

**Biokatalytische Synthese von α -Ketoglutarat
und „Protein Engineering“ der NADH-Oxidase
aus *Lactobacillus brevis* zur *in situ*-
Cofaktorregenerierung von NADP⁺**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Carsten Lanzerath

aus Rheinbach

Erftstadt, Juni 2015

Aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Werner Hummel

Korreferent: Prof. Dr. Vlada B. Urlacher

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2015

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2010 bis April 2014 am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Prof. Dr. W. Hummel durchgeführt. Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen des Projektes „Nachhaltige biokatalytische Oxidationsprozesse“ der Deutschen Bundes Umweltstiftung (DBU, AZ 13234-32) finanziert und unterstützt.

Teilweise wurde der Inhalt der vorliegenden Arbeit bereits in Form von Publikationen veröffentlicht:

Greschner, W., Lanzerath, C., Reiß, T., Tenbrink, K., Borchert, S., Hummel, W., Gröger, H. (2014). Artificial cofactor regeneration with an iron(III)porphyrin as NADH-oxidase mimic in the enzymatic oxidation of L-glutamate to α -ketoglutarate. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*.

Lanzerath, C., Hummel, W., Gröger, H., Reiß, T. (2016). Efficient biocatalytic production of α -ketoglutarate from L-glutamate by the coupled system L-glutamate oxidase and catalase. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*. (eingereicht)

Lanzerath, C., Hummel, W. (2016). Alteration of the nicotinamide cofactor specificity of NADH oxidase from *Lactobacillus brevis* by rational protein design: new useful catalysts for the efficient *in situ* regeneration of NADP⁺. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*. (eingereicht)

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1. Enzyme als Biokatalysatoren	1
2. Verfahren zur Identifizierung von neuen Biokatalysatoren.....	3
2.1. Screening nach neuen Biokatalysatoren	3
2.2. "Protein Engineering"	3
2.2.1 Rationales Proteindesign.....	4
2.2.2 Gerichtete Evolution	4
3. Die Ketosäure α -Ketoglutarat.....	7
3.1 Verfahren zur Darstellung von α -KG	8
3.1.1 Verfahren zur chemischen Darstellung von α -KG.....	8
3.1.2 Verfahren zur biotechnologischen Darstellung von α -KG.....	8
3.1.3 Die Aminosäure L-Glutamat.....	12
4. Oxidoreduktasen.....	13
4.1 L-Glutamat-Dehydrogenasen	13
4.1.1 Einsatz von GluDHs in der Biotechnologie	16
4.2 L-Aminosäure-Oxidasen.....	16
4.2.1 L-Glutamat-Oxidasen.....	18
4.2.2 Einsatz von D- oder L-Aminosäure-Oxidasen in der Biotechnologie	19
4.3 L-Aminosäure-Transaminasen	20
4.3.1 L-Glutamat-Pyruvat-Transaminase	21
4.3.2 Einsatz von L-Aminosäure-Transaminasen in der Biotechnologie.....	21
5. Regenerierung von Nicotinamid Cofaktoren.....	22
5.1 Photochemische Methoden zur Cofaktorregenerierung	25
5.2 Chemische Methoden zur Cofaktorregenerierung	25
5.3 Elektrochemische Methoden zur Cofaktorregenerierung	26
5.4 Enzymatische Methoden zur Cofaktorregenerierung	27
5.4.1 Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung	27
5.4.2 Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung.....	28
5.4.2.1 Enzym-gekoppelte Regenerierung der reduzierten Cofaktoren.....	29
5.4.2.2 Enzym-gekoppelte Regenerierung der oxidierten Cofaktoren	30
5.5 Cofaktorregenerierung mit ganzen Zellen.....	31
6. NADH-Oxidasen.....	32
6.1 Einsatz von NADH-Oxidasen in der Biotechnologie.....	36
7. Motivation und Zielsetzung.....	37
II Material und Methoden	39
1. Material	39
1.1 Chemikalien	39
1.2 Geräte	40
1.3 Enzyme	41

1.4	Verwendete Vektoren	42
1.5	Verwendete Mikroorganismen.....	42
2.	Methoden	43
2.1	Mikrobiologische Methoden	43
2.1.1	Medien und Lösungen.....	43
2.1.2	Medien und Lösungen für die Kultivierung von Bodenisolaten mittels Anreicherungskultur	44
2.1.3	Medien für die Kultivierung von Stammsammlungsstämmen.....	46
2.1.4	Screening nach neuen GluDHs	47
2.1.4.1	Kultivierung von Bodenisolaten mittels Anreicherungskulturen	47
2.1.4.2	Kultivierung von Sammlungsstämmen.....	47
2.1.5	Screening nach GluOX.....	48
2.1.6	Kultivierung von <i>E. coli</i>	48
2.1.6.1	Plattenkulturen	48
2.1.6.2	Flüssigkulturen	48
2.1.6.3	Hochzelldichte Fermentation von <i>E. coli</i>	49
2.1.7	Heterologe Expression der Gene	50
2.1.7.1	Heterologe Expression <i>gludh</i> aus <i>F. nucleatum</i> in <i>E. coli</i>	50
2.1.7.2	Heterologe Expression <i>gludh</i> aus <i>C. difficile</i> in <i>E. coli</i>	50
2.1.7.3	Heterologe Expression <i>gludh</i> aus <i>B. subtilis</i> in <i>E. coli</i>	50
2.1.7.4	Heterologe Expression <i>gludh</i> aus <i>T. thermophilus</i> in <i>E. coli</i>	51
2.1.7.5	Heterologe Expression <i>gludh</i> aus <i>K. lactis</i> in <i>E. coli</i>	51
2.1.7.6	Heterologe Expression <i>gludh</i> aus <i>B. pumilus</i> in <i>E. coli</i>	51
2.1.7.7	Heterologe Expression <i>nox</i> aus <i>L. brevis</i> in <i>E. coli</i>	52
2.1.7.8	Heterologe Expression <i>gluox</i> aus <i>S. sp. X-119-6</i> in <i>E. coli</i>	52
2.1.8	Stammhaltung/-lagerung	52
2.1.8.1	Stammhaltung auf festen Nährböden	52
2.1.8.2	Anlegen von Gefrierkulturen	52
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	53
2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	53
2.2.2	Präparation von genomischer DNA	53
2.2.3	DNA-Restriktion	53
2.2.4	Reinigung von DNA.....	53
2.2.5	Dephosphorylierung von DNA.....	53
2.2.6	Agarosegelelektrophorese	54
2.2.7	Agarosegelelextraktion	54
2.2.8	Ligation von DNA mit T4-DNA-Ligase	54
2.2.9	Herstellung kompetenter Zellen.....	54
2.2.10	Hitzeschocktransformation	55
2.2.11	Herstellung der Primer	55
2.2.12	Polymerasekettenreaktion (PCR)	56
2.2.13	“Error-Prone” PCR (epPCR).....	56

2.2.14	“Quick Change” PCR.....	58
2.2.15	Sättigungsmutagenese mittels „Quick Change PCR“.....	59
2.2.16	Sequenzierung	59
2.2.17	Herstellung und Genexpression der <i>gludh</i> -Mutantenbibliothek	59
2.2.18	Herstellung und Genexpression der <i>gludh</i> -Sättigungsmutagenese- bibliothek	60
2.2.19	Herstellung und Genexpression der <i>nox</i> -Mutantenbibliothek	60
2.3	Biochemische Methoden	61
2.3.1	Herstellung von Zellrohextrakten der Mutantenbibliothek.....	61
2.3.2	Zellaufschluss mittels Ultraschall	61
2.3.3	Zellaufschluss mittels Schwingkugelmühle	62
2.3.4	Proteingehaltbestimmung nach Bradford.....	62
2.3.5	Bestimmung der Enzymaktivitäten.....	63
2.3.5.1	Bestimmung der GluDH-Aktivität.....	63
2.3.5.2	Nachweis GluDH-Aktivität mittels NTB-Aktivitätsfärbung.....	63
2.3.5.3	Bestimmung der NOX-Aktivität.....	63
2.3.5.4	Bestimmung der NOX-Aktivität für die <i>in situ</i> - Cofaktorregenerierung	64
2.3.5.5	Bestimmung der GluOX-Aktivität.....	64
2.3.5.6	Bestimmung der Katalase-Aktivität.....	64
2.3.5.7	Bestimmung der GPT-Aktivität	65
2.3.5.8	Bestimmung der AlaDH-Aktivität	65
2.3.5.9	Bestimmung der LeuDH-Aktivität	65
2.3.5.10	Bestimmung der LDH-Aktivität	66
2.3.5.11	Bestimmung der ADH-Aktivität.....	66
2.3.6	Screening nach verbesserten Enzymvarianten	66
2.3.6.1	Screening der NOX-Mutantenbibliothek	66
2.3.6.2	Screening der Mutantenbibliothek auf NADPH-Oxidase-Aktivität ..	66
2.3.6.3	Screening der Mutantenbibliothek auf erhöhte Stabilität im basischen pH-Bereich	67
2.3.6.4	Screening der GluDH-Mutantenbibliothek	68
2.3.7	Reinigung der Enzyme	68
2.3.7.1	Reinigung der rekombinanten GluDH aus <i>F. nucleatum</i>	68
2.3.7.2	Reinigung der rekombinanten GluDH aus <i>C. difficile</i>	69
2.3.7.3	Reinigung der rekombinanten GluDH aus <i>B. subtilis</i>	69
2.3.7.4	Reinigung der rekombinanten GluDH aus <i>B. pumilus</i>	70
2.3.7.5	Reinigung der rekombinanten GluDH aus <i>K. lactis</i>	70
2.3.7.6	Reinigung der rekombinanten LeuDH aus <i>B. cereus</i>	70
2.3.7.7	Reinigung der rekombinanten GluOX aus <i>Streptomyces</i> sp. X-119-6	70
2.3.7.8	Reinigung der rekombinanten NOX aus <i>L. brevis</i> sowie deren Mutanten.....	72

2.3.7.9	Präparation der rekombinanten LeuDh aus <i>B. cereus</i>	72
2.3.7.10	Präparation der rekombinanten LDH aus <i>Bacillus subtilis</i>	73
2.3.7.11	Präparation der rekombinanten ADH aus <i>L. kefir</i>	74
2.3.7.12	Präparation der rekombinanten ADH aus <i>L. brevis</i>	74
2.3.7.13	Präparation der rekombinanten ADH aus <i>R. ruber</i>	74
2.3.8	Inclusion Bodies.....	75
2.3.9	Umpuffern bzw. Entsalzen von Proteinlösungen.....	75
2.3.10	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen.....	75
2.3.11	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	75
2.3.12	Permeabilisierung der Zellmembran.....	76
2.3.13	Immobilisierung GluOX und Katalase.....	76
2.4	Analytische Methoden.....	77
2.4.1	Nachweis von chiralen Alkoholen mittels Gaschromatographie.....	77
2.4.2	Nachweis von α -KG.....	77
2.4.3	Strukturanalyse und Modellierung.....	78
2.5	Darstellung von α -KG aus L-Glu mittels Biotransformation.....	79
2.5.1	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz von GluDHs unter <i>in situ</i> -Regenerierung des Cofaktors NAD ⁺	79
2.5.2	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz der GluOX aus <i>Streptomyces</i> sp. X-119-6.....	79
2.5.3	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz der GluOX aus <i>Streptomyces</i> sp. X-119-6 unter <i>in situ</i> -Eliminierung von H ₂ O ₂ mittels der Katalase aus <i>M. luteus</i>	80
2.5.4	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz des GluOX/Katalase-Immobilisates.....	80
2.5.5	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz des GluOX/Katalase Ganzzellkatalysators.....	81
2.5.6	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GPT ohne Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat.....	81
2.5.7	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GPT unter <i>in situ</i> -Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat mittels der AlaDH aus <i>B. subtilis</i>	82
2.5.8	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GPT unter <i>in situ</i> -Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat mittels der L-AAO aus <i>C. atrox</i>	82
2.6	Anwendung der mittels rationalem Proteindesign hergestellten NOX-Mutanten zur NADP ⁺ -Regenerierung.....	83
2.6.1	Darstellung (S)-1-Phenylethanol aus <i>rac</i> -1-Phenylethanol durch den Einsatz der NADP ⁺ -abhängigen ADH aus <i>L. kefir</i> und <i>L. brevis</i> unter <i>in situ</i> -Cofaktorregenerierung durch eine NAD(P)H-Oxidase.....	83

2.6.2	Darstellung von (<i>R</i>)-1-Phenylethanol aus <i>rac</i> -1-Phenylethanol durch den Einsatz der NAD ⁺ -abhängigen (<i>S</i>)-spezifischen ADH aus <i>R. ruber</i> unter <i>in situ</i> -Cofaktorregenerierung durch eine NOX-Mutante	84
2.6.3	Darstellung von (<i>S</i>)-1-Phenylethanol aus <i>rac</i> -1-Phenylethanol durch den Einsatz von Ganzzellbiokatalysatoren mit <i>in vivo</i> -Cofaktorregenerierung.....	84
III	Ergebnisse	86
1.	Darstellung von α -Ketoglutarat	86
1.1	Darstellung von α -KG mittels L-Glutamat-Dehydrogenasen (GluDH)	86
1.1.1	Evaluierung geeigneter GluDHs	
1.1.2	Klonierung, heterologe Expression und Reinigung der ausgewählten GluDHs.....	89
1.1.2.1	Klonierung des <i>gludh</i> Gens aus <i>F. nucleatum</i>	89
1.1.2.2	Heterologe Expression des <i>gludh</i> Gens aus <i>F. nucleatum</i> in <i>E. coli</i>	89
1.1.2.3	Reinigung der rekombinanten GluDH aus <i>F. nucleatum</i>	89
1.1.2.4	Klonierung des <i>gludh</i> Gens aus <i>C. difficile</i>	91
1.1.2.5	Heterologe Expression des <i>gludh</i> Gens aus <i>C. difficile</i> in <i>E. coli</i>	91
1.1.2.6	Reinigung der rekombinanten GluDH aus <i>C. difficile</i>	91
1.1.2.7	Klonierung des <i>gludh</i> Gens aus <i>B. subtilis</i>	93
1.1.2.8	Heterologe Expression des <i>gludh</i> Gens aus <i>B. subtilis</i> in <i>E. coli</i>	93
1.1.2.9	Reinigung der rekombinanten GluDH aus <i>B. subtilis</i>	93
1.1.2.10	Klonierung des <i>gludh</i> Gens aus <i>T. thermophilus</i>	94
1.1.2.11	Heterologe Expression des <i>gludh</i> Gens aus <i>T. thermophilus</i> in <i>E. coli</i>	94
1.1.2.12	Optimierung der heterologen Expression	95
1.1.2.13	Variation der Expressionsbedingungen.....	96
1.1.2.14	Klonierung des <i>gludh</i> Gens aus <i>T. thermophilus</i> in pTrc99a	97
1.1.2.15	Transformation und Expression in <i>E. coli</i> Rosetta(DE3).....	97
1.1.2.16	Co-Expression von Chaperonen	98
1.1.2.17	Zusammenfassung zur GluDH aus <i>T. thermophilus</i>	99
1.1.3	Biochemische Charakterisierung der rekombinanten GluDHs.....	100
1.1.3.1	Bestimmung der pH-Optima.....	100
1.1.3.2	Lagerstabilität der gereinigten GluDHs.....	102
1.1.3.3	Untersuchung des Einflusses der Reaktionsprodukte auf die GluDHs	102
1.1.3.3.1	Untersuchung des Einflusses der Reaktionsprodukte auf die <i>F. nucleatum</i> GluDH	102
1.1.3.3.2	Untersuchung des Einflusses der Reaktionsprodukte auf die <i>C. difficile</i> GluDH	104

1.1.3.3.3	Untersuchung des Einflusses der Reaktionsprodukte auf die <i>B. subtilis</i> GluDH	106
1.1.3.3.4	Untersuchung des Einflusses von α -KG und Ammonium auf die GluDH mittels NTB-Aktivitätsfärbung	109
1.1.4	Screening nach neuen GluDHs	111
1.1.4.1	Strategie I: Gerichtete Evolution einer GluDH	111
1.1.4.1.1	Vorversuche zur gerichteten Evolution	111
1.1.4.1.2	Wachstumsbasiertes Selektionssystem	112
1.1.4.1.3	Random Mutagenese mittels „error-prone PCR“ (epPCR) ..	112
1.1.4.1.4	Herstellung und Screening der Mutantenbibliothek auf neue Enzymvarianten	113
1.1.4.1.5	Sättigungsmutagenese an Position 326	114
1.1.4.1.6	Herstellung und Screening der Sättigungsmutagenesebibliothek	115
1.1.4.2	Strategie II: Screening von Sammlungsstämmen	116
1.1.4.3	Strategie III: Screening von Bodenisolaten aus Anreicherungskulturen	118
1.1.4.4	Klonierung der identifizierten GluDHs	120
1.1.4.5	Heterologe Expression des <i>gludh</i> Gens aus <i>K. lactis</i> in <i>E. coli</i>	121
1.1.4.6	Reinigung der rekombinanten <i>K. lactis</i> GluDH	121
1.1.4.7	Heterologe Expression des <i>gludh</i> Gens aus <i>B. pumilus</i> in <i>E. coli</i>	122
1.1.4.8	Reinigung der <i>B. pumilus</i> GluDH	122
1.1.5	Charakterisierung der GluDHs aus dem Screening	123
1.1.5.1	Untersuchung des Einflusses der Reaktionsprodukte auf die GluDH aus <i>K. lactis</i>	123
1.1.5.2	Untersuchung des Einflusses von α -KG auf die GluDH <i>K. lactis</i> in Abhängigkeit vom pH-Wert	124
1.1.5.3	Untersuchung des Einflusses der Reaktionsprodukte auf die GluDH <i>B. pumilus</i>	124
1.1.6	Untersuchung des Einflusses von α -KG auf die GluDH aus <i>B. subtilis</i> , <i>C. difficile</i> und <i>F. nucleatum</i> in Abhängigkeit vom pH-Wert	126
1.1.6.1	Untersuchung der Produktinhibierung einer alternativen L-Aminosäure-Dehydrogenase in Abhängigkeit vom pH-Wert	129
1.1.7	Bereitstellung eines enzymatischen Systems zur NAD ⁺ -Regenerierung: Klonierung und heterologe Expression der NOX aus <i>L. brevis</i>	130
1.1.7.1	Klonierung des <i>nox</i> Genes aus <i>L. brevis</i>	131
1.1.7.2	Heterologe Expression der NOX aus <i>L. brevis</i> in <i>E. coli</i>	131
1.1.7.3	Reinigung der rekombinanten der NOX	131
1.1.7.4	Biochemische Charakterisierung der NOX aus <i>L. brevis</i>	133
1.1.7.4.1	Bestimmung des pH-Optimums	133

1.1.7.4.2	pH-Stabilität der NOX aus <i>L. brevis</i>	134
1.1.7.4.3	Untersuchung des Einflusses der Reaktions-Substrate und Produkte.....	135
1.1.8	Darstellung von α -KG mittels GluDHs.....	137
1.1.8.1	Vorversuche.....	137
1.1.8.1.1	Prozessstabilität der GluDHs.....	137
1.1.8.1.2	Ermittlung eines gemeinsamen pH-Wertes für die Biotransformation	137
1.1.8.2	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz von GluDHs unter <i>in situ</i> -Regenerierung des Cofaktors NAD ⁺ mittels einer NOX.....	139
1.1.8.3	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz der rekombinanten GluDHs aus dem Screening	144
1.1.8.4	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz von GluDHs unter Erhöhung der Substratkonzentration	145
1.1.8.5	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz von GluDHs unter Erhöhung des pH-Wertes	146
1.1.8.6	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz von GluDHs unter Zusatz der Reaktionsprodukte α -KG und Ammonium.....	147
1.1.8.7	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GluDH unter <i>in situ</i> -Regenerierung des Cofaktors NAD ⁺ mittels alternativer Systeme	149
1.1.8.7.1	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GluDH unter <i>in situ</i> -Regenerierung des Cofaktors NAD ⁺ mittels einer L-Lactat-Dehydrogenase	149
1.1.8.7.2	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GluDH unter <i>in situ</i> -Regenerierung des Cofaktors NAD ⁺ mittels einer L-Aminosäure-Dehydrogenase	151
1.1.8.8	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GluDH unter <i>in situ</i> -Entfernung von Ammonium mittels Zeolith...	153
1.1.8.9	<i>In situ</i> -Bereitstellung von C ¹³ -markiertem α -KG in der MenD abhängigen Synthese von 4-Hydroxy-5-oxo-hexansäure	154
1.2	Darstellung von α -KG mittels L-Glutamat-Oxidase (GluOX)	155
1.2.1	Evaluierung einer geeigneter GluOX	155
1.2.2	Klonierung und heterologe Expression der GluOX aus <i>Streptomyces</i> sp. X-119-6	156
1.2.2.1	Codon usage Optimierung des <i>gluox</i> Gens.....	156
1.2.2.2	Klonierung des <i>gluox</i> Gens	157
1.2.2.3	Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	157
1.2.2.4	Untersuchung der GluOX-Produktion in Abhängigkeit von der Temperatur	157

1.2.2.5	Hochzelldichte-Fermentation von <i>E. coli</i> zur Produktion von GluOX.....	158
1.2.2.6	Reinigung und Prozessierung der rekombinanten GluOX <i>Streptomyces</i> sp. X-119-6	159
1.2.3	Biochemische Charakterisierung der rekombinanten GluOX.....	163
1.2.3.1	Lagerstabilität der Hochzelldichte-Fermentations-Zellen und der gereinigten GluOX.....	163
1.2.3.2	Bestimmung des pH-Optimums der GluOX	164
1.2.3.3	Bestimmung der kinetischen Konstanten v_{\max} und K_M	165
1.2.3.3.1	Bestimmung der kinetischen Konstanten der unprozessierten GluOX.....	166
1.2.3.3.2	Bestimmung der kinetischen Konstanten der prozessierten GluOX.....	166
1.2.3.3.3	Zusammenfassung der kinetischen Daten der unprozessierten und prozessierten GluOX.....	167
1.2.3.4	Untersuchung des Einflusses der Reaktionsprodukte auf die GluOX.....	168
1.2.3.4.1	Untersuchung des Einflusses von α -KG auf die GluOX	168
1.2.3.4.2	Untersuchung des Einflusses von Ammonium auf die GluOX.....	170
1.2.4	Einführung Immobilisierung.....	171
1.2.4.1	Co-Immobilisierung der GluOX und der Katalase	172
1.2.5	Entwicklung Ganzzellkatalysator GluOX und Katalase	173
1.2.5.1	Isolierung und Klonierung des <i>hplI</i> -Gens.....	173
1.2.5.2	Konstruktion Ganzzellkatalysator GluOX und Katalase	174
1.2.6	Darstellung von α -KG mittels GluOX.....	176
1.2.6.1	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz der isolierten rekombinanten GluOX aus <i>Streptomyces</i> sp. X-119-6	176
1.2.6.2	Untersuchung der Stabilität und Decarboxylierung von α -KG	177
1.2.7	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz der GluOX aus <i>Streptomyces</i> sp. X-119-6 unter <i>in situ</i> -Eliminierung von H_2O_2 mittels der Katalase aus <i>M. luteus</i>	178
1.2.7.1	Vorversuche zur Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz der GluOX <i>Streptomyces</i> sp. X-119-6.....	179
1.2.7.1.1	Bestimmung des pH-Optimums der Katalase aus <i>M. luteus</i>	179
1.2.7.1.2	Ermittlung eines gemeinsamen pH-Wertes für die Biotransformation.....	180
1.2.7.1.3	Prozessstabilität der beiden Formen der GluOX sowie der Katalase	180

1.2.7.1.4	Ermittlung des optimalen Verhältnisses an GluOX und Katalase.....	180
1.2.7.2	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz der GluOX aus <i>Streptomyces</i> sp. X-119-6 unter <i>in</i> <i>situ</i> -Eliminierung von H ₂ O ₂ mittels der Katalase aus <i>M. luteus</i> - Erhöhung der Substratkonzentration	182
1.2.8	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz des GluOX/Katalase-Immobilisates	187
1.2.9	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz des GluOX/Katalase Ganzzellkatalysators	188
1.2.10	Screening nach neuen GluOX	191
1.3	Darstellung von α -KG mittels L-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)...	193
1.3.1	Klonierung und heterologe Expression des <i>aladh</i> -Gens aus <i>B. subtilis</i>	193
1.3.2	Prozessstabilität der GPT sowie der AlaDH.....	193
1.3.3	Untersuchung des Einflusses von Substraten und Produkten der Biotransformation auf die AlaDH aus <i>B. subtilis</i>	194
1.3.4	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GPT.....	196
1.3.5	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GPT unter Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat mittels der AlaDH aus <i>B. subtilis</i>	198
1.3.6	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GPT unter <i>in situ</i> -Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat mittels der L-AAO aus <i>C. atrox</i>	202
2.	Entwicklung eines enzymatischen Systems zur NADP ⁺ -Regenerierung	204
2.1	„Protein Engineering“ der NOX aus <i>L. brevis</i>	204
2.1.1	Gerichtete Evolution der NOX aus <i>L. brevis</i>	205
2.1.1.1.	„Random Mutagenese“ mittels „error-prone“ PCR (epPCR)	205
2.1.1.2	Herstellung und Screening der Mutantenbibliothek auf neue Enzymvarianten	206
2.1.2	Rationales Proteindesign der NOX aus <i>L. brevis</i>	206
2.1.2.1	NAD(H)- und NADP(H)-Spezifität von Pyridin-Nucleotid-Disulfid Oxidoreduktasen	207
2.1.2.2	Sequenzanalyse und Alignment der NOX aus <i>L. brevis</i>	208
2.1.2.3	Strukturanalyse der NOX aus <i>L. brevis</i>	210
2.1.2.4	Rationales Proteindesigns der NOX aus <i>L. brevis</i>	217
2.1.2.5	Heterologe Expression der mutierten <i>nox</i> -Gene in <i>E. coli</i>	219
2.1.2.6	Reinigung der rekombinanten NOX-Mutanten.....	219
2.1.2.7	Bestimmung der kinetischen Konstanten	223
2.2	Entwicklung eines Ganzzellbiokatalysators mit <i>in vivo</i> NADP ⁺ -Regenerierung	233

2.2.1	Konstruktion Ganzzellkatalysator ADH/NOX	233
2.2.2	Produktion Ganzzellkatalysator ADH/NOX.....	234
2.3	Anwendung der NOX-Mutanten zur Regenerierung von NADP ⁺ - Darstellung von enantiomerenreinen Alkoholen	236
2.3.1	Darstellung (S)-1-Phenylethanol aus <i>rac</i> -1-Phenylethanol durch den Einsatz der NADP ⁺ -abhängigen ADHs aus <i>L. kefir</i> und <i>L. brevis</i> unter <i>in situ</i> -Cofaktorregenerierung durch eine NOX-Mutante	237
2.3.2	Darstellung von (R)-1-Phenylethanol aus <i>rac</i> -1-Phenylethanol durch den Einsatz der NAD ⁺ -abhängigen (S)-spezifischen ADH aus <i>R. ruber</i> unter <i>in situ</i> -Cofaktorregenerierung durch eine NOX-Mutante	240
2.3.3	Darstellung von (S)-1-Phenylethanol aus <i>rac</i> -1-Phenylethanol durch den Einsatz von Ganzzellbiokatalysatoren mit zellinterner Cofaktorregenerierung	242
IV	Diskussion	245
1.	Entwicklung enzymatischer Verfahren zur Darstellung von α -KG	245
1.1.	Darstellung von α -KG aus L-Glu mittels GluDH	248
1.1.1	Heterologe Expression der <i>gludh</i> -Gene und Reinigung der Enzyme	248
1.1.2	Biochemische Charakterisierung der GluDHS	248
1.1.3	Screening nach neuen GluDHS	249
1.1.3.1	Gerichtete Evolution der GluDH aus <i>C. difficile</i>	250
1.1.3.2	Screening einer Stammsammlung und von Bodenisolaten aus Anreicherungskultur.....	250
1.1.4	Die pH-Wert Abhängigkeit der Inhibierung von GluDHS	252
1.1.5	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz von GluDHS unter <i>in situ</i> -Regenerierung des Cofaktors NAD ⁺ mittels einer NOX.....	252
1.1.6	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GluDH unter <i>in situ</i> -Regenerierung des Cofaktors NAD ⁺ mittels alternativer Systeme	255
1.1.7	Vergleich der Cofaktorregenerierungssysteme in der Biotransformation von L-Glu mittels GluDH.....	256
1.1.8	<i>In situ</i> -Bereitstellung von C13-markiertem α -KG zur MenD- abhängigen Synthese von 4-hydroxy-5-oxohexansäure	257
1.2	Darstellung von α -KG aus L-Glu mittels GluOX	258
1.2.1	Heterologe Expression des <i>gluox</i> -Gens, Reinigung und Prozessierung GluOX <i>Streptomyces</i> sp. X-119-6.....	258
1.2.2	Biochemische Charakterisierung der GluOX aus <i>Streptomyces</i> sp. X-119-6.....	259
1.2.3	Screening nach neuen Produzenten einer GluOX.....	262

1.2.4	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz der isolierten GluOX	263
1.2.5	Co-Immobilisierung von GluOX und Katalase	267
1.2.6	Ganzzellkatalysator GluOX und Katalase	268
1.2.7	Zusammenfassender Vergleich der verschiedenen Enzympräparationen.....	270
1.3	Darstellung von α -KG aus L-Glu mittels GPT	271
1.3.1	Untersuchung des Einflusses von Substraten und Produkten der Biotransformation auf die AlaDH aus <i>B. subtilis</i>	272
1.3.2	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GPT ohne <i>in situ</i> -Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors	273
1.3.3	Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GPT unter <i>in situ</i> -Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors.....	273
1.3.4	Vergleich der Biotransformationen von L-Glu mittels GPT	274
1.4	Vergleich der enzymatischen Verfahren zur Darstellung von α -KG	276
1.5	Vergleich der entwickelten Verfahren mit anderen biotechnologischen Produktionsverfahren für α -KG.....	282
2.	Entwicklung eines enzymatischen NADP ⁺ -Regenerierungssystems.....	287
2.1	„Protein Engineering“ der NOX aus <i>L. brevis</i>	289
2.1.1	Gerichtete Evolution der NOX aus <i>L. brevis</i>	289
2.1.2	Rationales Proteindesign der NOX aus <i>L. brevis</i>	290
2.1.2.1	Die NADH-Spezifität der NOX aus <i>L. brevis</i>	290
2.1.2.2	Herstellung, heterologe Expression und Reinigung der NOX-Mutanten.....	295
2.1.2.3	Biochemische Charakterisierung der NOX-Mutanten aus dem rationalen Proteindesign.....	298
2.1.2.4	Strukturmodellierung ausgewählter NOX-Mutanten	305
2.2	Anwendung der NOX-Mutanten zur Cofaktorregenerierung - Oxidative Darstellung von enantiomerenreinen Alkoholen.....	315
2.2.1	Cofaktorregenerierung in der oxidativen Darstellung von enantiomerenreinen Alkoholen mittels isolierter Enzyme	316
2.2.2	Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren mit <i>in vivo</i> -Cofaktorregenerierung von NADP ⁺	317
2.2.3	Beurteilung des enzymatischen NADP ⁺ -Regenerierungssystems.....	318
3.	Ausblick	322
3.1	Darstellung alternativer Ketosäuren mittels GluOX.....	322
3.2	Darstellung von D-Glutamat	322
3.3	Biotransformation erhöhter Substratkonzentrationen an L-Glu mittels Ganzzellkatalysator und Immobilisat	322
3.4	Biotransformation von L-Glu mittels GluDH	323
3.5	NOX aus <i>L. brevis</i> - Entwicklung einer rein NADPH-spezifischen NOX.....	323

V	Zusammenfassung	325
VI	Summary	328
VII	Anhang	331
1.1	Verwendete Klonierungsprimer	331
1.2	Verwendete Mutageneseprimer	333
1.3	Codon usage Optimierung des <i>gluox</i> Gens.....	334
VIII	Literaturverzeichnis.....	337

I. Einleitung

1. Enzyme als Biokatalysatoren

Bereits viele tausend Jahre vor ihrer eigentlichen Entdeckung nutzte die Menschheit indirekt Enzyme, zumeist zur Lebensmittelproduktion und Veredelung (Käseherstellung und Alkoholproduktion), aber auch in anderen Bereichen wie z.B. der Gerberei.

