsweise bei der Hydroxynitril-Lyase aus *Hevea brasiliensis* beobachtet wurden [199]. Dabei konnte – verglichen mit den anderen Enzymen bzw. Fusionsproteinen – eine deutlich erhöhte Aktivität des Fusionsproteins *At*HNL-FbFP-CBM im untersuchten pH-Bereich von pH 4 – 5 festgestellt werden (3.2.3, Abb. 23). Da sich die Fusionsproteine in ihrer molekularen Masse unterscheiden und ein Vergleich der spezifischen Aktivität bezogen auf mg Protein somit nicht geeignet war, wurde die Aktivität in Form des k_{cat} -Werts verglichen. Auf diese Weise konnte die Aktivität pro aktivem Zentrum ausgedrückt werden, sodass ein direkter Vergleich der Aktivitäten bei pH 5 ermöglicht wurde (Abb. 38). Dabei wurde festgestellt, dass das Fusionsprotein *At*HNL-FbFP etwa die doppelte Aktivität der wildtypischen *At*HNL aufwies, wohingegen das freie bzw. Avicel- oder RAC-immobilisierte Fusionsprotein *At*HNL-FbFP-CBM sogar die dreifache Aktivität zeigte.

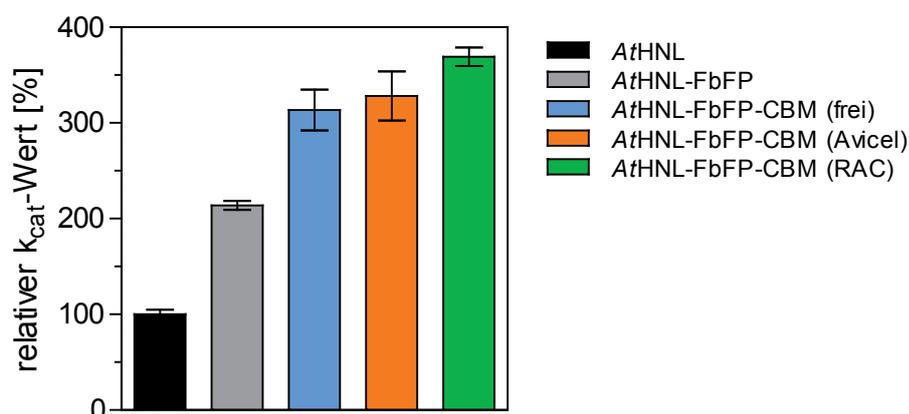


Abb. 38: Vergleich der k_{cat} -Werte der verschiedenen Proteine bzw. Fusionsproteine bei pH 5. Alle Werte sind bezogen auf den k_{cat} -Wert der wildtypischen *At*HNL dargestellt, wobei 100 % $17,2 \pm 0,8 \text{ s}^{-1}$ entspricht. Die angegebenen Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Dreifachbestimmung dar. Modifiziert nach Kopka *et al.* [187].

Die erhöhte Aktivität lässt sich wahrscheinlich auf eine Überlagerung der enzymatischen Reaktion mit schnellen Deaktivierungsprozessen aufgrund des pH-Werts zurückführen, da die Messung eine vorherige 5-minütige Inkubation des Enzyms in Puffer des jeweiligen pH-Werts beinhaltet. Bei der Bestimmung der pH-Stabilität der

verschiedenen Fusionsproteine im Vergleich zur wildtypischen *AthHNL* konnte dies bestätigt werden (3.2.3, Tab. 12). So wurde beispielsweise eine siebenfach erhöhte pH-abhängige Halbwertszeit bei pH 4,75 für das freie Fusionsprotein *AthHNL*-FbFP-CBM festgestellt. Die Immobilisierung des Proteins führte zu einer weiteren Erhöhung der pH-Stabilität, z. B. um einen Faktor von etwa acht im Vergleich zur wildtypischen *AthHNL* bei pH 4,5 (3.2.3.2, Tab. 13). Diese erhöhte Stabilität könnte auf eine veränderte Oligomerisierung des Fusionsproteins im Vergleich zur wildtypischen *AthHNL* zurückzuführen sein, wie sie bereits für ein ähnliches Fusionsprotein aus *AthHNL* und FbFP beschrieben wurde [200]. Dabei vermittelte die FbFP-Domäne eine Veränderung des Oligomerisierungszustands. Die hier verwendete FbFP-Domäne liegt isoliert als Dimer vor [201] und das isolierte CBM konnte ebenfalls in dimerer Form nachgewiesen werden [139]. In weiteren Versuchen könnte daher eine Analyse des Oligomerisierungszustands des freien Fusionsproteins *AthHNL*-FbFP-CBM, beispielsweise mittels Größenausschlusschromatographie, durchgeführt werden. Im Falle des immobilisierten Fusionsproteins könnte die erhöhte pH-Stabilität auf stabilisierende Effekte des Trägermaterials zurückzuführen sein. So könnten eventuell enthaltene Reste eines Puffers mit einem höheren pH-Wert das adsorbierte Protein zusätzlich stabilisieren.

4.5 Fluoreszenzmessungen zeigen eine pH-abhängige Freisetzung des Chromophors FMN aus dem RAC-adsorbierten Fusionsprotein *AthHNL*-FbFP-CBM

Die Fluoreszenzeigenschaften der fusionierten FbFP-Domäne erlaubten die Untersuchung der Adsorptionsstabilität des Fusionsproteins *AthHNL*-FbFP-CBM auf dem Trägermaterial RAC im schwach sauren pH-Bereich, wobei eine Freisetzung des Chromophors FMN festgestellt werden konnte (3.2.4, Abb. 27). Weiterhin konnte mittels SDS-PAGE Analyse bestätigt werden, dass es zu keiner nennenswerten Desorption des adsorbierten Proteins kam (3.2.4, Abb. 28). Dies stimmte mit den Beobachtungen von Ong *et al.* für das isolierte CBM überein, welches im pH-Bereich von pH 3 – 9 stabil an bakterieller mikrokristalliner Cellulose adsorbiert blieb [183]. Auch eine Analyse der pH-Stabilität eines Fusionsproteins aus CBM und einer β -Glucosidase aus *Agrobacterium* sp. zeigte die Stabilität der Adsorption an Cellufine im Bereich von pH 2 – 9 auf [202].

Anhand der experimentellen Daten zur Freisetzung des Chromophors FMN aus dem RAC-immobilisierten *AthHNL-FbFP-CBM* Fusionsprotein wurde die Geschwindigkeitskonstante K des Prozesses ermittelt. Dabei konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeitskonstante K , welche die zeitabhängige FMN-Freisetzung charakterisiert, und dem pH-Wert des Inkubationspuffers beobachtet werden (Abb. 39).

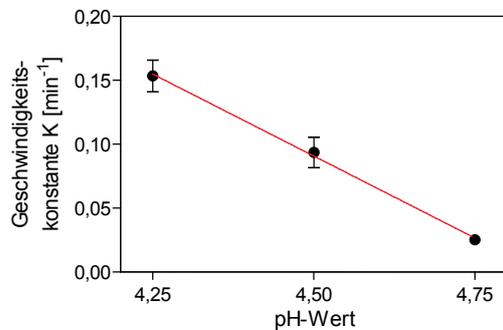


Abb. 39: Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeitskonstante K (min^{-1}) der FMN-Freisetzung aus RAC-adsorbiertem *AthHNL-FbFP-CBM* Fusionsprotein und dem pH-Wert. Die Geschwindigkeitskonstante K wurde aus der Anpassung der experimentellen Daten zur Freisetzung des Chromophors FMN mit einer exponentiellen Funktion erster Ordnung bestimmt. R^2 betrug 0,9986. Die angegebenen Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Dreifachbestimmung dar.

Dabei scheint ein linearer Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit der FMN-Freisetzung und dem pH-Wert zu bestehen, sodass ein niedriger pH-Wert zu einer schnelleren Chromophorfreisetzung führt. Für eine weiterführende Analyse dieses Zusammenhangs sollten jedoch weitere pH-Werte untersucht werden, beispielsweise im pH-Bereich von 4 bis 5 in 0,2 pH-Schritten.

Die Freisetzung des nicht-kovalent gebundenen Chromophors FMN könnte durch eine pH-abhängige Entfaltung der fusionierten FbFP-Domäne hervorgerufen werden, wobei allerdings die isolierte FbFP-Domäne im untersuchten pH-Bereich über eine gute Stabilität verfügt [188]. Eventuell führt demnach die Fusion der FbFP-Domäne an das CBM bzw. die *AthHNL* zu einer Destabilisierung der FMN-Bindung, sodass die pH-Stabilität der Domäne beeinflusst wird. Weiterhin könnte die fusionierte CBM-Domäne Einfluss auf die FMN-Freisetzung haben. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die CBM-vermittelte Adsorption an Cellulose ein dynamischer Vorgang ist und das CBM weiterhin eine Bewegung des adsorbierten Proteins entlang der Celluloseoberfläche ermöglicht [182]. Dies könnte zu Konformationsänderungen in der fusionierten FbFP-Domäne führen, die wiederum eine Freisetzung des Chromophors bewirken. Um dem nachzugehen, müsste die pH-Stabilität des freien Fusionsproteins im selben pH-Bereich zeitlich aufgelöst und die Geschwindigkeitskonstanten für die Freisetzung von FMN im freien Fusionsprotein mit denen des immobilisierten Proteins verglichen werden. Des Weiteren könnte die FMN-

Freisetzung auf eine Verringerung der pH-Stabilität der fusionierten FbFP-Domäne aufgrund einer Änderung ihres Oligomerisierungszustands zurückzuführen sein. Die Fusion der AtHNL und des CBMs könnte die Dimerisierung der FbFP-Domäne verhindern, wodurch eventuell die Stabilität der nunmehr monomeren FbFP-Domäne gesenkt würde.

4.6 Cellulose-basierte AtHNL-FbFP-CBM-Immobilisate eignen sich zur Synthese von (*R*)-Mandelonitril im organischen, mikrowässrigen Reaktionssystem

Die Eignung von Cellulose-immobilisiertem AtHNL-FbFP-CBM Fusionsprotein zur Synthese von (*R*)-Mandelonitril konnte mit Avicel-, RAC- und CA-basierten Immobilisaten in einem mikrowässrigen Reaktionssystem mit dem organischen Lösungsmittel Methyl-*tert*-Butylether (MTBE) als Reaktionsmedium erfolgreich nachgewiesen werden (3.2.5, Abb. 30). Dabei wurden die verwendeten Immobilisate stets durch Inkubation des Cellulosematerials in einem entsprechenden *E. coli* BL21(DE3)-GZE gewonnen, da sie auf diese Weise sehr einfach herzustellen waren und zudem über einen ausgezeichneten Reinheitsgrad des Fusionsproteins verfügten. Aufgrund der guten Handhabbarkeit des nassen RAC-Immobilisats konnte weiterhin der Einfluss, den die Art der Einbringung sowie eine MTBE-Vorbehandlung des Immobilisats auf die Reaktionsgeschwindigkeit und den erzielten Enantiomerenüberschuss (*enantiomeric excess*, *ee*) haben, untersucht werden. Dabei wurde beobachtet, dass ein direktes Einspritzen des Immobilisats in das vorbereitete Reaktionsmedium die Reaktionsgeschwindigkeit und den *ee*-Wert im Vergleich zur Reaktion mit vorgelegtem Immobilisat erhöht (3.2.5, Abb. 31). Dies lässt sich durch die vergrößerte Oberfläche des Immobilisats im eingespritzten Fall erklären, da sich das vorgelegte Immobilisat an den Wänden des Reaktionsgefäßes anlagerte und somit nur eine geringe Oberfläche für die gelösten Substrate zugänglich war. Die Vorbehandlung des RAC-basierten Immobilisats mit getrocknetem MTBE hatte zudem eine deutliche Verbesserung der Reaktionsgeschwindigkeit und des erzielten *ee*-Werts zur Folge, sodass die Vorbehandlungsdauer mit MTBE systematisch analysiert wurde. Dazu wurde das RAC-basierte Immobilisat in einer lösungsmittelresistenten Nylonmembran eingeschlossen und unterschiedlich oft einer 10-minütigen Vorbehandlung in getrocknetem MTBE unterzogen (3.2.5.1, Abb. 32),

wobei die Reaktionsgeschwindigkeit sowie der *ee*-Wert mit jedem Vorbehandlungsschritt zunahm. Weiterhin konnte ein sichtbares Schrumpfen des Immobilisats im Nylonbeutel mit zunehmender Inkubationsdauer in getrocknetem MTBE festgestellt werden. Dies lässt auf den Entzug von im Immobilisat enthaltenem Wasser bzw. Puffer schließen. Durch den somit verringerten Wasseranteil des Immobilisats wird die Diffusion des schwer in Wasser löslichen Substrats Benzaldehyd zu den immobilisierten Biokatalysatoren erleichtert und die nicht-enzymatische Nebenreaktion unterdrückt. Mit den Avicel-basierten Immobilisaten war eine MTBE-Vorbehandlung aufgrund der schlechten Handhabbarkeit und der Tatsache, dass das Immobilisat nicht ausreichend durch die Nylonmembran zurückgehalten wurde, nicht möglich.

4.6.1 RAC- und CA-basiertes Immobilisat kann mehrfach zur (*R*)-Mandelonitril-Synthese wiederverwendet werden

Den Hauptvorteil von immobilisierten gegenüber freien Enzymen stellt die Wiederverwendbarkeit dar, die den Einsatz in biotechnologischen Prozessen ökonomisch rentabel macht [76]. Daher wurde die Wiederverwendbarkeit des Cellulose-immobilisierten *At*HNL-FbFP-CBM Fusionsproteins zur (*R*)-Mandelonitril-Synthese untersucht und konnte mit RAC- sowie mit CA-immobilisiertem Fusionsprotein erfolgreich bestätigt werden. Dabei wurde das RAC-basierte Immobilisat zunächst in einem optimierten Nylonbeutel einer MTBE-Vorbehandlung unterzogen und anschließend in drei aufeinanderfolgende (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktionen eingesetzt, wobei zwischen den Reaktionen ein Waschschriff mit getrocknetem oder Puffer-gesättigtem MTBE erfolgte (3.2.5.2.1, Abb. 33). Der Waschschriff mit getrocknetem MTBE hatte einen drastischen Verlust an Reaktionsgeschwindigkeit in den drei aufeinanderfolgenden Reaktionen zur Folge, sodass in der dritten Reaktion lediglich ein Umsatz von etwa 50 % in 60 min erreicht werden konnte. Dies könnte auf das Entfernen von zu viel Wasser bzw. Puffer aus dem RAC-basierten Immobilisat oder auf eine Inaktivierung des Proteins zurückzuführen sein. Dagegen konnte durch den Waschschriff mit Puffer-gesättigtem MTBE sehr gute Umsätze von Benzaldehyd und Blausäure zu (*R*)-Mandelonitril in drei aufeinanderfolgenden Reaktionen erzielt werden (3.2.5.2.1, Abb. 33 B).

Für eine Analyse der Wiederverwendbarkeit war das CA-basierte Immobilisat sehr gut geeignet, da die CA-Disks aufgrund ihrer Größe einfach aus dem Reaktionssystem entfernt werden konnten, und somit keine Nylonmembran benötigt wurde. Des Weiteren konnten die CA-Disks getrocknet in die Reaktion eingesetzt werden, sodass keine vorherige MTBE-Behandlung notwendig war. Das Recycling wurde in drei aufeinanderfolgenden Reaktionen erfolgreich durchgeführt, wobei der erzielte *ee*-Wert von etwa 96 % (*R*) jedoch hinter dem mit RAC-basiertem Immobilisat von ungefähr 98 % (*R*) zurück blieb (3.2.5.2.2, Abb. 34). Die CA-Disks mit immobilisiertem *A*tHNL-FbFP-CBM Fusionsprotein wurden vor dem Einsatz in die Synthesereaktion getrocknet, sodass relativ wenig Wasser bzw. Puffer enthalten und die nicht-enzymatische Nebenreaktion somit unterdrückt worden sein sollte. Daher wurde zur Verbesserung des *ee*-Werts statt einer MTBE-Vorbehandlung eine Vorbehandlung der CA-Disks mit Puffern unterschiedlicher pH-Werte vor dem anschließenden Trocknen durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass ein Absenken des pH-Werts des Puffers von pH 8 auf pH 6,5 die Reaktionsgeschwindigkeit in der (*R*)-Mandelonitril-Synthese nicht signifikant beeinflusste, den *ee*-Wert jedoch von 97,7 % auf 99,5 % (*R*) erhöhte (3.2.5.2.2, Abb. 35). Eine Vorbehandlung der CA-Disks in Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,5 hatte dagegen eine Verringerung des Umsatzes auf etwa 40 % im betrachteten Zeitraum zur Folge, was eventuell auf den isoelektrischen Punkt des Proteins, welcher theoretisch ermittelt bei pH 5,5 liegt, zurückzuführen sein könnte. Durch die Vorbehandlung des CA-immobilisierten *A*tHNL-FbFP-CBM Fusionsproteins mit Citrat-Phosphat-Puffer pH 6,5 konnte die Synthese von (*R*)-Mandelonitril in drei aufeinanderfolgenden Synthesereaktionen mit ausgezeichneten *ee*-Werten von etwa 99 % (*R*) durchgeführt werden (3.2.5.2.2, Abb. 36). Die Reaktionsgeschwindigkeit nahm jedoch in den späteren Reaktionen ab, was auf eine progressive Inaktivierung des Proteins hindeuten könnte.

Ein Vorteil der Immobilisierung des *A*tHNL-FbFP-CBM Fusionsproteins auf CA-Disks ist die einfache Dosierbarkeit des eingesetzten Proteins. Pro CA-Disk sind etwa 50 µg Fusionsprotein immobilisiert und somit kann die benötigte Menge an Biokatalysator genau dosiert werden. Weiterhin zeigte das CA-immobilisierte *A*tHNL-FbFP-CBM Fusionsprotein eine sehr hohe Aktivität in der (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktion.

4.6.2 Vergleich der Cellulose-basierten *AthNL*-FbFP-CBM-Immobilisate mit herkömmlichen *AthNL*-Immobilisaten

In vorangegangenen Arbeiten wurde die wildtypische *AthNL* bereits erfolgreich auf verschiedene Weise immobilisiert und zur (*R*)-Cyanhydrin-Synthese in einem organischen, mikrowässrigen Reaktionssystem verwendet. So wurde die *AthNL* mittels Adsorption auf dem porösen Trägermaterial Kieselgur (Celite), mittels Einschluss in einem Sol-Gel und mittels kovalenter Quervernetzung als CLEA (*cross-linked enzyme aggregate*) immobilisiert [118, 119]. Für die Immobilisierung wurde jeweils gereinigte *AthNL* verwendet, wodurch sich ein erheblicher Arbeits- und Kostenaufwand ergibt. Im Gegensatz dazu kann die Adsorption an Cellulose bei der Verwendung des *AthNL*-FbFP-CBM Fusionsproteins direkt aus *E. coli*-GZE erfolgen, sodass lediglich ein Zellaufschluss und keine teure Proteinreinigung nötig ist. Eine Gegenüberstellung der benötigten Geräte, Materialien sowie des damit verbundenen Arbeitsaufwands zur Bereitstellung der gereinigten wildtypischen *AthNL* bzw. eines *E. coli*-GZE ist in Tab. 15 dargestellt.

Tab. 15: Vergleich der benötigten Geräte, Materialien und des Zeitaufwands zur Reinigung der wildtypischen *AthNL* mit der Herstellung eines *E. coli*-GZE. Das Reinigungsprotokoll der *AthNL* entspricht den Angaben nach Guterl *et al.* [117], wobei der Arbeitsaufwand abgeschätzt wurde. FPLC: *fast protein liquid chromatography*.

Verfahren	Arbeitsschritte	Geräte & Materialien	Arbeitsaufwand (aktiv/passiv)
Reinigung (wildtypische <i>AthNL</i>)	1. Zellaufschluss & Zentrifugation 2. Gelfiltration 3. Anionenaustauscher 4. Gelfiltration 5. Konzentrierung 6. Gefriertrocknung	<ul style="list-style-type: none"> ● Ultraschallgerät ● Zentrifuge ● FPLC-System ● Säulenkörper (2 x) ● Konzentrator ● Gefriertrockner ● Sephadex™ G-25 (0,42 €/ml, Gelfiltrationsmedium) ● Q-Sepharose Fast Flow (1,6 €/ml, Anionenaustauscher) 	2,5 h / 29,5 – 53,5 h ^a
Herstellung eines GZE (<i>AthNL</i> -FbFP-CBM)	1. Zellaufschluss & Zentrifugation	<ul style="list-style-type: none"> ● Ultraschallgerät ● Zentrifuge 	0,5 h / 0,5 h

^a je nach Menge bzw. verwendetem Gefriertrockner

Die Reinigung der wildtypischen *AthNL* benötigt eine Vielzahl an zum Teil teuren Geräten und Materialien, wie beispielsweise ein FPLC-System (*fast protein liquid chromatography*) zur Durchführung der drei Chromatographie-Schritte (Tab. 15).

Dagegen sind zur Herstellung eines *E. coli*-GZE lediglich ein Zellaufschlussgerät, z. B. ein Ultraschall-Homogenisator, und eine Zentrifuge notwendig. Auch der Zeitaufwand ist bei der Reinigung der wildtypischen *A θ HNL* deutlich höher als bei der Herstellung des GZE, so wird allein das Fünffache an aktivem Arbeitsaufwand benötigt. Für eine mögliche industrielle Produktion des Immobilisats spielen des Weiteren die Kosten eine große Rolle. So konnte von Tufvesson *et al.* anhand von Beispielprozessen ermittelt werden, dass bereits durch den Zellaufschluss die Kosten eines Enzyms verdoppelt werden im Vergleich zur Verwendung von ganzen Zellen. Die anschließende Reinigung mithilfe eines Ionenaustauschers verfünffacht die Produktionskosten weiter [203]. Daher sind Immobilisierungsstrategien, wie das hier vorgestellte CBM-Immobilisierungsverfahren, die keine teuren Reinigungsschritte des Enzyms voraussetzen, kosteneffektiv und somit attraktiv für industrielle Prozesse.

Die eigentliche Herstellung der verschiedenen Immobilisate, sowohl der herkömmlichen als auch der Cellulose-basierten, ist darüber hinaus mit einem unterschiedlichen Präparationsaufwand verbunden durch Arbeitsaufwand und benötigte Geräte sowie Materialien verbunden, welcher in Tab. 16 dargestellt ist. Generell ist die Präparation von herkömmlichen Immobilisaten der wildtypischen *A θ HNL* mit einem höheren Zeitaufwand – sowohl aktiv als auch passiv – verbunden und benötigt mehr Geräte und Materialien als die Präparation der Cellulose-basierten Immobilisate. In dem angegebenen Zeitaufwand ist zudem der Präparationsaufwand der Reinigung der wildtypischen *A θ HNL* bzw. die Herstellung eines *E. coli*-GZE nicht miteingerechnet (Tab. 15), sodass die endgültige Präparation der herkömmlichen Immobilisate mit einem noch höheren Zeitaufwand verbunden ist. Des Weiteren wird vor allem bei den wildtypischen *A θ HNL*-Immobilisaten eine Vielzahl von gefährlichen Chemikalien verwendet, z. B. giftige Chemikalien bei der Herstellung des Sol-Gels. Dagegen werden bei der Präparation der Cellulose-basierten Immobilisate keine bzw. kaum gefährliche Chemikalien benötigt, lediglich die verwendete Phosphorsäure bei der RAC-Herstellung ist ätzend. Diese Gefahrenquelle könnte jedoch durch Verwendung einer kommerziell erhältlichen RAC-Präparation, beispielsweise RAC-Membranfilter der Firma GE Healthcare (München, Deutschland), vermieden werden. Insgesamt betrachtet verursacht die Präparation von Cellulose-basierten Immobilisaten einen geringen Arbeitsaufwand und benötigt wenige Geräte und Chemikalien. Verglichen mit der Verwendung von herkömmlichen Immobilisaten ist die CBM-Immobilisierungsstrategie demnach sehr kosteneffektiv und attraktiv.

Tab. 16: Vergleich des Präparationsaufwands von verschiedenen A β HNL-Immobilisaten. Die Angaben für die wildtypischen A β HNL-Immobilisate (Celite, Sol-Gel, CLEA) wurden der Dissertation von Daniel Okrob [119] entnommen, wohingegen die Angaben für A β HNL-FbFP-CBM und die Cellulosematerialien Avicel, RAC und CA aus dieser Arbeit stammen. Soweit zutreffend sind die Gefahrensymbole bei Chemikalien aufgeführt. Der Arbeitsaufwand für die Proteinreinigung bzw. die Herstellung des GZE ist nicht miteingerechnet.