Enzyme sind Biokatalysatoren, d.h. dass sie bereits in geringen Mengen chemische Reaktionen um den Faktor von 10^8 bis 10^{14} beschleunigen, ohne bei der Reaktion selbst verbraucht zu werden. Hierbei ist die katalytische Aktivität eines Enzyms von verschiedenen Parametern wie z.B. Cofaktoren, Temperatur, Inhibitoren und pH-Wert abhängig. Wie alle Katalysatoren liegt das Enzym nach der abgelaufenen Reaktion wieder in seiner Ausgangsform vor. Die katalytische Wirksamkeit von Enzymen beruht auf der Fähigkeit, die Aktivierungsenergie der katalysierten Reaktion deutlich abzusenken, ohne das thermodynamische Gleichgewicht zu beeinflussen. Das Gleichgewicht der Reaktion wird durch den Biokatalysator also nicht verändert, sondern die Geschwindigkeit, mit der es sich einstellt.

Nach dem heutigen Stand der Technik werden Enzyme in einer großen Anzahl von verschiedenen technischen Prozessen als Biokatalysator eingesetzt, sowohl in isolierter Form als auch als Ganzzell-System [Schmid et al., 2001; Wohlgemuth, 2010; Kara et al., 2014]. Die industrielle Synthese von Zielsubstanzen durch die Biotransformation mit Hilfe von Biokatalysatoren wird als „Weiße Biotechnologie“ bezeichnet.

Bei der Verwendung von ganzen Zellen als Biokatalysator wird zwischen zwei verschiedenen Verfahrensweisen unterschieden: (1) Fermentation und (2) mikrobielle Transformation. In Prozessen, die fermentativ durchgeführt werden, befinden sich die Zellen im Wachstum und produzieren das gewünschte Produkt mittels ihres Stoffwechsels aus zu meist billigen Kohlenstoffquellen wie z.B. Glucose. Die mikrobielle Transformation hingegen ist ein Prozess, bei dem die Zelle ruht und nicht wächst, das Produkt wird hier direkt aus einem häufig nicht-natürlichen Substrat gebildet. Mikrobielle Transformationen besitzen im Gegensatz zu fermentativen Prozessen den Vorteil, dass Zellwachstum und Transformation voneinander getrennt sind. Auf diese Weise ist es möglich, dass beide Prozesse voneinander unabhängig durchgeführt und jeweils einzeln optimiert werden können. Durch den gezielten Einsatz der hergestellten Zellen lassen sich weiterhin wesentlich höhere Zelldichten und damit Katalysatorkonzentrationen im Prozess einstellen, als in einer Fermentation aufgrund von Wachstumslimitierungen erreicht werden können.

Der Einsatz ganzer Zellen bietet verschiedene Vorteile. Zum einen sind die für die Reaktion benötigten Cofaktoren zumeist in ausreichender Menge bereits innerhalb der Zelle vorhanden bzw. werden von ihr nachgeliefert und müssen somit der Reaktion nicht zwingend extern zugefügt werden, wodurch die Gesamtkosten eines Prozesses beträchtlich gesenkt werden können. Weiterhin entfällt hier eine zumeist aufwendige und kostenintensive Isolierung und Reinigung der Enzyme. Der Einsatz von gereinigten Enzymen hingegen besitzt den Vorteil, dass die Existenz konkurrierender Enzyme ausgeschlossen werden kann. Ebenfalls ist eine sehr genaue Dosierung des Biokatalysators möglich, allerdings müssen die benötigten Cofaktoren zugesetzt werden, wodurch die Prozesskosten beträchtlich ansteigen können.

Die Entwicklungen auf dem Gebiet der Herstellung von rekombinanten Proteinen machen es heute möglich, enzymatische Biokatalysatoren in nahezu unbegrenzter Menge zur Verfügung zu stellen, eine industrielle Anwendung wird heute vor allem in der Pharma- und Lebensmittel-Industrie durchgeführt. In den letzten Jahren haben Biokatalysatoren insbesondere in der Synthese von enantiomerenreinen Verbindungen und sogenannten Bulkchemikalien an Bedeutung gewonnen [Kroutil et al., 2004].

Oft können die biotechnologischen Verfahren Vorteile gegenüber der chemischen Synthese vorweisen. Chemische Syntheseverfahren benötigen oftmals extreme Bedingungen wie hohen Druck und hohe Temperatur, sowie den Einsatz von Schwermetall-haltigen Katalysatoren, deren Entsorgung nach der Reaktionsführung oft problematisch ist. Des Weiteren laufen diese Reaktionen in aller Regel in organischen Lösungsmitteln ab, die im Nachhinein kostenintensiv gereinigt werden müssen, wobei bei mehrstufigen Reaktionen häufig für jeden Schritt separate Lösungsmittel eingesetzt werden. Weiterhin sind chemische Prozesse oft mit der Produktion von ungewollten Nebenprodukten sowie umweltschädlichen Abfällen verbunden. Enzymatische Reaktionen hingegen laufen in wässrigem Milieu unter zumeist milden Reaktionsbedingungen ab und es entstehen in aller Regel keine Nebenprodukte [Bornscheuer et al., 2012]. Beim Einsatz als Biokatalysator können jedoch auch zahlreiche Schwierigkeiten auftreten, wie z.B. unzureichende Aktivität des Enzyms für ein bestimmtes unnatürliches Substrat, unzureichende Stabilität, mangelnde Selektivität oder auch die Abhängigkeit von teuren Cofaktoren. Weitreichende Fortschritte auf den Gebieten der Produktion, Isolierung und Reinigung von Proteinen haben dazu geführt, dass enzymatische Biokatalysatoren heute leicht in größeren Mengen sowie kostengünstig hergestellt werden können. Die gezielte Identifizierung von neuen Biokatalysatoren für eine bestimmte biotechnologische Anwendung kann durch

verschiedene Verfahren durchgeführt werden, ebenfalls ist es durch den Stand der Technik möglich, mittels Methoden der sogenannten gerichteten Evolution oder des rationalen Proteindesigns Biokatalysatoren herzustellen, die für den jeweiligen Prozess optimierte bzw. angepasste Eigenschaften besitzen.

2.0 Verfahren zur Identifizierung von neuen Biokatalysatoren

2.1. Screening nach neuen Biokatalysatoren

Im Allgemeinen können zwei unterschiedliche Verfahren zur Identifizierung von neuen Biokatalysatoren benannt werden. Das erste Verfahren beruht auf dem Auffinden und Isolieren von möglicherweise geeigneten und bisher unbekanntem Biokatalysatoren aus Stammsammlungen oder natürlichen Ressourcen [Shimizu et al., 1997]. Die natürlichen Ressourcen bieten hierbei eine fast unbegrenzte Quelle für neue Biokatalysatoren, allerdings lässt sich eine Vielzahl an Mikroorganismen nicht oder nur unzureichend in Reinkultur unter Laborbedingungen kultivieren, wodurch die Methode stark eingeschränkt wird [Asano, 1998]. Ein relativ neuer Ansatz zur Umgehung dieser Einschränkung durch die Kultivierbarkeit von Mikroorganismen aus natürlichen Ressourcen ist der Metagenom-Ansatz [Lorenz und Eck, 2004]. Bei diesem Verfahren wird ein DNA-Gemisch der Mikroorganismen einer Probe isoliert, in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert und vorzugsweise in *E. coli* expremiert (Anlage einer Metagenombank). Anschließend wird mit Hilfe einer geeigneten Screeningmethode nach der gewünschten enzymatischen Aktivität in der Metagenombank gesucht. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode ist es, dass das gesuchte Enzym bereits rekombinant vorliegt und dass durch die Klonierung die DNA-Sequenz leicht zugänglich ist.

2.2. „Protein Engineering“

Das zweite angewandte Verfahren beruht auf der Anpassung von bereits bekannten Biokatalysatoren für eine biotechnologische Anwendung. Nach dem heutigen Stand der Technik stehen verschiedenste Methoden des „Protein Engineering“ zur Verfügung, um natürlich vorkommende enzymatische Biokatalysatoren hinsichtlich ihrer spezifischen Eigenschaften zu verändern bzw. zu optimieren und sie somit für eine bestimmte biotechnologische Anwendungen nutzbar zu machen. Hierbei wird zwischen dem rationalen Proteindesign und der gerichteten Evolution von Enzymen unterschieden [Arnold, 2001; Reetz, 2011; Bornscheuer und Pohl, 2001; Böttcher und Bornscheuer, 2010].

2.2.1 Rationales Proteindesign

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Proteinstrukturen aufgeklärt und in speziellen Datenbanken hinterlegt, so finden sich in der "Protein Data Bank" (PDB) [Berman et al., 2000] mehr als 101 000 Proteinstrukturen (Stand Juli 2014). Mit den Daten dieser Strukturdatenbanken ergeben sich umfangreiche Möglichkeiten zur Analyse und zur Vorhersage von Enzymvarianten bzw. Enzymeigenschaften. Häufig sind nur wenige Aminosäuren eines Enzyms mit einer spezifischen Funktion für die jeweilige katalytische Aktivität oder auch Substratspezifität verantwortlich. Sind detaillierte Kenntnisse über die dreidimensionale Struktur, die Funktionsweise und die Bedeutung einzelner Aminosäuren eines Enzyms bekannt, ist es möglich durch den Einsatz des rationalen Proteindesigns bzw. der ortsgerichteten Mutagenese das Enzym gezielt zu verändern [Cedrone et. al., 2000; Bornscheuer und Pohl, 2001]. Eine Vorhersage von Aminosäuremutationen, die zu der gewünschten Veränderung führen könnten, ist heute jedoch auch ohne Kenntnis der gelösten Enzymstruktur möglich. Mit Hilfe der Strukturmodellierung, basierend auf den Strukturdaten eines homologen Enzyms, lässt sich in einem begrenztem Umfang die unbekannte Struktur eines Enzyms vorhersagen.

Als nachteilig kann genannt werden, dass der Ansatz des rationalen Proteindesigns relativ zeit- und auch kostenintensiv ist, da für die Überprüfung jeder ausgewählten und eingeführten Mutation das jeweilige Enzym rekombinant hergestellt und isoliert werden muss. Weiterhin sind Beispiele des „Protein Engineerings“ bekannt, bei denen für die Veränderung einer Enzymeigenschaft mehrere weit voneinander entfernt liegende Aminosäureaustausche mittels gerichteter Evolution eingeführt wurden. Durch das rationale Proteindesign lassen sich solche positiven Mutationen, die in keinem direkten funktionellen oder räumlichen Zusammenhang stehen, nur unzureichend bzw. nicht vorhersagen.

2.2.2 Gerichtete Evolution

Ein anderer Ansatz zur Erzeugung von enzymatischen Biokatalysatoren mit speziellen Eigenschaften besteht in der gerichteten Evolution („directed evolution“) von Enzymen [Labrou, 2010; Otten und Quax, 2004; Turner, 2009; Jaeger et. al., 2001]. Dabei werden durch verschiedene molekularbiologische Methoden Bibliotheken von Enzymmutanten hergestellt, die in Kombination mit geeigneten Screeningmethode die Identifizierung verbesserter Enzymvarianten ermöglichen. Im Unterschied zu dem Ansatz der ortsgerichteten Mutagenese sind für diesen Mutageneseprozess keine Kenntnisse über die Struktur des Enzyms bzw. den genauen Katalysemechanismus notwendig.

Für die gerichtete Evolution stehen nach dem heutigen Stand der Technik mehrere verschiedene Methoden zur Verfügung, die sich in rekombinative und nicht-rekombinative Methoden einteilen lassen. Als nicht-rekombinative Methoden sind z.B. die „random mutagenese“ (Zufallsmutagenese) mittels „error-prone“ PCR (epPCR) oder auch der Nutzen von bakteriellen Mutationsstämmen zu nennen [Reetz et al., 2001]. Um Fehler bei der Amplifizierung der DNA herbeizuführen werden bei der epPCR absichtlich PCR-Bedingungen (z.B. erhöhte $MgCl_2$ -Konzentration oder Verwendung von $MnCl_2$) gewählt, bei denen die eingesetzte Polymerase verstärkt Fehler verursacht. Ebenfalls wird eine Polymerase eingesetzt, die keine „proofreading“ Aktivität besitzt, was bedeutet, dass sie nicht über die Möglichkeit verfügt, über eine 3'-5'-Exonucleaseaktivität fehlerhaft eingebaute Nucleotide zu erkennen und zu ersetzen [Cadwell und Joyce, 1994]. Eine deutliche Einschränkung der Methode der epPCR ergibt sich aus der Degenerierung des genetischen Codes, da einige Aminosäuren durch eine höhere Anzahl an Basen-Triplets codiert werden als andere. So wird z.B. die Aminosäure L-Methionin nur durch ein Codon repräsentiert, wohingegen z.B. L-Valin durch vier und L-Leucin durch sechs Codons codiert werden. Dies bedeutet zum einen, dass bestimmte Aminosäuren statistisch betrachtet öfter auftreten als andere, aber auch, dass nicht jede Basen-Mutation zu einem Aminosäureaustausch führt [Jaeger et. al., 2001], weiterhin finden nicht alle Basenaustausche mit der gleichen Wahrscheinlichkeit bzw. Häufigkeit statt. Diese Limitierung kann jedoch durch die Anwendung einer Sättigungsmutagenese umgangen werden, falls in der Zufallsmutagenese eine interessante Position identifiziert werden konnte.

Bei einer Sättigungsmutagenese wird die Aminosäure an der betreffenden Position gegen alle anderen natürlichen Aminosäuren ausgetauscht. Es sind verschiedenen Methoden zur Sättigungsmutagenese publiziert worden [Reetz, 2011; Arnold und Georgiou, 2003] jedoch ist die sogenannte „quick change“ PCR die einfachste und heute am häufigsten verwendete. Bei dieser Methode werden spezifische Primer in der PCR eingesetzt, die zueinander komplementär sind und eine Degenerierung wie z.B. NNK (N: Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin; K: Guanin, Thymin) tragen. Die Degenerierung NNK beinhaltet 32 Codons, die den theoretischen Austausch gegen alle proteinogenen Aminosäuren ermöglichen [Reetz, 2011]. Diese spezifischen Primer werden in einer PCR zur Amplifizierung des gesamten Plasmids mit dem zu mutierendem Gen eingesetzt. Ein großer Vorteil der „quick change“ PCR Methode ist, dass die DNA nach Einführung der Mutation(en) als Plasmid vorliegt und nicht für eine Transformation vorbereitet werden muss.

Bei Anwendung von rekombinativen Methoden werden Mutationen in der Gensequenz durch das Fragmentieren und Zusammenfügen von DNA in einer neuen Kombination eingeführt. Ein Beispiel für ein solches rekombinatives Mutationsverfahren ist das DNA-Shuffling [Stemmer, 1994], bei dem verwandte Gene durch das DNA Restriktionsenzym DNase I zufällig fragmentiert werden. Anschließend werden die entstandenen DNA-Fragmente miteinander rekombiniert.

Den Ausgangspunkt der gerichteten Evolution eines Enzyms stellt im Normalfall der Wildtyp dar, für den mittels Mutagenese eine Bibliothek von Genvarianten hergestellt wird. Durch ein geeignetes Screeningverfahren können nun die Enzyme der Mutantenbibliothek mit einer gegenüber dem Wildtyp verbesserten Eigenschaft identifiziert werden. Um maßgeschneiderte Enzyme mit Methoden der gerichteten Evolution zu generieren, ist es oft nötig, Genbanken mit mehreren zehntausend Klonen zu untersuchen, was einen bedeutenden Zeit- und Kostenfaktor darstellt. Nach dem heutigen Stand der Technik ist es jedoch möglich, dass diese Verfahren auch automatisiert als Hochdurchsatz-Screeningverfahren im Mikrotiterplatten-Maßstab mit Robotern durchgeführt werden, was zu einem deutlich geringeren Zeit- und Arbeitsaufwand führt.

Ein großer Vorteil der gerichteten Evolution ist es, dass die möglicherweise in der ersten Generation gefundenen Enzymvarianten durch weitere Mutation(en) optimiert werden können, man spricht in diesem Fall dann von der iterativen Mutagenese.

3. Die Ketosäure α -Ketoglutarat

Die Ketosäure α -Ketoglutarat (2-Oxoglutarinsäure, 2-Oxo-pentan-1,5-dicarbonsäure, α -KG) ist ein wichtiges Zwischenprodukt im Tricarbonsäurezyklus und im Aminosäurestoffwechsel bzw. Stickstoffmetabolismus [Verseck et al., 2009]. Aufgrund seiner vielfältigen Einsatz-Möglichkeiten stellt α -KG heute einen sehr interessanten Synthesebaustein für die chemische und pharmazeutische Industrie dar [Otto et al., 2011].

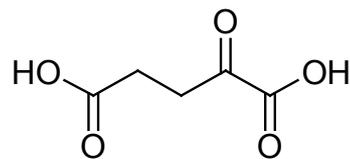


Abbildung 1: Struktur von α -Ketoglutarat (α -KG)

So findet α -KG z. B. in der Herstellung bestimmter Pflanzenschutzmittel sowie als Bulkchemikalie Verwendung [Verseck et al., 2007; Blitzke et al., 1993, 1994]. Stottmeister beschrieb 2005 die hohe Bedeutung von α -KG als Synthesebaustein bzw. Vorstufe für chemische Synthesen, wie z.B. Kondensations- und Cyclo-Kondensationsreaktionen, und zeigte die Möglichkeit der Synthese von über 70 neuen und interessanten Verbindungen auf Grundlage von α -KG als Ausgangsstoff organischer Synthesen auf [Stottmeister et al., 2005].

Ein innovatives Einsatzgebiet ist die Verwendung bei der Herstellung von neuartigen Elastomeren mittels Polykondensation mit Glycerol, 1,2,4-Butanetriol oder auch 1,2,6-Hexanetriol [Barrett und Yousaf, 2008], wobei die entstehenden Elastomere chemische und mechanische Eigenschaften besitzen, die sie für einen Einsatz in der Bio- bzw. Pharmamedizin höchst interessant machen.

Größere Bedeutung hat es als Nahrungsergänzungsmittel bei chronischen Erkrankungen des Stoffwechsels sowie als Zusatz in Infusionslösungen [Otto et al., 2011; Verseck et al., 2007]. Weiterhin wird α -KG gemeinsam mit 5-Hydroxymethylfural für die Synthese von Wirkstoffen eingesetzt, die in der Lage sind, menschliche Zellen vor oxidativem Stress zu schützen [Moser et al., 2007]. Die verschiedenen Einsatzmöglichkeiten von α -KG wurden von Otto zusammengefasst und in einem Review publiziert [Otto et al., 2011].

3.1 Verfahren zur Darstellung von α -KG

3.1.1 Verfahren zur chemischen Darstellung von α -KG

Nach dem heutigen Stand der Technik sind verschiedene chemische Verfahren zur Synthese von α -KG verfügbar. Ein bisher gängiges Syntheseverfahren stellt die chemische Transaminierung von Glyoxalsäure und L-Glutamat unter Verwendung eines Kupferkatalysators dar. Nachteilig zeigt sich bei diesem Prozess allerdings die unerwünschte Nebenproduktbildung in Form von Glycin und anderen organischen Säuren [Timmler und Wegler, 1971], die eine hohe Produktreinheit verhindern und die Produktaufarbeitung erschweren. In der Patentschrift CH000000509960A aus dem Jahre 1971 ist ein Verfahren zur Herstellung von α -KG durch die Umsetzung von α - α -Dichlorglutarsäure als Erdalkalisalz in Suspension oder wässriger Lösung mit Salzen aus schwachen Säuren und starken Basen bei erhöhter Temperatur beschrieben [Timmler und Wegler, 1971].

Weiterhin ist die chemische Synthese aus Succinat- und Oxalat-diethylester möglich, ebenso die Synthese via Cyanhydrinen oder der Hydrolyse von Acyl-Cyaniden [Stottmeister et al., 2005]. Zusammenfassend bringen die bis heute bekannten und durchgeführten chemischen Synthesemethoden viele Nachteile mit sich: Hohe Prozesskosten, Einsatz toxischer Chemikalien und Katalysatoren, Produktion von kritischen Abwässern sowie hohe unerwünschte Nebenproduktbildung [Otto et al., 2011; Timmler und Wegler, 1971].

3.1.2 Verfahren zur biotechnologischen Darstellung von α -KG

In Publikationen sowie in Patentschriften sind verschiedenen Möglichkeiten zur biotechnologischen Produktion von α -KG aufgeführt und beschrieben. Zur Produktion von α -KG werden hierbei in der Hauptsache fermentative Verfahren eingesetzt, bei denen sowohl Bakterien als auch Hefen Verwendung finden.

Durch Lockwood und Stodola konnte α -KG als Fermentationsprodukt von *Pseudomonas fluorescens* nachgewiesen werden [Lockwood und Stodola, 1946], diese Ergebnisse wurden durch die Untersuchungen von Koepsell bestätigt [Koepsell et al., 1952]. Hockenull und Mitarbeiter nutzen *Penicillium chrysogenum* zur fermentativen Produktion von α -KG auf Grundlage von L-Lactat [Hockenull et al., 1951].

Weiterhin wurde der Einsatz verschiedener Bakterien wie z.B. *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Bacillus natto*, oder *Gluconoacetobacter cerinum* zur fermentativen Überproduktion von α -KG auf der Grundlage von Glucose untersucht und beschrieben [Kosheleva et al., 1967]. Die Patentschriften DE0000014422-62A und -59A aus den Jahren 1964 und 1965 betreffen fermentative Verfahren zur Herstellung von α -KG aus Kohlenwasserstoffen mittels *Micrococcus paraffinolyticus*, *Brevibacterium ketoglutamicus*, *Arthrobacter roseoparaffinius* sowie *Arthrobacter hydrocarboglutamicus* [Tanaka et al., 1964; Tanaka et al., 1965], hierbei wurden Produktkonzentrationen von bis zu 50 g l⁻¹ erreicht, bei einer Substrat-bezogenen Ausbeute von 50 %.

Verschiedene weitere Mikroorganismen, die in der Lage sind, α -KG auf fermentativem Wege zu bilden, sind in den Patentschriften US3450599 sowie US3616213 aufgeführt [Tsugawa et al., 1971; Tanaka et al., 1969]. So ist es durch den Einsatz von *Arthrobacter paraffineus* Zellen möglich, auf der Grundlage von n-Paraffinen eine α -KG Produktkonzentration von 60 g l⁻¹ zu erreichen.

Die Patentschrift DE102007051452A1 aus dem Jahre 2007 behandelt ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von α -KG aus nachwachsenden Rohstoffen unter Nutzung eines *Corynebacterium glutamicum* Stamms [Verseck et al., 2007]. Der Einsatz ganzer *Aerobacter* Zellen zur Herstellung von α -KG ist in der Patentschrift US3022223 aus dem Jahre 1962 aufgeführt, wohingegen in der Patentschrift US3450599 *Arthrobacter simplex* sowie *Arthrobacter hydrocarboglutamicus* eingesetzt wurden [Borel et al., 1962; Tanaka et al., 1969].

Milton und Robinson untersuchten und charakterisierten die Synthese von α -KG durch die reduktive Carboxylierung von Succinat durch den Einsatz ganzer *Bacteroides ruminicola* Zellen sowie Zellrohextrakt [Milton und Robinson, 1970].

Seit Mitte der 1960er Jahre ist bekannt, dass bestimmte Stämme der Hefegattungen *Candida* und *Yarrowia* große Mengen an Ketosäuren auf Grundlage von Kohlenwasserstoffen und anderen Substraten infolge von Wachstumslimitationen synthetisieren können [Finogenova et al., 1968; Tsugawa et al., 1969]. Im Falle von α -KG ist eine Thiamin-Limitierung erforderlich, da die Thiamin-abhängige α -Ketoglutarat-Dehydrogenase unter diesen Bedingungen inaktiviert wird, was zu einer Überproduktion und Exkretion von α -KG führt.

Die fermentative Gewinnung von α -KG erfolgt heute bevorzugt mit Hilfe von Hefen der Gattung *Yarrowia* [Zhang et al., 2009; Aurich und Stottmeister, 2006; Weissbrodt et al., 1989], insbesondere *Yarrowia lipolytica* zeichnet sich durch eine hohe Vielfalt an einsetzbaren Substraten zur α -KG Produktion aus.

Neben Kohlenwasserstoffen fossiler Herkunft können auch Glucose und andere nachwachsende Rohstoffe wie z.B. Ethanol, Raps-, Sonnenblumenöl und Glycerol durch die Hefe zur Produktion von α -KG genutzt werden [Finogenova et al., 2005]. Für den Stamm *Yarrowia lipolytica* H222-27-11 wird in der Patentschrift DD267999 eine α -KG-Bildung von 195 g l^{-1} innerhalb eines Zeitraumes von 140 h aus n-Alkanen beschrieben [Weissbrodt et al., 1989]. Die Nutzung von Ethanol zur fermentativen Produktion von α -KG wurde durch Chernyavskaya und Mitarbeiter berichtet. Hierbei konnte eine maximale Produktkonzentration von 49 g l^{-1} erreicht werden, was einer Substratbezogenen Ausbeute von 42 % entspricht [Chernyavskaya et al., 2000]. Unter Verwendung des alternativen Stammes *Y. lipolytica* H355 konnten aus Raps- und Pflanzenöl α -KG-Konzentrationen von 125 g l^{-1} erzielt werden [Aurich und Stottmeister, 2006].

Die enzymatische Synthesemöglichkeit von α -KG durch die L-Glutamat-Dehydrogenase aus *Clostridium symbiosum* wurde durch Ödman beschrieben, das eingesetzte Enzym erscheint unter ökonomischen Gesichtspunkten allerdings wenig attraktiv, da nur niedrige Konzentrationen von 5 mM Substrat umgesetzt werden konnten [Ödman et al., 2004]. Kürzlich wurde der Einsatz einer L-Aminosäure-Deaminase zur Produktion von α -KG aus L-Glutamat beschrieben [Liu et al., 2013], mit diesem System konnten jedoch ebenfalls nur geringe Substratkonzentrationen umgesetzt und niedrige Produktausbeuten erreicht werden.

Die heute bekannten und durchgeführten biotechnologischen Synthesemöglichkeiten bzw. Produktionsverfahren von α -KG sind in der nachfolgenden Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle1: Publierte biotechnologische Produktionsverfahren für α -KG (RZA = Raum-Zeit-Ausbeute, bezogen auf die Gesamtdauer des Verfahrens).

Verfahren	Substrat	α -KG (g L ⁻¹)	RZA (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Referenz
Fermentation				
<i>Torulopsis glabrata</i> M202019	Glucose	37,7	0,52	Zhang et al., 2009
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B-6	Glucose	41	0,14	Koepsell et al., 1952
<i>Yarrowia lipolytica</i> H222-27-11	n-Alkane	195	1,40	Weissbrodt et al., 1989
<i>Yarrowia lipolytica</i> WT	n-Alkane	109		Finogenova et al., 2005
<i>Yarrowia lipolytica</i> Mutant N1	Ethanol	49	0,34	Chernyavskaya et al., 2000
<i>Arthrobacter paraffineus</i>	n-Paraffine	60	0,83	Tabaka et al., 1969
<i>Yarrowia lipolytica</i> D1805	n-Paraffine	185	-	Maldonado et al., 1976
<i>Yarrowia lipolytica</i> H355	Rapsöl	120	0,44	Aurich und Stottmeister, 2006
<i>Yarrowia lipolytica</i> H355	Pflanzenöle	125	0,50	Aurich und Stottmeister, 2006
<i>Yarrowia lipolytica</i> H355	Glycerol	38	0,10	Aurich und Stottmeister, 2006
Biotransformation				
L-Glutamat- Dehydrogenase	L-Glutamat	0,7	0,04	Ödman et al., 2004
L-Aminosäure- Deaminase	L-Glutamat	1,5	0,25	Liu et al., 2013

3.1.3 Die Aminosäure L-Glutamat

Die zu α -KG korrespondierende Aminosäure L-Glutamat (L-Glutaminsäure, 2-Aminoglutarensäure, L-Glu) zählt zu den nicht-essentiellen α -Aminosäuren. L-Glu besitzt eine wichtige Funktion als Intermediat für die Proteinbiosynthese und ist ein zentraler Metabolit, welcher in der Synthese anderer Aminosäuren eine entscheidende Rolle spielt.