Immobilisat	Arbeitsschritte	Geräte & Materialien	Arbeitsaufwand (aktiv/passiv)
Celite (Adsorption)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Benetzen der Partikel mit gereinigter AβHNL 2. Trocknung mit Exsikkator 	<ul style="list-style-type: none"> • Exsikkator • Celite • gereinigte AβHNL 	0,2 h / 16 h
Sol-Gel (Einschluss)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Herstellung des Polymergemischs 2. Verdampfen des entstehenden Methanols () 3. Mischung von gereinigter AβHNL und gelierendem Sol-Gel 4. Reifung bei 4 °C 5. Zermahlen 	<ul style="list-style-type: none"> • Laborabzug • Rotationsverdampfer • Tetramethoxysilan () • Methyltrimethoxysilan () • gereinigte AβHNL 	2 h / 16 h
CLEA (kovalente Quervernetzung)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fällern der gereinigten AβHNL mit gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung 2. Trennung durch Zentrifugation 3. Quervernetzung mit Glutardialdehyd 4. mehrfache Waschschrirte 5. Trocknung mit Gefrier-trockner/Exsikkator 	<ul style="list-style-type: none"> • Zentrifuge • Gefrier-trockner/ Exsikkator • gereinigte AβHNL • gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung • Glutardialdehyd () 	3 h / 24 – 35 h
Avicel ^a (Adsorption)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inkubation mit GZE 2. Waschen durch Zentrifugation (3 – 4 x) 	<ul style="list-style-type: none"> • Zentrifuge • Avicel • <i>E. coli</i>-GZE 	0,1 h / 1,5 – 16,5 h ^b
RAC ^a (Adsorption)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Lösen von Avicel in Phosphorsäure 2. Fällern mit Wasser 3. Waschen durch Zentrifugation (3 – 4 x) 4. Inkubation mit GZE 5. Waschen durch Zentrifugation (3 – 4 x) 	<ul style="list-style-type: none"> • Zentrifuge • Avicel • 85 % (v/v) <i>ortho</i>-Phosphorsäure () • Natriumcarbonat • <i>E. coli</i>-GZE 	1 h / 5 – 20 h ^b
CA ^a (Adsorption)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Filter waschen, lochen und trocknen 2. Inkubation mit GZE 3. Waschen durch Dekantieren (3 – 4 x) 4. Trocknung mit Argon 	<ul style="list-style-type: none"> • Locher • CA-Filter • <i>E. coli</i>-GZE • Argon 	0,7 h / 1,5 – 16,5 h ^b

^a Angaben für das Fusionsprotein A β HNL-FbFP-CBM

^b entweder 1 h oder 16 h Inkubation mit GZE

Alle vorgestellten Immobilisate – sowohl die herkömmlichen der wildtypischen *AthHNL* [118] als auch die Cellulose-basierten des *AthHNL*-FbFP-CBM Fusionsproteins – konnten erfolgreich in einem organischen, mikrowässrigen Reaktionssystem zur Synthese von enantiomerenreinem (*R*)-Mandelonitril eingesetzt werden. Dabei wurden die Immobilisate ebenfalls einem Recycling unterzogen und mehrfach wiederverwendet. In Tab. 17 sind die verwendeten Enzymmengen, die Anzahl der erfolgreich durchgeführten Umsätze sowie die Vor- und Nachteile bei der Verwendung des jeweiligen Immobilisats vergleichend dargestellt. Im direkten Vergleich der verschiedenen Immobilisate ist festzustellen, dass bei den Cellulose-basierten Immobilisaten eine deutlich geringere Enzymmenge – mindestens eine Größenordnung weniger – in die (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktion eingesetzt werden konnte. Die Cellulose-basierten Immobilisate des *AthHNL*-FbFP-CBM Fusionsproteins wiesen demnach eine höhere Aktivität auf als die herkömmlichen Immobilisate der wildtypischen *AthHNL*, was jedoch ebenfalls auf eine eventuell höhere Stabilität des Fusionsproteins gegenüber den Reaktionsbedingungen zurückzuführen sein könnte. Des Weiteren unterscheidet sich die Anzahl der erfolgreichen Recyclingschritte zwischen den verschiedenen Immobilisaten. So kann beispielsweise Celite-*AthHNL* fünfmal wiederverwendet werden, wohingegen die Wiederverwendung von Sol-Gel-*AthHNL* lediglich zweimal praktikabel ist. Die Cellulose-basierten Immobilisate lassen sich – bis auf das Avicel-basierte – mindestens dreimal wiederverwenden, wobei besonders die Verwendung des CA-Immobilisats sehr vorteilhaft ist, da keine zusätzliche Nylonmembran zum Recycling benötigt wird. Der Vergleich der verschiedenen Immobilisate zeigte somit, dass die Cellulose-basierten den herkömmlichen Immobilisaten der wildtypischen *AthHNL* überlegen sind.

Durch die einfache Präparation, die zum Teil sehr hohe Aktivität in der (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktion und ihre vorteilhaften Eigenschaften konnte anhand der in dieser Arbeit charakterisierten Cellulose-basierten Immobilisate des *AthHNL*-FbFP-CBM Fusionsproteins eindrucksvoll gezeigt werden, dass die Nutzung von CBMs als Immobilisierungsträger eine geeignete und attraktive Strategie zur Reinigung und Immobilisierung von Biokatalysatoren darstellt.

Tab. 17: Vergleich der verwendeten Enzymmengen, der Wiederverwendbarkeit zur (R)-Mandelonitril-Synthese sowie der Vor- und Nachteile von herkömmlichen und Cellulose-basierten Immobilisaten. Die Angaben für die wildtypischen *AthHNL*-Immobilisate (Celite, Sol-Gel, CLEA) wurden Okrob *et al.* [118] und der Dissertation von Daniel Okrob [119] entnommen, wohingegen die Angaben für *AthHNL*-FbFP-CBM und die Cellulosematerialien Avicel, RAC und CA aus dieser Arbeit stammen. Für die Enzymmenge in nmol wurde die theoretische molare Masse eines Monomers miteinbezogen (2.12.3.2, Tab. 8). Bei der Anzahl der möglichen Recyclingschritte wurden nur Reaktionen beachtet, die mindestens 50 % Substratumsatz in 60 min lieferten.

Immobilisat	Menge Enzym (Synthese)	Recycling	Vorteile	Nachteile
Celite	7,5 mg bzw. 286 nmol	5 x	<ul style="list-style-type: none"> ● einfache Präparation ● häufig wieder- verwendbar 	<ul style="list-style-type: none"> ● Nylonbeutel zum Recycling nötig
Sol-Gel	5 mg bzw. 191 nmol	2 x	<ul style="list-style-type: none"> ● hohe Aktivität 	<ul style="list-style-type: none"> ● aufwendige Präparation ● Nylonbeutel zum Recycling nötig ● geringe Wieder- verwendbarkeit
CLEA	17 mg bzw. 648 nmol	n.b.	<ul style="list-style-type: none"> ● kein zusätzliches Trägermaterial 	<ul style="list-style-type: none"> ● aufwendige Präparation ● Präparation nicht reproduzierbar ● geringe Aktivität in der Synthesereaktion
Avicel ^a	0,6 mg bzw. 11 nmol	n.b.	<ul style="list-style-type: none"> ● einfache Präparation 	<ul style="list-style-type: none"> ● kein Recycling möglich (nicht kompatibel mit Nylonbeutel) ● schwierige Handhabung
RAC ^a	2,9 mg bzw. 52 nmol	3 x	<ul style="list-style-type: none"> ● einfache Präparation ● einfache Handhabung 	<ul style="list-style-type: none"> ● MTBE-Vorbehandlung nötig ● Nylonbeutel zum Recycling nötig
CA ^a	1 mg bzw. 18 nmol	3 x	<ul style="list-style-type: none"> ● einfache Präparation ● einfache Handhabung ● einfach zu dosieren ● sehr hohe Aktivität in der Synthesereaktion ● kein Nylonbeutel zum Recycling nötig 	

n.b.: nicht bestimmt

^a Angaben für das Fusionsprotein *AthHNL*-FbFP-CBM

4.7 CBMs als alternative Immobilisierungsträger für Enzyme im Vergleich zu anderen Strategien

Einer der größten Vorteile der vorgestellten CBM-Immobilisierungsstrategie gegenüber etablierten Verfahren ist die direkte, spezifische, gerichtete und stabile Immobilisierung des Zielproteins aus einem *E. coli*-GZE auf dem kostengünstigen Trägermaterial Cellulose, wodurch das Zielprotein in einem ausgezeichneten Reinheitsgrad gewonnen werden kann. Durch die direkte Immobilisierung werden keine vorherigen Proteinreinigungsschritte benötigt und das Zielprotein kann sofort in den gewünschten biokatalytischen Prozess eingesetzt werden.

Neben dem vorgestellten CBM-Verfahren gibt es weitere vergleichbare Strategien zur kombinierten Reinigung und Immobilisierung eines Zielproteins direkt aus *E. coli*-GZE. Generell können alle spezifischen Proteinreinigungsmethoden dazu gezählt werden, in denen ein Tag an das Zielprotein fusioniert wird, der die Interaktion mit einem bestimmten Trägermaterial vermittelt und das Zielprotein somit immobilisiert. Das bekannteste Beispiel ist die Verwendung des kurzen – z. B. sechs Aminosäuren langen – His-Tags und eines Trägermaterial, welches gebundene Liganden (z. B. Nitrilotriessigsäure) enthält, an denen immobilisierte Metallionen komplexiert sind [13]. Der His-Tag des Zielproteins komplexiert die immobilisierten Metallionen und wird dadurch am Trägermaterial immobilisiert. Diese Methode konnte bereits für eine Vielzahl von Proteinen angewendet werden, wobei unterschiedliche Trägermaterialien verwendet wurden. Beispielsweise können die Metallionen an Kugeln aus quervernetzter Agarose [64], an Glasoberflächen [204], an magnetischen Partikeln [205] oder in Hydrogelen immobilisiert sein [206]. Jedoch müssen diese Trägermaterialien zunächst aufwendig hergestellt oder kommerziell erworben werden, wodurch hohe Kosten entstehen. Einen weiteren Nachteil der Immobilisierung über einen His-Tag stellt die Anfälligkeit der Komplexbildung der Metallionen dar. So kann die Immobilisierung des Zielproteins lediglich im pH-Bereich von ungefähr pH 7 – 8 effektiv erfolgen, da der pK_s -Wert der Histidinreste im His-Tag bei etwa pH 6 liegt und im protonierten Zustand keine Komplexbildung der immobilisierten Metallionen zustande kommt [13, 207]. Des Weiteren beeinflussen viele Stoffe, wie z. B. Detergenzien, bestimmte Aminosäuren, organische Lösungsmittel und einige Pufferkomponenten die Komplexbildung [208]. All dies schränkt die Anwendbarkeit des erzeugten Immobilisats in einer biotechnologisch interessanten Reaktion deutlich ein. Hinzu kommt, dass die Verwendung von giftigen Schwermetallionen bei der

Immobilisierung von Biokatalysatoren auch Probleme bezüglich der Umweltfreundlichkeit dieser Verfahren mit sich bringt. Zudem können Spuren von Schwermetallionen aus dem Immobilisat freigesetzt werden und das Produkt verunreinigen oder zur Inaktivierung des Biokatalysators führen. Dennoch konnte beispielsweise die direkte Immobilisierung der Lipase B aus *Candida antarctica* auf Co^{2+} -Ionen enthaltenden Silica-Kugeln von Cassimjee *et al.* durchgeführt und die erzeugten Immobilisate zur Transesterifizierung von Ethyloctanoat mit Hexanol verwendet werden [209].

Neben der hier vorgestellten Immobilisierungsstrategie, bei der das Familie-2, Typ A CBM der Exoglucanase/Xylanase Cex aus *Cellulomonas fimi* als Immobilisierungstag genutzt wurde, sind in der Literatur weitere Beispiele beschrieben, bei denen CBM-Fusionsproteine erzeugt und direkt aus einem GZE immobilisiert wurden [210-213]. Darunter sind auch einige Beispiele von Fusionsproteinen, welche zur Katalyse von biotechnologisch interessanten Reaktionen verwendet wurden. So wurde beispielsweise ein Fusionsprotein bestehend aus der (+) γ -Lactamase Gla aus *Sulfolobus solfataricus* und dem Familie-3, Typ A CBM des *cellulosome-integrating protein A* aus *Clostridium thermocellum* erzeugt. Das Fusionsprotein wurde heterolog in *E. coli* produziert, direkt aus einem GZE auf Avicel immobilisiert und zur kinetischen Racematspaltung von racemischem γ -Lactam verwendet [214]. Auf diese Weise konnte (-) γ -Lactam gewonnen werden, welches als chiraler Baustein für die Synthese der HIV- bzw. Grippemedikamente Abacavir [215] und Peramivir [216] benötigt wird. Ein weiteres Beispiel stellt ein Fusionsprotein bestehend aus der Lactase LacA aus *Thermoanaerobacter ethanolicus* und dem Familie-28 CBM der Endoglucanase CelD aus *Anaerocellum thermophilum* dar. Dieses Fusionsprotein wurde in *E. coli* produziert, direkt nach dem Zellaufschluss auf Cellulose-Granulat immobilisiert und in einen kontinuierlichen Reaktor eingesetzt [217]. So konnte durch das Cellulose-immobilisierte Enzym Lactose in Glucose und Galactose gespalten werden, was eine wichtige Anwendung in der Nahrungsmittelindustrie darstellt, da auf diese Weise lactosefreie Milchprodukte hergestellt werden [218].

Für biotechnologisch interessante Reaktionen werden oftmals nicht-konventionelle Medien, wie z. B. organische Lösungsmittel, eingesetzt. In der Literatur ist jedoch bisher lediglich ein CBM-Fusionsprotein beschrieben, dessen Aktivität in Mischungen aus wässrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln explizit nachgewiesen wurde. Das Fusionsprotein bestehend aus einer Meerrettichperoxidase und dem

Familie-3 CBM des *cellulose-binding protein A* aus *Clostridium cellulovorans* wurde in *E. coli* produziert, in Form von unlöslichen Proteinaggregaten isoliert und rückgefaltet, bevor es auf Cellulose-Kugeln immobilisiert werden konnte [219]. Anschließend wurde die Aktivität in bis zu 80 % wassermischbaren, organischen Lösungsmitteln (Acetonitril, Aceton, Ethanol, Tetrahydrofuran) anhand von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten nachgewiesen.

Daher stellt das in dieser Arbeit beschriebene *AtHNL-FbFP-CBM* Fusionsprotein das erste CBM-Fusionsprotein dar, welches direkt nach der heterologen Produktion durch Immobilisierung an Cellulose isoliert und in eine biokatalytisch interessante Reaktion eingesetzt wurde, welche in einem Reaktionssystem bestehend aus organischem, mikrowässrigem Lösungsmittel durchgeführt wurde.

4.8 Ausblick

In weiteren Arbeiten könnte der Oligomerisierungszustand des freien Fusionsproteins *AtHNL-FbFP-CBM* mittels größenausschlusschromatographischen Methoden bestimmt werden, um eine mögliche Ursache der erhöhten Stabilität im schwach sauren pH-Bereich aufzuzeigen. Dabei wäre besonders der oligomere Zustand unter Assaybedingungen, d. h. schwach saurer pH-Wert und eine geringe Proteinkonzentration von 0,5 μM , interessant. Des Weiteren könnte eine isoelektrische Fokussierung durchgeführt werden, um den isoelektrischen Punkt des Fusionsproteins experimentell zu ermitteln. Dieser wäre für eine Optimierung des Puffers für den Einsatz eines Cellulose-basierten Immobilisats in die (*R*)-Mandelonitril-Synthesereaktion sinnvoll.

Die Anwendung von Cellulose-basierten *AtHNL-FbFP-CBM*-Immobilisaten im organischen, mikrowässrigen Reaktionssystem könnte ebenfalls weiter optimiert werden. So wäre eine Verwendung von Citrat-Phosphat-Puffer pH 6,5 zur Vorbereitung des RAC-basierten Immobilisats denkbar, die eine Verbesserung des erzielten *ee*-Werts – analog zum CA-basierten Immobilisat – zur Folge haben könnte. Auch die Anwendung von CA-basierten Immobilisaten könnte weiterführend untersucht werden. In diesem Zusammenhang wäre die Verwendung von CA-Disks unterschiedlicher Porengröße eine Möglichkeit, um die Wiederverwendbarkeit des Immobilisats zu beeinflussen. Größere Poren sollten das tiefere Eindringen des adsorbierten Proteins ermöglichen und somit könnte die Stabilität des resultierenden

Immobilisats verbessert werden, da sich die Proteinmoleküle in einer eventuell stabilisierenden Umgebung befinden.

Generell wäre die Fusion weiterer Zielenzyme an das Modul FbFP-CBM denkbar, um eine breite Anwendbarkeit der beschriebenen Immobilisierungsstrategie zu untersuchen. Hier wären besonders Zielenzyme interessant, die industriell relevante Reaktionen katalysieren, sodass kontinuierliche Reaktionen durchgeführt werden könnten. In diesem Kontext wären beispielsweise Reaktionen basierend auf CA-Spritzenfiltern eine attraktive Anwendung.

Eine Möglichkeit, die beschriebene, spezifische und gerichtete Immobilisierungsstrategie direkt aus *E. coli* BL21(DE3)-GZE weiter zu vereinfachen, wäre das Verwenden der nativ in der Exoglucanase/Xylanase Cex vorkommenden, amino-terminalen Signalsequenz. Diese Sequenz vermittelt den Sec-abhängigen Export des Proteins in das Periplasma, von wo es zu einer Freisetzung des Proteins kommt, welches somit in den Überstand der Kultur gelangt. Die Verwendung dieser Signalsequenz in einem Fusionsprotein konnte bereits erfolgreich in *E. coli* demonstriert und große Mengen des Zielproteins aus dem Überstand gewonnen werden [220]. Auf diese Weise könnte der Schritt des Zellaufschlusses gespart und die spezifische Immobilisierung an Cellulosematerialien weiter vereinfacht werden.

5 ANHANG

Auflistung der Aminosäure- und DNA-Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteine bzw. der entsprechenden Gene, wobei die Aminosäure jeweils über der ersten Base des Kodons steht. Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen, die zur Klonierung verwendet wurden, sind in der DNA-Sequenz unterstrichen. In der Aminosäure-Sequenz ist der **His-Tag hellblau**, das **FbFP dunkelgrün**, der **Prolin-Threonin-Linker dunkelblau**, das jeweilige **CBM orange**, der **GS-Linker lila**, die **AfHNL hellgrün** und das **Ende des Fusionsproteins rot** dargestellt. Zusätzlich eingefügte Aminosäuren (z. B. durch die verwendeten Restriktionsschnittstellen) sind schwarz eingefärbt.

FbFP-CBM (in pET28a)

```

M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M V G V V
CCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGTAGGGGTTG
NcoI                               His-Tag                               NdeI
I T D P A L E D N P I V Y V N Q G F V Q M T G Y E
TCATTACGGATCCTGCGCTTGAGGATAACCCGATCGTCTATGTGAACCAAGGCTTCGTGCAGATGACCGGCTATG
FbFP
T E E I L G K N A R F L Q G K H T D P A E V D N I
AAACCGAAGAGATTCTGGGCAAAAATGCGCGCTTTCTGCAGGGCAAACACACAGATCCAGCCGAAGTGGACAACA
R T A L Q N K E P V T V Q I Q N Y K K D G T M F W
TTCGCACAGCGTTGCAGAACAAAGAACCGGTTACCGTTCAGATCCAGAACTACAAGAAAGATGGTACGATGTTTT
N E L N I D P M E I E D K T Y F V G I Q N D I P T
GGAATGAACTGAACATCGATCCGATGGAAATTGAGGACAAAACCTACTTTGTGGGTATTTCAGAACGACATCCCTA
P T P T T P T P T P T T P T P T P T S G P A G C Q
CTCCGACTCCTACCACCCCAACCCCAACACCGACCAGCCCACTCCGACTCCCACCTCTGGTCCAGCTGGTTGCC
Prolin-Threonin-Linker
V L W G V N Q W N T G F T A N V T V K N T S S A P
AAGTTCTGTGGGGAGTAAACCAGTGAATACGGGCTTTACTGCGAACGTCACAGTGAAGAATACCAGTTCTGCCC
CBM der Exoglucanase/Xylanase Cex aus Cellulomonas fimi
V D G W T L T F S F P S G Q Q V T Q A W S S T V T
CGGTGGATGGCTGGACCTTAACGTTCTCGTTTCCGTCAGGTCAGCAAGTCACTCAAGCCTGGTTCGTCCACGGTAA
Q S G S A V T V R N A P W N G S I P A G G T A Q F
CGCAATCCGGTAGTGCGGTGACCGTTCGTAACGCACCGTGAATGGAAGCATTCCCGCTGGTGGTACGGCTCAGT
G F N G S H T G T N A A P T A F S L N G T P C T V
TCGGGTTCAATGGCAGCCATACGGGGACCAATGCAGCACCGACCGCCTTTAGCCTCAATGGCACACCGTGTACCG
G *
TGGGCTAAGTCGAC
Stopp SaII

```

CBM-FbFP (in pET22b)

M A P G C R V D Y A V T N Q W P G G F G A N V T
 CATATGGCCCCGGGTTGTCGTGTCGACTATGCCGTTACAAACCAATGGCCAGGTGGATTTGGCGCGAATGTGACC
NdeI *CBM der Endoglucanase CenA aus Cellulomonas fimi*
I T N L G D P V S S W K L D W T Y T A G Q R I Q Q
 ATCACCAATCTTGGGGATCCGGTTTCTTCCTGGAAACTGGACTGGACCTATACGGCCGGACAGCGCATTACAGCAG

L W N G T A S T N G G Q V S V T S L P W N G S I P
 TTGTGGAATGGTACCGCGTCTACCAATGGCGGTCAAGTGTCCGTAACCAGCTTACCATGGAATGGCTCGATTCCG

T G G T A S F G F N G S W A G S N P T P A S F S L
 ACCGGTGGGACTGCGTCATTTGGCTTTAACGGCAGTTGGGCTGGCTCCAATCCGACACCTGCTAGCTTCAGCCTG

N G T T C T G T V P T T S P T P T P T P T P T P
 AATGGGACGACTTGCACGGGAACTGTTCCGACGACCAGTCCGACTCCGACGCCGACACCACAACACCGACTCCA
Prolin-Threonin-Linker
T P T P T P T P T P T V T P V G V V I T D P A L E
 ACCCCTACCCCGACTCCGACCCCTACGCCACCGTAACGCCTGTAGGTGTGGTGATAACCGATCCGGCACTGGAA
FbFP
D N P I V Y V N Q G F V Q M T G Y E T E E I L G K
 GATAACCCGATTGTGTACGTGAACCAGGGTTTCGTTTCAGATGACGGGCTATGAAACCGAGGAAATCCTGGGTAAG

N A R F L Q G K H T D P A E V D N I R T A L Q N K
 AACGCACGCTTTCTGCAAGGCAAACATACGGATCCAGCGGAAGTCGACAACATTCGTACCGCACTCCAGAACAAA

E P V T V Q I Q N Y K K D G T M F W N E L N I D P
 GAACCAGTGACCGTCCAAATCCAGAACTACAAGAAAGATGGCAGCATGTTCTGGAACGAACTGAACATTGATCCC

M E I E D K T Y F V G I Q N D I L E H H H H H H *
 ATGGAGATCGAGGATAAAACCTACTTTGTCCGCATCCAGAATGACATTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA
XhoI *His-Tag* *Stopp*

A β HNL-FbFP-CBM (in pET28a)

M A H H H H H H A A S M E R K H H F V L V H N A Y
 CCATGGCACATCATCATCATCATCACGCGGCTAGCATGGAGAGGAAACATCACTTCGTGTTAGTTCACAACGCTT
NcoI *His-Tag* *NheI*
H G A W I W Y K L K P L L E S A G H R V T A V E L
 ATCATGGAGCCTGGATCTGGTACAAGCTCAAGCCCCCTCCTTGAATCAGCCGGCCACCAGCGTTACTGCTGTGCAAC
Hydroxynitril-Lyase aus Arabidopsis thaliana
A A S G I D P R P I Q A V E T V D E Y S K P L I E
 TCGCCGCTCCGGGATCGACCCACGACCAATCCAGGCCGTTGAAACCGTCGACGAATACTCCAAACCGTTGATCG

T L K S L P E N E E V I L V G F S F G G I N I A L
 AAACCCTCAAATCTCTTCCAGAGAACGAAGAGGTAATTCCTGGTTGGATTCAGCTTCGGAGGCATCAACATCGCTC

A A D I F P A K I K V L V F L N A F L P D T T H V
 TCGCCCGGACATATTTCCGGCGAAGATTAAGGTTCTTGTGTTCTCAACGCCTTCTTGCCCGACACAACCCACG

P S H V L D K Y M E M P G G L G D C E F S S H E T
 TGCCTTCTCACGTTCTGGACAAGTATATGGAGATGCCTGGAGGTTTGGGAGATTGTGAGTTTTTCATCTCATGAAA

R N G T M S L L K M G P K F M K A R L Y Q N C P I
 CAAGAAATGGGACGATGAGTTTATTGAAGATGGGACCAAATTCATGAAGGCACGTCTTTACCAAATTTGTCCCA