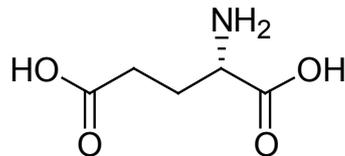


Abbildung 2: Struktur von L-Glutamat (L-Glu)

Industrielle und wirtschaftliche Bedeutung hat L-Glu durch seine Verwendung als Geschmacksverstärker in Form von Natriumglutamat gewonnen. Natriumglutamat bewirkt den sogenannten „umami“ Geschmack und kommt natürlicherweise in verschiedenen Lebensmitteln wie z.B. Tomaten, Käse oder auch Sojabohnen vor [Dermiki et al., 2013]. Dieser „umami“ Geschmack signalisiert dem Körper, dass das Nahrungsmittel eine hervorragende Eiweiß- und Energiequelle darstellt. Es verstärkt den Eigengeschmack von Lebensmitteln und findet heute in hohem Maßstab Anwendung in der asiatischen Küche sowie in der Produktion von Fertiggerichten [Dermiki et al., 2013; Halpern, 2000; Jinap et al., 2010]. Die Entwicklungen und Erfindungen der letzten Jahre bzw. Jahrzehnte in der fermentativen Herstellung von Aminosäuren machen es heute möglich, diese in großem Maßstab und zu geringen Kosten herzustellen. Insbesondere L-Glu kann mittels Fermentation von *Corynebacterium glutamicum* sehr kostengünstig und in großtechnischem Maßstab produziert werden [Asakura et al., 2007; Schulz et al., 2007; Sano, 2009]. Unter Biotin-limitierenden Wachstumsbedingungen bzw. unter Zusatz bestimmter induzierender Substanzen ist dieses Bakterium in der Lage, L-Glu in hoher Reinheit und Quantität herzustellen. Das Mononatrium-Salz von L-Glu ist heute einer der weltweit gebräuchlichsten Geschmacksverstärker mit einer jährlichen Produktion von etwa 1,5 bis 2,0 Millionen Tonnen [Hermann et al., 2003; Kataoka et al., 2006; Sano, 2009], bei der auch nachwachsende Rohstoffe wie z.B. Glucose zum Einsatz kommen.

4. Oxidoreduktasen

Oxidoreduktasen katalysieren sogenannte Redoxreaktionen, bei diesen findet sowohl eine Reduktionsreaktion als auch eine Oxidationsreaktion statt. In Abhängigkeit von der Reaktionsrichtung wird hierbei entweder das Substrat oxidiert und der genutzte Cofaktor reduziert oder das Substrat reduziert und der Cofaktor oxidiert. Zu den Oxidoreduktasen werden die Dehydrogenasen, die Oxygenasen sowie die Oxidasen gezählt. Alle der bisher bekannten Oxidoreduktasen sind für ihre katalytische Aktivität auf Cofaktoren angewiesen. Nach Reid und Fewson werden die Oxidoreduktasen in Abhängigkeit vom verwendeten Cofaktor in drei Kategorien unterteilt [Reid und Fewson, 1994]:

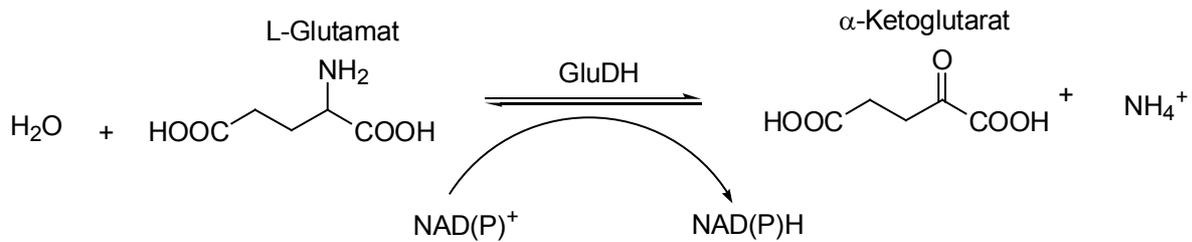
- I. NAD(P)(H)-abhängige Dehydrogenasen
- II. F420- oder PQQ-abhängige Dehydrogenasen
- III. FAD-abhängige Oxidasen

Enzyme, die nicht auf Cofaktoren angewiesen sind, besitzen natürlicherweise in der enzymatischen Synthese von Zielsubstanzen das größere Potential, da sie keine zusätzlichen Kosten für den Cofaktor bzw. ein Regenerierungssystem verursachen. Jedoch hat in den letzten Jahrzehnten die Bedeutung von Oxidoreduktasen, insbesondere der Dehydrogenasen, in der industriellen enzymatischen Synthese stark zugenommen [Hummel und Kula, 1989; Kula und Kragl, 2000; Devaux-Basseguy et al., 1997]. Vor allem in der Produktion von enantiomerenreinen Verbindungen und sogenannten Bulkchemikalien haben die Dehydrogenasen eine hohe Bedeutung erlangt und werden heute als Biokatalysatoren sowohl in Form von isolierten Enzymen als auch als Ganzzell-Systeme in einer wachsenden Anzahl von präparativen Prozessen eingesetzt.

4.1 L-Glutamat-Dehydrogenasen

L-Glutamat-Dehydrogenasen (L-Glutamat NAD(P) Oxidoreduktase, GluDH, EC 1.4.1.2 – 1.4.1.3) katalysieren die reversible NAD(P)⁺-abhängige Desaminierung von L-Glu zu α -KG und Ammonium [Smith et al., 1975], wobei das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite der Aminosäurebildung liegt [Engel und Dalziel, 1969].

Bei der Desaminierung von L-Glu wird als erstes die Aminogruppe zur Iminogruppe oxidiert, wobei ein Hydrid-Ion auf NAD(P)⁺ übertragen wird. In einem zweiten Schritt wird die Iminogruppe hydrolytisch abgespalten und es entstehen α -KG sowie Ammonium. Die Reaktion der GluDH in der reversiblen oxidativen Desaminierung von L-Glu ist in Schema 1 dargestellt.



Schema 1: Reaktionsschema der GluDH in der reversiblen NAD(P)^+ -gekoppelten oxidativen Desaminierung von L-Glu.

Die GluDH gehört der Familie der Aminosäure-Dehydrogenasen an und nimmt in dieser aufgrund ihrer hohen Substratspezifität eine gewisse Sonderstellung ein. Andere Mitglieder der Superfamilie wie z.B. die L-Leucin-Dehydrogenase und die L-Valin-Dehydrogenase sind dagegen in der Lage, die reversible oxidative Desaminierung von verschiedenen Aminosäuren zu katalysieren [Schütte et al., 1985; Priestley und Robinson, 1989].

In der Literatur ist eine große Anzahl an GluDHs unterschiedlicher Herkunft beschrieben und charakterisiert [Andersson und Roger, 2003; Miñambres et al., 2000; Hudson und Daniel, 1993]. GluDHs können in der Natur nahezu überall gefunden werden, sie kommen in allen drei Domänen des Lebens vor [Hudson und Daniel, 1993]. Bis heute wurden vor allem Enzyme aus Bakterien wie z.B. *Clostridium symbiosum* [Teller et al., 1991], *Pyrococcus furiosus* [Robb et al., 1992], *Psychrobacter* sp. TAD1 [Camardella et al., 2002] und *Halobacterium salinarum* [Ingoldsby et al., 2005] isoliert und charakterisiert. Daneben sind verschiedene Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* [Cammaerts et al., 1985], Tabak [Skopelitis, et al., 2007] und Sojabohne [Shargool und Jain, 1989] als Produzenten von GluDHs beschrieben.

GluDHs stellen eine sehr wichtige Gruppe von Enzymen im Metabolismus der meisten Lebewesen dar, da sie die entscheidende Verbindung zwischen dem Kohlenstoff- und dem Stickstoffkreislauf darstellen [Smith und Stanley, 2008]. Sie sind an der Ammonium-Assimilierung und -Dissimilierung beteiligt [Hudson und Daniel, 1993].

Basierend auf der unterschiedlichen Cofaktorspezifität werden die GluDHs in drei Gruppen eingeteilt [Smith et al., 1975; Hudson und Daniel, 1993].

I: NADP(H)- spezifische GluDHs (EC 1.4.1.4), die *in vivo* die Ammonium-Aufnahme und -Verwertung durch die reduktive Aminierung von α -KG zu L-Glu katalysieren, welches dann in der Synthese von Aminosäuren mittels Transaminierungsreaktionen weitere Verwendung findet. Sie übernehmen eine anabolische Funktion innerhalb der Zelle und kommen in Eukaryoten, Eubakterien sowie Archaeen vor [Consalvi et al., 1991].

II: NAD(H)-spezifische GluDHs (EC 1.4.1.2), kommen in Bakterien, Pflanzen und Pilzen vor und besitzen *in vivo* eine katabolische Funktion, indem sie den Abbau von L-Glu zu α -KG katalysieren, welches anschließend dem Stoffwechsel des Organismus zugeführt wird [Smith et al., 1975].

III: NADP(H)/NAD(H)-spezifische GluDHs (EC 1.4.1.3), die *in vivo* sowohl eine anabolische als auch eine katabolische Funktion besitzen und in höheren Eukaryoten zu finden sind [Smith et al., 1975].

In Betracht auf die physiologische Aufgabe von GluDHs liefert die Cofaktorabhängigkeit also eindeutige Hinweise auf metabolische Kreisläufe und Prozesse, in denen das jeweilige Enzym involviert ist. Zusammenfassend können GluDHs höherer Eukaryoten beide Cofaktoren (NADH und NADPH) nutzen, wohingegen die GluDHs aus Eubakterien, Archaeen und niederen Eukaryoten auf einen bestimmten Cofaktor (NADH oder NADPH) angewiesen sind [Smith et al., 1975; Hudson und Daniel, 1993]. Es existieren ebenfalls Organismen, die zwei Enzyme mit unterschiedlicher Cofaktorabhängigkeit besitzen, so z.B. *Neurospora crassa*, welche sowohl eine NAD(H)-spezifische als auch eine NADP(H)-spezifische GluDH produziert [Grover und Kapoor, 2009]. Der Zellmetabolismus besitzt aufgrund der unterschiedlichen Cofaktorspezifität der Enzyme die Möglichkeit, für die Verbindungen α -KG und L-Glu katabole und anabole Stoffwechselforgänge voneinander getrennt zu halten.

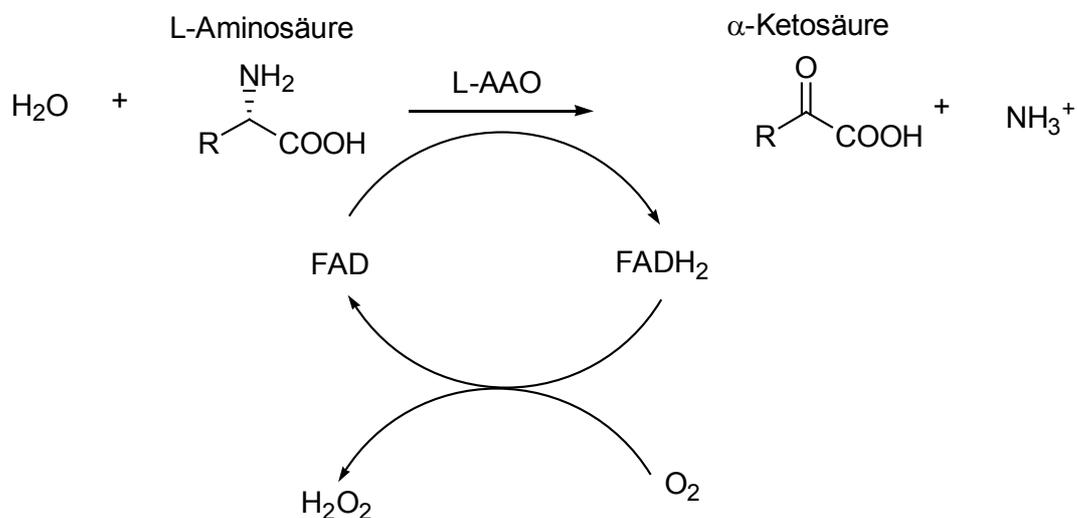
Neben der Identifizierung einer großen Anzahl an Primärsequenzen gelang es auch zahlreiche dreidimensionale Strukturen von GluDHs aufzuklären. So wurden unter anderem die Strukturen der Enzyme aus *Clostridium symbiosum* [Baker et al., 1992], *Thermococcus litoralis* [Britton et al., 1995], *Thermotoga maritima* [Knapp et al., 1997] und *Pyrococcus furiosus* [Lebbink et al., 1995] gelöst und beschrieben.

4.1.1 Einsatz von GluDHs in der Biotechnologie

Das bekannteste Beispiel für eine biotechnologische Anwendung der GluDH stellt die Herstellung von L-Glu mit *C. glutamicum* dar [Kataoka et al., 2006; Schultz et al., 2007]. Unter bestimmten Bedingungen ist *C. glutamicum* in der Lage, L-Glu mittels der zelleigenen GluDH zu produzieren und in hohen Konzentrationen im Kultivierungsmedium anzureichern [Gutmann et al., 1992]. Heute wird mit Hilfe von *C. glutamicum* eine jährliche Produktion von etwa 1,5 bis 2,0 Millionen Tonnen L-Glu erzielt [Hermann et al., 2003; Kataoka et al., 2006; Sano, 2009]. Aufgrund ihrer oftmals hohen Substratspezifität sind GluDHs weiterhin von speziellem Interesse für den Einsatz als Biosensor in der Analytik von Aminosäuren [Tian et al., 2009]. Eine weitere biotechnologische Nutzung stellt der Einsatz als System zur Cofaktorregenerierung in einer Vielzahl von gekoppelten Reaktionen mit anderen Dehydrogenasen dar [Weckbecker et al., 2010; Chenault et al., 1988; Zhao und Van der Donk, 2003].

4.2 L-Aminosäure-Oxidasen

L-Aminosäure-Oxidasen (L-AAO) (EC 1.4.3.2) katalysieren die irreversible oxidative Desaminierung von L-Aminosäuren zu Ketosäuren unter Abspaltung der Aminogruppe und Freisetzung von Wasserstoffperoxid. Das Reaktionsschema ist nachfolgend dargestellt (Schema 2). Hierbei werden beide Reaktionsschritte durch die L-Aminosäure-Oxidase katalysiert, die oxidative Überführung der Aminosäure zur Iminosäure, und die anschließende Hydrolyse der Iminosäure zur Ketosäure [Pawelek et al., 2000]. Der beteiligte Cofaktor FAD ist innerhalb der Enzymstruktur fest verankert und wird nach der Reaktion durch molekularen Sauerstoff regeneriert, was unter Bildung von Wasserstoffperoxid geschieht.



Schema 2: Reaktionsschema der L-Aminosäure-Oxidase (L-AAO) in der irreversiblen oxidativen Desaminierung von L-Aminosäuren

Analog oxidieren D-Aminosäure-Oxidasen (D-AAO, EC 1.4.3.3) D-Aminosäuren zu den entsprechenden Ketosäuren. Im Vergleich zum Reaktionsmechanismus der L-AAO läuft hier jedoch die Hydrolyse der Iminosäure zur Ketosäure und zu Ammonium interessanterweise nicht enzymkatalysiert sondern spontan ab [Pilone, 2000].

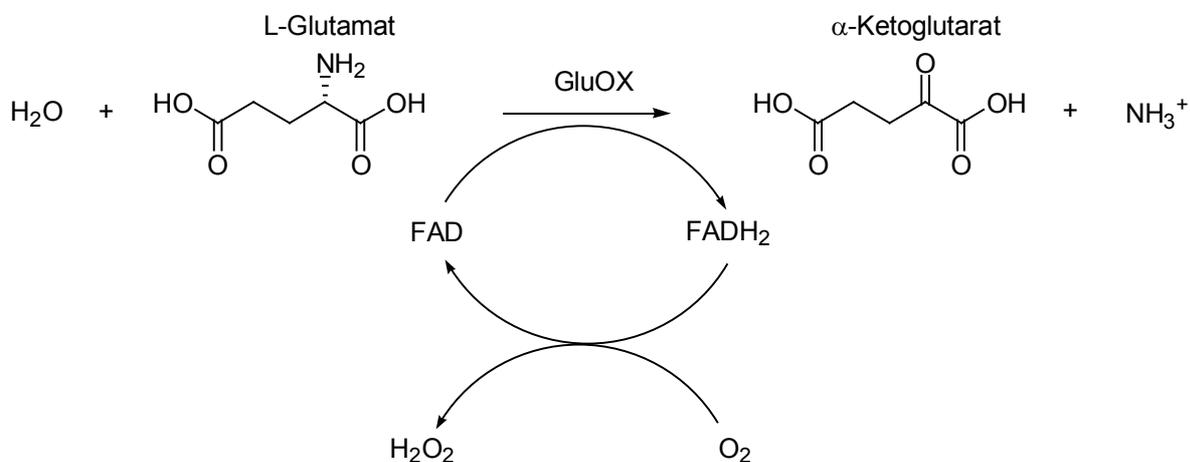
Das Vorkommen von L-AAOs ist in der Natur weit verbreitet, Mitglieder dieser Enzymklasse sind in verschiedensten Quellen identifiziert worden. Der erste Vertreter der Klasse dieser Enzyme wurde durch Zeller und Maritz aus Schlangengift isoliert [Zeller und Maritz, 1948]. Heute stellen die L-AAOs aus Schlangengift den größten Anteil an den bisher bekannten Enzymen und sind ebenfalls die am besten untersuchten Mitglieder dieser Enzymklasse [Macheroux et al., 2001; Tan und Fung, 2008]. So werden die Enzyme aus *Crotalus adamanteus* und *Crotalus atrox* ausführlich in der Literatur beschrieben [Findrik und Vasic Racki, 2008; Findrik et al., 2005; Findrik et al., 2012; Findrik et al., 2006; Tan und Fung, 2008]. Weiterhin wurden L-AAOs in verschiedenen Bakterien wie *Corynebacterium hydrocarboclastus* [Coudert et al., 1975], *Rhodococcus opacus* [Geueke et al., 2002; Geueke und Hummel, 2003], *Lechevalieria aerocolonigenes* [Nishizawa et al., 2005] und *Bacillus carotarum* [Brearley et al., 1994] nachgewiesen und untersucht. Auch Algen [Pistorius et al., 1980] und Phytoplankton [Palenik et al., 1990] sind in der Lage, L-AAOs zu bilden. Pilze wie *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* sowie *Aspergillus fumigatus* besitzen L-spezifische Enzyme mit breitem Substratspektrum [Singh et al., 2009; Nuutinen et al., 2012; Schilling und Lerch, 1995].

Die meisten der bisher identifizierten und in der Literatur beschriebenen L-AAO weisen ein breites Substratspektrum auf, akzeptieren also eine größere Anzahl an L-Aminosäuren als Reaktionspartner. Die meisten dieser Enzyme mit einem breiten Substratspektrum zeigen hauptsächlich Aktivität gegenüber basischen, hydrophoben und solchen Aminosäuren, die eine positiv geladene Seitenkette besitzen. Im Allgemeinen werden hydrophobe Aminosäuren wie L-Tryptophan oder L-Methionin bevorzugt. Saure Aminosäuren wie L-Glu oder L-Asparagin werden durch diese Enzyme nicht oder wenn nur in geringem Maße als Substrat akzeptiert [Geueke et al., 2002; Ponnudurai et al., 1994]. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Enzymen mit breitem Substratspektrum weisen einige wenige L-AAOs ein deutlich eingeschränktes Substratspektrums auf, sie katalysieren ausschließlich die Oxidation einer oder einiger weniger L-Aminosäuren. In der Literatur werden sie aufgrund ihrer hohen Spezifität auch als L-Lysin-Oxidase [Kusakabe et al., 1980; Lukasheva und Berezov, 2002], L-Phenylalanin-Oxidase [Koyama et al., 1984], L-Aspartat-Oxidase [Mortarino et al., 1996] bzw. als L-Glutamat-Oxidase [Kusakabe et al., 1983] bezeichnet.

Bisher sind verschiedene natürliche biologische Funktionen von L-AAOs bekannt. Im Gift verschiedener Schlangen kommt das Enzym in hohen Konzentrationen vor und wird in direktem Zusammenhang mit dessen Toxizität gebracht [Ahn; et al., 1997], da Untersuchungen darauf hinweisen, dass diese Enzyme Effekte wie Apoptose sowie Hämolyse auslösen können [Suhr und Kim, 1996; Torii et al., 1997]. Verantwortlich hierfür ist mit hoher Wahrscheinlichkeit Wasserstoffperoxid, das als Nebenprodukt der Reaktion entsteht, da die toxische Wirkung der L-AAOs durch Zusatz von Katalase unterdrückt werden kann [Torii et al., 1997]. Weiterhin ist eine Beteiligung am Stickstoff- und Aminosäure-Metabolismus in verschiedenen Mikroorganismen nachgewiesen worden; so werden die Enzyme in *Neurospora crassa* und *Chlamydomonas reinhardtii* unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen sowie in Anwesenheit von Aminosäuren induziert [DeBusk und Ogilvie, 1984; Munoz-Blanco et al., 1990].

4.2.1 L-Glutamat-Oxidasen

L-Glutamat-Oxidasen (GluOX, EC. 1.4.3.11) katalysieren die nicht-reversible oxidative Desaminierung von L-Glu zu α -KG unter Freisetzung von Ammoniak und Wasserstoffperoxid (Schema 3).



Schema 3: Reaktionsschema der L-Glutamat-Oxidase (GluOX) in der irreversiblen oxidativen Desaminierung von L-Glu.

Erstmals wurde das Enzym GluOX im Jahre 1983 von Kamei und Mitarbeitern aus *Streptomyces violascens* isoliert und näher beschrieben [Kamei et al., 1983]. Kusakabe gelang 1983 die Identifizierung und Isolierung einer GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119 [Kusakabe et al., 1983].

Später konnten weitere GluOXs in verschiedenen anderen *Streptomyces* Arten wie *Streptomyces endus* [Böhmer et al., 1989], *Streptomyces* sp. 18G [Wachiratianchai et al., 2004] sowie *Streptomyces* sp. P-106 [Bang-Ce et al., 1995] nachgewiesen und beschrieben werden. Das Enzym aus *Streptomyces* sp. X-119-6 konnte erfolgreich rekombinant in *E. coli* hergestellt, gereinigt und hinsichtlich der biochemischen Eigenschaften charakterisiert werden [Arima et al., 2003; Arima et al., 2009; Utsumi et al., 2012].

GluOXs sind bisher vorzugsweise in der Biosensorik zum Nachweis von L-Glu genutzt worden [Ryan et al., 1997; Basu et al., 2006; Upadhyay et al., 2006; Tian et al., 2009; Li et al., 1996]. Weiterhin wurden sie als Hilfsenzyme in der Aktivitätsbestimmung von Enzymen eingesetzt, so nutzten Upadhyay und Sukhacheva eine GluOX in einem Analysesystem zur Bestimmung der Aktivitäten von L-Glutamat-Pyruvat-Transaminase, L-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase sowie γ -Glutamyl-Transpeptidase [Upadhyay et al., 2006; Sukhacheva et al., 2004]. Eine präparative Anwendung von GluOX wurde bisher nicht beschrieben.

4.2.2 Einsatz von D- oder L-Aminosäure-Oxidasen in der Biotechnologie

Das hohe Potential von Aminosäure-Oxidasen als Biokatalysator für verschiedene Einsatzgebiete führte in den letzten Jahren zu einer verstärkten Forschung zur funktionellen heterologen Expression in unterschiedlichen Expressionssystemen. So konnte z.B. die L-AAO aus *Rhodococcus opacus* durch Geueke erfolgreich rekombinant in *Streptomyces lividans* hergestellt und gereinigt werden [Geueke et al., 2002].

L-AAOs fanden bisher Anwendung in der Darstellung von enantiomerenreinen D- bzw. L-Aminosäuren. Findrik und Vasic-Racki setzten die Enzyme aus *Crotalus adamanteus* und *Crotalus atrox* für die Racematspaltung von D/L-Methionin bzw. die Produktion der D-Aminosäure ein [Findrik und Vasic-Racki, 2008]. Die L-AAO aus *Rhodococcus* sp. Z-35-1 wurde bei der Synthese verschiedener D-Aminosäuren aus den korrespondierenden racemischen Gemischen eingesetzt [Isobe et al., 2010]. Weiterhin ist bekannt, dass der Einsatz von L-AAOs bzw. D-AAOs zur Produktion von Ketosäuren aus Aminosäuren möglich ist [Brodellius et al., 1981; Szwajcer et al., 1982; Upadhyay et al., 1999]. In der Literatur sind hierzu verschiedene Beispiele aufgeführt. Der Einsatz von D-AAOs zur Produktion der Antibiotika Vorstufe 7-Aminocephalosporansäure aus Cephalosporin C ist in der Literatur ausführlich beschrieben und wird heute als industrieller Prozess durchgeführt [Pollegioni et al., 2004; Pilone und Pollegioni, 2002].

Weiterhin wurde L-DOPA durch den Einsatz der L-AAO aus *C. adamanteus* in die korrespondierende Ketosäure überführt [Findrik et al., 2005]. α -Ketoisocaproat kann durch Biotransformation mittels ganzer *R. opacus* Zellen, die Träger einer L-AAO sind, aus L-Leucin hergestellt werden [Zhu et al., 2011]. Eine große Anzahl an Veröffentlichungen beschreibt den Einsatz von L-AAOs als Bestandteil von Biosensoren, die für den *in vivo* und *in vitro* Nachweis von Aminosäuren eingesetzt werden [Ryan et al., 1997; Chen et al., 1991; Basu et al., 2005; Tian et al., 2009].

4.3 L-Aminosäure-Transaminasen

L-Aminosäure-Transaminasen (L-Aminosäure-Transferasen, LAT) katalysieren den reversiblen Transfer der Aminogruppe von L-Aminosäuren (Amino-Donor) zu Ketosäuren (Amino-Akzeptor), wobei jeweils eine neue Aminosäure und Ketosäure entstehen [Shin und Kim, 2001; Taylor et al., 1998], das Reaktionsschema ist im Schema 4 dargestellt. Die LATs besitzen eine zentrale Rolle in der Synthese der proteinogenen Aminosäuren [Herrmann et al., 1983].

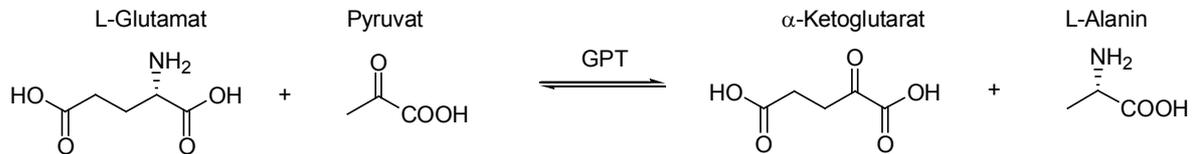


Schema 4: Reaktionsschema der L-Aminosäure-Transaminase (LAT) beim reversiblen Transfer der Aminogruppe einer L-Aminosäure (Amino-Donor) zu einer Ketosäuren (Amino-Akzeptor)

LATs sind für ihre katalytische Aktivität nicht auf externe Cofaktoren angewiesen. Sie gehören zur Klasse der Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzyme, die Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) als prosthetische Gruppe besitzen und für ihre Reaktion nutzen [Shin und Kim, 2001]. Das PLP ist innerhalb der Struktur von LAT fest verankert, wie typisch für PLP-abhängige Enzyme ist es über eine Schiff'sche Base gebunden [Christen und Mehta, 2001].

4.3.1 L-Glutamat-Pyruvat-Transaminase

Die L-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT, EC 2.6.2.1) katalysiert den reversiblen Transfer der Aminogruppe von L-Glu auf Pyruvat, wobei L-Alanin sowie α -KG entstehen (Schema 5) [Pfleiderer et al., 1968; De Rosa et al., 1979].



Schema 5: Reaktion der L-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) beim reversiblen Transfer der Aminogruppe von L-Glu zu Pyruvat.

4.3.2 Einsatz von L-Aminosäure-Transaminasen in der Biotechnologie

Der Einsatz von LAT in biotechnologischen Syntheseprozessen für die Produktion von einer Vielzahl an sowohl natürlich als auch nicht natürlich vorkommenden Aminosäuren und chiralen Aminen ist in der Literatur mehrfach beschrieben [Stewart et al., 2001; Taylor et al., 1998; Fotheringham et al., 1998].

5. Regenerierung von Nicotinamid Cofaktoren

Für die pharmazeutische oder auch chemische Industrie stellen enantiomerenreine Stoffe, wie z.B. Alkohole oder Aminosäuren höchst interessante Synthesebausteine bzw. Ausgangsstoffe dar [Engel und Paradisi, 2010; Stottmeister et al., 2005; Verseck et al., 2009]. Die hohe Selektivität, mit der Enzyme in der Lage sind, solche Stoffe zu produzieren, führte in den letzten Jahren zu einer verstärkten Forschung mit dem Ziel, etablierte chemische Prozesse durch den Einsatz von enzymatischen Biokatalysatoren zu ersetzen [Hollmann et al., 2011]. Insbesondere die Enzymklasse der Oxidoreduktasen wird in einer Vielzahl von Prozessen genutzt, in denen industriell interessante Verbindungen synthetisiert werden [Hummel, 1999; Hummel und Kula, 1989; Kula und Kragl, 2000; Devaux-Basseguy et al., 1997]. Viele der heute in biotechnologischen Prozessen eingesetzten Enzyme sind für ihre katalytische Aktivität auf Cofaktoren angewiesen. Cofaktoren sind niedermolekulare Substanzen, die während der Reaktion als Redoxäquivalente fungieren und in stöchiometrischen Mengen umgesetzt werden. Sie können als prosthetische Gruppe oder auch frei beweglich vorliegen. Eine Übersicht über die häufigsten vorkommenden Cofaktoren ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht über die häufigsten vorkommenden Cofaktoren (Preise: Hochgerechnete Katalogpreise Carl Roth oder Sigma 05/2014).