E D Y E L A K M L H R Q G S F F T E D L S K K E K
 TAGAGGATTACGAGCTGGCAAAAATGTTGCATAGGCAAGGGTCATTTTTTCACAGAGGATCTATCAAAGAAAGAAA
 F S E E G Y G S V Q R V Y V M S S E D K A I P C D
 AGTTTAGCGAGGAAGGATATGGTTCGGTGCACGAGTTTACGTAATGAGTAGTGAAGACAAAGCCATCCCCTGCG
 F I R W M I D N F N V S K V Y E I D G G D H M V M
 ATTTCAATTCGTTGGATGATTGATAATTTCAACGTCTCGAAAGTCTACGAGATCGATGGCGGAGATCACATGGTGA
 L S K P Q K L F D S L S A I A T D Y M G G G S G G
 TGCTCTCCAAACCCCAAAAACCTCTTTGACTCTCTCTGCTATTGCCACCGATTATATGGGCGGGCGGTAGCGGTG
 G S H M V G V V I T D P A L E D N P I V Y V N Q G
 CCGGTAGCCATATGGTAGGGGTTGTCAATACGGATCCTGCGCTTGAGGATAACCCGATCGTCTATGTGAACCAAG
 F V Q M T G Y E T E E I L G K N A R F L Q G K H T
 GCTTCGTGCAGATGACCGGCTATGAAACCGAAGAGATTCTGGGCAAAAATGCGCGCTTTCTGCAGGGCAAACACA
 D P A E V D N I R T A L Q N K E P V T V Q I Q N Y
 CAGATCCAGCCGAAGTGGACAACATTGCACAGCGTTGCAGAACAAAGAACCGGTTACCGTTCAGATCCAGAACT
 K K D G T M F W N E L N I D P M E I E D K T Y F V
 ACAAGAAAGATGGTACGATGTTTTGGAATGAACTGAACATCGATCCGATGGAAATTGAGGACAAAACCTACTTTG
 G I Q N D I P T P T P T T P T P T P T P T P T P T P T P T P
 TGGGTATTCAGAACGACATCCCTACTCCGACTCCTACCACCCCAACCCCAACACCGACCACGCCACTCCGACTC
 T S G P A G C Q V L W G V N Q W N T G F T A N V T
 CCACCTCTGGTCCAGCTGGTTGCCAAGTTCTGTGGGGAGTAAACCAGTGAATACGGGCTTTACTGCGAACGTCA
 V K N T S S A P V D G W T L T F S F P S G Q Q V T
 CAGTGAAGAATACCAGTTCTGCCCGGTGGATGGCTGGACCTTAACGTTCTCGTTTCCGTCAGGTCAGCAAGTCA
 Q A W S S T V T Q S G S A V T V R N A P W N G S I
 CTCAAGCCTGGTTCGTCCACGGTAACGCAATCCGGTAGTGCGGTGACCGTTTCGTAACGCACCGTGAATGGAAGCA
 P A G G T A Q F G F N G S H T G T N A A P T A F S
 TTCCCGCTGGTGGTACGGCTCAGTTCGGGTTCAATGGCAGCCATACGGGGACCAATGCAGCACCGACCGCCTTTA
 L N G T P C T V G *
 GCCTCAATGGCACACCGTGTACCGTGGGCTAAGTCGAC
 Stopp SaI1

AtHNL-FbFP (in pET28a)

M A H H H H H A A S M E R K H H F V L V H N A Y
 CCATGGCACATCATCATCATCACGCGGCTAGCATGGAGAGGAAACATCACTTCGTGTTAGTTCACAACGCTT
 H G A W I W Y K L K P L L E S A G H R V T A V E L
 ATCATGGAGCCTGGATCTGGTACAAGCTCAAGCCCCTCCTTGAATCAGCCGGCCACCGGTTACTGCTGTGCAAC
 A A S G I D P R P I Q A V E T V D E Y S K P L I E
 TCGCCGCTCCGGGATCGACCCACGACCAATCCAGGCCGTTGAAACCGTCGACGAATACTCCAAACCGTTGATCG
 T L K S L P E N E E V I L V G F S F G G I N I A L
 AAACCCCTCAAATCTCTTCCAGAGAACGAAGAGGTAATTCTGGTTGGATTTCAGCTTCGGAGGCATCAACATCGCTC

A A D I F P A K I K V L V F L N A F L P D T T H V
 TCGCCGCCGACATATTTCCGGCGAAGATTAAGGTTCTTGTGTTCTCAACGCCTTCTTGCCCGACACAACCCACG

 P S H V L D K Y M E M P G G L G D C E F S S H E T
 TGCCTTCTCACGTTCTTGACAAGTATATGGAGATGCCTGGAGGTTTGGGAGATTGTGAGTTTTTCATCTCATGAAA

 R N G T M S L L K M G P K F M K A R L Y Q N C P I
 CAAGAAATGGGACGATGAGTTTATTGAAGATGGGACCAAATTCATGAAGGCACGTCTTTACCAAATTTGTCCCA

 E D Y E L A K M L H R Q G S F F T E D L S K K E K
 TAGAGGATTACGAGCTGGCAAAAATGTTGCATAGGCAAGGGTCATTTTTACAGAGGATCTATCAAAGAAAGAAA

 F S E E G Y G S V Q R V Y V M S S E D K A I P C D
 AGTTTAGCGAGGAAGGATATGGTTCCGTGCAACGAGTTTACGTAATGAGTAGTGAAGACAAAGCCATCCCCTGCC

 F I R W M I D N F N V S K V Y E I D G G D H M V M
 ATTTCAATTCGTTGGATGATTGATAATTTCAACGCTCTCGAAAAGTCTACGAGATCGATGGCGGAGATCACATGGTGA

 L S K P Q K L F D S L S A I A T D Y M G G G S G G
 TGCTCTCCAAACCCCAAAAACCTTTGACTCTCTCTGCTATTGCCACCGATTATATGGGCGGGCGGTAGCGGTG
GS-Linker
 G S H M V G V V I T D P A L E D N P I V Y V N Q G
 GCGGTAGCCATATGGTAGGGGTTGTCATTACGGATCCTGCGCTTGAGGATAACCCGATCGTCTATGTGAACCAAG
NdeI FbFP
 F V Q M T G Y E T E E I L G K N A R F L Q G K H T
 GCTTCGTGCAGATGACCGGCTATGAAACCGAAGAGATTCTGGGCAAAAATGCGCGCTTTCTGCAGGGCAAACACA

 D P A E V D N I R T A L Q N K E P V T V Q I Q N Y
 CAGATCCAGCCGAAGTGGACAACATTCGCACAGCGTTGCAGAACAAAGAACCGGTTACCGTTCAGATCCAGAACT

 K K D G T M F W N E L N I D P M E I E D K T Y F V
 ACAAGAAAGATGGTACGATGTTTTGGAATGAACTGAACATCGATCCGATGGAAATTGAGGACAAAACCTACTTTG

 G I Q N D I *
 TGGGTATTCAGAACGACATCTAA
Stopp

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] **Reetz, M. T.** (2013) Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: Past, present, and future. *J Am Chem Soc* **135**:12480-12496.
- [2] **Vasic-Racki, D.** (2006) History of industrial biotransformations – Dreams and realities. *In* Liese, A., Seelbach, K., and Wandrey, C. (ed.), *Industrial Biotransformations*, 2nd ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [3] **Kützing, F. T.** (1837) Mikroskopische Untersuchungen über die Hefe und Essigmutter, nebst mehreren anderen dazu gehörigen vegetabilischen Gebilden. *J prakt Chem* **11**:385-409.
- [4] **Schwann, T.** (1837) Vorläufige Mitteilung, betreffend Versuche über die Weingärung und Fäulnis. *Ann Phys Chem* **41**:184-193.
- [5] **Traube, M.** (1858) *Theorie der Fermentwirkungen*. Ferd Dümmler, Berlin.
- [6] **Kühne, W.** (1877) Über das Verhalten verschiedener organisierter und sog. ungeformter Fermente., p. 190-193, *Verhandlungen des Naturhistorisch-medizinischen Vereins zu Heidelberg*, vol. 1. Naturhistorisch-medizinischer Verein, Heidelberg.
- [7] **Buchner, E.** (1897) Alkoholische Gärung ohne Hefezellen (Vorläufige Mitteilung). *Ber Dtsch Chem Ges* **30**:117-127.
- [8] **Rosenthaler, L.** (1908) Enzyme effected asymmetrical synthesis. *Biochem Z* **14**:238-253.
- [9] **Trommsdorff, E.** (1976) *Dr. Otto Röhm - Chemiker und Unternehmer*. Econ, Düsseldorf.
- [10] **Fernandes, P.** (2010) Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalysts. *Enzyme Res* **2010**:862537.
- [11] **Mertz, J. E., and Davis, R. W.** (1972) Cleavage of DNA by R₁ restriction endonuclease generates cohesive ends. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**:3370-3374.
- [12] **Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., and Helling, R. B.** (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**:3240-3244.
- [13] **Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., and Belfrage, G.** (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**:598-599.
- [14] **Glick, B. R., Paternak, J. J., and Patten, C. L.** (2010) *Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA*, 4th ed. ASM Press, Washington, DC.
- [15] **Nestl, B. M., Nebel, B. A., and Hauer, B.** (2011) Recent progress in industrial biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol* **15**:187-193.
- [16] **Bornscheuer, U. T., and Buchholz, K.** (2005) Highlights in biocatalysis - Historical landmarks and current trends. *Eng Life Sci* **5**:309-323.
- [17] **Adrio, J. L., and Demain, A. L.** (2014) Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. *Biomolecules* **4**:117-139.
- [18] **Sanchez, S., and Demain, A. L.** (2011) Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. *Org Process Res Dev* **15**:224-230.
- [19] **Kirk, O., Borchert, T. V., and Fuglsang, C. C.** (2002) Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol* **13**:345-351.

- [20] **Torres, C. E., Negro, C., Fuente, E., and Blanco, A.** (2012) Enzymatic approaches in paper industry for pulp refining and biofilm control. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**:327-344.
- [21] **Klug-Santner, B. G., Schnitzhofer, W., Vrsanska, M., Weber, J., Agrawal, P. B., Nierstrasz, V. A., and Guebitz, G. M.** (2006) Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2. *J Biotechnol* **121**:390-401.
- [22] **Jegannathan, K. R., and Nielsen, P. H.** (2013) Environmental assessment of enzyme use in industrial production - A literature review. *J Clean Prod* **42**:228-240.
- [23] **Gröger, H., and Asano, Y.** (2012) Introduction - Principles and historical landmarks of enzyme catalysis in organic synthesis. In Drauz, H., Gröger, H., and May, O. (ed.), *Enzyme catalysis in organic synthesis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [24] **Bornscheuer, U. T., Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S., Moore, J. C., and Robins, K.** (2012) Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **485**:185-194.
- [25] **Desai, A. A.** (2011) Sitagliptin manufacture: A compelling tale of green chemistry, process intensification, and industrial asymmetric catalysis. *Angew Chem Int Ed* **50**:1974-1976.
- [26] **Klibanov, A. M.** (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**:241-246.
- [27] **Zhao, H.** (2010) Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids - A review. *J Chem Technol Biotechnol* **85**:891-907.
- [28] **Wimmer, Z., and Zarevucka, M.** (2010) A review on the effects of supercritical carbon dioxide on enzyme activity. *Int J Mol Sci* **11**:233-253.
- [29] **Lamare, S., Legoy, M. D., and Graber, M.** (2004) Solid/gas bioreactors: Powerful tools for fundamental research and efficient technology for industrial applications. *Green Chem* **6**:445-458.
- [30] **Krishna, S. H.** (2002) Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. *Biotechnol Adv* **20**:239-267.
- [31] **Sym, E. A.** (1936) Action of esterase in the presence of organic solvents. *Biochem J* **30**:609-617.
- [32] **Dastoli, F. R., Musto, N. A., and Price, S.** (1966) Reactivity of active sites of chymotrypsin suspended in an organic medium. *Arch Biochem Biophys* **115**:44-47.
- [33] **Zaks, A., and Klibanov, A. M.** (1984) Enzymatic catalysis in organic media at 100 °C. *Science* **224**:1249-1251.
- [34] **Zaks, A., and Klibanov, A. M.** (1985) Enzyme-catalyzed processes in organic-solvents. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**:3192-3196.
- [35] **Halling, P. J.** (1984) Effects of water on equilibria catalyzed by hydrolytic enzymes in biphasic reaction systems. *Enzyme Microb Technol* **6**:513-516.
- [36] **Halling, P. J.** (1990) Solvent selection for biocatalysis in mainly organic-systems - Predictions of effects on equilibrium position. *Biotechnol Bioeng* **35**:691-701.
- [37] **Halling, P. J.** (1987) Biocatalysis in multi-phase reaction mixtures containing organic liquids. *Biotechnol Adv* **5**:47-84.
- [38] **Castro, G. R., and Knubovets, T.** (2003) Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures. *Crit Rev Biotechnol* **23**:195-231.

- [39] **Carrea, G., and Riva, S.** (2000) Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angew Chem Int Ed* **39**:2226-2254.
- [40] **Doukyu, N., and Ogino, H.** (2010) Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochem Eng J* **48**:270-282.
- [41] **Gerhards, T., Mackfeld, U., Bocola, M., von Lieres, E., Wiechert, W., Pohl, M., and Rother, D.** (2012) Influence of organic solvents on enzymatic asymmetric carboligations. *Adv Synth Catal* **354**:2805-2820.
- [42] **Iyer, P. V., and Ananthanarayan, L.** (2008) Enzyme stability and stabilization - Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochem* **43**:1019-1032.
- [43] **Korman, T. P., Sahachartsiri, B., Charbonneau, D. M., Huang, G. L., Beauregard, M., and Bowie, J. U.** (2013) Dieselzymes: Development of a stable and methanol tolerant lipase for biodiesel production by directed evolution. *Biotechnol Biofuels* **6**:70.
- [44] **Limanto, J., Shafiee, A., Devine, P. N., Upadhyay, V., Desmond, R. A., Foster, B. R., Gauthier, D. R., Reamer, R. A., and Volante, R. P.** (2005) An efficient chemoenzymatic approach to (S)- γ -fluoroleucine ethyl ester. *J Org Chem* **70**:2372-2375.
- [45] **Tamarez, M., Morgan, B., Wong, G. S. K., Tong, W. D., Bennett, F., Lovey, R., McCormick, J. L., and Zaks, A.** (2003) Pilot-scale lipase-catalyzed regioselective acylation of ribavirin in anhydrous media in the synthesis of a novel prodrug intermediate. *Org Process Res Dev* **7**:951-953.
- [46] **Datta, S., Christena, L. R., and Rajaram, Y.** (2013) Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials. *3 Biotech* **3**:1-9.
- [47] **Schultz, N., Syldatk, C., Franzreb, M., and Hobley, T. J.** (2007) Integrated processing and multiple re-use of immobilised lipase by magnetic separation technology. *J Biotechnol* **132**:202-208.
- [48] **Raghuvanshi, S., and Gupta, R.** (2010) Advantages of the immobilization of lipase on porous supports over free enzyme. *Protein Peptide Lett* **17**:1412-1416.
- [49] **Nelson, J. M., and Griffin, E. G.** (1916) Adsorption of invertase. *J Am Chem Soc* **38**:1109-1115.
- [50] **Sheldon, R. A., and van Pelt, S.** (2013) Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chem Soc Rev* **42**:6223-6235.
- [51] **Cao, L.** (2006) Adsorption-based immobilization, p. 53-168, Carrier-bound immobilized enzymes. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [52] **Maxim, S., Flondor, A., and Carpov, A.** (1987) Ionic binding of biologically-active proteins on cross-linked acrylic macromolecular supports. *Biotechnol Bioeng* **30**:593-597.
- [53] **Moriya, K., Tanizawa, K., and Kanaoka, Y.** (1989) Immobilized chymotrypsin by means of Schiff-base copper(II) chelate. *Biochem Biophys Res Commun* **162**:408-414.
- [54] **Ahmad, A., Bishayee, S., and Bachhawa, Bk.** (1973) Novel method for immobilization of chicken brain arylsulfatase A using concanavalin A. *Biochem Biophys Res Commun* **53**:730-736.
- [55] **Izui, K., Fujita, N., and Katsuki, H.** (1982) Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli* - Hydrophobic chromatography using specific elution with allosteric inhibitor. *J Biochem* **92**:423-432.

- [56] **Kery, V., Haplova, J., Tihlarik, K., and Schmidt, S.** (1990) Factors influencing the activity and thermostability of immobilized porcine pancreatic lipase. *J Chem Technol Biotechnol* **48**:201-207.
- [57] **Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernandez-Lafuente, R., Huguet, J., and Guisan, J. M.** (1998) A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng* **58**:486-493.
- [58] **Nematgorgani, M., Karimian, K., and Mohanazadeh, F.** (1985) Synthesis, characterization, and properties of hexadecyl silica - A novel hydrophobic matrix for protein immobilization. *J Am Chem Soc* **107**:4756-4759.
- [59] **Petkar, M., Lali, A., Caimi, P., and Daminati, M.** (2006) Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. *J Mol Catal B Enzym* **39**:83-90.
- [60] **Shah, S., Solanki, K., and Gupta, M. N.** (2007) Enhancement of lipase activity in non-aqueous media upon immobilization on multi-walled carbon nanotubes. *Chem Cent J* **1**:30.
- [61] **Huitron, C., and Limonlason, J.** (1978) Immobilization of glucose isomerase to ion-exchange materials. *Biotechnol Bioeng* **20**:1377-1391.
- [62] **Ashraf, H., and Husain, Q.** (2010) Stabilization of DEAE cellulose adsorbed and glutaraldehyde crosslinked white radish (*Raphanus sativus*) peroxidase. *J Sci Ind Res (India)* **69**:613-620.
- [63] **Liu, H. S., Chen, W. H., and Lai, J. T.** (1997) Immobilization of isoamylase on carboxymethyl-cellulose and chitin. *Appl Biochem Biotechnol* **66**:57-67.
- [64] **Coulet, P. R., Carlsson, J., and Porath, J.** (1981) Immobilization of enzymes on metal-chelate regenerable carriers. *Biotechnol Bioeng* **23**:665-668.
- [65] **Ljungquist, C., Breitholtz, A., Brinknilsson, H., Moks, T., Uhlen, M., and Nilsson, B.** (1989) Immobilization and affinity purification of recombinant proteins using histidine peptide fusions. *Eur J Biochem* **186**:563-569.
- [66] **Ikura, K., Okumura, K., Yoshikawa, M., Sasaki, R., and Chiba, H.** (1984) Specific immobilization of an enzyme by monoclonal antibody: Immobilization of guinea pig liver transglutaminase. *J Appl Biochem* **6**:222-231.
- [67] **Hutsell, S. Q., Kimple, R. J., Siderovski, D. P., Willard, F. S., and Kimple, A. J.** (2010) High-affinity immobilization of proteins using biotin- and GST-based coupling strategies. *Methods Mol Biol* **627**:75-90.
- [68] **Skerra, A., and Schmidt, T. G.** (1999) Applications of a peptide ligand for streptavidin: the Strep-tag. *Biomol Eng* **16**:79-86.
- [69] **Cao, L.** (2006) Covalent enzyme immobilization, p. 169-316, Carrier-bound immobilized enzymes. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [70] **Trevan, M. D.** (1988) Enzyme immobilization by covalent bonding. *Methods Mol Biol* **3**:495-510.
- [71] **Hanefeld, U., Gardossi, L., and Magner, E.** (2009) Understanding enzyme immobilisation. *Chem Soc Rev* **38**:453-468.
- [72] **Katchalski-Katzir, E., and Kraemer, D. M.** (2000) Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *J Mol Catal B Enzym* **10**:157-176.
- [73] **Kallenberg, A. I., van Rantwijk, F., and Sheldon, R. A.** (2005) Immobilization of penicillin G acylase: The key to optimum performance. *Adv Synth Catal* **347**:905-926.

- [74] **Basso, A., Braiuca, P., Cantone, S., Ebert, C., Linda, P., Spizzo, P., Caimi, P., Hanefeld, U., Degrassi, G., and Gardossi, L.** (2007) *In silico* analysis of enzyme surface and glycosylation effect as a tool for efficient covalent immobilisation of CalB and PGA on Sepabeads. *Adv Synth Catal* **349**:877-886.
- [75] **Tran, D. N., and Balkus, K. J.** (2011) Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. *ACS Catal* **1**:956-968.
- [76] **Sheldon, R. A.** (2007) Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv Synth Catal* **349**:1289-1307.
- [77] **Cao, L., van Langen, L. M., van Rantwijk, F., and Sheldon, R. A.** (2001) Cross-linked aggregates of penicillin acylase: Robust catalysts for the synthesis of β -lactam antibiotics. *J Mol Catal B Enzym* **11**:665-670.
- [78] **Schoevaart, R., Wolbers, M. W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A. P. G., van Rantwijk, F., van der Wielen, L. A. M., and Sheldon, R. A.** (2004) Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnol Bioeng* **87**:754-762.
- [79] **Sheldon, R. A.** (2007) Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): Stable and recyclable biocatalysts. *Biochem Soc Trans* **35**:1583-1587.
- [80] **Cao, L.** (2006) Enzyme entrapment, p. 317-395, Carrier-bound immobilized enzymes. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [81] **Cao, L.** (2006) Enzyme encapsulation, p. 397-448, Carrier-bound immobilized enzymes. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [82] **Ishige, T., Honda, K., and Shimizu, S.** (2005) Whole organism biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol* **9**:174-180.
- [83] **Braun, S., Rappoport, S., Zusman, R., Avnir, D., and Ottolenghi, M.** (1990) Biochemically active sol-gel glasses - The trapping of enzymes. *Mater Lett* **10**:1-5.
- [84] **Pierre, A. C.** (2004) The sol-gel encapsulation of enzymes. *Biocatal Biotransformation* **22**:145-170.
- [85] **Pierre, A. C., and Pajonk, G. M.** (2002) Chemistry of aerogels and their applications. *Chem Rev* **102**:4243-4265.
- [86] **Bhushan, I., Parshad, R., Qazi, G. N., and Gupta, V. K.** (2008) Immobilization of lipase by entrapment in Ca-alginate beads. *J Bioact Compat Polym* **23**:552-562.
- [87] **Draget, K. I., Skjak-Braek, G., and Smidsrod, O.** (1997) Alginate based new materials. *Int J Biol Macromol* **21**:47-55.
- [88] **Bremond, N., Santanach-Carreras, E., Chu, L. Y., and Bibette, J.** (2010) Formation of liquid-core capsules having a thin hydrogel membrane: Liquid pearls. *Soft Matter* **6**:2484-2488.
- [89] **DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulouse, A. J., and Bohlmann, G.** (2013) Industrial use of immobilized enzymes. *Chem Soc Rev* **42**:6437-6474.
- [90] **Yamade, K., and Fukushima, S.** (1989) Continuous alcohol production from starchy materials with a novel immobilized cell/enzyme bioreactor. *J Ferment Bioeng* **67**:97-101.
- [91] **Khan, A. A., and Alzohairy, M. A.** (2010) Recent advances and applications of immobilized enzyme technologies: A review. *Res J Biol Sci* **5**:565-575.
- [92] **Bhosale, S. H., Rao, M. B., and Deshpande, V. V.** (1996) Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol Rev* **60**:280-300.

- [93] **Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., and Fernandez-Lafuente, R.** (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol* **40**:1451-1463.
- [94] **Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Ortiz, C., Fernandez-Lafuente, R., and Guisan, J. M.** (2002) Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: Hydrolytic resolution of mandelic acid esters. *Enzyme Microb Technol* **31**:775-783.
- [95] **Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., and Stevanato, R.** (2013) Enzyme immobilization: An update. *J Chem Biol* **6**:185-205.
- [96] **Hernandez, K., and Fernandez-Lafuente, R.** (2011) Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. *Enzyme Microb Technol* **48**:107-122.
- [97] **Wang, J. Q., Bhattacharyya, D., and Bachas, L. G.** (2001) Improving the activity of immobilized subtilisin by site-directed attachment through a genetically engineered affinity tag. *Fresenius J Anal Chem* **369**:280-285.
- [98] **Andexer, J. N., von Langermann, J., Mell, A., Bocola, M., Kragl, U., Eggert, T., and Pohl, M.** (2007) An (*R*)-selective hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* with an α/β -hydrolase fold. *Angew Chem Int Ed* **46**:8679-8681.
- [99] **Andexer, J. N., Staunig, N., Eggert, T., Kratky, C., Pohl, M., and Gruber, K.** (2012) Hydroxynitrile lyases with α/β -hydrolase fold: Two enzymes with almost identical 3D structures but opposite enantioselectivities and different reaction mechanisms. *Chembiochem* **13**:1932-1939.
- [100] **Griengl, H., Schwab, H., and Fechter, M.** (2000) The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases. *Trends Biotechnol* **18**:252-256.
- [101] **Vetter, J.** (2000) Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon* **38**:11-36.
- [102] **Zagrobelyny, M., and Moller, B. L.** (2011) Cyanogenic glucosides in the biological warfare between plants and insects: The Burnet moth-Birdsfoot trefoil model system. *Phytochemistry* **72**:1585-1592.
- [103] **Holt, J., and Hanefeld, U.** (2009) Enantioselective enzyme-catalysed synthesis of cyanohydrins. *Curr Org Synth* **6**:15-37.
- [104] **Dadashipour, M., and Asano, Y.** (2011) Hydroxynitrile lyases: Insights into biochemistry, discovery, and engineering. *ACS Catal* **1**:1121-1149.
- [105] **Purkarthofer, T., Skranc, W., Schuster, C., and Griengl, H.** (2007) Potential and capabilities of hydroxynitrile lyases as biocatalysts in the chemical industry. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**:309-320.
- [106] **Dreveny, I., Kratky, C., and Gruber, K.** (2002) The active site of hydroxynitrile lyase from *Prunus amygdalus*: Modeling studies provide new insights into the mechanism of cyanogenesis. *Protein Sci* **11**:292-300.
- [107] **Glieder, A., Weis, R., Skranc, W., Poechlauer, P., Dreveny, I., Majer, S., Wubbolts, M., Schwab, H., and Gruber, K.** (2003) Comprehensive step-by-step engineering of an (*R*)-hydroxynitrile lyase for large-scale asymmetric synthesis. *Angew Chem Int Ed* **42**:4815-4818.
- [108] **Wagner, U. G., Hasslacher, M., Griengl, H., Schwab, H., and Kratky, C.** (1996) Mechanism of cyanogenesis: The crystal structure of hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. *Structure* **4**:811-822.