Cofaktor	Übertragung von	Preis (€/mol)
NAD ⁺	Wasserstoff	11700
NADP ⁺	Wasserstoff	17200
NADH	Wasserstoff	25200
NADPH	Wasserstoff	400700
FAD	Wasserstoff	798600
FMN	Wasserstoff	1722000
ATP	Phosphat	5000
PLP	Amino-Gruppe	7600

Wie in Tabelle 2 ersichtlich ist, sind die Wasserstoff-übertragenden Nicotinamid Cofaktoren sehr kostenintensiv. In der Fachliteratur sind nichtsdestotrotz eine wachsende Anzahl an biotechnologischen Verfahren beschrieben, in denen Enzyme eingesetzt werden, die für ihre katalytische Aktivität die reduzierten Cofaktoren NADH oder NADPH, bzw. ihre oxidierten Formen NAD⁺ bzw. NADP⁺ benötigen [Devaux-Basseguy et al., 1997; Hummel, 1999; Stottmeister et al., 2005; Arterburn, 2001; Kroutil et al., 2004; Schrittwieser et al., 2011; Romano et al., 2012; Schrittwieser et al., 2014].

Da der Einsatz von stöchiometrischen Konzentrationen an Cofaktoren mit sehr hohen Kosten verbunden ist, erscheint die *in situ*-Regenerierung von größter Wichtigkeit in Hinsicht auf eine ökonomische Reaktionsführung [van der Donk und Zhao, 2003; Zhao und van der Donk, 2003; Riebel et al., 2003; Hummel, 1999; Romano et al., 2012]. Durch die *in situ*-Regenerierung wird der umgewandelte Cofaktor durch eine gezielte angekoppelte Reaktion in seinen jeweiligen Ausgangszustand zurückgewandelt und steht somit der Reaktion bzw. dem Enzym für eine erneute Produktbildung zur Verfügung. Es findet neben der Synthesereaktion also eine weitere Redoxreaktion in umgekehrter Richtung statt, welche die Redoxäquivalente erneut bereitstellt und somit den Einsatz von katalytischen Mengen an Cofaktor ermöglicht.

An ein System zur Cofaktorregenerierung werden verschiedene Anforderungen gestellt. Die benötigten Katalysatoren müssen in größerer Menge einfach und kostengünstig verfügbar sein. Ebenfalls sollte die Regenerierungsreaktion thermodynamisch bevorzugt ablaufen, um die Synthesereaktion in Richtung der gewünschten Produktbildung hin anzutreiben. Eventuell eingesetzte Co-Substrate und der Katalysator dürfen keinen negativen Einfluss auf die eigentliche Synthesereaktion ausüben und müssen mit dieser kompatibel sein. Weiterhin darf der Katalysator zur Cofaktorregenerierung keine Nebenaktivität mit dem Substrat oder Produkt der Synthesereaktion besitzen, um unerwünschte Nebenprodukte zu verhindern und somit eine einfache und schnelle Produktisolierung zu gewährleisten. Ausschlaggebend für die Beurteilung eines Systems zur Cofaktorregenerierung sind eine hohe Recyclingzahl bzw. Zyklenzahl, auch als „total turnover number“ (TTN) des Cofaktors bezeichnet, wobei dieser Wert angibt, wie viel Mol Produkt pro Mol an eingesetztem Cofaktor während der Reaktion gebildet werden. Für eine effiziente präparative Anwendung werden TTN von 10^3 bis 10^5 benötigt [Chenault et al., 1988; Woodyer et al., 2003].

Die Regenerierung der beteiligten Cofaktoren kann neben der deutlichen Kostensenkung noch weitere positive Effekte in einer gekoppelten Reaktion bewirken. Einige durch Dehydrogenasen katalysierte Reaktionen besitzen ein thermodynamisch ungünstiges Gleichgewicht, welches für oxidative Reaktionen oft auf Seiten der Substrate liegt. Wird die Regenerierung der beteiligten Cofaktoren durch eine irreversible Reaktionen bewerkstelligt, kann das Gleichgewicht der thermodynamisch ungünstigen Reaktion zu Gunsten der gewünschten Produktbildung verschoben werden. Weiterhin ist für etliche Enzyme bekannt, dass sie durch eine Akkumulation an oxidierten oder reduzierten Cofaktoren in ihrer Aktivität gehemmt werden können. Eine solche Akkumulation wird durch die kontinuierliche Cofaktorregenerierung unterbunden.

Verschiedene Autoren haben sich mit den Möglichkeiten zur Cofaktorregenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren beschäftigt und es sind eine ganze Reihe von Review-Artikel mit dem jeweils aktuellen Stand zu diesem Thema erschienen [Weckbecker et al., 2010; Zhao und van der Donk, 2003; van der Donk und Zhao, 2003; Woodyer et al., 2003; Liu und Wang, 2007; Wichmann und Vasic-Racki, 2005; Uppada et al., 2014]. Nach Wichmann und Vasic-Racki werden die verschiedenen Methoden zur Regenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren größeren Kategorien zugeordnet [Wichmann und Vasic-Racki, 2005]. Es werden photochemische, elektrochemische, chemische, elektroenzymatische und enzymatische Methoden unterschieden (*in vitro* Methoden). Ebenfalls kann die Cofaktorregenerierung mittels ganzer Zellen erfolgen (*in vivo*) [Weckbecker et al., 2010; Wichmann und Vasic-Racki, 2005].

Jedes System zur Cofaktorregenerierung besitzt im Vergleich zu anderen bestimmte Vor- und Nachteile. Die Wahl des Systems zur Cofaktorregenerierung ist von der Synthesereaktion, den beteiligten Biokatalysatoren, den Substraten und Produkten sowie den Reaktionsbedingungen abhängig, so dass für den jeweiligen Prozess ein geeignetes System aus der Vielzahl an den heute bekannten Möglichkeiten ausgewählt und gegebenenfalls modifiziert werden muss. Allerdings wurden eine Reihe von Dehydrogenase-katalysierten Umsetzungen bereits im industriellen Maßstab angewandt, so dass darüber einige Regenerierungssysteme mittlerweile etabliert sind. Das trifft insbesondere für Reduktionsreaktionen zu, bei denen sich für die Regenerierung von NADH das Enzym Formiat-Dehydrogenase mit dem Substrat Formiat und die Glucose-Dehydrogenase mit dem Substrat Glucose bewährt haben; letzteres wird auch für die Regenerierung von NADPH eingesetzt [Weckbecker et al., 2010].

Da die Anforderungen an einen Prozess zur Regenerierung von Cofaktoren sehr unterschiedlich sein können, wurden im Zeitraum der letzten Jahre eine große Anzahl an neuen Verfahren zur Cofaktorregenerierung entwickelt. Nach dem heutigen Stand der Technik stehen für die Regenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren verschiedenste Methoden zur Verfügung, von denen die wichtigsten im Folgenden kurz beschrieben werden.

5.1 Photochemische Methoden zur Cofaktorregenerierung

Ein innovatives System zur Cofaktorregenerierung stellt die photochemische Regenerierung von NAD(P)H dar. Hierzu können phototrophe Organismen wie Cyanobakterien eingesetzt werden, die in der Lage sind, Lichtenergie mittels einer photosynthetischen Elektronentransfer-Reaktion in Form von NAD(P)H zu fixieren, welches wiederum für die eigentliche Synthesereaktion zur Verfügung steht. Nakamura beschreibt den Einsatz ganzer Zellen zur Reduktion von Ketonen [Nakamura et al., 2002]. Weiterhin sind photosensitive Farbstoffe in der Lage, durch Anregung mittels Lichtenergie NAD(P)H unter Elektronenaufnahme zu oxidieren [Julliard et al., 1986], was auch als Photoredoxreaktion bezeichnet wird.

Die photochemische Cofaktorregenerierung bietet den Vorteil, dass keine zusätzlichen Enzyme eingesetzt werden müssen, die auf ein Co-Substrat angewiesen sind, was einen zusätzlichen Kostenfaktor darstellt. Ebenfalls kann auf die kostengünstig verfügbare Sonnenenergie zurückgegriffen werden, um die Cofaktorregenerierung anzutreiben. Die photochemischen Methoden benötigen jedoch den Einsatz von photosensitiven Stoffen, welche häufig einen negativen Einfluss auf Enzymaktivität und Stabilität haben.

5.2 Chemische Methoden zur Cofaktorregenerierung

Die rein chemische Cofaktorregenerierung basiert auf der direkten chemischen Reduktion oder Oxidation der Nicotinamid-Cofaktoren. Bisher wurden nur wenige Prozesse mit rein chemischer Cofaktorregenerierung entwickelt und durchgeführt. So wird der Einsatz von FMN als Regenerierungsmittels durch Jones und Taylor beschrieben [Jones und Taylor, 1976]. Die chemische Reduktion von NAD(P)⁺ kann mit Hilfe von Wasserstoff und eines Metallkatalysators wie Rhodium- bzw. Rutheniumkomplexe durchgeführt werden [Wagenknecht et al., 2003].

Die Anwendung eines synthetischen Eisen(III)-porphyrin Komplexes (FeTSPP, 5,10,15,20-Tetrakis-(4-sulfonatophenyl)-porphyrin-Fe(III)-chlorid) zur Regenerierung von NAD⁺ ist in der Literatur beschrieben. Der Cofaktor NADH wird durch FeTSPP oxidiert, wobei das FeTSPP durch die Reaktion mit molekularem Sauerstoff regeneriert wird. Ein Anwendungsbeispiel ist die Oxidation von D-Glucose zu D-Glucono- δ -lacton durch den Einsatz einer NAD⁺-abhängigen Glucose-Dehydrogenase, wobei ein Umsatz von 80% nach 140 h erreicht werden konnte [Böhm, 2013].

Die chemischen Verfahren zur Cofaktorregenerierung sind zum größten Teil vergleichsweise kostengünstig und es entstehen keine Kosten für Co-Substrate, allerdings sind sie oft nur bedingt mit Enzymen kompatibel und durch ungewollte Reaktionen mit dem Substrat entstehen oft unerwünschte Nebenprodukte, welche die Isolierung des Zielproduktes erschweren können.

5.3 Elektrochemische Methoden zur Cofaktorregenerierung

Bei der elektrochemischen Cofaktorregenerierung werden die Nicotinamid Cofaktoren mit Hilfe einer Elektrode oxidiert bzw. reduziert und damit erneut der Reaktion zur Verfügung gestellt. Dabei werden dem Cofaktor elektrochemisch 2 Elektronen zugeführt (Reduktion des Cofaktors) oder entzogen (Oxidation des Cofaktors), wobei die Regenerierung des Cofaktors entweder direkt an der Elektrode, über einen Mediator, der den Elektronentransfer zwischen Cofaktor und Elektrode vermittelt, oder mit einem gekoppeltes System aus Mediator und Enzym stattfinden kann [Hollmann und Schmid, 2003; Kochius et al., 2012; Kochius et al., 2014]. Bis heute wurden erst wenige Prozesse entwickelt, bei denen eine enzymkatalysierte Synthesereaktion mit einem elektrochemischen System zur Regenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren kombiniert wurde [Kohlmann et al., 2008; Vuorilehto et al., 2004]. Für die Oxidation von NAD(P)H sind verschiedene Phenanthrolin-Komplexe bekannt, so wurde durch Hilt ein Phenanthrolin-Komplex zur Cofaktorregenerierung in der durch die Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber katalysierten Synthese von Cyclohexanon eingesetzt [Hilt et al., 1997]. Kim und Joo nutzten die elektrochemische Cofaktorregenerierung in der Oxidation von 2-Propanol zu Aceton mittels der NADP⁺-abhängigen Alkohol Dehydrogenase aus *Thermoanaerobium Brockii* [Kim und Joo, 2009]. Ein weiteres Anwendungsbeispiel ist die Oxidation von 2-Butanol durch den Einsatz einer NADP⁺ abhängigen Alkohol Dehydrogenase aus *T. Brockii* [Ruppert et al., 1989]. Ebenfalls kann die elektrochemische mit photochemischen Methoden der Cofaktorregenerierung gekoppelt werden. Dabei wird Strahlung entweder eingesetzt, um den Elektronentransfer vom Cofaktor auf den Mediator zu beschleunigen oder den Elektronentransfer zwischen Mediator und Elektrode zu erleichtern.

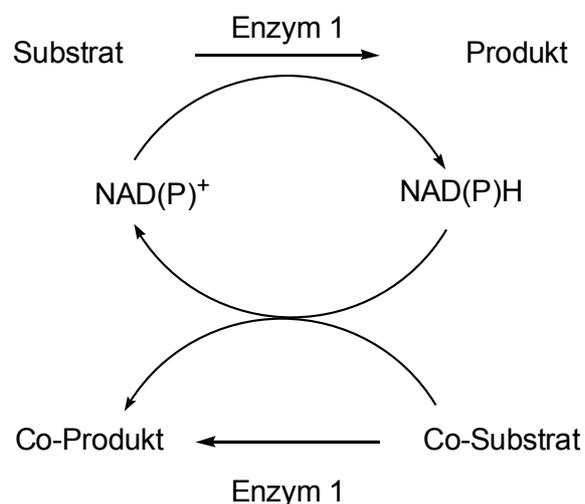
Die Vorteile der elektrochemischen Cofaktorregenerierung liegen in den relativ geringen Kosten und der Vermeidung von ungewollten Nebenprodukten, was die Produktaufarbeitung deutlich erleichtern kann. Jedoch weisen sie verschiedene Nachteile wie hohe Potentiale an den Elektroden, niedrige TTN sowie Stabilitätsprobleme auf und sind daher für die Cofaktorregenerierung weniger geeignet als alternative Systeme.

5.4 Enzymatische Methoden zur Cofaktorregenerierung

Die am häufigsten eingesetzte Methode zur Regenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren ist eindeutig die enzymatische Cofaktorregenerierung. In Abhängigkeit davon, ob derselbe enzymatische Biokatalysator für Synthesereaktion und Cofaktorregenerierung eingesetzt wird oder ob ein weiteres Enzym genutzt wird, unterscheidet man hierbei die Enzym- und Substrat-gekoppelten Methoden. Geeignet sind Regenerierungsenzyme, die kostengünstige Substrate umsetzen können, einfach zu entfernende Produkte herstellen und durch ihre Substrate und Produkte die eigentliche Synthesereaktion sowie die Stabilität der eingesetzten Enzyme nicht beeinträchtigen.

5.4.1 Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung

Bei den Substrat-gekoppelten Methoden wird dem Reaktionssystem ein zweites Substrat zugesetzt, welches vom enzymatischen Biokatalysator während der Cofaktorregenerierung ebenfalls in einer reduktiven oder oxidativen Reaktion umgewandelt werden kann, je nachdem, ob der reduzierte oder oxidierte Cofaktor benötigt wird. Die Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung der oxidierten Nicotinamid-Cofaktoren ist im Schema 6 dargestellt.



Schema 6: Substrat-gekoppelte enzymatische Regenerierung am Beispiel der oxidierten Nicotinamid-Cofaktoren.

Das zweite Substrat wird bei dieser Methode oftmals in einem hohem Überschuss zugegeben, um das thermodynamische Gleichgewicht der enzymatischen Reaktion auf die Seite der Cofaktorregenerierung und damit der Primärprodukt-Bildung zu verschieben [Kara et al., 2014]. Die Auswahl des Co-Substrates ist hierbei durch die Substratspezifität des eingesetzten enzymatischen Biokatalysators eingeschränkt.

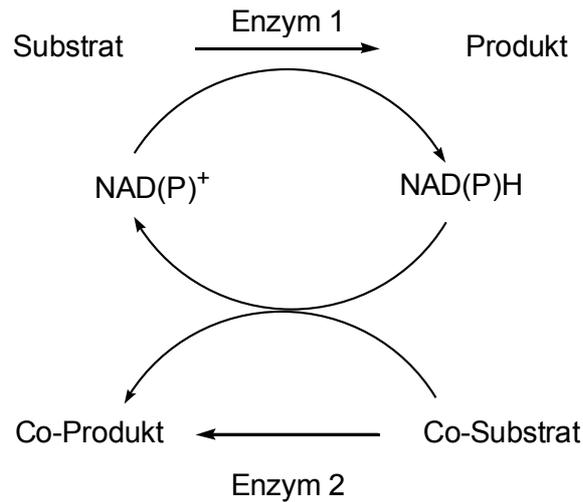
In der Praxis wird diese Methode heute zumeist für Alkohol-Dehydrogenasen in Verbindung mit einem kostengünstigen Alkohol bzw. einer Carbonylverbindung (wie z.B. Isopropanol und Aceton) als Substrat angewandt, um die reduzierten bzw. oxidierten Nicotinamid-Cofaktoren zu regenerieren [Schubert et al., 2002; Wolberg et al., 2001]. Als Beispiel kann hier die Alkohol-Dehydrogenase aus *Thermoanaerobium brockii* aufgeführt werden, die für die Reduktion von prochiralen Aldehyden oder Ketonen eingesetzt wird, wobei sie gleichzeitig durch die Oxidation des Co-Substrates Isopropanol NADPH regeneriert [Keinan et al., 1987]

Substrat-gekoppelte Methoden bieten den großen Vorteil, dass kein zweites Enzym für die Cofaktorregenerierung eingesetzt werden muss, was die Kosten und die Komplexität eines Prozesses deutlich senkt. Nachteilig beim Einsatz können jedoch die benötigten hohen Konzentrationen an Co-Substrat und damit auch an Co-Produkt sein, die einen negativen Einfluss auf die Aktivität oder auch Stabilität des Biokatalysators haben können sowie die Produktisolierung erschweren.

5.4.2 Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung

Enzym-gekoppelte Methoden zur Regenerierung von Nicotinamid Cofaktoren können durch den Zusatz eines zweiten Enzyms in Verbindung mit einem geeigneten Substrat beschrieben werden, welches den Cofaktor wieder in seine Ausgangsform überführt.

Die Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung der oxidierten Cofaktoren ist im Schema 7 dargestellt.



Schema 7: Enzym-gekoppelte enzymatische Regenerierung am Beispiel der oxidierten Nicotinamid Cofaktoren.

5.4.2.1 Enzym-gekoppelte Regenerierung der reduzierten Cofaktoren

Für die Cofaktorregenerierung in Prozessen, in denen die Regenerierung der reduzierten Cofaktoren NADH und NADPH nötig ist, steht eine Vielzahl an etablierten und gut untersuchten Systemen zur Enzym-gekoppelten enzymatischen Cofaktorregenerierung zur Verfügung. Einige dieser Methoden werden heute auch erfolgreich im industriellen Maßstab angewandt.

Das erste im industriellen Maßstab angewandte enzymatische Verfahren ist der Einsatz einer Formiat-Dehydrogenase (FDH). Formiat-Dehydrogenasen katalysieren die Oxidation von kostengünstigem und leicht verfügbarem Formiat zu Kohlenstoffdioxid unter gleichzeitiger Reduktion von NAD⁺ zu NADH [Tishkov und Popov, 2004]. Das entstehende Kohlenstoffdioxid kann hier aus dem Reaktionsgemisch leicht durch Ausgasen entfernt werden, so dass eine Akkumulation von unerwünschten und die Produktisolierung erschwerenden Nebenprodukten vermieden wird. Durch das Entweichen des Kohlendioxids aus dem Reaktionsgemisch wird die Reaktion der Formiat-Dehydrogenase annähernd irreversibel, was das thermodynamische Gleichgewicht der Enzymreaktion in Richtung der NADH-Regeneration verschiebt.

Das FDH-System ist in einer Vielzahl von Reaktionen angewandt worden. Neuerdings existiert auch eine mittels Sättigungsmutagenese hergestellte NADP⁺-abhängige Formiat-Dehydrogenase Mutante, die für die Regenerierung von NADPH genutzt werden kann [Andreadeli et al., 2008]. Nachteil der Cofaktorregenerierung mittels FDH ist jedoch der hohe Preis und die niedrige spezifische Aktivität des Enzyms, die auch nach Reinigung nur in der Größenordnung von 6-8 U mg⁻¹ liegt [Weckbecker et al., 2010].

Weitere geeignete und literaturbekannte Enzyme zur Regenerierung der reduzierten Cofaktoren sind Glucose-Dehydrogenase, die sowohl für die Regenerierung von NADH als auch NADPH geeignet ist, Malic Enzyme (NADH), Alkohol-Dehydrogenasen (NADH und NADPH), sowie Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (NADH und NADPH) [Weckbecker et al., 2010; Zhao und van der Donk, 2003; Hollmann et al., 2011; Uppada et al., 2014]. Ein neuer Ansatz ist die Verwendung von Phosphit-Dehydrogenasen in der Cofaktorregenerierung (NADH und NADPH), welche NAD(P)⁺-abhängig kostengünstiges Phosphit in Phosphat überführen [Woodyer et al., 2003].

5.4.2.2 Enzym-gekoppelte Regenerierung der oxidierten Cofaktoren

Im Gegensatz zu den vielfältigen Verfahren zur Regenerierung der reduzierten Cofaktoren NADH und NADPH stehen für die Regenerierung der oxidierten Cofaktoren NAD⁺ und NADP⁺ nur wenige funktionelle enzymatische System zur Verfügung [Woodyer et al., 2003], wobei hierbei die Verfahren zur Regenerierung von NAD⁺ deutlich überwiegen. Unter anderem werden heute L-Lactat-Dehydrogenase, Glucose-Dehydrogenase, Alkohol-Dehydrogenase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase sowie NADH-Oxidase für die Regenerierung von NAD⁺ eingesetzt [Lee und Whitesides, 1985; Hummel und Riebel, 2003; Weckbecker et al., 2010; Uppada et al., 2014; Hollmann et al., 2011].

Für die Regenerierung von NADP⁺ werden Alkohol-Dehydrogenasen sowie neuerdings eine NADPH-abhängige L-Lactat-Dehydrogenase Mutante eingesetzt, wobei das bisher am meisten verwandte und gebräuchlichste enzymatische System die L-Glutamat-Dehydrogenase darstellt [Weckbecker et al., 2010; Carrea et al., 1985; Richter et al., 2011; Lee und Whitesides, 1985; Fossati et al., 2005]. So wurde durch Carrea eine GluDH für die Regenerierung von NADP⁺ in der Synthese von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure mittels der 12- α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus *Clostridium* sp. eingesetzt [Carrea et al., 1984]. Fossati und Mitarbeiter untersuchten den Einsatz einer Alkohol-Dehydrogenase als alternatives System zur Regenerierung von NADP⁺ in der Synthese von 12-Keto-Chenodesoxycholsäure mittels der 12- α -Hydroxysteroid Dehydrogenase [Fossati et al., 2005]. Weiterhin ist der Einsatz der Alkohol-Dehydrogenase aus *Thermoanaerobium brockii* zur Regenerierung von NADP⁺ möglich [Kroutil et al., 2004], wobei sie durch die Reduktion des Co-Substrates Aceton NADP⁺ regeneriert. Durch Richter wurde eine NADPH-abhängige L-Lactat-Dehydrogenase Mutante für die NADP⁺-Regenerierung in der Racemattrennung von *rac*-1-Phenylethanol mittels der NADP⁺-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* eingesetzt [Richter et al., 2011].

NAD(P)H-Oxidasen sind bisher kaum in der Regenerierung von NADP⁺ genutzt worden, lediglich für die Enzyme aus *Lactobacillus sanfranciscensis* [Riebel et al., 2003] und *Thermococcus kodakarensis* [Wu et al., 2011] wurde der Einsatz zur Cofaktorregenerierung in der Kopplung mit einer NADP⁺-abhängigen Dehydrogenase beschrieben.

5.5 Cofaktorregenerierung mit ganzen Zellen

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, kann eine Biotransformation sowie die Regenerierung von beteiligten Cofaktoren mittels isolierter enzymatischer Biokatalysatoren durchgeführt werden. Eine weitere biokatalytische Methode ist die Regenerierung des Cofaktors innerhalb einer ganzen Zelle. Im Gegensatz zu der Verwendung isolierter Enzyme können bei der Verwendung ganzer Zellen die Kosten für Isolierung und Reinigung des Enzyms eingespart werden, jedoch muss zusätzlich auf Transportprozesse durch die Zellmembran geachtet werden, da Substrate und Produkte der Biotransformation auf einen Transport in und aus der Zelle angewiesen sind, um mit dem enzymatischen Biokatalysator in Kontakt zu treten.

Biotransformationen mit ganzen Zellen von Wildtyp-Stämmen können oft für ein großes Spektrum an Substraten eingesetzt werden. So wurden durch Siedler ganze *Corynebacterium glutamicum* Zellen in der Synthese von (*R*)-Methyl-3-hydroxybutyrate eingesetzt, als zelleigenes Regenerierungssystem für NADPH diente hierbei der Phentose-phosphat-Weg [Siedler et al., 2013]. Kometani beschreibt den Einsatz von ganzen *Sacharomyces cerevisiae* Zellen zur Produktion von chiralen Alkoholen, in der asymmetrischen Reduktion von prochiralen Ketonen kommt Ethanol als Energiequelle für die Regenerierung von NAD(P)H zum Einsatz während in der Oxidation von racemischen Alkoholen NAD⁺ durch die Atmungskette der Zellen regeneriert wird [Kometani et al., 1996].

In Biotransformationen mit Wildtyp-Stämmen können durch weitere zelleigene Enzyme jedoch auch leicht unerwünschte Nebenprodukte gebildet werden, wodurch die hergestellten Zielsubstanzen nicht die erforderliche hohe Reinheit besitzen, was wiederum die Produktaufreinigung erschwert. Ein alternativer Ansatz hierzu ist die Verwendung von Zellen, die sowohl den eigentlichen enzymatischen Biokatalysator als auch ein Enzym zur Cofaktorregenerierung rekombinant produzieren.

In den letzten Jahrzehnten wurden eine große Anzahl unterschiedlichster rekombinanter Ganzzellbiokatalysatoren mit Syntheseezym und zellinterner Cofaktorregenerierung entwickelt. Solche auch als „Designerzellen“ [Gröger et al., 2006] bezeichneten Ganzzellbiokatalysatoren können nach dem heutigen Stand der Technik zumeist einfach hergestellt werden und besitzen im Vergleich zu Wildtyp-Stämmen den großen Vorteil, dass bei einer sehr guten Überexpression, also hohen zellinternen Aktivitäten dieser Enzyme unerwünschte Nebenreaktionen weitgehend unterdrückt werden.

Im Zuge der Dissertation von Hußmann gelang beispielsweise die Konstruktion und Charakterisierung solcher Designerzellen mit zellinterner NADH-Regenerierung zur Synthese von L-*tert*-Leucin aus Trimethylpyruvat. Eine L-Leucin-Dehydrogenase war hier für die Synthese von L-*tert*-Leucin zuständig, während der verbrauchte Cofaktor NADH durch eine Formiat-Dehydrogenase regeneriert wurde [Hußmann, 2009]. Ein Ganzzellbiokatalysator mit zellinterner NADPH-Regenerierung wurde erfolgreich durch die Co-Expression der NADPH-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* und der NADP⁺-abhängigen Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* konstruiert [Weckbecker, 2005]. Xiao und Mitarbeiter entwickelten erfolgreich einen Ganzzellbiokatalysator mit NAD⁺-Regenerierung durch die Co-Expression der NAD⁺-abhängigen (2R,3R)-2,3-Butandiol-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* und der NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* [Xiao et al., 2010].

Zahlreiche weitere Beispiele für Ganzzellbiokatalysatoren mit zellinterner Regenerierung von NADH, NADPH sowie NAD⁺ sind in der Literatur beschrieben [Uppada et al., 2014]. Bis heute existiert jedoch kein Ganzzellbiokatalysator mit zellinterner NADP⁺-Regenerierung, obwohl für ein solches System eine breitere Anwendung in Kombination mit NADP⁺-abhängigen Dehydrogenasen vorstellbar ist.

6. NADH-Oxidasen

Das Enzym NADH-Oxidase (NOX, E.C. 1.6.3.1) wurde zum ersten mal durch Dolin in *Streptococcus faecalis* nachgewiesen und beschrieben [Dolin, 1953]. NOXs enthalten den nicht kovalent gebundenen Cofaktor FAD und gehören zu der Klasse der FAD-abhängigen Pyridin-Nucleotid-Disulfid Oxidoreduktasen (PNDOR), welche der GR1 Unterfamilie der Glutathion Reduktasen (GR) zugeordnet ist [Dym und Eisenberg, 2001]. PNDORs werden nach Argyrou und Blanchard weiterhin in drei Untergruppen unterteilt, wobei die NOXs zusammen mit den NADH-Peroxidasen (POX) sowie den Coenzyme-A-Disulfid Reduktasen (CoADR) zu der dritten Gruppe gehört [Argyrou und Blanchard, 2004].

Analog zu den GRs und POXs unterscheiden sich die NOX von den Enzymen der ersten sowie der zweiten Untergruppe durch das Fehlen eines Disulfid-Redox-Zentrums [Claiborne et al., 2001; Mallett et al., 2006].

NOXs katalysieren die irreversible Oxidation von NADH zu NAD⁺ unter gleichzeitiger Reduktion von molekularem Sauerstoff (O₂) [Koh et al., 2009; Hummel und Riebel, 2003]. Die Reduktionsreaktion von Sauerstoff kann hier durch eine Zwei-Elektronenreduktion zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂), oder in einer vier Elektronenreduktion zu Wasser (H₂O) führen [Hummel und Riebel, 2003; Jia et al., 2008; Kawasaki et al., 2004].

Aufgrund dieser verschiedenen Reaktionsnebenprodukte, können die NOX in zwei verschiedene Klassen eingeteilt werden: (1) Wasser (H₂O)-bildende NOX und (2) Wasserstoffperoxid (H₂O₂)-bildende NOX. Das Reaktionsschema der H₂O-bildenden NOX ist nachfolgend in Schema 8 dargestellt.