- [109] **Hughes, J., Decarvalho, J. P. C., and Hughes, M. A.** (1994) Purification, characterization, and cloning of α -hydroxynitrile lyase from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Arch Biochem Biophys **311**:496-502.
- [110] **Roos, J., Stelzer, U., and Effenberger, F.** (1998) Synthesis of (1*R*,cis, α *S*)-cypermethrine via lipase catalyzed kinetic resolution of racemic *m*-phenoxybenzaldehyde cyanohydrin acetate. Tetrahedron Asymmetry **9**:1043-1049.
- [111] **Fishman, A., and Zviely, M.** (1998) Chemo-enzymatic synthesis of (*S*)- α -cyano-3-phenoxybenzyl alcohol. Tetrahedron Asymmetry **9**:107-118.
- [112] **Zhang, T. Z., Yang, L. R., Zhu, Z. Q., and Wu, J. P.** (2002) The kinetic study on lipase-catalyzed transesterification of α -cyano-3-phenoxybenzyl alcohol in organic media. J Mol Catal B Enzym **18**:315-323.
- [113] **Pscheidt, B., Liu, Z. B., Gaisberger, R., Avi, M., Skranc, W., Gruber, K., Griengl, H., and Glieder, A.** (2008) Efficient biocatalytic synthesis of (*R*)-pantolactone. Adv Synth Catal **350**:1943-1948.
- [114] **von Langermann, J., Guterl, J. K., Pohl, M., Wajant, H., and Kragl, U.** (2008) Hydroxynitrile lyase catalyzed cyanohydrin synthesis at high pH-values. Bioprocess Biosyst Eng **31**:155-161.
- [115] **Andexer, J. N., von Langermann, J., Kragl, U., and Pohl, M.** (2009) How to overcome limitations in biotechnological processes - Examples from hydroxynitrile lyase applications. Trends Biotechnol **27**:599-607.
- [116] **Hanefeld, U.** (2013) Immobilisation of hydroxynitrile lyases. Chem Soc Rev **42**:6308-6321.
- [117] **Guterl, J. K., Andexer, J. N., Sehl, T., von Langermann, J., Frindi-Wosch, I., Rosenkranz, T., Fitter, J., Gruber, K., Kragl, U., Eggert, T., and Pohl, M.** (2009) Uneven twins: Comparison of two enantiocomplementary hydroxynitrile lyases with α/β -hydrolase fold. J Biotechnol **141**:166-173.
- [118] **Okrob, D., Paravidino, M., Orru, R. V. A., Wiechert, W., Hanefeld, U., and Pohl, M.** (2011) Hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana*: Identification of reaction parameters for enantiopure cyanohydrin synthesis by pure and immobilized catalyst. Adv Synth Catal **353**:2399-2408.
- [119] **Okrob, D.** (2012) Optimierung der Hydroxynitril-Lyase aus *Arabidopsis thaliana* für die enantioselektive Synthese von (*R*)-Cyanhydrinen. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- [120] **Scholz, K. E., Okrob, D., Kopka, B., Grünberger, A., Pohl, M., Jaeger, K. E., and Krauss, U.** (2012) Synthesis of chiral cyanohydrins by recombinant *Escherichia coli* cells in a micro-aqueous reaction system. Appl Environ Microbiol **78**:5025-5027.
- [121] **Studier, F. W.** (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. Protein Expr Purif **41**:207-234.
- [122] **van Tilbeurgh, H., Tomme, P., Claeysens, M., Bhikhabhai, R., and Pettersson, G.** (1986) Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* - Separation of functional domains. FEBS Letters **204**:223-227.
- [123] **Gilkes, N. R., Warren, R. A. J., Miller, R. C., Jr., and Kilburn, D. G.** (1988) Precise excision of the cellulose-binding domains from two *Cellulomonas fimi* cellulases by a homologous protease and the effect on catalysis. J Biol Chem **263**:10401-10407.
- [124] **Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., and Davies, G. J.** (2004) Carbohydrate-binding modules: Fine-tuning polysaccharide recognition. Biochem J **382**:769-781.

- [125] **Guillen, D., Sanchez, S., and Rodriguez-Sanoja, R.** (2010) Carbohydrate-binding domains: Multiplicity of biological roles. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**:1241-1249.
- [126] **Bolam, D. N., Ciruela, A., McQueen-Mason, S., Simpson, P., Williamson, M. P., Rixon, J. E., Boraston, A. B., Hazlewood, G. P., and Gilbert, H. J.** (1998) *Pseudomonas* cellulose-binding domains mediate their effects by increasing enzyme substrate proximity. *Biochem J* **331**:775-781.
- [127] **Gilbert, H. J., Knox, J. P., and Boraston, A. B.** (2013) Advances in understanding the molecular basis of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules. *Curr Opin Struct Biol* **23**:669-677.
- [128] **Uni, F., Lee, S., Yatsunami, R., Fukui, T., and Nakamura, S.** (2012) Mutational analysis of a CBM family 5 chitin-binding domain of an alkaline chitinase from *Bacillus* sp. J813. *Biosci Biotech Biochem* **76**:530-535.
- [129] **Peng, H., Zheng, Y., Chen, M., Wang, Y., Xiao, Y., and Gao, Y.** (2014) A starch-binding domain identified in α -amylase (AmyP) represents a new family of carbohydrate-binding modules that contribute to enzymatic hydrolysis of soluble starch. *FEBS Lett* **588**:1161-1167.
- [130] **van Bueren, A. L., Higgins, M., Wang, D., Burke, R. D., and Boraston, A. B.** (2007) Identification and structural basis of binding to host lung glycogen by streptococcal virulence factors. *Nat Struct Mol Biol* **14**:76-84.
- [131] **Xie, H. F., Bolam, D. N., Nagy, T., Szabo, L., Cooper, A., Simpson, P. J., Lakey, J. H., Williamson, M. P., and Gilbert, H. J.** (2001) Role of hydrogen bonding in the interaction between a xylan-binding module and xylan. *Biochemistry* **40**:5700-5707.
- [132] **Miyanaga, A., Koseki, T., Miwa, Y., Mese, Y., Nakamura, S., Kuno, A., Hirabayashi, J., Matsuzawa, H., Wakagi, T., Shoun, H., and Fushinobu, S.** (2006) The family 42 carbohydrate-binding module of family 54 α -L-arabinofuranosidase specifically binds the arabinofuranose side chain of hemicellulose. *Biochem J* **399**:503-511.
- [133] **Boraston, A. B., Wang, D., and Burke, R. D.** (2006) Blood group antigen recognition by a *Streptococcus pneumoniae* virulence factor. *J Biol Chem* **281**:35263-35271.
- [134] **Notenboom, V., Boraston, A. B., Williams, S. J., Kilburn, D. G., and Rose, D. R.** (2002) High-resolution crystal structures of the lectin-like xylan binding domain from *Streptomyces lividans* xylanase 10A with bound substrates reveal a novel mode of xylan binding. *Biochemistry* **41**:4246-4254.
- [135] **Newstead, S. L., Watson, J. N., Bennet, A. J., and Taylor, G.** (2005) Galactose recognition by the carbohydrate-binding module of a bacterial sialidase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**:1483-1491.
- [136] **Lombard, V., Ramulu, H. G., Drula, E., Coutinho, P. M., and Henrissat, B.** (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* **42**:D490-D495.
- [137] **Richardson, J. S.** (1981) The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv Protein Chem* **34**:167-339.
- [138] **Murzin, A. G., Lesk, A. M., and Chothia, C.** (1992) β -trefoil fold: Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 β and 1 α and fibroblast growth factors. *J Mol Biol* **223**:531-543.
- [139] **Xu, G. Y., Ong, E., Gilkes, N. R., Kilburn, D. G., Muhandiram, D. R., Harrisbrandts, M., Carver, J. P., Kay, L. E., and Harvey, T. S.** (1995) Solution structure of a cellulose-binding domain from *Cellulomonas fimi* by nuclear-magnetic-resonance spectroscopy. *Biochemistry* **34**:6993-7009.

- [140] **Kraulis, J., Clore, G. M., Nilges, M., Jones, T. A., Pettersson, G., Knowles, J., and Gronenborn, A. M.** (1989) Determination of the three-dimensional solution structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. A study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing. *Biochemistry* **28**:7241-7257.
- [141] **Georgelis, N., Yennawar, N. H., and Cosgrove, D. J.** (2012) Structural basis for entropy-driven cellulose binding by a type-A cellulose-binding module (CBM) and bacterial expansin. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**:14830-14835.
- [142] **Tsukimoto, K., Takada, R., Araki, Y., Suzuki, K., Karita, S., Wakagi, T., Shoun, H., Watanabe, T., and Fushinobu, S.** (2010) Recognition of cellooligosaccharides by a family 28 carbohydrate-binding module. *FEBS Lett* **584**:1205-1211.
- [143] **Boraston, A. B., Nurizzo, D., Notenboom, V., Ducros, V., Rose, D. R., Kilburn, D. G., and Davies, G. J.** (2002) Differential oligosaccharide recognition by evolutionarily-related β -1,4 and β -1,3 glucan-binding modules. *J Mol Biol* **319**:1143-1156.
- [144] **Ficko-Blean, E., Stuart, C. P., Suits, M. D., Cid, M., Tessier, M., Woods, R. J., and Boraston, A. B.** (2012) Carbohydrate recognition by an architecturally complex α -N-acetylglucosaminidase from *Clostridium perfringens*. *PLoS One* **7**:e33524.
- [145] **Notenboom, V., Boraston, A. B., Kilburn, D. G., and Rose, D. R.** (2001) Crystal structures of the family 9 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima* xylanase 10A in native and ligand-bound forms. *Biochemistry* **40**:6248-6256.
- [146] **Gilbert, H. J.** (2010) The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. *Plant Physiol* **153**:444-455.
- [147] **Taylor, N. G.** (2008) Cellulose biosynthesis and deposition in higher plants. *New Phytol* **178**:239-252.
- [148] **Khandelwal, M., and Windle, A. H.** (2013) Self-assembly of bacterial and tunicate cellulose nanowhiskers. *Polymer* **54**:5199-5206.
- [149] **Ross, P., Mayer, R., and Benziman, M.** (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev* **55**:35-58.
- [150] **Mihriyan, A.** (2011) Cellulose from *Cladophorales* green algae: From environmental problem to high-tech composite materials. *J Appl Polym Sci* **119**:2449-2460.
- [151] **Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., and Bohn, A.** (2005) Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew Chem Int Ed* **44**:3358-3393.
- [152] **Credou, J., and Berthelot, T.** (2014) Cellulose: From biocompatible to bioactive material. *J Mater Chem B Mater Biol Med* **2**:4767-4788.
- [153] **Siqueira, G., Bras, J., and Dufresne, A.** (2010) Cellulosic bionanocomposites: A review of preparation, properties and applications. *Polymers (Basel)* **2**:728-765.
- [154] **Chu, S. S. C., and Jeffrey, G. A.** (1968) The refinement of the crystal structures of β -D-glucose and cellobiose. *Acta Crystallogr B* **24**:830-838.
- [155] **Nishiyama, Y., Langan, P., and Chanzy, H.** (2002) Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose 1 β from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *J Am Chem Soc* **124**:9074-9082.
- [156] **Nishiyama, Y., Sugiyama, J., Chanzy, H., and Langan, P.** (2003) Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose 1 α from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *J Am Chem Soc* **125**:14300-14306.

- [157] **Zugenmaier, P.** (2001) Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers. *Prog Polym Sci* **26**:1341-1417.
- [158] **Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindstrom, T., Ankerfors, M., Gray, D., and Dorris, A.** (2011) Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. *Angew Chem Int Ed* **50**:5438-5466.
- [159] **Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z., and Graham, M. W.** (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**:3469-3478.
- [160] **Studier, F. W., and Moffatt, B. A.** (1986) Use of bacteriophage-T7 RNA-polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**:113-130.
- [161] **Scholz, K. E.** (2012) Fluoreszenzreporterproteine als Werkzeuge in der Biotechnologie. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- [162] **Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning - A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
- [163] **Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-580.
- [164] **Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
- [165] **Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K., and Mattick, J. S.** (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* **19**:4008.
- [166] **Zhang, Y. H. P., Cui, J., Lynd, L. R., and Kuang, L. R.** (2006) A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: Evidence from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure. *Biomacromolecules* **7**:644-648.
- [167] **Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- [168] **Bonde, M., Pontoppidan, H., and Pepper, D. S.** (1992) Direct dye binding - A quantitative assay for solid-phase immobilized protein. *Anal Biochem* **200**:195-198.
- [169] **Gill, S. C., and von Hippel, P. H.** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**:319-326.
- [170] **Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- [171] **Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., and Righetti, P. G.** (2004) Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**:1327-1333.
- [172] **Pepinsky, R. B.** (1991) Selective precipitation of proteins from guanidine hydrochloride-containing solutions with ethanol. *Anal Biochem* **195**:177-181.
- [173] **Hanefeld, U., Stranzl, G., Straathof, A. J. J., Heijnen, J. J., Bergmann, A., Mittelbach, R., Glatter, O., and Kratky, C.** (2001) Electrospray ionization mass spectrometry, circular dichroism and SAXS studies of the (S)-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. *Biochim Biophys Acta* **1544**:133-142.