Schema 8: Reaktion der H₂O-bildenden NOX in der irreversiblen Oxidation von NADH.

Es sind jedoch auch Enzyme isoliert worden, die keiner der beiden Klassen eindeutig zugeordnet werden können. So entstehen bei der Oxidation von NADH durch die NOXs aus *Methanocaldococcus jannaschii* und *Pyrococcus furiosus* sowohl H₂O als auch H₂O₂ als Reaktionsprodukte [Case et al., 2009; Ward et al., 2001]. Weiterhin gibt es die sogenannten NADH-Peroxidasen (POX), die wie die H₂O-bildenden NOXs als Nebenprodukt der Reaktion Wasser bilden, allerdings als Reaktionsäquivalent H₂O₂ anstatt von molekularem Sauerstoff nutzen. Eine POX wurde z.B. in *Streptococcus faecalis* nachgewiesen, isoliert und charakterisiert [Stehle et al., 1991; Ross und Claiborne, 1991; Stehle et al., 1993].

Bis heute ist eine große Anzahl an unterschiedlichen NOXs isoliert und teilweise auch umfassend biochemisch charakterisiert worden. Die ersten in der Literatur beschriebenen Enzyme können der H₂O₂-bildenden Gruppe der NOXs zugeordnet werden. Die Anzahl beschriebener Enzyme dieser Gruppe ist nach heutigem Stand bedeutend größer als die der H₂O-bildenden NOXs, obwohl diese aufgrund der Bildung des toxischen Nebenproduktes H₂O₂ für biotechnologische Anwendungen weniger interessant erscheinen als die H₂O-bildenden.

H₂O₂-bildende NOXs konnten unter anderem in *Amphibacillus xylanus* [Niimura et al., 2000; Niimura et al., 2007], *Eubacterium ramulus* [Herles et al., 2002], *Sporolactobacillus inulinus* [Sakamoto et al., 1996], *Thermotoga hypogea* [Yang und Ma, 2005] sowie *Thermus thermophilus* [Asna et al. 1995; Park et al. 1992] nachgewiesen und untersucht werden. Aufgrund der in Hinsicht auf das Nebenprodukt H₂O vorteilhaften Oxidationsreaktion der H₂O-bildenden NOXs wurden diese in den letzten Jahren verstärkt isoliert und charakterisiert. Bisher wurden H₂O-bildende NOXs aus verschiedenen Organismen wie z.B. *Clostridium acetobutylicum* [Hillmann et al., 2009], *Leuconostoc mesenteroides* [Sakamoto et al., 1996], *Lactococcus lactis* [Heux et al., 2006], *Clostridium aminovalericum* [Kawasaki et al., 2004], *Lactococcus lactis* [Felipe und Hugenholtz, 2001], *Streptococcus faecalis* [Ross und Claiborne, 1992; Schmidt et al., 1986], *Clostridium aminovalericum* [Kawasaki et al., 2004], *Lactobacillus sanfranciscensis* [Riebel et al., 2002, 2003] sowie *Lactobacillus brevis* [Hummel und Riebel, 2003; Geueke et al., 2003] beschrieben.

Die Gruppe der NOXs besteht aus Enzymen, die verschiedenen Aufgaben *in vivo* übernehmen und innerhalb der Zelle unterschiedlich lokalisiert sind. Es existieren sowohl lösliche als auch Membran-gebundene bzw. integrierte NOXs [Pagala et al., 2002; Gomes und Teixeira, 1998, Berridge und Tan, 2000]. In vielen Fällen ist die physiologische Funktion noch nicht eindeutig aufgeklärt. In fakultativ anaeroben und strikt anaeroben Bakterien spielen sie eine wichtige Rolle in der Abwehr von oxidativem Stress durch Sauerstoff, wie es für die NOXs aus *Lactococcus lactis* [Jiang et al., 2005], *Thermococcus profundus* [Jia et al., 2008] und *Pyrococcus furiosus* [Ward et al., 2001] beschrieben wurde.

Vor kurzem wurde von strikt anaeroben Mikroorganismen wie *Thermotoga hypogea*, *Thermotoga neapolitana* und *Thermotoga maritima* berichtet, dass sie in der Lage sind, auch in Anwesenheit von geringen Sauerstoffkonzentrationen zu wachsen. Diese Fähigkeit konnte auf die Expression von NOXs zurückgeführt werden, welche in Zusammenarbeit mit einer POX ein Schutzsystem der Zelle vor Sauerstoff bildet [Yang und Ma, 2005]. *Clostridium aminovalericum* ist ein obligat anaerobes Bakterium, für welches eine Beteiligung der zelleigenen NOX an der Detoxifizierung von Sauerstoff vermutet wird [Kawasaki et al., 2004]. So stieg nach 30 min Begasung mit einer niedrigen Sauerstoffkonzentration (3 % O₂, 97 % N₂) die im zellfreien Rohextrakt messbare Aktivität der NOX um mehr als das 5-fache an. Die NADH-abhängige Reaktion mit molekularem Sauerstoff scheint ein weit verbreitetes Sauerstoff-Abwehrsystem darzustellen [Ward et al., 2001; Kengen et al., 2003].

Die NOX aus *Pyrococcus horikoshii* und *Pyrococcus furiosus* zeigen ebenfalls CoADR- und Sulfur-Reduktase-Aktivität [Harris et al., 2005; Ward et al., 2001]. Weiterhin wird eine durch die NOX ausgelöste Aggregation von nicht korrekt oder partiell ungefalteten Enzymen sowie der *in vitro* Abbau von Nukleinsäuren beschrieben [Jia et al., 2010]. Es wird vermutet, dass NOXs in aeroben Organismen eine zentrale Rolle in der Regeneration von NAD⁺ als Reaktionsäquivalent übernehmen sowie an der Regulierung des zellinternen Verhältnisses von NAD⁺ und NADH beteiligt sind, was für die NOX aus dem anaeroben Bakterium *Amphibacillus xylanus* nachgewiesen wurde [Niimura et al., 2000].

NADH-Oxidasen stellen bezüglich ihrer Substratspezifität eine relativ homogene Gruppe von Enzymen dar, nur wenige der bisher bekannten Enzyme sind in der Lage, neben NADH auch NADPH als Substrat in der Oxidation zu akzeptieren. Diese NOXs werden auch als NAD(P)H-Oxidasen bezeichnet. Durch Park wurde erstmalig die NOX aus *Thermus thermophilus* beschrieben, die sowohl NADH als auch NADPH als Substrat akzeptiert [Park et al., 1992; Hecht et al., 1995], für dieses Enzym sind jedoch keine kinetischen Daten bezüglich der Oxidation von NADPH verfügbar. Weiterhin wurde für die NOXs aus *Eubacterium ramulus* [Herles et al., 2002] und *Methanocaldococcus jannaschii* [Case et al., 2009] berichtet, dass sie ebenfalls in geringem Maße NADPH als Substrat akzeptieren, jedoch liegt die NADPH-Oxidase Aktivität nur bei ca. 5% der NADH-Oxidase Aktivität. Das Enzym aus *Lactobacillus sanfranciscensis* ist in der Lage, NADPH mit einer höheren Effektivität zu oxidieren, die spezifische Aktivität beträgt hier bei annähernd gleicher Affinität ca. 30 % der NADH-Oxidase-Aktivität [Riebel et al., 2003]. Für die NOX aus *Thermococcus profundus* wurde nachgewiesen, dass sie neben NADH auch NADPH oxidiert [Jia et al., 2008]. In *Thermococcus kodakaraensis* kommen sieben NOXs vor, von denen die Oxidase TK1299 sowohl NADH als auch NADPH mit annähernd gleicher Bindungsaffinität als Substrat in der Oxidation umsetzt [Kobori et al., 2010; Nisar et al., 2013]. Die meisten der bisher bekannten NOXs, die in der Lage sind, neben NADH auch NADPH als Substrat in der Oxidation zu akzeptieren, weisen eine hohe Spezifität für NADH über NADPH auf.

6.1 Einsatz von NADH-Oxidasen in der Biotechnologie

In der Literatur sind ausführlich die Isolierung, die Überexpression, sowie die mehr oder weniger umfassende Charakterisierung von H₂O₂-bildenden NOXs beschrieben. Allerdings wurde diese Enzymgruppe bisher nicht oder nur in geringem Maße für die Cofaktorregenerierung von NAD⁺ oder NADP⁺ eingesetzt. Dies ist auf das Nebenprodukt Wasserstoffperoxid zurückzuführen, das zu Reaktionen mit Substraten, Produkten und beteiligten Katalysatoren neigt und dadurch den Einsatz eines H₂O₂-abbauenden Systems nötig macht.

H₂O-bildende NOXs sind für enzymatische Cofaktorregenerierung in Syntheseprozessen von größerer Bedeutung. So wurde die NOX aus *Leuconostoc mesenteroides* mit einer Hydroxysteroid-Dehydrogenase gekoppelt, um die Regenerierung von NAD⁺ in der stereospezifischen Oxidation von Steroiden zu bewerkstelligen [Ergan et al., 1984]. Die NOXs aus *L. brevis* sowie *L. sanfranciscensis* wurden erfolgreich zur NAD⁺-Regenerierung in der Kopplung mit einer (*R*)-spezifischen Alkohol Dehydrogenase eingesetzt, so dass enantiomerenreine Alkohole synthetisiert werden konnten [Geueke et al., 2003; Riebel et al., 2003]. Findrik beschreibt die Synthese von 5'-Methylthio-3-ketobutanoat mittels Oxidation von L-Methionin durch die L-Phenylalanin-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. und NAD⁺-Regenerierung durch die NOX aus *L. brevis* [Findrik et al., 2008]. Weiterhin wurde das Enzym aus *L. brevis* in Kombination mit der L-Leucin-Dehydrogenase aus *Bacillus cereus* erfolgreich für die Racemattrennung von DL-*tert*-Leucin [Hummel et al., 2003] sowie in der enantioselektiven Oxidation von L-Phenylalanin durch eine L-Phenylalanin-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. [Hummel et al., 2003] eingesetzt. Der Nutzen der NOX aus *Thermus aquaticus* als Hilfsenzym in der Analytik von biologisch relevanten Stoffen wie z.B. von Zuckern und Alkoholen ist ebenfalls in der Literatur beschrieben [McNeil et al., 1989]. Die Enzyme aus *Streptococcus mutans* [Felipe et al., 1998; Hugenholtz et al., 2000] und *Lactobacillus brevis* [Xiao et al., 2010] wurden erfolgreich für die Konstruktion von Ganzzellbiokatalysatoren mit zellinterner NAD⁺-Regenerierung durch die Co-Klonierung der jeweiligen NOX eingesetzt.

Nur wenige der bisher bekannten NOXs sind in der Lage, neben NADH auch NADPH als Substrat in der Oxidation zu akzeptieren. Von diesen Enzymen weisen die meisten eine geringe Aktivität und Spezifität für NADPH auf und sind bisher nicht in der enzymatischen Regenerierung von NADP⁺ genutzt worden. Lediglich der Einsatz der Enzyme aus *L. sanfranciscensis* [Riebel et al., 2003] und *T. kodakarensis* [Wu et al., 2011] zur Cofaktorregenerierung wurde untersucht und publiziert.

7. Motivation und Zielsetzung

Die Herstellung von α -Ketosäuren ist von großer industrieller Bedeutung für die chemische und pharmazeutische Industrie, wobei insbesondere α -KG aufgrund der vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten einen sehr interessanten Synthesebaustein darstellt. Bisher wurde α -KG auf chemischem Weg oder mit Hilfe von fermentativen Verfahren hergestellt, wobei insbesondere die chemischen Synthesemethoden viele Nachteile wie hohe Prozesskosten, Einsatz toxischer Chemikalien und Katalysatoren sowie Nebenproduktbildung mit sich bringen.

Eine interessante, bisher jedoch kaum beachtete Syntheseroute stellt die Herstellung mittels enzymatischer Biotransformation von L-Glu dar. L-Glu ist ein außerordentlich preisgünstiger, leicht erhältlicher und in großen Mengen verfügbarer Ausgangsstoff für die Herstellung von α -KG. Das Mononatrium-Salz von L-Glu ist einer der weltweit gebräuchlichsten Geschmacksverstärker mit einer jährlichen Produktion von > 1,5 Millionen Tonnen. Die Entwicklungen und Erfindungen der letzten Jahrzehnte in der fermentativen Herstellung dieser Aminosäure machen es heute möglich, L-Glu in großem Maßstab und zu geringen Kosten herzustellen.

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die biotechnologische Herstellung der Ketosäure α -KG mittels enzymatischer Biotransformation von L-Glu. Hierzu werden die Enzyme GluDH, GluOX sowie GPT als Katalysatoren in der Biotransformation genutzt. Für den Einsatz der Enzyme sollen verschiedene Parameter untersucht werden, um die Bedingungen der Biotransformation den Erfordernissen der unterschiedlichen biokatalytischen Teilreaktionen (Cofaktor- bzw. Co-Substrat-Regenerierung) anzupassen und optimale Verhältnisse zu schaffen sowie eventuelle Limitierungen zu identifizieren. Wichtige Faktoren sind hier das pH-Optimum sowie die Stabilität der beteiligten Enzyme sowie vor allem der Einfluss der verschiedenen Substrate und Produkte auf die Enzyme. Im Falle eventueller Limitierungen ist es weiterhin geplant, die Biokatalysatoren, wenn nötig, entsprechend zu optimieren.

In der Biotransformation sollen verschiedene Enzympräparationen wie isolierte Enzyme, immobilisierte Enzyme oder auch ganze Zellen für die Darstellung von α -KG aus L-Glu eingesetzt werden. Abschließend sollen die einzelnen enzymatischen Systeme anhand der Ergebnisse der Biotransformation vergleichend bewertet werden.

In den letzten Jahrzehnten hat die Bedeutung von Cofaktor-abhängigen Enzymen, insbesondere Oxidoreduktasen, welche für ihre katalytische Aktivität entweder auf die reduzierten Cofaktoren NADH oder NADPH oder ihre oxidierten Formen NAD^+ und NADP^+ angewiesen sind, für präparative Zwecke stark zugenommen. Da der Einsatz von stöchiometrischen Konzentrationen an NAD(H) bzw. NADP(H) mit sehr hohen Kosten verbunden ist, ist die *in situ*-Regenerierung von größter Wichtigkeit in Hinsicht auf eine ökonomische Reaktionsführung. Für die enzymatische Regenerierung der reduzierten Cofaktoren NADH und NADPH ist eine Vielzahl an etablierten und gut untersuchten Systemen in der Fachliteratur beschrieben, im Gegensatz hierzu existieren jedoch kaum funktionelle enzymatische Regenerierungssysteme für die oxidierten Cofaktoren, wobei nach dem heutigen Stand der Technik insbesondere die effiziente und ökonomische Regenerierung von NADP^+ eine große Herausforderung darstellt.

Ein gut geeignetes und bisher mehrfach erfolgreich eingesetztes System zur enzymatischen Regenerierung von NAD^+ stellt das Enzym NOX aus *Lactobacillus brevis* dar. Da diese NOX ein eingeschränktes Substratspektrum besitzt und nicht in der Lage ist, NADPH zu oxidieren, sollte dieses Enzym mit Methoden des „Protein Engineerings“ so modifiziert werden, dass eine Akzeptanz von NADPH als Substrat in der Oxidation erreicht wird. In dieser Arbeit wird daher unter anderem versucht, über die gelöste Struktur der NOX sowie über publizierte Struktur- und Sequenzinformationen strukturverwandter Enzyme Aminosäurepositionen zu identifizieren, die für die strikte NADH-Spezifität der NOX von Bedeutung sind. Hierbei ist das wesentliche Ziel, Einblicke in den Bindungsmechanismus von NADH und die Struktur-funktionsbeziehungen des Enzyms zu erlangen, um anschließend die Substratspezifität der NOX mittels rationalem Proteindesign verändern zu können. Hergestellte Mutanten sollen hinsichtlich ihrer katalytischen Eigenschaften bezüglich NADH und NADPH sowie der präparativen Anwendung in der Cofaktorregenerierung anhand der Synthese von enantiomerenreinen Alkoholen mit biotechnologisch interessanten Alkohol-Dehydrogenasen charakterisiert werden. Ein weiteres Ziel ist die Entwicklung eines Ganzzellbiokatalysators mit zellinterner NADP^+ -Cofaktorregenerierung, da ein solches System eine sehr einfache und ökonomische Variante eines Biokatalysators darstellt. Trotz eines breiten möglichen Einsatzbereiches in Kombination mit NADP^+ -abhängigen Enzymen ist ein solcher Ganzzellbiokatalysator bis heute noch nicht realisiert und beschrieben worden. Ganzzellbiokatalysatoren sollte durch die Co-Expression der NADP^+ -abhängigen (*R*)-spezifischen Alkohol-Dehydrogenasen aus *Lactobacillus kefir* und *Lactobacillus brevis* sowie einer NADPH-oxidierenden Mutante zur Regenerierung des Cofaktors konstruiert werden.

II Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Merck, Fluka, Sigma, oder Roth geliefert. Die Coenzyme wurden von Biomol bezogen.

1kb DNA-Ladder Marker	Fermentas
Agar-Agar	Carl Roth
Agarose	Carl Roth
Ampicillin	Gerbu
Brilliant Blue G-250	Fluka
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Fermentas
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Merck
Glycerol	Carl Roth
Glycin	Riedel-de Hæn
IPTG	Senn Chemicals
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumchlorid	Fluka
Natriumhydroxid	Carl Roth
Phosphorsäure	Carl Roth
Triton X-100	Fluka
Kits für die Molekularbiologie	
QIAquick Gelextraktion Kit	Qiagen
QIAquick PCR Kit	Qiagen
DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen
Plasmid Miniprep Kit	AnalytikJena
Double pure Kit	AnalytikJena

1.2 Geräte

Analytik:

^1H -NMR

UV/VIS-Spektralphotometer UV-1602, Shimadzu

Gaschromatograph GC-17A, Shimadzu

Chromatographie:

ÄKTA System, Amersham Pharmacia-Biotech

Chromatographiesäulen, Amersham Pharmacia-Biotech

Fraktionssammler, Amersham Pharmacia-Biotech

Matrix: Q-Sepharose FF, Pharmacia-Biotech; Ni-NTA, Quiagen

PD-10 Säulen, GE Healthcare

Sterilisation:

Varioklav Autoklav, H+P Labortechnik

Autoklav, KSG

Autoklav, Webeco

Sterilisationsschrank, MEMMERT

Bildverarbeitung:

Eagle-Eye II, Stratagene

Stella, Raytest

Zellaufschluss:

Ultraschallgerät Sonopuls HD 60, Bandelin Electronic

French Press

Schwingkugelmühle MM2, Retsch

Elektrophorese:

Wide mini-sub Cell GT, Bio Rad

Runone Electrophoreses Cell, EmbiTech

NuPAGE XCell *SureLock*™ Mini Cell, Invitrogen

PCR:

Mastercycler Gradient, Eppendorf

Ultrafiltration:

Vivaspin 10kDa, Sartorius

10 kDa Filter, Amicon

Ultraschallbad:

Sonovex, Bandelin Electronic

Zentrifugen:

Biofuge pico, Heraeus

Mikro 22R, Hettich

Rotina 35R, Hettich

Sorvall RC-5B, Du Pont

Zentrifuge 5415D, Eppendorf

Sonstige:

Clean bench Ultraclean, Weiss Technik

Magnetrührer Heidolph MR 3001 K

Microplate Reader Spectra Max 250, MWG-Biotech

Microtiterplattenschüttler TiMix Control, MWG-Biotech

Vakuumpumpe PVK 650

Rotator SB2, Stuart

Thermomixer Komfort, Eppendorf

Vortexer, Bender und Hobein Ag

Waage, Sartorius

Wasserbad SWB 25, ThermoHanke

1.3 Enzyme

Die eingesetzten Restriktionsenzyme, CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase), die T4-DNA Ligase und die *Pfu*-Polymerase wurden von der Firma Fermentas bezogen, die Goldstar Taq Polymerase von der Firma Eurogentec. Weitere Enzyme: L-Glutamat-Dehydrogenase aus Rinderleber sowie Peroxidase aus Meerrettich, Katalase *Micrococcus luteus* (*Micrococcus lysodeikticus*) und Lysozym von Sigma, Pronase von Boehringer Mannheim.

1.4 Verwendete Vektoren

pTrc99a

pET-21a(+) Novagen

pETDuet-1 Novagen

pACYCDuet-1 Novagen

pet28a Novagen

Chaperone Kit TAKARA

1.5 Verwendete Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit eingesetzten *Escherichia coli* Stämme sind nachfolgend aufgeführt.

E. coli K12 Stratagene

E. coli BL21(DE3) Novagen

E. coli Tuner(DE3) Novagen

E. coli Origami(DE3) Novagen

E. coli BL21 CodonPlus(DE3)-RP Stratagene

E. coli Rosetta 2 (DE3)pLacI Novagen

Weiterhin wurden verschiedene Sammlungsstämme der AG Hummel verwendet.

2. Methoden

2.1 Mikrobiologische Methoden

2.1.1 Medien und Lösungen

Zur Herstellung der Medien wurde ausschließlich Millipore Wasser verwendet. Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter kontrolliert und bei Bedarf auf den angegebenen pH-Wert eingestellt. Für die Herstellung von festen Nährböden wurden 1,5 % Agar hinzugefügt. Anschließend wurden die Medien durch Autoklavieren bei 2 bar und 121°C für 20 min sterilisiert. Wenn Platten oder Flüssigmedium für einen Selektionsdruck Antibiotikum enthalten sollten, wurde der Ansatz mit Antibiotika in der jeweiligen Endkonzentration versetzt. Feste Nährböden wurden bis zur Verwendung für maximal 2 Wochen bei 4°C gelagert.

Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf ein Volumen von 1 Liter.

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium):

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
ad. Aqua dest.	1,0 l
pH 7,0	

Low-salt LB-Medium:

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
ad. Aqua dest.	1,0 l
pH 7,0	

Expressions-Medium L-Glutamat-Oxidase:

Trypton	16,0 g
Hefeextrakt	10,0 g
NaCl	5,0 g
ad. Aqua dest.	1,0 l
pH 7,2-7,4	

Autoinduktions-Medium:

Lösung A:

Caseinhydrolysat	12,0 g
Hefeextrakt	24,0 g
Glycerol	5,0 g
ad. 900 ml, 100 mM Kpi-Puffer (pH 7,0)	

Lösung B:

Glucose	0,5 g
Laktose	2,0 g
ad. 100 ml, 100 mM Kpi-Puffer (pH 7,0)	

Nach dem Autoklavieren werden der Lösung A 100 ml sterile Laktose/Glucoselösung (Lösung B) zugegeben.

Verwendete Antibiotika Stammlösungen:Chloramphenicol: 34 mg ml⁻¹, gelöst in 70 % EthanolAmpicillin: 100 mg ml⁻¹, gelöst in H₂OKanamycin: 50 mg ml⁻¹, gelöst in H₂OGentamycin 50 mg ml⁻¹, gelöst in H₂O

Die Stammlösungen wurde mit Hilfe eines Sterilfilters (Porengröße 0,22 µm) filtriert und bei einer Temperatur von -18 °C gelagert.

2.1.2 Medien und Lösungen für die Kultivierung von Bodenisolaten mittels Anreicherungskultur

Die folgenden Medien wurden für die Screening von Bodenisolaten mittels Anreicherungskulturen verwendet: Medium A mit L-Glu als alleiniger Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle sowie Medium B mit L-Glu als alleiniger Stickstoff-Quelle.

Die Medien wurden für 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf ein Volumen von 1 Liter.

Anreicherungsmedium A:

L-Glutamat	20,0 g
Hefeextrakt	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,34 g
KH ₂ PO ₄	6,35 g
HVK-Spurenelementlösung	20 ml
ad. Aqua dest.	1,0 L
pH-Wert	8,0

Anreicherungsmedium B:

L-Glutamat	5,0 g
Hefeextrakt	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,34 g
KH ₂ PO ₄	6,35 g
Glycerin	20 g
HVK-Spurenelementlösung	20 ml
ad. Aqua dest.	1,0 L
pH-Wert	8,0

HVK-Spurenelementlösung

Titriplex I	10,0 g
MgSO ₄ ×7H ₂ O	14,5 g
CaCl ₂ ×H ₂ O	3,3 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ×4H ₂ O	9,3 mg
Metall-Lösung	50 ml

Metall-Lösung

Titriplex II	250 mg
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	4,2 mg
FeSO ₄ ×7H ₂ O	2,5 mg
MnSO ₄ ×H ₂ O	4,0 mg
CuSO ₄ ×5H ₂ O	39,2 mg
Co(NO ₃) ₂ ×6H ₂ O	244 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ ×10H ₂ O	171 mg
pH-Wert	1,5-2,0

2.1.3 Medien für die Kultivierung von Stammsammlungsstämmen

Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf ein Volumen von 1 Liter.

DSMZ Medium 65:

Glucose	4 g
Hefeextrakt	4 g
Malzextrakt	10 g
pH	7,2

DSMZ Medium MRS:

Caseinhydrolysat	10 g
Fleischextrakt	10 g
Hefeextrakt	5 g
Glucose	20 g
Tween 80	1 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Na-Acetat	5 g
(NH ₄) ₂ Citrat	2 g
MgSO ₄ x7H ₂ O	200 mg
MnSO ₄ x H ₂ O	50 mg
pH	6.2 - 6.5

DSMZ Medium M1:

Pepton	5 g
Fleischextrakt	3 g
pH	7,0

DSMZ Medium 186:

Hefeextrakt	3 g
Malzextrakt	3 g
Pepton Sojabohne	5 g
Glucose	10 g

2.1.4 Screening nach neuen GluDHs

2.1.4.1 Kultivierung von Bodenisolaten mittels Anreicherungskulturen

1 g der jeweiligen Bodenprobe wurde mit 5 ml steriler Saline gut durchmischt und für 1 h bei 30°C und 120 rpm inkubiert. 5 ml Anreicherungsmedium A bzw. B wurden mit 200 µl vom Überstand beimpft und bei 30°C für 1-2 Tage bei 120 rpm kultiviert, bis eine deutliche Trübung des Anreicherungsmediums zu erkennen war. Medium A mit L-Glu als alleiniger Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle sowie Medium B mit L-Glu als alleiniger Stickstoff-Quelle. 50 µl dieser Anreicherungskultur wurden in neues Flüssigmedium überführt, dieser Schritt wurde jeweils zwei mal wiederholt. Die Anreicherungskulturen wurden in geeigneter Verdünnung auf Agar-Platten mit Anreicherungsmedium A bzw. B ausplattiert. Die Platten wurden dann über Nacht bei 30°C inkubiert. Von diesen Platten wurden einzeln erkennbare Kolonien mittels Verdünnungsausstrich auf neue Agar-Platten überimpft. Diese Reinkulturen wurden in 10 ml Anreicherungsmedium bei 30°C und 120 rpm angezogen und nach ausreichendem Zellwachstum mittels Zentrifugation (5000 rpm, 30 min, 4°C) geerntet. Die Zellen wurden entweder unmittelbar aufgeschlossen und die erhaltenen Zellrohextrakte auf GluDH-Aktivität hin untersucht oder bis zur weiteren Verwendung als Pellet bei -18°C gelagert.

2.1.4.2 Kultivierung von Sammlungsstämmen

Mikroorganismen der Stammsammlung AG Hummel wurden auf GluDH-Aktivität untersucht. Dazu wurden unter anderem Stämme der Gattungen *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Amycolatopsis*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Dactylosporangium*, *Pseudomonas* sowie *Bacillus* in den von der DSMZ empfohlenen Flüssigmedium mit Zusatz von L-Glu (1 %) bei den entsprechenden Temperaturen angezogen und nach ausreichendem Zellwachstum mittels Zentrifugation (5000 rpm, 30 min, 4°C) geerntet. Die Kultivierung wurde standardmäßig in Schüttelkolben (100 ml) ohne Schikanen bei 120 rpm und der von der DSMZ empfohlenen Temperatur durchgeführt. Die Zellen wurden entweder unmittelbar nach Kultivierung und Zellernte mittels Zelmühle aufgeschlossen und die erhaltenen Zellrohextrakte auf GluDH-Aktivität hin untersucht oder bis zur weiteren Verwendung als Pellet bei -18°C gelagert.

2.1.5 Screening nach GluOX

Ein Nebenaspekt dieser Arbeit war es, bisher unbekannte mikrobielle L-AAO bzw. GluOX zu identifizieren. Dazu wurden unterschiedliche Sammlungsstämmen auf eine mögliche GluOX-Aktivität hin untersucht. Die Stämme wurden in dem von der DSMZ empfohlenen Medien mit Zusatz von 1 % L-Glu kultiviert. Anschließend wurden die Zellrohextrakte hergestellt und auf GluOX-Aktivität untersucht. Teilweise wurde für die Untersuchung auch auf Rohextrakte zurückgegriffen, die im Institut vorhanden waren. Für das Screening wurde der o-Dianisidin Aktivitätsassay eingesetzt, die Untersuchung wurde im Mikrotiterplattenformat durchgeführt. Für *Streptomyceten* Stämme wurde der Kultur-Überstand ebenfalls in der Aktivitätsuntersuchung eingesetzt. Eine Untersuchung der Rohextrakte auf Katalase Aktivität wurde durchgeführt, um eine mögliche Störreaktion durch den Abbau von Wasserstoffperoxid auszuschließen.

2.1.6 Kultivierung von *Escherichia coli*

2.1.6.1 Plattenkulturen

Die Inkubation auf LB-Agarplatten erfolgte bei 37°C, bis Einzelkolonien erkennbar waren. Mit Kolonien bewachsene Platten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 4°C gelagert.

2.1.6.2 Flüssigkulturen

Standardmäßig wurden die verschiedenen *E. coli* Stämme in LB-Medium kultiviert. Vorkulturen wurden in Reagenzgläsern, größere Kulturen in Schüttelkolben mit oder ohne Schikane inkubiert. Dazu wurden Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von LB-Agarplatten angeimpft und bei 120 rpm und 37°C geschüttelt. Bei Bedarf wurden dem Medium zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks notwendige Antibiotika hinzugefügt. Expressions-Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,05 aus Vorkulturen angeimpft und bei 120 rpm und der entsprechenden Temperatur kultiviert. Bei Bedarf wurden dem Medium zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks notwendige Antibiotika hinzugefügt (50 µg·ml⁻¹ Kanamycin, 34 µg·ml⁻¹ Chloramphenicol, 100 µg·ml⁻¹ Ampicillin). Die Genexpression wurde durch die Zugabe von IPTG (0,1 bis 1 mM) induziert und für weitere 4 bis 24 h bei der entsprechenden Temperatur unter Schütteln (120 rpm) kultiviert.

Teilweise wurden die entsprechenden *E. coli* Stämme unter Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks in Autoinduktionsmedium kultiviert. Hierbei erfolgt die Genexpression automatisch, nachdem die im Medium vorhandene Glucose verbraucht wurde und der Stoffwechsel der Zellen auf die Metabolisierung von Laktose umgestellt wurde.

Laktose induziert intrazellulär die Produktion der T7-RNA-Polymerase und somit die Expression des oder der entsprechenden Gene. Nach der Kultivierung wurde die Kulturbrühe in entsprechende Zentrifugenbehälter überführt und bei 4°C für 30 min zentrifugiert (5000 bis 12000 rpm), bis sich ein deutliches Zellpellet gebildet hatte. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden entweder direkt genutzt oder bis zur weiteren Verwendung als Pellet bei -18°C gelagert.

2.1.6.3 Hochzelldichte Fermentation von *E. coli*

Zur Produktion der GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 wurde eine Hochzelldichte-Fermentation von *E. coli* BL21(DE3)/pHISGLOX in einem 40 L Fermenter der Fa. Infors AG durchgeführt (Fermentationsmedium: HZD-Batchmedium; Modus: feed-batch).

HZD-Batchmedium enthielt 0,2 g NH₄Cl, 2 g (NH₄)₂SO₄, 13 g KH₂PO₄, 10 g K₂HPO₄, 6 g NaH₂PO₄×H₂O, 3 g Hefeextrakt, 2 g Glucose, 1 g MgSO₄×7H₂O, 0,5 % Vitaminlösung (0,1 g Riboflavin, 10 g Thiamin, 0,5 g Nicotinsäure, 0,5 g Pyridoxin, 0,5 g Ca-Phanthotenat, 0,001 g Biotin, 0,002 g Folsäure, 0,01 g Cyanocobalamin), 0,4 % Spurenelementlösung (10 g CaCl₂×2H₂O, 0,5 g ZnSO₄×7H₂O, 0,25 g CuCl₂×2H₂O, 2,5 g MnSO₄×H₂O, 1,75 g CoCl₂×6H₂O, 0,125 g H₃BO₃, 2,5 g AlCl₃×6H₂O, 0,5 g Na₂MoO₄×2H₂O, 10 g FeSO₄×7H₂O), und 0,1g Thiamin in destilliertem Wasser. Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf ein Volumen von 1 L. HZD-Feedmedium enthielt die gleichen Inhaltsstoffen wie das Batch-Medium, davon abweichend 18 g Hefeextrakt, 600 g Glucose, 10 g MgSO₄×7H₂O und 1 g Thiamin.

Die Fermentationstemperatur betrug durchgehend 28°C. Der pH-Wert des Mediums wurde auf 7,0 eingestellt und durch die Zudosierung von Korrekturmittel (25 % NH₄OH, 85 % H₃PO₄) konstant gehalten. Die Belüftung erfolgte mittels Pressluft, wobei die Regulierung des Sauerstoffpartialdruckes (auf 30% eingestellt) über die Belüftungsrate erfolgte. Die Kultivierung erfolgte unter Glucose-limitierten Wachstumsbedingungen. Die Zudosierung des HZD-Feedmediums wurde nach einem im Institut optimierten Protokoll für die Fermentation von *E. coli* durchgeführt. Die Genexpression wurde durch die Zugabe von IPTG (0,5 mM) induziert. Nach Beendigung der Fermentation wurden die Zellen von der Fermenterbrühe mittels Zentrifugation (30 min, 5000 rpm bei 4°C, Hettich Zentrifuge) abgetrennt und in Pelletform bei -18°C eingefroren.

2.1.7 Heterologe Expression der Gene

2.1.7.1 Heterologe Expression *gludh* aus *F. nucleatum* in *E. coli*

Eine Einzelkolonie von *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHF_n wurde von Platte in 20 ml LB-Medium (Ampicillin 100 µg ml⁻¹) überimpft. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Kultivierung über Nacht bei 37°C und 120 rpm. Mit der Vorkultur wurde die Hauptkultur (1 L) auf eine OD₆₀₀ von 0,05 beimpft (LB-Medium, Ampicillin 100 µg ml⁻¹). Die Kultivierung erfolgte im Schüttelkolben (5 L Volumen) bei 37°C und 120 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5. Die Genexpression wurde durch die Zugabe von IPTG (0,2 mM) induziert und für 16 h bei 30°C unter Schütteln (120 rpm) kultiviert. Danach wurde die Zellmasse durch Zentrifugation (30 min, 5000 rpm bei 4°C) von dem Medium abgetrennt. Entweder wurden die Zellen direkt genutzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -18°C gelagert.

2.1.7.2 Heterologe Expression *gludh* aus *C. difficile* in *E. coli*

Eine Einzelkolonie von *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHC_d wurde von Platte in 20 ml LB-Medium (Ampicillin 100 µg ml⁻¹) überimpft. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C und 120 rpm. Mit der Vorkultur wurde die Hauptkultur (1 L) auf eine OD₆₀₀ von 0,05 beimpft (LB-Medium, Ampicillin 100 µg ml⁻¹). Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Kultivierung im Schüttelkolben (5 L Volumen) unter Schütteln (120 rpm) bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5. Die Genexpression wurde durch die Zugabe von IPTG (0,2 mM) induziert und für weitere 16 h bei 30°C unter Schütteln (120 rpm) kultiviert. Danach wurde die Zellmasse durch Zentrifugation (30 min, 5000 rpm bei 4°C) von dem Medium abgetrennt. Entweder wurde die Zellen direkt genutzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -18°C gelagert.

2.1.7.3 Heterologe Expression *gludh* aus *B. subtilis* in *E. coli*

Eine Einzelkolonie von *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHB_s wurde von Platte in 20 ml LB-Medium (Ampicillin 100 µg ml⁻¹) überimpft. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C und 120 rpm. Mit der Vorkultur wurde die Hauptkultur (1L) auf eine OD₆₀₀ von 0,05 beimpft (LB-Medium, Ampicillin 100 µg ml⁻¹). Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Kultivierung im Schüttelkolben (5 L Volumen) unter Schütteln (120 rpm) bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5. Die Genexpression wurde durch die Zugabe von IPTG (0,1 mM) induziert und für weitere 4 h bei 37°C unter Schütteln (120 rpm) kultiviert. Danach konnte die Zellmasse durch Zentrifugation (30 min, 5000 rpm bei 4°C) von dem Medium abgetrennt werden. Entweder wurde die Zellen direkt genutzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -18°C gelagert.

2.1.7.4 Heterologe Expression *gludh* aus *T. thermophilus* in *E. coli*

Eine Einzelkolonie von *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHTt wurde in LB-Medium (Ampicillin $100 \mu\text{g ml}^{-1}$) überimpft. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C und 120 rpm. Mit der Vorkultur wurde die Hauptkultur (1L) auf eine OD_{600} von 0,05 beimpft. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Kultivierung im Schüttelkolben (5 L Volumen) bei 37°C und 120 rpm bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5. Die Genexpression wurde durch die Zugabe von IPTG (0,1 mM) induziert und für weitere 4 h bei 37°C kultiviert. Danach wurde die Zellmasse durch Zentrifugation (30 min, 5000 rpm bei 4°C , Hettich Zentrifuge) von dem Medium abgetrennt. Nach Ultraschall-Aufschluss und Zentrifugation wurde der geklärte Rohextrakt für die Aktivitätsmessung eingesetzt. Eine SDS-Page der löslichen und unlöslichen Fraktion des Zellrohextraktes wurde zur Kontrolle durchgeführt.

2.1.7.5 Heterologe Expression *gludh* aus *K. lactis* in *E. coli*

Eine Einzelkolonie von *E. coli* BL21(DE3)/pTGluDHKI wurde von Platte in 20 ml LB-Medium (Ampicillin $100 \mu\text{g ml}^{-1}$) überimpft. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Kultivierung über Nacht bei 37°C und 120 rpm. Mit der Vorkultur wurde die Hauptkultur (1 L) auf eine OD_{600} von 0,05 beimpft (LB-Medium, Ampicillin $100 \mu\text{g ml}^{-1}$). Die Kultivierung erfolgte im Schüttelkolben (5 L Volumen) unter Schütteln (120 rpm) bei 37°C bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5. Die Genexpression wurde durch die Zugabe von IPTG (0,1 mM) induziert und für weitere 22 h bei 25°C unter Schütteln (120 rpm) kultiviert. Danach wurde die Zellmasse durch Zentrifugation (30 min, 5000 rpm bei 4°C) von dem Medium abgetrennt. Entweder wurden die Zellen direkt genutzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -18°C gelagert.

2.1.7.6 Heterologe Expression *gludh* aus *B. pumilus* in *E. coli*

Eine Einzelkolonie von *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHBp wurde von Platte in 20 ml LB-Medium (Ampicillin $100 \mu\text{g ml}^{-1}$) überimpft. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C und 120 rpm. Mit der Vorkultur wurde die Hauptkultur (1 L) auf eine OD_{600} von 0,05 beimpft (LB-Medium, Ampicillin $100 \mu\text{g ml}^{-1}$). Die Kultivierung erfolgte im Schüttelkolben (5 L Volumen) unter Schütteln (120 rpm) bei 37°C bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5. Die Genexpression wurde durch die Zugabe von IPTG (0,1 mM) induziert und für weitere 4 h bei 37°C unter Schütteln (120 rpm) kultiviert. Danach wurde die Zellmasse durch Zentrifugation (30 min, 5000 rpm bei 4°C , Hettich Zentrifuge) von dem Medium abgetrennt. Entweder wurde die Zellen direkt genutzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -18°C gelagert.

2.1.7.7 Heterologe Expression *nox* aus *L. brevis* in *E. coli*

Eine Einzelkolonie von *E. coli* BL21(DE3)/pHISNOX (oder auch *E. coli* BL21(DE3) mit den entsprechenden Plasmiden für die verschiedenen NOX-Mutanten aus dem rationalen Proteindesign) wurde in 20 ml LB-Medium (Kanamycin 50 µg ml⁻¹) überimpft. Die Kultivierung erfolgte für 16 bis 24 h bei 120 rpm und 37°C. Mit dieser Vorkultur wurde die Hauptkultur (200 ml bis 1 L Autoinduktionsmedium, Kanamycin 50 µg ml⁻¹) auf eine OD₆₀₀ von 0,05 eingestellt. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Kultivierung im Schüttelkolben bei 120 rpm und 30°C für 16 h. Die Zellmasse wurde durch Zentrifugation (30 min, 5000 rpm bei 4°C) von dem Medium abgetrennt. Entweder wurden die Zellen direkt genutzt oder bis zur weiteren Verwendung als Pellet bei -18°C gelagert.

2.1.7.8 Heterologe Expression *gluox* in *E. coli*

Eine Einzelkolonie von mit pGLOXHIS transformierten *E. coli* wurde in 20 ml LB Medium (Kanamycin 50 µg ml⁻¹) überimpft. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C und 120 rpm. Mit der Vorkultur wurde die Hauptkultur (1 L Expressionsmedium) auf eine OD₆₀₀ von 0,05 beimpft. Die Kultivierung erfolgte im Schüttelkolben (5 L Volumen) bei 22°C und 120 rpm für 24 h, die Genexpression wurde durch die Zugabe von IPTG (0,5 mM) induziert und für weitere 24 h bei 22°C und 120 rpm kultiviert. Anschließend wurde die Zellmasse durch Zentrifugation (30 min, 5000 rpm bei 4°C) von dem Medium abgetrennt. Entweder wurde die Zellen direkt genutzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -18°C gelagert.

2.1.8 Stammhaltung/-lagerung

2.1.8.1 Stammhaltung auf festen Nährböden

Die Stämme wurden auf LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum bei 37°C über Nacht angezogen und anschließend bei 4°C gelagert. Unter diesen Bedingungen wurden die bewachsenen Platten für 2 Wochen genutzt.

2.1.8.2 Anlegen von Gefrierkulturen

Zur Langzeitlagerung wurde eine einzelne Kolonie des entsprechenden Stammes von der LB-Agarplatte in 3 ml LB Medium mit Selektionsantibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Zu 1,3 ml der Kulturlösung wurden 700 µl DMSO-Lösung (100 %) gegeben, gut gemischt und die Kultur in einem sterilem Kryoröhrchen (von Nunc) bei -80°C gelagert.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte standardmäßig mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen oder der Firma AnalytikJena nach Angaben des Herstellers. Die Elution der Plasmid-DNA wurde mit sterilem Millipore-Wasser durchgeführt. Die Lagerung erfolgte bei -18°C .

2.2.2 Präparation von genomischer DNA

Die Isolierung von genomischer DNA erfolgte standardmäßig mit dem DNeasy Blood and Tissue Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die Elution der genomischen DNA wurde mit sterilem Millipore-Wasser durchgeführt, die Lagerung erfolgte bei 4°C .

2.2.3 DNA Restriktion

Die Restriktionsenzyme wurden von der Firma Fermentas bezogen. Für analytische und präparative Anwendungen wurden unterschiedliche Mengen an DNA mit 1 bis 5 U Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 10 bis 50 μl versetzt. Für den Restriktionsverdau wurde für jedes Enzym der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet. Bei Doppelrestriktion wurde ein Puffer gewählt, der für beide Enzyme die höchste Aktivität ermöglicht.

Das Volumen der eingesetzten Enzymlösung betrug nicht mehr als maximal 10 % (v/v) des Restriktionsansatzes. Die Ansätze wurden 1 bis 24 h bei der entsprechenden Temperatur inkubiert und anschließend die Restriktionsenzyme thermisch inaktiviert.

2.2.4 Reinigung von DNA

Die Reinigung von DNA aus PCR- bzw. Restriktionsansätzen wurde mit dem PCR Kit der Firma Quiagen bzw. dem double pure Kit der Firma Analytik Jena durchgeführt. Eluiert wurde die DNA mit Wasser (Millipore steril, pH 7,5) und bis zur Verwendung bei -18°C gelagert.

2.2.5 Dephosphorylierung von DNA

Pro 10 μl Reaktionsansatz wurden 1 μl Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) sowie 1 μl 10x Tangow Yellow-Reaktionspuffer (Fermentas) zugesetzt. Die Reaktionszeit bei 37°C betrug 60 min. CIAP wurde durch Erhitzen auf 85°C für 15 min inaktiviert.

2.2.6 Agarosegelelektrophorese

Die analytische bzw. präparative Auftrennung von DNA erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde Ethidiumbromid verwendet.

Agarose (0,8 %) wurde in 0,5 x TBE Puffer pH 8,0 (45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA) gelöst (Erhitzen in der Mikrowelle) und Ethidiumbromid zugegeben. Anschließend wurden Gele (verschiedener Größe) in Platten gegossen und die jeweiligen Stege eingesetzt. Nach Erhitzen wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingelegt und die Proben in die Probentaschen eingefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 100 V für 20-25 min durchgeführt.

Als Größenstandard diente hierbei der 1 kb Standard der Firma Fermentas. Die Visualisierung der DNA erfolgte bei 312 nm über das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid (Eagle Eye II, Stratagene).

2.2.7 Agarosegelelextraktion

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem Geleextraktion Kit der Firma Quiagen bzw. dem double pure Kit der Firma Analytik Jena nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde mit Wasser eluiert (Millipore steril, pH 7,5) und bis zur weiteren Verwendung bei -18°C gelagert.

2.2.8 Ligation von DNA mit T4-DNA-Ligase

Für die Ligrationsreaktion mit überhängenden Enden (sticky-ends) wurde das zu klonierende DNA-Fragment in etwa dreifachem molarem Überschuss im Vergleich zum Vektor vorgelegt. Zur Ligation wurde die DNA-Lösung mit 2 μl 5-fach Ligasepuffer, 0,5 μl T4-DNA-Ligase (2,5 U) und sterilem Millipore Wasser gemischt (Endvolumen 10 μl). Der Ligrationsansatz wurde eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Der Ansatz wurde für die Transformation in *E. coli* verwendet oder bei -18°C gelagert.

2.2.9 Herstellung kompetenter Zellen

Bakterienzellen aus einer Gefrierkultur wurden auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit sterilen Zahnstochern wurde eine Vorkultur (10 ml) aus einer Einzelkolonie angeimpft, es wurde für mind. 14 h bei 37°C und 120 rpm kultiviert.

Anschließend wurde eine Hauptkultur (100 ml + Mg²⁺-Mix) auf eine OD₆₀₀ von 0,05 beimpft. Die Hauptkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C kultiviert. Die Zellsuspension wurde aufgeteilt und zentrifugiert (20 min, 4°C und 5.000 rpm). Die Zellpellets wurden in jeweils 25 ml Transformationspuffer (4°C) resuspendiert, für 1 h auf Eis inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert (20 min, bei 4°C und 5000 rpm). Nachfolgend wurden die sedimentierten Zellen in insgesamt 10 ml TMF-Glycerol-Puffer (TMF-Puffer + 20 % Glycerol) resuspendiert und jeweils 100 µl in sterile Eppendorf Reaktionsgefäße (im Eisfach vorgekühlt) gegeben. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80°C.

Transformationspuffer (TMF)

100 mM CaCl₂
50 mM RbCl
40 mM MnCl₂

Mg²⁺-Mix

500 mM MgCl₂
500 mM MgSO₄

2.2.10 Hitzeschocktransformation

Zu 100 µl kompetenten Zellen wurden 1-10 µl eines Ligationsansatzes oder 1-5 µl Vektor bzw. Plasmid hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 15 bis 60 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 1,5 min bei 42 °C, gefolgt von einer Inkubation auf Eis (2 min). Nach der Zugabe von 700 µl LB-Medium folgte die phänische Expression für die jeweils benötigte Zeit (in Abhängigkeit vom verwendeten Antibiotikum) bei 37 °C und leichtem Schütteln (120 rpm). Die Zellen wurden anschließend mittels Zentrifugation (12000 rpm, 1 min) sedimentiert, in 200 µl LB-Medium resuspendiert und ein Aliquot (10-100 µl) auf LB-Agarplatten mit dem entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen.

2.2.11 Herstellung der Primer

Alle in dieser Arbeit benötigten Primer wurden von der Firma MWG synthetisiert und in lyophilisierter Form geliefert. Das Lösen der Primer geschah in sterilem Millipore Wasser, sie wurden durchgängig bei -18°C gelagert und vor dem Einsatz in der PCR auf Eis aufgetaut.

2.2.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifizierung der unterschiedlichen Gene (*gludh*, *nox*, *gluox*, *hplI*, und *aladh*) eingesetzt. Für die PCR wurde die Phusion Polymerase der Firma Fermentas verwendet, die eine 5'-3' „Proofreading“ Aktivität besitzt (mittels einer Exonucleaseaktivität werden durch die Polymerase eventuell falsch eingebaute Nucleotide erkannt und ersetzt). Die Zusammensetzung eines Standard-PCR-Reaktionsansatzes in der Tabelle 3 wiedergegeben.

Tabelle 3: Die Zusammensetzung eines Standard-PCR-Reaktionsansatzes.

Komponente	Menge
DNA-Template (Plasmid-DNA, genomische DNA)	5-100 ng
Reaktionspuffer	1x
dATP,dCTP,dGTP,dTTP	je 0,2 mM
Primer for	25 pmol
Primer rev	25 pmol
DMSO	0-8 % (v/v)
Phusion Polymerase	0,5-1 U
Aqua bidest	ad 50 µl

Standardmäßig wurden PCRs auf einem DNA-Thermal-Cycler (Eppendorf) nach folgendem Programm durchgeführt, wobei die Temperatur des Annealingschrittes von den Schmelzpunkten der jeweils verwendeten Primer abhängig war.

1. Initiale Denaturierung 98°C 30 s
2. Denaturierung 98°C 10 s
3. Annealing 20 s
4. Elongation 72°C 15-30 s/kb, 30 mal zurück zu Schritt 2.
5. Finale Elongation 72° 10 min

2.2.13 “Error-Prone” PCR (epPCR)

Die Methode der „error-prone“ PCR (epPCR) wurde zur zufälligen Mutagenese angewandt, Es wurde jeweils ein epPCR Protokoll verwendet, das die gewünschte Mutationsrate in Höhe von 1-3 aufweist (Abbildung 4).

Fünf Parallelansätze zu je 50 µl wurden durchgeführt, hierbei wurde eine Goldstar Taq-Polymerase verwendet, die keine „Proofreading“ Aktivität besitzt. Das bedeutet, sie verfügt nicht über die Möglichkeit fehlerhaft eingebaute Nucleotide zu erkennen und diese zu ersetzen. Die Zusammensetzung eines Standard-epPCR-Reaktionsansatz in der Tabelle 4 wiedergegeben.

Tabelle 4: Die Zusammensetzung eines Standard-epPCR-Reaktionsansatz.

Komponente	Menge
DNA-Template (Plasmid-DNA)	5-100 ng
Reaktionspuffer	1x
dATP,dCTP,dGTP,dTTP	je 0,2 mM
Primer for	25 pmol
Primer rev	25 pmol
Goldstar Taq-Polymerase	2,5 U
MgCl ₂	6 mM
MnCl ₂	0,05 mM
Aqua bidest	ad 50 µl

Die epPCR wurde auf einem automatischen DNA-Thermal-Cycler (Eppendorf) nach folgendem Programm durchgeführt:

1. Initiale Denaturierung 95°C 3 min
2. Denaturierung 95°C 1 min
3. Annealing [$T_m - 4^\circ\text{C}$] 1 min
4. Elongation 72°C 2 min, 30 mal zurück zu Schritt 2.
5. Finale Elongation 72° 10 min

Nach Ablauf des Programms wurden die verschiedenen Ansätze miteinander vereinigt. Der epPCR-Ansatz wurde mit Hilfe eines präparativen Agarosegels und anschließendem Gel Kit gereinigt. Zur Kontrolle der amplifizierten DNA-Fragmente, wurde ein Aliquot des epPCR-Ansatzes in einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt.

2.2.14 „Quick Change“ PCR

Bei dieser Methode werden Primer verwendet, die zueinander komplementär sind und an der betreffenden Stelle innerhalb der Sequenz eine Mutation tragen. Die Mutageneseprimer werden in einer PCR zur Amplifizierung vom gesamten Plasmid mit dem zu mutierendem Gen eingesetzt. Für die „Quick Change“ PCR wurde die Phusion-Polymerase der Firma Fermentas verwendet, die Zusammensetzung eines Standard PCR-Ansatzes in der Tabelle 5 wiedergegeben.

Tabelle 5: Die Zusammensetzung bzw. Konzentrationen der Komponenten im „Quick Change“ PCR Reaktionsansatz (50 µl).

Komponente	Menge
DNA-Template (Plasmid-DNA)	10-50 ng
Reaktionspuffer	1x
dATP,dCTP,dGTP,dTTP	je 0,2 mM
Quick Change Primer for	20 pmol
Quick Change Primer rev	20 pmol
Phusion-Polymerase	1-2,5 U
DMSO	0-8 % (v/v)
Aqua bidest	ad 50 µl

Standardmäßig wurden PCR Reaktionen auf einem automatischen DNA-Thermal-Cycler (Eppendorf) nach folgendem Programm durchgeführt:

1. Initiale Denaturierung 98°C 3 min
2. Denaturierung 98°C 20 s
3. Annealing 20 s
4. Elongation 72°C 15-30 s/kb, 20 mal zurück zu Schritt 2.
5. Finale Elongation 72° 10 min

Die Temperatur des Annealingschrittes hängt von den Schmelzpunkten der jeweils verwendeten Primer ab. Nach Durchführung der Quick Change PCR wurde die Template-DNA durch einen Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *DpnI* abgebaut. *DpnI* erkennt ausschließlich methylierte DNA, so dass die PCR Produkte unberührt bleiben.

2.2.15 Sättigungsmutagenese mittels „Quick Change“ PCR

Die Sättigungsmutagenese erfolgte nach dem Prinzip der „Quick Change“ PCR. Es wurden Mutageneseprimer verwendet, die zueinander komplementär sind und an der betreffenden Stelle innerhalb der Sequenz die Degenerierung NNK (N: Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin; K: Guanin, Thymin) tragen. Die Degenerierung NNK beinhaltet 32 Codons, die den theoretischen Austausch gegen alle proteinogenen Aminosäuren ermöglichen [Reetz, 2011]. Die degenerierten Primer wurden in der PCR eingesetzt. Es wurden der Standard-PCR-Reaktionsansatz und das Standard-PCR-Programm der „Quick Change“ PCR verwendet. Nach Durchführung der PCR wurde die Template-DNA durch einen Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *DpnI* abgebaut.

2.2.16 Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von den Firmen Sequiserve, MWG oder LGC durchgeführt.

2.2.17 Herstellung und Genexpression der *gludh*-Mutantenbibliothek

Die DNA-Fragmente der epPCR wurden in die erste MCS des Vektors petDuet-1 mittels Ligation eingefügt (pDGluDHCDep) und in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Nach Kultivierung auf Festmedium wurden die hergestellten Mutanten mit sterilen Zahnstochern in 96-Deep-Well Mikrotiterplatten (Masterplatten) überimpft (1 ml Kulturvolumen) und unter Selektionsdruck in LB-Medium (Ampicillin 100 µg ml⁻¹) bis zum Erreichen der stationären Phase über Nacht bei 37 °C und 800 rpm kultiviert. Der erste Wachstumsschritt bei 37 °C bis zum Erreichen der stationären Phase sorgte dafür, dass die Zellen in den verschiedenen Wells der 96-Deep-Well Mikrotiterplatte eine ähnliche optische Dichte erreichen. Jede Deep-Well Mikrotiterplatte enthielt als Positiv-Kontrolle je vier Wells mit der rekombinanten Wildtyp-GluDH (*E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHCd) und je zwei Wells mit *E. coli* BL21(DE3)/petDuet-1 als Negativ-Kontrolle. Die Kulturen wurden in einem zweiten Schritt in neue Mikrotiterplatten mit Autoinduktionsmedium überimpft (1 ml Kulturvolumen), die Kultivierung wurde unter Selektionsdruck über Nacht für 16 h bei 30 °C und 800 rpm durchgeführt. Hierbei erfolgt die Genexpression automatisch, nachdem die im Medium vorhandene Glucose metabolisiert und der Stoffwechsel der Zellen auf die aktive Aufnahme von Laktose umgestellt wurde. Durch die Verwendung von Autoinduktionsmedium war gewährleistet, dass Kultivierung und Genexpression der verschiedenen Mutanten der Bibliothek stets unter gleichen Bedingungen ablaufen.

Zur Stammkonservierung wurden die Masterplatten nach Kultivierung und Überimpfung bei -80°C gelagert. Die Zellen der Deep-Well-Platte mit Autoinduktionsmedium wurden nach der Kultivierung mittels Zentrifugation (Hettich Zentrifuge mit Deep-Well-Platten Einsatz, 20 min bei 5000 rpm und 4°C) vom Medium abgetrennt und entweder direkt für die weiteren Versuche eingesetzt oder bis zur Verwendung bei -18°C gelagert.

2.2.18 Herstellung und Genexpression der *gludh*-Sättigungsmutagenesebibliothek

Die mutierte DNA der Quick Change PCR wurde in kompetente *E. coli* BL21 (DE3) Zellen transformiert. Nach Kultivierung auf LB-Platten (Ampicillin $100\ \mu\text{g ml}^{-1}$) wurden die hergestellten Mutanten mit sterilen Zahnstochern in Deep-Well Mikrotiterplatten überimpft und unter Selektionsdruck in LB-Medium über Nacht bei $37\ ^{\circ}\text{C}$ und 800 rpm kultiviert. Jede Platte enthielt als Kontrolle zwei Wells mit der Wildtyp GluDH (*E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHCd), mit der Mutante M16H9 (*E. coli* BL21(DE3)/pDM16H9) und zwei Wells mit *E. coli* BL21(DE3)/petDuet-1 als Leervektor-Kontrolle. Die Kulturen wurden in neue Mikrotiterplatten mit Autoinduktionsmedium überimpft (1 ml Kulturvolumen) und unter Selektionsdruck über Nacht für 16 h bei $30\ ^{\circ}\text{C}$ und 800 rpm kultiviert. Durch die Verwendung von Autoinduktionsmedium war gewährleistet, dass Kultivierung und Genexpression der verschiedenen Mutanten der Bibliothek stets unter gleichen Bedingungen ablaufen. Die Zellen der Deep-Well-Platte mit Autoinduktionsmedium wurden nach der Kultivierung mittels Zentrifugation (Hettich Zentrifuge mit Deep-Well-Platten Einsatz, 20 min bei 5000 rpm und 4°C) vom Medium abgetrennt und entweder direkt für die weiteren Versuche eingesetzt oder bis zur Verwendung bei -18°C gelagert.

2.2.19 Herstellung und Genexpression der *nox*-Mutantenbibliothek

Die DNA-Fragmente der epPCR wurden in die MCS des Vektors pet28a mittels Ligation eingefügt (pHISNOXep) und in kompetente Zellen (*E. coli* BL21(DE3)) transformiert. Die gewachsenen Kolonien wurden mit sterilen Zahnstochern in 96-Deep-Well Mikrotiterplatten (Masterplatten) überimpft (1 ml Kulturvolumen) und unter Selektionsdruck in LB-Medium (Kanamycin $50\ \mu\text{g ml}^{-1}$) über Nacht bei $30\ ^{\circ}\text{C}$ und 120 rpm kultiviert. Jede Platte enthielt als Positiv-Kontrolle je zwei Wells mit der rekombinanten Wildtyp-NOX in *E. coli* BL21(DE3) und mit *E. coli* BL21(DE3)/pet28a als Negativ-Kontrolle. Die Kulturen wurden in neue 96-Deep-Well Mikrotiterplatten mit Autoinduktionsmedium überimpft (1 ml Kulturvolumen, Kanamycin $50\ \mu\text{g ml}^{-1}$).