- [174] **Jäger, G., Wu, Z., Garschhammer, K., Engel, P., Klement, T., Rinaldi, R., Spiess, A. C., and Büchs, J.** (2010) Practical screening of purified cellobiohydrolases and endoglucanases with α -cellulose and specification of hydrodynamics. *Biotechnol Biofuels* **3**:18.
- [175] **Bansal, P., Hall, M., Realff, M. J., Lee, J. H., and Bommarius, A. S.** (2009) Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnol Adv* **27**:833-848.
- [176] **Drepper, T., Eggert, T., Circolone, F., Heck, A., Krauss, U., Guterl, J. K., Wendorff, M., Losi, A., Gärtner, W., and Jaeger, K. E.** (2007) Reporter proteins for *in vivo* fluorescence without oxygen. *Nat Biotechnol* **25**:443-445.
- [177] **Losi, A., Polverini, E., Quest, B., and Gärtner, W.** (2002) First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes. *Biophys J* **82**:2627-2634.
- [178] **Salomon, M., Christie, J. M., Knieb, E., Lempert, U., and Briggs, W. R.** (2000) Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* **39**:9401-9410.
- [179] **Creagh, A. L., Ong, E., Jervis, E. J., Kilburn, D. G., and Haynes, C. A.** (1996) Binding of the cellulose-binding domain of exoglucanase Cex from *Cellulomonas fimi* to insoluble microcrystalline cellulose is entropically driven. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:12229-12234.
- [180] **Nakamura, T., Mine, S., Hagihara, Y., Ishikawa, K., Ikegami, T., and Uegaki, K.** (2008) Tertiary structure and carbohydrate recognition by the chitin-binding domain of a hyperthermophilic chitinase from *Pyrococcus furiosus*. *J Mol Biol* **381**:670-680.
- [181] **Simpson, P. J., Xie, H. F., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., and Williamson, M. P.** (2000) The structural basis for the ligand specificity of family 2 carbohydrate-binding modules. *J Biol Chem* **275**:41137-41142.
- [182] **Jervis, E. J., Haynes, C. A., and Kilburn, D. G.** (1997) Surface diffusion of cellulases and their isolated binding domains on cellulose. *J Biol Chem* **272**:24016-24023.
- [183] **Ong, E., Gilkes, N. R., Miller, R. C., Jr., Warren, R. A. J., and Kilburn, D. G.** (1993) The cellulose-binding domain (CBD_{Cex}) of an exoglucanase from *Cellulomonas fimi*: Production in *Escherichia coli* and characterization of the polypeptide. *Biotechnol Bioeng* **42**:401-409.
- [184] **Gilkes, N. R., Jervis, E. J., Henrissat, B., Tekant, B., Miller, R. C., Jr., Warren, R. A. J., and Kilburn, D. G.** (1992) The adsorption of a bacterial cellulase and its two isolated domains to crystalline cellulose. *J Biol Chem* **267**:6743-6749.
- [185] **Tomme, P., Boraston, A. B., McLean, B., Kormos, J., Creagh, A. L., Sturch, K., Gilkes, N. R., Haynes, C. A., Warren, R. A. J., and Kilburn, D. G.** (1998) Characterization and affinity applications of cellulose-binding domains. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **715**:283-296.
- [186] **Sammond, D. W., Payne, C. M., Brunecky, R., Himmel, M. E., Crowley, M. F., and Beckham, G. T.** (2012) Cellulase linkers are optimized based on domain type and function: Insights from sequence analysis, biophysical measurements, and molecular simulation. *PLoS One* **7**:e48615.
- [187] **Kopka, B., Diener, M., Wirtz, A., Pohl, M., Jaeger, K.-E., and Krauss, U.** (2015) Purification and simultaneous immobilization of *Arabidopsis thaliana* hydroxynitrile lyase using a family 2 carbohydrate-binding module. *Biotechnol J Mar* **9**:doi: 10.1002/biot.201400786 [Epub ahead of print].
- [188] **Mukherjee, A., Walker, J., Weyant, K. B., and Schroeder, C. M.** (2013) Characterization of flavin-based fluorescent proteins: An emerging class of fluorescent reporters. *PLoS One* **8**:e64753.
- [189] **Chen, X. Y., Zaro, J. L., and Shen, W. C.** (2013) Fusion protein linkers: Property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev* **64**:1357-1369.

- [190] **Guterl, J. K.** (2009) Hydroxynitril-Lyasen für die Biotechnologie. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- [191] **Brooks, H. B., Geeganage, S., Kahl, S. D., Montrose, C., Sittampalam, S., Smith, M. C., and Weidner, J. R.** (2004) Basics of Enzymatic Assays for HTS. In Sittampalam, G. S., Gal-Edd, N., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Bejcek, B., Glicksman, M., Inglese, J., Lemmon, V., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Minor, L., Napper, A., Riss, T., Trask, O. J., and Weidner, J. (ed.), Assay Guidance Manual [Internet], Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences [updated 2012 Oct 01].
- [192] **Rondi, A., Kiselev, D., Machado, S., Extermann, J., Weber, S., Bonacina, L., Wolf, J. P., Roslund, J., Roth, M., and Rabitz, H.** (2011) Discriminating biomolecules with coherent control strategies. *Chimia (Aarau)* **65**:346-349.
- [193] **Thomas, J. G., and Baneyx, F.** (1996) Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* cells overexpressing heat-shock proteins. *J Biol Chem* **271**:11141-11147.
- [194] **Mathes, T., Vogl, C., Stolz, J., and Hegemann, P.** (2009) In vivo generation of flavoproteins with modified cofactors. *J Mol Biol* **385**:1511-1518.
- [195] **Fedyukina, D. V., and Cavagnero, S.** (2011) Protein folding at the exit tunnel. *Annu Rev Biophys* **40**:337-359.
- [196] **Saibil, H.** (2013) Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**:630-642.
- [197] **Hong, J., Ye, X. H., and Zhang, Y. H. P.** (2007) Quantitative determination of cellulose accessibility to cellulase based on adsorption of a nonhydrolytic fusion protein containing CBM and GFP with its applications. *Langmuir* **23**:12535-12540.
- [198] **Hong, J., Ye, X., Wang, Y., and Zhang, Y. H. P.** (2008) Bioseparation of recombinant cellulose-binding module-proteins by affinity adsorption on an ultra-high-capacity cellulosic adsorbent. *Anal Chim Acta* **621**:193-199.
- [199] **Hickel, A., Graupner, M., Lehner, D., Hermetter, A., Glatter, O., and Griengl, H.** (1997) Stability of the hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*: A fluorescence and dynamic light scattering study. *Enzyme Microb Technol* **21**:361-366.
- [200] **Scholz, K. E., Kopka, B., Wirtz, A., Pohl, M., Jaeger, K.-E., and Krauss, U.** (2013) Fusion of a flavin-based fluorescent protein to hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* improves enzyme stability. *Appl Environ Microbiol* **79**:4727-4733.
- [201] **Möglich, A., and Moffat, K.** (2007) Structural basis for light-dependent signaling in the dimeric LOV domain of the photosensor YtvA. *J Mol Biol* **373**:112-126.
- [202] **Ong, E., Gilkes, N. R., Miller, R. C., Jr., Warren, R. A. J., and Kilburn, D. G.** (1991) Enzyme immobilization using a cellulose-binding domain - Properties of a β -glucosidase fusion protein. *Enzyme Microb Technol* **13**:59-65.
- [203] **Tufvesson, P., Lima-Ramos, J., Nordblad, M., and Woodley, J. M.** (2011) Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes. *Org Process Res Dev* **15**:266-274.
- [204] **Liu, Y. C. C., Rieben, N., Iversen, L., Sorensen, B. S., Park, J., Nygard, J., and Martinez, K. L.** (2010) Specific and reversible immobilization of histidine-tagged proteins on functionalized silicon nanowires. *Nanotechnology* **21**:245105.
- [205] **Sassolas, A., Hayat, A., and Marty, J.-L.** (2013) Immobilization of enzymes on magnetic beads through affinity interactions, p. 139-148. In Guisan, J. M. (ed.), Immobilization of Enzymes and Cells, vol. 1051. Humana Press, Totowa, NJ.

- [206] **Ha, E. J., Kim, K. K., Park, H. S., Lee, S. G., Lee, J. O., An, S. S. A., and Paik, H. J.** (2013) One-step immobilization and purification of his-tagged enzyme using poly(2-acetamidoacrylic acid) hydrogel. *Macromol Res* **21**:5-9.
- [207] **Bornhorst, J. A., and Falke, J. J.** (2000) Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Method Enzymol* **326**:245-254.
- [208] **GE Healthcare.** (2012) Recombinant protein purification - Principles and methods, 11/2012 ed. GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden.
- [209] **Cassimjee, K. E., Kourist, R., Lindberg, D., Larsen, M. W., Thanh, N. H., Widersten, M., Bornscheuer, U. T., and Berglund, P.** (2011) One-step enzyme extraction and immobilization for biocatalysis applications. *Biotechnol J* **6**:463-469.
- [210] **Shpigel, E., Goldlust, A., Eshel, A., Ber, I. K., Efroni, G., Singer, Y., Levy, I., Dekel, M., and Shoseyov, O.** (2000) Expression, purification and applications of staphylococcal protein A fused to cellulose-binding domain. *Biotechnol Appl Biochem* **31**:197-203.
- [211] **Hwang, S., Ahn, J., Lee, S., Lee, T. G., Haam, S., Lee, K., Ahn, I. S., and Jung, J. K.** (2004) Evaluation of cellulose-binding domain fused to a lipase for the lipase immobilization. *Biotechnol Lett* **26**:603-605.
- [212] **Kavoosi, M., Sanaie, N., Dismer, F., Hubbuch, J., Kilburn, D. G., and Haynes, C. A.** (2007) A novel two-zone protein uptake model for affinity chromatography and its application to the description of elution band profiles of proteins fused to a family 9 cellulose-binding module affinity tag. *J Chromatogr A* **1160**:137-149.
- [213] **Myung, S., Zhang, X. Z., and Zhang, Y. H. P.** (2011) Ultra-stable phosphoglucose isomerase through immobilization of cellulose-binding module-tagged thermophilic enzyme on low-cost high-capacity cellulosic adsorbent. *Biotechnol Prog* **27**:969-975.
- [214] **Wang, J. J., Zhu, J. G., Min, C., and Wu, S.** (2014) CBD binding domain fused γ -lactamase from *Sulfolobus solfataricus* is an efficient catalyst for (-) γ -lactam production. *BMC Biotechnology* **14**:40.
- [215] **Hervey, P. S., and Perry, C. M.** (2000) Abacavir - A review of its clinical potential in patients with HIV infection. *Drugs* **60**:447-479.
- [216] **Gubareva, L. V., Webster, R. G., and Hayden, F. G.** (2001) Comparison of the activities of zanamivir, oseltamivir, and RWJ-270201 against clinical isolates of influenza virus and neuraminidase inhibitor-resistant variants. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:3403-3408.
- [217] **Velikodvorskaya, G. A., Tikhonova, T. V., Gurvits, I. D., Karyagina, A. S., Lavrova, N. V., Sergienko, O. V., Tashlitskii, V. N., Lunina, N. A., and Lunin, V. G.** (2010) Chimeric lactase capable of spontaneous and strong immobilization on cellulose and development of a continuous-flow system for lactose hydrolysis at high temperatures. *Appl Environ Microbiol* **76**:8071-8075.
- [218] **Li, B., Wang, Z., Li, S., Donelan, W., Wang, X., Cui, T., and Tang, D.** (2013) Preparation of lactose-free pasteurized milk with a recombinant thermostable β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. *BMC Biotechnol* **13**:73.
- [219] **Fishman, A., Levy, I., Cogan, U., and Shoseyov, O.** (2002) Stabilization of horseradish peroxidase in aqueous-organic media by immobilization onto cellulose using a cellulose-binding-domain. *J Mol Catal B Enzym* **18**:121-131.
- [220] **Rodriguez, B., Kavoosi, M., Koska, J., Creagh, A. L., Kilburn, D. G., and Haynes, C. A.** (2004) Inexpensive and generic affinity purification of recombinant proteins using a family 2a CBM fusion tag. *Biotechnol Prog* **20**:1479-1489.

EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität“ erstellt worden ist.

Die vorgelegte Dissertation wurde in dieser oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Bisher habe ich keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Ort, Datum

Benita Kopka