Die Kultivierung wurden unter Selektionsdruck in Autoinduktionsmedium über Nacht für 16 h bei 30 °C und 120 rpm durchgeführt. Hierbei erfolgt die Genexpression automatisch, Laktose induziert intrazellulär die Produktion der T7-RNA-Polymerase und somit die Expression des *nox*-Gens. Die Zellen der Deep-Well-Platte mit Autoinduktionsmedium wurden mittels Zentrifugation vom Medium abgetrennt (Hettich Zentrifuge mit Deep-Well-Platten Einsatz, 20 min bei 5000 rpm und 4°C). Entweder wurden die Zellen direkt für die weiteren Versuche eingesetzt oder bis zur Verwendung bei –18°C gelagert. Zur Stammkonservierung wurden die Masterplatten nach Kultivierung und Überimpfung in Autoinduktionsmedium bei –80°C gelagert.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Zellrohextrakten der Mutantenbibliothek

Der Aufschluss der Zellen aus den Deep-Well-Platten mit Autoinduktionsmedium wurde mittels Lysepuffer durchgeführt. Dazu wurden die Zellpellets in jeweils 200 µl Lysepuffer resuspendiert und für 1 h bei 37°C und 800 rpm inkubiert. Die Deep-Well-Platten wurden anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Morgen bei 4°C und 5000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der geklärte Zellrohextrakt (Überstand) wurde in den nachfolgenden Versuchen eingesetzt, die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Lysepuffer GluDH:	10 mg ml ⁻¹ Lysozym 0,4 % Triton X-100 in 50 mM Kpi Puffer pH 7,5
Lysepuffer NOX:	10 mg ml ⁻¹ Lysozym 0,4 % Triton X-100 in 50 mM Kpi Puffer pH 6,0

2.3.2 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Zellen wurden in dem entsprechendem Aufschlusspuffer in einem Zell-Puffer Verhältnis von 1:4 resuspendiert (25 % Zellsuspension) und auf Eis mit Ultraschall aufgeschlossen. Aufschlussbedingungen: Spitze: MS 72 oder MS 73 (Bandelin); Power 80 %, Cycles 50x; 3 x 2 min; jeweils 2 min Pause gekühlt auf Eis. Ganze Zellen und Zellfragmente wurden anschließend durch Zentrifugation (14000 rpm, 30 min, 4°C) abgetrennt.

2.3.3 Zellaufschluss mittels Schwingkugelmühle

Die Methode des Zellaufschlusses mittels Schwingkugelmühle wurde während des Screenings der Stammsammlung angewandt. Die Zellen wurden in 50 mM Kpi Puffer pH 7,5 resuspendiert, um eine 25 % Zellsuspension herzustellen. 700 µL dieser Suspension wurden mit 1,2 mg Glasperlen (0,3 mm) vermischt (1,5 ml Eppendorfgefäß), anschließend in den auf Eis vorgekühlten Probenhalterungen in der Schwingkugelmühle (Firma Retsch) befestigt und aufgeschlossen (5 min, Amplitude 100%). Es folgte eine Kühlphase der Zellsuspensionen auf Eis gefolgt von einem weiteren Schütteln für 5 min. Zelltrümmer sowie Glasperlen wurden durch Zentrifugation (14000 rpm, 30 min, 4°C) abgetrennt, der geklärte Überstand abgenommen und auf Eis bzw. bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. .

2.3.4 Proteingehaltbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurden 100 µl Probe mit 900 µl Bradfordreagenz in einer Küvette vermischt und 15 min im Dunkeln inkubiert. Die Extinktion bei 595 nm wurde gemessen und anhand der erstellten Eichreihe der Proteingehalt bestimmt, als Blindwert wurde Wasser verwendet. Die Extinktion der Probe bei 595 nm sollte für die Messung geringer als 0,6 sein. In Korrelation zu einer Eichreihe mit 0,01-1 mg ml⁻¹ Rinderserumalbumin wurde der Proteingehalt der Probe bestimmt.

Herstellung der Bradfordreagenz: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 wurden mit 50 ml Ethanol (95 %) versetzt und über Nacht gerührt. Nach Zugabe von 100 ml Phosphorsäure (85 %) und Auffüllen mit destilliertem Wasser (1 L) wurde die fertige Lösung eine Stunde gerührt und anschließend filtriert. Die Lösung wurde im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt und möglichst nicht bewegt.

2.3.5 Bestimmung der Enzymaktivitäten

2.3.5.1 Bestimmung der GluDH-Aktivität

Die Aktivitätsmessung der GluDH beruht auf der photometrisch gemessenen Zunahme an NADH bei 340 nm. Bei der oxidativen Desaminierung von L-Glu wird NAD^+ stöchiometrisch zu NADH reduziert. Der Standard-Testansatz enthielt, sofern nicht anderes angegeben, 50 mM L-Glu, 2,0 mM NAD^+ , 200 mM Kpi Puffer pH 8,0 (1 ml, 30°C). Für die Biotransformation wurde die Aktivität mit der entsprechend eingesetzten Konzentration an Substrat und Cofaktor im jeweiligen Puffer bestimmt. Die Messung wurde durch Zugabe der Enzymlösung gestartet über einen Zeitraum von einer Minute wurde die Änderung der Extinktion verfolgt. Der molare Extinktionskoeffizient für NADH beträgt $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Eine Unit (U) ist definiert als die Enzymmenge, welche die oxidative Desaminierung von 1 μmol L-Glu pro min und ml katalysiert.

2.3.5.2 Nachweis GluDH-Aktivität mittels NTB-Aktivitätsfärbung

Die NTB-Aktivitätsfärbung läuft folgendermaßen ab: Die eingesetzte GluDH reduziert in der katalysierten Reaktion NAD^+ zu NADH, wobei die Elektronen auf die Verbindung Phenazinmethosulfat (PMS) übertragen werden. PMS reagiert wiederum mit Nitrotetrazoliumblausulfat (NTB) und reduziert dieses zu Formazan. Für die Untersuchung mittels NTB-Aktivitätsfärbung wurden Konzentrationen von 100 mM bzw. 200 mM α -KG sowie von 10 mM bzw. 50 mM α -KG und Ammonium eingesetzt (10 mM L-Glu, 2,5 mM NAD^+ , 0,1 mg ml^{-1} NBT und 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ PMS, in 200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 30°C). Die Ansätze wurden mit Färbelösung versetzt und vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 0, 10, 20, 30 und 60 min wurde die Absorption der Proben bei 590 nm im Mikrotiterplatten-Photometer vermessen. Ebenfalls wurden Kontrollen ohne GluDH durchgeführt und die entsprechende Absorptionsänderung in der Auswertung berücksichtigt.

2.3.5.3 Bestimmung der NOX-Aktivität

Die Aktivität der Wildtyp-NOX sowie der NOX-Mutanten wurde photometrisch bei 340 nm bestimmt. Der Standard-Testansatz enthielt 0,2 mM NADH bzw. NADPH in 50 mM Kpi Puffer pH 6,0, Gesamtvolumen 1 ml, Temperatur 30°C. Die Messung wurde durch Zugabe der Enzymlösung gestartet und über den Zeitraum von 1 min bzw. 30 s wurde die Änderung der Extinktion verfolgt. Der molare Extinktionskoeffizient für NAD(P)H beträgt $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Eine Unit (U) ist definiert als die Enzymmenge, welche die Oxidation von 1 μmol NAD(P)H pro min und ml katalysiert.

2.3.5.4 Bestimmung der NOX-Aktivität für die *in situ*-Cofaktorregenerierung

Die NOX-Aktivität wurde photometrisch bei 340 nm bestimmt. Der Testansatz enthielt 0,1 mM NADH bzw. NADPH in 100 mM TEA Puffer pH 7,0 sowie 1 mM MgCl₂, Gesamtvolumen 1 ml, Temperatur 30°C. Die Messung wurde durch Zugabe der Enzymlösung gestartet über einen Zeitraum von einer Minute wurde die Änderung der Extinktion verfolgt. Der molare Extinktionskoeffizient für NAD(P)H beträgt 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹. Eine Unit (U) ist definiert als die Enzymmenge, welche unter den jeweiligen Bedingungen die Oxidation von 1 µmol NADH bzw. NADPH pro min und ml katalysiert.

2.3.5.5 Bestimmung der GluOX-Aktivität

Die Aktivität der GluOX wurde über die H₂O₂-Bildung während der Reaktion vermessen. Dazu wurde in einem gekoppelten Enzymtest die durch Meerrettich Peroxidase (POX) katalysierte Farbstoffbildung aus H₂O₂ und o-Dianisidin photometrisch bei 436 nm und entsprechender Temperatur nachgewiesen. Der molare Extinktionskoeffizient (436 nm) für o-Dianisidin beträgt 8,1 mM⁻¹ cm⁻¹. Der Standard-Testansatz enthielt: 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 0,05 mg ml⁻¹ o-Dianisidin, 10 U Meerrettich Peroxidase (POX), 10 µl ml⁻¹ Enzymlösung in geeigneter Verdünnung. Der Aktivitäts-Test wurde in einem Gesamtvolumen von 1 ml durchgeführt. Nach einer Temperaturanpassung (15 min) wurde die Reaktion durch Zugabe der Enzymlösung gestartet und die Extinktionsänderung infolge der Farbstoffbildung bei einer Wellenlänge von 436 nm vermessen. Für die Biotransformation wurde die GluOX-Aktivität mit der entsprechend eingesetzten Konzentration an Substrat bestimmt. Eine Unit (U) ist definiert als die Enzymmenge, welche die oxidative Desaminierung von 1 µmol L-Glu pro min und ml katalysiert.

2.3.5.6 Bestimmung der Katalase-Aktivität

Die Katalase-Aktivität wurde anhand der H₂O₂-Abnahme photometrisch bei 240 nm nachgewiesen. Der Standard-Testansatz enthielt 2,9 mM H₂O₂ in 50 mM Kpi Puffer pH 7,5 und Katalase in geeigneter Verdünnung. Der Aktivitätstest wurde in einer Quarzküvette (Gesamtvolumen 1 ml) bei 15°C durchgeführt. Die Messung wurde durch Zugabe der Enzymlösung gestartet über einen Zeitraum von einer Minute wurde die Änderung der Extinktion verfolgt. Der molare Extinktionskoeffizient für H₂O₂ beträgt 0,04 mM⁻¹ cm⁻¹. Eine Unit (U) ist definiert als die Enzymmenge, die den Abbau von 1 µmol H₂O₂ pro min und ml katalysiert.

2.3.5.7 Bestimmung der GPT-Aktivität

Die Messung der GPT-Aktivität wurde in einem gekoppelten Enzymtest mit einer GluDH durchgeführt. Bei der Transaminierung von L-Glu/Pyruvat entsteht stöchiometrisch α -KG, welches durch eine GluDH in der Gegenwart von Ammonium und NADH zu L-Glu reduziert wird. Die Aktivitätsbestimmung der GPT beruht hierbei auf der photometrisch gemessenen Abnahme an NADH bei 340 nm. Der Standard Testansatz enthielt 50 mM L-Glu, 5 mM Pyruvat, 0,1 mM NADH, 200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 50 U gereinigte GluDH *C. difficile*, das Gesamtvolumen betrug 1 ml, die Temperatur 30°C. Die Messung wurde durch Zugabe der Enzymlösung gestartet über einen Zeitraum von einer Minute wurde die Änderung der Extinktion verfolgt. Der molare Extinktionskoeffizient für NADH beträgt $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Eine Unit (U) ist definiert als die Enzymmenge, welche die Transaminierung von 1 μmol L-Glu und Pyruvat pro min und ml katalysiert.

2.3.5.8 Bestimmung der AlaDH-Aktivität

Die Aktivitätsbestimmung der AlaDH beruht auf der photometrisch gemessenen Zunahme an NADH bei 340 nm. Bei der oxidativen Desaminierung von L-Ala wird NAD^+ stöchiometrisch zu NADH reduziert. Der Standard Testansatz enthielt 5 mM L-Ala, 0,5 mM NAD^+ , 200 mM Kpi Puffer pH 8,0. Das Gesamtvolumen betrug 1 ml, die Temperatur 30°C. Die Messung wurde durch Zugabe der Enzymlösung gestartet über einen Zeitraum von einer Minute wurde die Änderung der Extinktion verfolgt. Der molare Extinktionskoeffizient für NADH beträgt $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Eine Unit (U) ist definiert als die Enzymmenge, welche die oxidative Desaminierung von 1 μmol L-Ala pro min und ml katalysiert.

2.3.5.9 Bestimmung der LeuDH-Aktivität

Die Aktivitätsbestimmung der LeuDH beruht auf der photometrisch gemessenen Zunahme bzw. Abnahme der Absorption von NADH bei 340 nm. Bei der oxidativen Desaminierung von L-Leu wird NAD^+ stöchiometrisch zu NADH reduziert. Der Standard Testansatz enthielt 10 mM L-Leu, 2,5 mM NAD^+ , 100 mM Gly-NaOH Puffer pH 10,5 bzw. für den Einsatz in der Cofaktorregenerierung 10 mM L-Leu, 1 mM NAD^+ , 200 mM Kpi Puffer pH 8,0. Das Gesamtvolumen betrug 1 ml, die Temperatur 30°C. Der molare Extinktionskoeffizient für NADH beträgt $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Eine Unit (U) ist definiert als die Enzymmenge, welche die oxidative Desaminierung von 1 μmol L-Leu pro min und ml katalysiert.

2.3.5.10 Bestimmung der LDH-Aktivität

Die Aktivität der LDH wurde photometrisch bei 340 nm bestimmt. Der Testansatz enthielt 100 mM Pyruvat, 0,1 mM NADH in 200 mM Kpi Puffer pH 7,0 bzw. 8,0, Gesamtvolumen 1 ml, Temperatur 30°C. Die Messung wurde durch Zugabe der Enzymlösung gestartet und erfolgte über einen Zeitraum von einer Minute. Der molare Extinktionskoeffizient für NAD(P)H beträgt $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Eine Unit (U) ist definiert als die Enzymmenge, welche die Oxidation von 1 μmol NADH pro min und ml katalysiert.

2.3.5.11 Bestimmung der ADH-Aktivität

Die Aktivitätsbestimmung der ADHs aus *Lactobacillus kefir* (LkADH), *Lactobacillus brevis* (LbADH) sowie *Rhodococcus ruber* (RrADH) beruht auf der photometrisch gemessenen Zunahme an NAD(P)H bei 340 nm. Bei der Oxidation des Alkohols zum Keton wird NAD(P)⁺ stöchiometrisch zu NAD(P)H reduziert. Der Standard Testansatz enthielt 10 mM *rac*-1-Phenylethanol, 1 mM MgCl₂ und 0,1 mM NAD(P)⁺, 100 mM TEA Puffer pH 7,0. Das Gesamtvolumen betrug 1 ml, die Temperatur 30°C. Für die Biotransformation wurden die Aktivitäten mit den entsprechend eingesetzten Konzentrationen an NAD(P)⁺ (je nach Ansatz 0,025 bis 0,1 mM) und *rac*-1-Phenylethanol (10 bis 50 mM) bestimmt. Die Messung wurde durch Zugabe der Enzymlösung in geeigneter Verdünnung gestartet und über den Zeitraum von einer Minute wurde die Änderung der Extinktion verfolgt. Der molare Extinktionskoeffizient für NAD(P)H beträgt $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Eine Unit (U) ist definiert als die Enzymmenge, welche die Oxidation von 1 μmol (*R*)-1-Phenylethanol bzw. (*S*)-1-Phenylethanol pro min und ml katalysiert.

2.3.6 Screening nach verbesserten Enzymvarianten

2.3.6.1 Screening der NOX-Mutantenbibliothek

Das Screening der Mutantenbibliothek aus der Random Mutagenese mittels epPCR auf NOX-Varianten mit NADPH-Oxidase-Aktivität bzw. mit einer erhöhten pH-Stabilität im eher basischen pH Bereich von 9,0 erfolgte mittels photometrischem Aktivitätstest.

2.3.6.2 Screening der Mutantenbibliothek auf NADPH-Oxidase-Aktivität

Die Aktivitätsuntersuchung der geklärten Zellrohextrakte erfolgte im Mikrotiterplatten-Photometer (Microplate Reader), hierzu wurde die Abnahme des im Verlauf der Reaktion von der NOX oxidierten NADPH vermessen.

2.3.6.4 Screening der GluDH-Mutantenbibliothek

Das Screening der Mutantenbibliothek aus der „Random Mutagenese“ mittels ep-PCR sowie der Sättigungsmutagenese auf GluDH-Mutanten mit erniedrigter Produktinhibierung durch α -KG erfolgte mittels photometrischem Aktivitätstest. Hierzu wurde die Aktivität in der oxidativen Desaminierung von L-Glu ohne oder mit Zusatz einer äquimolaren Konzentration an α -KG untersucht. Die Aktivitätsuntersuchung der geklärten Zellrohextrakte erfolgte im Mikrotiterplatten-Photometer (Microplate Reader).

Mit Hilfe einer Merkanalpipette (Eppendorf) wurden jeweils 20 μ l Aliquote der geklärten Zellrohextrakte in eine für die Photometermessung geeignete Mikrotiterplatte (Nunc) überführt. Zu diesen 20 μ l Zellrohextrakt wurde anschließend mit Hilfe einer Merkanalpipette jeweils 140 μ l vortemperierte Reaktionslösung hinzugegeben, es ergibt sich dadurch ein Endvolumen von 160 μ l. Anschließend wurde mittels Mikrotiterplatten-Photometer für 10 s gemischt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 340 nm und einer Temperatur von 30°C über einen Zeitraum von 5 min.

Reaktionslösung A: L-Glu 28,5 mM (im Ansatz 25 mM)
 NAD⁺ 2,8 mM (im Ansatz 2,5 mM)
 100 mM Kpi Puffer pH 8,0
 temperiert auf 30°C

Reaktionslösung B: wie A jedoch zusätzlich
 α -KG 28,5 mM (im Ansatz 25 mM)

2.3.7 Reinigung der Enzyme

Die Aufreinigung der verschiedenen in dieser Arbeit eingesetzten Enzyme erfolgte über säulenchromatographische Methoden. Alle eingesetzten Puffer wurden vor Gebrauch autoklaviert bzw. sterilfiltriert, mittels Ultraschallbad entgast und auf 4°C gekühlt. Die Herstellung der Zellrohextrakte erfolgte mittels Ultraschall.

2.3.7.1 Reinigung der rekombinanten GluDH aus *F. nucleatum*

Die Reinigung der rekombinanten *F. nucleatum* GluDH aus *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHF_n-Zellen erfolgte durch Hitzefällung sowie Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose. Im Verlauf der Reinigung wurden nach jedem Schritt Proben für Aktivitäts- und Proteingehaltsmessungen zurückgestellt.

Die Zellen wurden in 50 mM Kpi Puffer pH 7,5 resuspendiert (25 % Zellsuspension) und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der durch Zentrifugation (14000 rpm, 30 min, 4°C) geklärte Zellrohextrakt wurde für die Hitzedenaturierung eingesetzt. Um eine Abtrennung von Fremdproteinen zu erreichen, wurde der Rohextrakt für 30 min auf 59°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die GluDH ist in diesem Temperaturbereich ausgesprochen stabil, ungewollte zelleigene Proteine hingegen denaturieren und fallen aus. Die Lösung wurde zentrifugiert (14000 rpm, 30 min, 4°C) und der Überstand abgenommen. Die weitere Reinigung erfolgte über eine chromatographische Säule, die mit Q-Sepharose FF (GE Healthcare) gepackt war (Säulenvolumen 20 ml). Zur Äquilibrierung wurde die Säule sowie das Pumpensystem der ÄKTA mit dem 10-fachen Säulenvolumen an 50 mM Kpi Puffer pH 7,5 gespült. Der geklärte Überstand der Hitzefällung wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 1,5 ml min⁻¹ auf die Säule aufgetragen, so dass das Enzym an die Säulenmatrix bindet. Nach der Beladung wurde die Säule mit mind. dem 5-fachen Säulenvolumen an 50 mM Kpi Puffer pH 7,5 gewaschen. Anschließend wurde die Elution der Proteine mit einem NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M (50 mM Kpi Puffer pH 7,5) in 130 min gestartet. Während der Elution wurden Fraktionen von 2,5 ml gesammelt. Die Elution der Proteine von der Säule wurde mit Hilfe eines UV-Detektors bei 280 nm verfolgt. Die Peaks im Chromatogramm wurden den verschiedenen Fraktionen zugeordnet, welche auf Aktivität hin überprüft wurden. Die als aktiv identifizierten Elutionsfraktionen wurden zu einem Pool vereinigt und mit Hilfe einer Ultrafiltrationseinheit eingeeengt, anschließend wurde die Enzymlösung mit einer PD10 Sephadex G 25 Säule (Pharmacia) umgepuffert (50 mM Kpi Puffer pH 7,5). Die Lagerung der aufgereinigten GluDH erfolgte bei -18°C.

2.3.7.2 Reinigung der rekombinanten GluDH aus *C. difficile*

Die Reinigung der rekombinanten *C. difficile* GluDH aus dem *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHCd Zellrohextrakt erfolgte analog zum Enzym aus *F. nucleatum* durch Hitzefällung bei 59°C sowie Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose. Aufschluss-, Äquilibrierungs- und Lagerpuffer 50 mM Kpi Puffer pH 7,5.

2.3.7.3 Reinigung der rekombinanten GluDH aus *B. subtilis*

Die Reinigung der rekombinanten *B. subtilis* GluDH aus dem *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHBs Zellrohextrakt erfolgte analog zum Enzym aus *F. nucleatum* durch Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose.

Äquilibrierungspuffer 50 mM Kpi Puffer pH 7,5, Aufschluss- und Lagerpuffer 100 mM Kpi Puffer pH 5,5 (3 mM EDTA, 30 % Glycerol).

2.3.7.4 Reinigung der rekombinanten GluDH aus *B. pumilus*

Die Reinigung der rekombinanten *B. pumilus* GluDH aus dem *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHBp Zellrohextrakt erfolgte analog zum Enzym aus *F. nucleatum* durch Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose. Aufschluss-, Äquilibrierungs- und Lagerpuffer 50 mM Kpi Puffer pH 7,5.

2.3.7.5 Reinigung der rekombinanten GluDH aus *K. lactis*

Die Reinigung der rekombinanten *K. lactis* GluDH aus dem *E. coli* BL21(DE3)/pTGluDHKI Zellrohextrakt erfolgte analog zum Enzym aus *F. nucleatum* durch Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose. Aufschluss-, Äquilibrierungs- und Lagerpuffer 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5.

2.3.7.6 Reinigung der rekombinanten LeuDH aus *B. cereus*

Die Reinigung der rekombinanten *B. cereus* LeuDH aus dem *E. coli* BL21(DE3)/pLeu2 Zellrohextrakt erfolgte analog zur GluDH aus *F. nucleatum* durch Hitzefällung bei 59°C und Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose. Aufschluss-, Äquilibrierungs- und Lagerpuffer 50 mM Kpi Puffer pH 7,5.

2.3.7.7 Reinigung der rekombinanten GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119

Zur Reinigung der rekombinanten GluOX aus *E. coli* BL21(DE3)/pGLOXGHIS mittels Metallaffinitätschromatographie wurde ein Tropfsäulen-System der Firma Quiagen eingesetzt, für die Reinigung mittels Q-Sepharose wurde ein ÄKTA-System der Firma Pharmacia verwendet. Nach der Herstellung wurde der Rohextrakt auf seine Volumenaktivität und seine Proteingehalt hin untersucht. Eine Rückstellprobe wurde bei 4°C gelagert. Anschließend wurde der Rohextrakt auf eine mit Ni-NTA gepackte Säule (Quiagen) aufgetragen, die zuvor mit dem 5-fachen Säulenvolumen 50 mM NaH₂PO₄-Puffer pH 8,0 (10 mM Imidazol, 300 mM NaCl) (Puffer A) äquilibriert wurde. Um nichtbindende Proteine abzutrennen, wurde die Säule nach dem Aufragen des Rohextraktes mit mind. dem 5-fachen Säulenvolumen an Puffer A (50 mM NaH₂PO₄-Puffer pH 8, 10 mM Imidazol, 300 mM NaCl) gespült.

Um Fremdproteine mit einer leichten Bindung abzutrennen, wurde die Säule anschließend mit mind. dem 5-fachen des Säulenvolumens an Puffer B (50 mM Kpi Puffer pH 8, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl) gespült. Anschließend wurde die GluOX mittels einer hohen Konzentration an Imidazol (50 mM NaH₂PO₄-Puffer pH 8, 250 mM Imidazol, 300 mM NaCl, Puffer C) im 5-fachen Säulenvolumen eluiert. Unter Nutzen einer Ultrafiltrationseinheit (Vivaspin 20 von Sartorius, Ausschlussvolumen 10 kDa) wurde die Enzymlösung eingeeengt und mit einer PD10 Sephadex G 25 Säule (Pharmacia) umgepuffert (20 mM Kpi Puffer pH 7,4).

Die weitere Reinigung erfolgte über eine chromatographische Säule, die mit Q-Sepharose gepackt war (Säulenvolumen 20 ml). Zur Äquilibration wurde die Säule sowie das Pumpensystem mit dem 10-fachen Säulenvolumen an 20 mM Kpi Puffer pH 7,4 gespült. Die Enzymlösung wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 1,5 ml min⁻¹ auf die Säule aufgetragen. Nach der Beladung wurde die Säule mit mindestens dem 5-fachen Säulenvolumen (20 mM Kpi Puffer pH 7,4) gespült. Anschließend wurde die Elution der Proteine mit einem NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M (20 mM Kpi Puffer pH 7,4) in 130 min gestartet, es wurden 5 ml-Fractionen gesammelt. Die Elution der Proteine von der Säule wurde mit Hilfe eines UV-Detektors bei 280 nm verfolgt. Die Peaks im Chromatogramm wurden den verschiedenen Fraktionen zugeordnet, welche auf Aktivität hin überprüft wurden. Die als aktiv identifizierten Elutionsfraktionen wurden zu einem Pool vereinigt und mit Hilfe einer Ultrafiltrationseinheit (Vivaspin 20 von Sartorius, Ausschlussvolumen 10 kDa) wurde die Enzymlösung eingeeengt und mit einer PD10 Sephadex G 25 Säule (Pharmacia) umgepuffert (20 mM Kpi Puffer pH 7,4). 20 % dieser Enzymlösung wurden für spätere Biotransformationsversuche sowie die kinetische Untersuchung zurückgestellt.

Die restliche GluOX wurde durch den Einsatz von Pronase (3,6 µg Pronase mg⁻¹ GluOX) prozessiert. Nach einer Inkubation bei 20°C für 2 h und für weitere 22 h bei 4°C wurde die Pronase mittels Hitzedenaturierung bei 50°C für 30 min inaktiviert. Nach Zentrifugation (14000 rpm, 4°C, 30 min) wurde die nun prozessierte GluOX mittels Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose gereinigt, um die eingesetzte Protease sowie entstandene Protein-Fragmente abzutrennen.

Die als aktiv identifizierten Elutionsfraktionen wurden zu einem Pool vereinigt und mit Hilfe einer Ultrafiltrationseinheit (Vivaspin 20 von Sartorius, Ausschlussvolumen 10 kDa) wurde die Enzymlösung eingeeengt und mit einer PD10 Sephadex G 25 Säule (Pharmacia) umgepuffert (20 mM Kpi Puffer pH 7,4). Die Lagerung der gereinigten unprozessierten und prozessierten GluOX erfolgte bei 4°C.

2.3.7.8 Reinigung der rekombinanten NOX aus *L. brevis* sowie deren Mutanten

Für die Reinigung der rekombinanten *L. brevis* NOX aus *E. coli* BL21(DE3)/pHISNOX sowie der hergestellten NOX-Mutanten mittels Metallaffinitätschromatographie wurde entweder ein ÄKTA-System der Firma Pharmacia verwendet oder es wurde ein Tropfsäulen-System der Firma Quiagen eingesetzt.

Nach der Herstellung wurde der Rohextrakt auf seine Volumenaktivität und seine Proteingehalt hin untersucht. Da aus früheren Arbeiten und der Literatur bekannt war, dass das zellinterne FAD Level von *E. coli* BL21(DE3) bei einer starken Überexpression der NOX nicht ausreicht, um das Enzym vollständig mit Cofaktor abzusättigen, wurde dem jeweiligen Rohextrakt FAD in einer Konzentration von 10-200 μM zugesetzt. Anschließend wurden für 30 min auf Eis inkubiert. Der Rohextrakt wurde auf eine mit Ni-NTA-Säule (Quiagen) aufgetragen, die zuvor mit dem 5-fachen Säulenvolumen 50 mM NaH_2PO_4 -Puffer pH 8,0 (10 mM Imidazol, 300 mM NaCl) (Puffer A) äquilibriert wurde.

Um nichtbindende Proteine abzutrennen, wurde die Säule nach dem Aufrufen des Rohextraktes mit mind. dem 5-fachen Säulenvolumen an Puffer A (50 mM NaH_2PO_4 -Puffer pH 8,0, 10 mM Imidazol, 300 mM NaCl) gespült. Um Fremdproteine mit einer leichten Bindung abzutrennen, wurde die Säule anschließend mit mind. dem 5-fachen des Säulenvolumens an Puffer B (NaH_2PO_4 -Puffer pH 8,0, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl) gespült. Anschließend wurde die NOX mittels einer hohen Konzentration an Imidazol (50 mM NaH_2PO_4 -Puffer pH 8,0, 250 mM Imidazol, 300 mM NaCl, Puffer C) im 5-fachen Säulenvolumen eluiert.

Die als aktiv identifizierten Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mit Hilfe einer Ultrafiltrationseinheit eingeeengt, anschließend wurde die Enzymlösung mit einer PD10 Sephadex G 25 Säule (Pharmacia) umgepuffert (50 mM Kpi Puffer pH 6,5). Die Lagerung der gereinigten NOXs erfolgte bei 4°C.

2.3.7.9 Präparation der rekombinanten LeuDh aus *B. cereus*

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3)/pLeu2 (pLeu2, Vektor ptrc99a mit dem *leudh* Gen aus *B. cereus*) war im Institut aus einer älteren Arbeit vorhanden [Lanzerath, 2008]. Standardmäßig wurde *E. coli* BL21(DE3)/pLeu2 bei einer OD_{600} von 0,5 mit 100 μM IPTG induziert. Für eine optimale Expression wurde nach der Induktion eine Expressionstemperatur von 30°C sowie eine Expressionszeit von 4 h gewählt. Nach der Zellernte mittels Zentrifugation (5000 rpm, 30 min, 4°C) wurden die Zellen in einem Zell-

Puffer Verhältnis von 1:4 in 100 mM 50 mM Kpi Puffer pH 7,5 resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Ganze Zellen und Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (14000 rpm, 30 min, 4°C) abgetrennt. Um eine Denaturierung von Fremdproteinen zu erreichen, wurde der zellfreie Rohextrakt für 10 min auf 59°C erwärmt und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Die Lösung wurde zentrifugiert (14000 rpm, 30 min, 4°C) und der Überstand abgenommen. Dieser wurde für die Aktivitäts- und Proteingehaltbestimmung sowie die weitere Reinigung mittels Q-Sepharose eingesetzt.

Die Abtrennung von *E. coli* eigenen Fremdproteinen durch die Hitzedenaturierung bei 59°C konnte erfolgreich durchgeführt werden, die spezifische Aktivität wurde von 11,1 U mg⁻¹ im Rohextrakt 1,19-fach auf 13,2 U mg⁻¹ erhöht. Die weitere Reinigung der rekombinanten LeuDH erfolgte analog zum Enzym aus *F. nucleatum* durch Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose (Äquilierungspuffer 50 mM Kpi Puffer pH 7,5). Die als aktiv identifizierten Elutionsfraktionen wurden zu einem Pool vereinigt und mit Hilfe einer Ultrafiltrationseinheit eingeeengt, anschließend wurde die Enzymlösung mit einer PD10 Sephadex G 25 Säule (Pharmacia) umgepuffert (50 mM Kpi Puffer pH 7,5). Die spezifische Aktivität der gereinigten LeuDH betrug 35,4 U mg⁻¹, die Lagerung erfolgte bei einer Temperatur von 4 °C.

2.3.7.10 Präparation der rekombinanten LDH aus *Bacillus subtilis*

Rekombinante *E. coli* Zellen mit der NAD(H)-abhängigen LDH aus *B. subtilis* (BsLDH) waren im Institut aus älteren Arbeiten vorhanden (*E. coli* BL21(DE3)/pLDH, pLDH: Vektor pet21a mit dem *ldh* Gen aus *B. subtilis*, Schüttelkolbenexpression) [Richter et al., 2011]. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in einem Zell-Puffer Verhältnis von 1:4 in 50 mM Kpi Puffer pH 7.5 resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Ganze Zellen und Zellfragmente wurden durch Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C für 30 min abgetrennt. Der geklärte Rohextrakt wurde mit Hilfe eines Sterilfilters (Porengröße 0,22 µm) filtriert und bei einer Temperatur von 4 °C gelagert.

2.3.7.11 Präparation der rekombinanten ADH aus *L. kefir*

Rekombinante *E. coli* Zellen mit der (*R*)-spezifischen NADP(H)-abhängigen ADH aus *L. kefir* (LkADH) waren im Institut aus älteren Arbeiten vorhanden (*E. coli* BL21(DE3)/pADHLk, pADHLk: Vektor pet21a mit dem *adh* Gen aus *L. kefir* DSM 20587, Hochzelldichtefermentation). Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in einem Zell-Puffer Verhältnis von 1:4 in 100 mM TEA Puffer pH 7.0 (1 mM MgCl₂) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Ganze Zellen und Zellfragmente wurden durch Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C für 30 min abgetrennt. Der geklärte Rohextrakt wurde mit Hilfe eines Sterilfilters (Porengröße 0,22 µm) sterilfiltriert und bei einer Temperatur von 4 °C gelagert.

2.3.7.12 Präparation der rekombinanten ADH aus *L. brevis*

Rekombinante *E. coli* Zellen mit der (*R*)-spezifischen NADP(H)-abhängigen ADH aus *L. brevis* (LbADH) waren im Institut aus älteren Arbeiten vorhanden (*E. coli* BL21(DE3)/pADHLb, pADHLb: Vektor petDuet-1 mit dem *adh* Gen aus *L. brevis* DSM 20054, Schüttelkolbenexpression). Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in einem Zell-Puffer Verhältnis von 1:4 in 100 mM TEA Puffer pH 7.0 (1 mM MgCl₂) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Ganze Zellen und Zellfragmente wurden durch Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C für 30 min abgetrennt. Der geklärte Rohextrakt wurde mit Hilfe eines Sterilfilters (Porengröße 0,22 µm) sterilfiltriert und bei einer Temperatur von 4 °C gelagert.

2.3.7.13 Präparation der rekombinanten ADH aus *R. ruber*

Rekombinante *E. coli* Zellen mit der (*S*)-spezifischen NAD(H)-abhängigen ADH aus *R. ruber* (RrADH) waren im Institut aus älteren Arbeiten vorhanden (*E. coli* BL21(DE3)/pRRADH1/pGro7, pRRADH1: Vektor pKA1 mit dem *adh* Gen aus *R. ruber* DSM 44541, pGro7 Chaperone Vektor Takara). Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in einem Zell-Puffer Verhältnis von 1:4 in 100 mM TEA Puffer pH 7.0 (1 mM MgCl₂) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Ganze Zellen und Zellfragmente wurden durch Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C für 30 min abgetrennt. Der geklärte Rohextrakt wurde mit Hilfe eines Sterilfilters (Porengröße 0,22 µm) filtriert und bei einer Temperatur von 4 °C gelagert.

2.3.8 Inclusion Bodies

Das durch Zentrifugation erhaltene Protein-Pellet wurde in Harnstoff-Puffer (6 M Harnstoff, 20 mM Kpi, pH 7,5) resuspendiert und für 1 h bei RT sowie 800 rpm inkubiert. Das Volumen an Puffer entsprach hierbei dem Volumen des eingesetzten Rohextraktes.

2.3.9 Umpuffern bzw. Entsalzen von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden mit PD10 Sephadex G 25 Säulen (Pharmacia) nach dem Prinzip der Gelfiltration umpuffert bzw. entsalzt. Die Säulen wurden mit 20 ml Puffer äquilibriert und 2,5 ml der Probe wurden aufgetragen. Die Proteine wurden anschließend mit 3,5 ml des gewünschten Puffers von der PD10 Säule eluiert.

2.3.10 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Zur Aufkonzentrierung von Proteinlösungen wurde eine Vivaspin 20 Ultrafiltrationseinheit der Firma Sartorius verwendet. Die Ultrafiltrationseinheit besaß ein Ausschlussvolumen von 10 kDa und wurde maximal mit 5000 rpm (Hettich Zentrifuge) bei 4°C zentrifugiert.

2.3.11 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-PAGE diente der Reinheitskontrolle sowie der Bestimmung des Molekulargewichts. Die Proben wurden auf die gewünschte Proteinkonzentration eingestellt, mit SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt. Das SDS-Gel wurde in die Kammer eingespannt und die Proben sowie der Standard in die Taschen eingespritzt. Das Gel lief in MOPS-Laufpuffer (N-Morpholino-Propansulfonsäure) mit NuPage Antioxidant (Invitrogen) bei 200 V und 120 mA. Als Standard-Marker wurden der Pre-Stained Protein Standard von Fermentas und der SeeBlue2 Pre-Stained Protein Standard von Invitrogen verwendet.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine durch Anfärbung mit Coomassie Blue sichtbar gemacht. Die Färbung wurde mittels der Coomassie G-250-Färbelösung „Simply Blue Safe Stain“ laut Vorschrift des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt.

2.3.12 Permeabilisierung der Zellmembran

Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte durch die Zugabe von 10 µl Toluol pro ml Zellsuspension (25 % in 20 mM Kpi Puffer pH 7,4). Es folgte eine Inkubation von 30 min

bei 37°C unter leichtem Schwenken. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (Zentrifugation für 10 min bei 12000 rpm und 4°C) und drei mal mit Puffer gewaschen (20mM Kpi Puffer pH 7,4), um das Toluol zu entfernen. Die Zellen wurden in Puffer resuspendiert (25% in 20 mM Kpi Puffer pH 7,4) und in der Ganzzellbiotransformation eingesetzt.

2.3.13 Immobilisierung GluOX und Katalase

GluOX und Katalase wurden auf dem Immobilisierungsträger EP113/S der Firma Resindion immobilisiert. Der Träger EP113/S besitzt laut Herstellerangabe eine Porengröße von 20 bis 50 nm sowie eine Epoxid-Gruppen Dichte von 50 $\mu\text{mol g}^{-1}$.

Die GluOX lag vor der Immobilisierung in 20 mM Kpi-Puffer pH 7,4 vor. 100 mg Trägermaterial wurden mittels einer Analysewaage eingewogen und mit GluOX-Lösung (9,88 U entsprechend) sowie Katalase-Lösung (500 U entsprechend) versetzt. Anschließend wurde mit 1 M Kpi-Puffer pH 7,0 bis auf 500 μl aufgefüllt. Zur Immobilisierung wurde die Träger mit der Enzymlösung für 24 h bei 4°C und 120 rpm inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Trägermaterial wurde anschließend dreimal mit 5 ml 50 mM Kpi-Puffer pH 7,0 gewaschen und in 200 μl Puffer resuspendiert.

Um mögliche negative Einflüsse auszuschließen, wurden restliche freie Epoxid-Gruppen des Trägermaterials nach der Immobilisierung mit der Aminosäure Glycin (Gly) abgesättigt. Dazu wurde das Immobilisat sedimentiert und der Überstand abgenommen. Dem Immobilisat wurde Gly in einer Endkonzentration von 0,2 M zugegeben und mit 1 M Kpi-Puffer pH 7,0 bis auf 500 μl aufgefüllt. Anschließend wurde für 24 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Sedimentation des Immobilisates wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das nun abgesättigte Trägermaterial wurde anschließend mit zweimal mit 5 ml Puffer (25 mM Kpi pH 7,4) gewaschen, um überschüssiges und nicht gebundenes Gly zu entfernen. Nach der Immobilisierung wurde das Trägermaterial in 25 mM Kpi Puffer pH 7,4 bei 4°C gelagert.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Nachweis von chiralen Alkoholen mittels Gaschromatographie

Die Analyse der Umsetzungen von *rac*-1-Phenylethanol zu Acetophenon erfolgte mittels Gaschromatographie. Proben wurden mit dem doppelten Volumen an Ethylacetat gründlich gemischt (Vortexer 1 min max. Einstellung). Zur Trennung der wässrigen und organischen Phase wurde 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert, die organische Phase

vorsichtig abgenommen und mittels Gaschromatographie analysiert. Es wurde der Gaschromatograph GC-17A von Shimadzu eingesetzt. Für die Trennung der Alkohole wurde die chirale Säule CP-Chirasil-DEX CB (Chrompack) verwendet. Als mobile Phase diente Helium (Flow 1,3 ml min⁻¹). Temperaturprogramm: 60°C (5 min), 100 – 140°C (5°C min⁻¹), 140 – 195°C (55°C min⁻¹). Die Retentionszeiten waren: Acetophenon 7,1 min, (*R*)-1-Phenylethanol 10,4 min und (*S*)-1-Phenylethanol 10,7 min.

2.4.2 Nachweis von α -KG

Die Analyse der Biotransformation von L-Glu zu α -KG erfolgte entweder mittels ¹H-NMR-Spektroskopie oder im Falle der GluOX auch mittels Photometrie.

Die Proben wurden durch eine Ultrafiltration (Amicon 10 kDa Filter, 12000 rpm, 4°C) für die Analyse mittels ¹H-NMR-Spektroskopie aufgearbeitet. Für die Konzentrationsbestimmung von L-Glu und α -KG wurden die Messungen mit dem internen Standard Pivalinsäure durchgeführt. Eine Verbesserung der Messgenauigkeit zur Bestimmung der absoluten Stoffmenge wurde durch ein Verfahren zur Unterdrückung des Lösungsmittelsignals erreicht. Bei dieser Methode der Vorsättigung wird vor der Messung ein schwacher und langer Impuls auf die Probe eingestrahlt (bei ca. 2350 Hz), wodurch die Magnetisierung der Lösungsmittelprotonen abgesättigt wird. Die durch diese Technik erhaltenen Spektren erforderten keine Nachbearbeitung mehr und ermöglichten eine Umsatzbestimmung mit ausreichender Genauigkeit. Für L-Glu wurde eine Wiederfindung von 94 % bis 106 % und für α -KG eine Wiederfindung von 92-108 % ermittelt [Greschner et al., 2013].

Für den photometrischen Nachweis wurde eine Standardgerade (Abbildung 3) von α -KG in 200 mM Kpi Puffer pH 7,0 bei 260 nm aufgenommen (Konzentrationsbereich 1 bis 20 mM). Anhand der Geradengleichung ($y = 0,0518x$; R^2 0,99, Abbildung 3) konnte der α -KG Gehalt der Proben berechnet werden. Als Blindwert wurde jeweils der gleiche Biotransformationsansatz mit Enzym aber ohne L-Glu mitgeführt und genutzt.

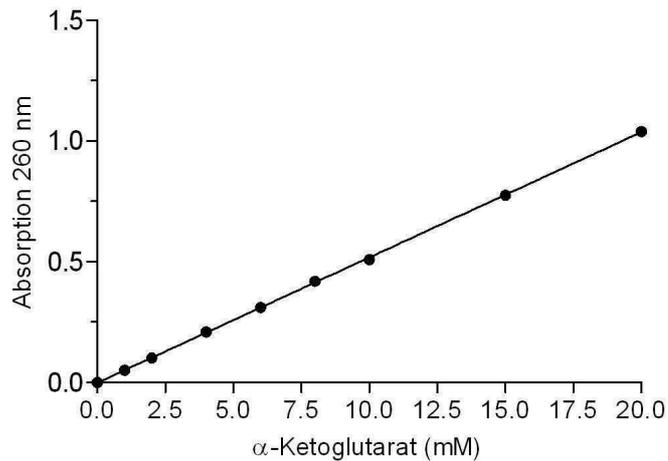


Abbildung 3: Standardgerade von α -KG in 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, (260 nm, Konzentrationsbereich 1 bis 20 mM), $y = 0,0518x$; R^2 0,99.

2.4.3 Strukturanalyse und Modellierung

Die Struktur der NOX wurde mittels der Programme Swiss-Pdb Viewer und Chimera visualisiert und analysiert. Für die Modellierung des NADH-Enzym Komplexes wurde die Struktur der unligierten Wildtyp-NOX mit der Struktur der NADH-ligierten POX aus *Streptococcus faecalis* [Stehle et al., 1993] überlagert. Zur Analyse der strukturellen Ähnlichkeiten wurde das Programm Chimera [Pettersen et al., 2004] (Needleman-Wunsch Algorithmus, Matrix BLOSUM-62) verwendet, welches die zwei Strukturen bestmöglich überlagert und dabei die Abweichung berechnet. Beide Enzyme zeigen eine ähnliche dreidimensionale Struktur mit einem rmsd-Wert („root-mean-square distance“) von 0,991 für 386 Atome. Anschließend wurde mit dem Programm Swiss-Pdb Viewer [Guex und Peitsch, 1997] eine „energy minimisation“ (GROMOS96) zur Verfeinerung der Struktur durchgeführt. Zur Modellierung der Strukturen der NOX-Mutanten wurden die Aminosäuren in der Struktur der Wildtyp-NOX mit dem Programm Swiss-Pdb Viewer ausgetauscht, anschließend wurde eine „energy minimisation“ (GROMOS96) zur Verfeinerung der Struktur durchgeführt. Die Modellierung von NADH-Enzym-Komplexen erfolgte analog zum Wildtyp-Enzym durch die Überlagerung mit der Struktur der NADH-ligierten POX aus *S. faecalis* [Stehle et al., 1993]. Für die Modellierung von NADPH-Enzym-Komplexen wurden die Strukturen mit dem NADPH-Komplex der *B. anthracis* CoADR [Wallen et al., 2008] überlagert (Programm Chimera, Needleman-Wunsch Algorithmus, Matrix BLOSUM-62). Alternative Seitenketten-Rotamere [Dunbrack, 2002] und Wasserstoffbrückenbindungen wurden mit dem Programm Chimera [Pettersen et al., 2004] berechnet.

2.5 Darstellung von α -KG aus L-Glu mittels Biotransformation

2.5.1 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz von GluDHs unter *in situ*-Regenerierung des Cofaktors NAD⁺

Zur Darstellung von α -KG aus L-Glu mittels isolierter Enzyme wurden die gereinigten bzw. partiell gereinigten GluDHs aus *F. nucleatum*, *C. difficile*, *B. subtilis*, *B. pumilus* sowie *K. lactis* eingesetzt. Zur Regenerierung von NAD⁺ wurden die NOX aus *L. brevis*, die LDH aus *B. subtilis* sowie die LeuDH aus *B. cereus* verwendet.

Die Biotransformationen mit Substratkonzentrationen von 15 bis 500 mM L-Glu wurden als batch-Umsetzungen bei 30°C und unter Schütteln (120 rpm) in 10 ml bzw. 50 ml Falcon-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Puffer (200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 200 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0, 200 mM Gly-NaOH Puffer pH 9,0, 200 mM Gly-NaOH Puffer pH 9,5), Konzentrationen an NAD⁺ (0,25 bis 5 mM) sowie Verhältnisse an GluDH und Cofaktor-regenerierendem Enzym verwendet. Die Ansätze erfolgten in einem Gesamtvolumen zwischen 1 ml und 5 ml. In regelmäßigen Abständen wurden die Reaktionsgefäße geöffnet, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Proben wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen, durch Ultrafiltration (10 kDa) aufgearbeitet und mittels ¹H-NMR untersucht.

2.5.2 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz der GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6

Die Biotransformation wurde mit Hilfe der rekombinanten, gereinigten GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 als isoliertes Enzym durchgeführt. Es wurde GluOX vor der proteolytischen Prozessierung mittels Pronase eingesetzt (unprozessierte Form). Der Ansatz enthielt neben 2 U ml⁻¹ GluOX, 100 mM L-Glu in 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, Gesamtvolumen 3 ml. Die Reaktionstemperatur betrug 15°C, die Reaktion wurde als batch-Umsetzung unter Schütteln bei 120 rpm durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wurde das Reaktionsgefäß geöffnet, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Proben wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen und mittels Photometrie bzw. ¹H-NMR analysiert.

2.5.3 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz der GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 unter *in situ*-Eliminierung von H₂O₂ mittels der Katalase aus *M. luteus*

Biotransformationen unter Variation der Substratkonzentration an L-Glu bis zu 500 mM wurden durchgeführt, hierbei wurden sowohl die gereinigte unprozessierte als auch die gereinigte prozessierte GluOX genutzt. Die kommerzielle Katalase aus *M. luteus* wurde zum *in situ*-Abbau von H₂O₂ eingesetzt.

Die Ansätze enthielten neben den beiden Enzymen in verschiedenen Verhältnissen 50 bis 500 mM L-Glu, in 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, Gesamtvolumen 3 bis 5 ml. Die Reaktionstemperatur betrug 15°C, die Biotransformationen wurden als batch-Umsetzung unter Schütteln bei 120 rpm in sterilen und verschlossenen (Alufolie) 100 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wurden die Reaktionsgefäße geöffnet, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Proben wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen, mittels Photometrie analysiert, durch Ultrafiltration (10 kDa) aufgearbeitet und mittels ¹H-NMR analysiert.

2.5.4 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz des GluOX/Katalase-Immobilisates

Das GluOX/Katalase-Immobilisat wurde in mehreren Biotransformations-Zyklen unter Standardbedingungen eingesetzt. Die Ansätze enthielten jeweils 90 mg Immobilisat (dies entspricht einer GluOX-Aktivität von 2,1 U bzw. einer Katalase-Aktivität von 47,6 U) bei einem Gesamtvolumen von 5 ml, (Reaktionsansatz 50 mM L-Glu, 200 mM Kpi Puffer pH 7,0). Die Reaktionstemperatur betrug 15°C, die Biotransformation wurde als repetitive-batch-Umsetzung unter Schütteln bei 120 rpm in einem 50 ml Falcon-Reaktionsgefäßen durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wurde das Reaktionsgefäß geöffnet, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Proben vom Überstand wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen, mittels Photometrie analysiert, durch Ultrafiltration (10 kDa) aufgearbeitet und mittels ¹H-NMR analysiert. Nach vollständigem Umsatz von L-Glu wurde die Reaktionslösung vom Immobilisat getrennt, dieses wurde einmalig mit Puffer (25 mM Kpi Puffer pH 7,4) gewaschen und ein neuer Reaktionszyklus wurde durch Zugabe von Substrat und Puffer gestartet.

2.5.5 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz des GluOX/Katalase Ganzzellkatalysators

Es wurden Zellen von *E. coli* BL21(DE3)/pACHPII-a/pHISGLOX verwendet, die nach der Kultivierung und Zellernte zur Lagerung einmalig bei -18°C als Zellpellet gefroren wurden. Die Zellkonzentration betrug $12,5 \text{ mg ml}^{-1}$, was unter den Bedingungen der Biotransformation einer GluOX-Aktivität von $2,5 \text{ U ml}^{-1}$ bzw. einer Katalase-Aktivität von $133,8 \text{ U ml}^{-1}$ entspricht. Zum Vergleich wurden unbehandelte sowie mit Toluol permeabilisierte Zellen unter ansonsten gleichen Bedingungen in der Biotransformation eingesetzt. Die Ganzzellbiokatalysatoren wurden in Puffer (25 mM Kpi Puffer pH 7,4) resuspendiert und die entsprechende Menge an Zellsuspension der Reaktionslösung zugesetzt. Die Biotransformation wurde als repetitive-batch Umsetzung in 50 ml Falcon-Reaktionsgefäßen bei einem Gesamtvolumen von 3 ml unter Schütteln (120 rpm) durchgeführt (200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 15°C). In regelmäßigen Abständen wurde das Reaktionsgefäß geöffnet, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Um ein mögliches Zellwachstum während der Biotransformation zu verhindern und die Zelle als ruhenden Biokatalysator zu nutzen, wurde der Biotransformation Gentamycin ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) zugesetzt. Als Kontrolle wurde die Biotransformation analog mit *E. coli* BL21(DE3) Zellen durchgeführt. Proben wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen, durch Zentrifugation (13000 rpm, 10 min, 4°C) und Ultrafiltration (10 kDa) aufgearbeitet und mittels $^1\text{H-NMR}$ analysiert. Nach vollständigem Umsatz von L-Glu wurde die Reaktionslösung vom Ganzzellkatalysator getrennt (Zentrifugation bei 10000 rpm und 4°C , 20 min), die Zellmasse wurde mittels Analysewaage bestimmt und die entsprechende Menge an Substrat und Puffer zugegeben, wodurch ein neuer Reaktionszyklus gestartet wurde.

2.5.6 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GPT ohne Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat

Es wurde die kommerziell verfügbare GPT (Sigma) aus dem Schweineherz eingesetzt. Biotransformationen von 50 mM L-Glu wurden als batch-Umsetzungen bei 30°C und unter Schütteln (120 rpm) in 50 ml Falcon-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Puffer (200 mM Kpi Puffer pH 7,0 und 8,0, 200 mM Glycin-NaOH Puffer pH 9,0) sowie unterschiedliche Konzentrationen des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat (100 mM, 150 mM und 500 mM) verwendet (Gesamtvolumen 3 ml). In regelmäßigen Abständen wurden die Reaktionsgefäße geöffnet, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Proben wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen, durch Ultrafiltration (10 kDa) aufgearbeitet und mittels $^1\text{H-NMR}$ untersucht.

2.5.7 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GPT unter *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat mittels der AlaDH aus *B. subtilis*

Es wurde die kommerziell verfügbare GPT (Sigma) aus dem Schweineherz eingesetzt. Die Transaminase Reaktion wurde mit der AlaDH aus *B. subtilis* gekoppelt, um das entstehende L-Ala durch oxidative Desaminierung in Pyruvat zu überführen und dadurch *in situ* zu regenerieren. Zur Regenerierung von NAD⁺ wurde die NOX aus *L. brevis* verwendet. Biotransformationen von 100 mM L-Glu wurden als batch-Umsetzungen bei 30°C und unter Schütteln (120 rpm) in 50 ml Falcon-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat (2,5 mM und 5 mM), unterschiedliche Konzentrationen an NAD⁺ (0,25 und 1 mM) sowie unterschiedliche Verhältnisse an GPT (0,5 bis 1,5 U) und AlaDH (1,5 bis 2,5 U) bzw. NOX (10 bis 20 U) verwendet. Teilweise erfolgte der Zusatz von PLP (2,5 μ M). Die Ansätze erfolgten in einem Gesamtvolumen von 3 ml. In regelmäßigen Abständen wurden die Reaktionsgefäße geöffnet, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Proben wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen, durch Ultrafiltration (10 kDa) aufgearbeitet und mittels ¹H-NMR untersucht.

2.5.8 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GPT unter *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat mittels der L-AAO aus *C. atrox*

Es wurde die kommerziell verfügbare GPT (Sigma) aus dem Schweineherz eingesetzt. Die Transaminase Reaktion wurde mit der L-AAO aus *Crotalus atrox* gekoppelt, um das entstehende L-Ala durch oxidative Desaminierung in Pyruvat zu überführen und dadurch *in situ* zu regenerieren. Die kommerzielle Katalase aus *M. luteus* wurde zum *in situ*-Abbau von H₂O₂ eingesetzt. Die Biotransformation von 100 mM L-Glu wurde als batch-Umsetzung bei 30°C und unter Schütteln (120 rpm) in einem 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß durchgeführt. Es wurden 0,5 U GPT, 2 U L-AAO sowie 200 U Katalase eingesetzt (200 mM Kpi Puffer pH 8,0, Gesamtvolumen von 3 ml). In regelmäßigen Abständen wurde das Reaktionsgefäß geöffnet, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Proben wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen, durch Ultrafiltration (10 kDa) aufgearbeitet und mittels ¹H-NMR untersucht.

2.6 Anwendung der mittels rationalem Proteindesign hergestellten NOX-Mutanten zur NADP⁺-Regenerierung

2.6.1 Darstellung (S)-1-Phenylethanol aus rac-1-Phenylethanol durch den Einsatz der NADP⁺-abhängigen ADH aus *L. kefir* und *L. brevis* unter *in situ*-Cofaktorregenerierung durch eine NAD(P)H-Oxidase

Die Biotransformation wurde mit Hilfe der rekombinanten NADP⁺-abhängigen (*R*)-spezifischen Alkohol Dehydrogenasen aus *L. kefir* (LkADH) und *L. brevis* (LBADH) durchgeführt. Zur *in situ*-Regenerierung von NADP⁺ wurden die durch das rationale Proteindesign konstruierten NOX-Mutanten D177A/M179H, D177A/A178G/M179H und G159S/D177A/A178G/M179H eingesetzt.

Bei dem Einsatz der ADHs ist eine Zugabe von Mg²⁺-Ionen notwendig, um einer Inaktivierung der Biokatalysatoren vorzubeugen. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C, die Biotransformationen wurden als batch-Umsetzungen in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen unter Schütteln bei 900 rpm durchgeführt. Die Biotransformationen mit einer Substratkonzentration von 10 mM *rac*-1-Phenylethanol, enthielten in 100 mM TEA Puffer pH 7,0 neben Substrat 1 mM MgCl₂, 0,1 mM NADP⁺, 1 U ml⁻¹ ADH aus *L. kefir* bzw. *L. brevis* und 5 U ml⁻¹ NOX (Oxidation von NADPH), Gesamtvolumen 1 ml. Die Biotransformationen mit einer Substratkonzentration von 25 mM und 50 mM *rac*-1-Phenylethanol, enthielten in 100 mM TEA Puffer pH 7,0 neben Substrat 1 mM MgCl₂, 0,025 mM NADP⁺, 2 U ml⁻¹ ADH aus *L. kefir* und 15 U ml⁻¹ NOX (Oxidation von NADPH), Gesamtvolumen 1 ml.

Als negativ Kontrolle wurden analoge Biotransformationen von *rac*-1-Phenylethanol ohne Cofaktorregenerierung durch eine NOX durchgeführt. Die Reaktionsgefäße wurden in regelmäßigen Abständen geöffnet, um für einen ausreichenden Gasaustausch zu sorgen. Proben von 100 µl wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen, mit dem doppelten Volumen an Ethylacetat gründlich gemischt (Vortexer 1 min, max. Einstellung) und zur Trennung der wässrigen und organischen Phase für 3 min zentrifugiert (14000 rpm). Die organische Phase wurde vorsichtig abgenommen und mittels Gaschromatographie (siehe auch 2.4.1) analysiert.

2.6.2 Darstellung von (*R*)-1-Phenylethanol aus *rac*-1-Phenylethanol durch den Einsatz der NAD⁺-abhängigen (*S*)-spezifischen ADH aus *R. ruber* unter *in situ*-Cofaktorregenerierung durch eine NOX-Mutante

Die Biotransformation wurde mit Hilfe der rekombinanten NAD⁺-abhängigen (*S*)-spezifischen ADH aus *R. ruber* (RrADH) durchgeführt. Zur *in situ*-Regenerierung von NADP⁺ wurden die durch das rationale Proteindesign konstruierte NOX-Mutante D177A/M179H eingesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt 10 mM *rac*-1-Phenylethanol, 100 mM TEA Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM NAD⁺, 1 U ml⁻¹ RrADH (zellfreier *E. coli* Rohextrakt) und 5 U ml⁻¹ NOX D177A/M179H (Oxidation von NADH), Gesamtvolumen 1 ml. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C, die Biotransformation erfolgte wurde als batch-Umsetzung in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen unter Schütteln bei 900 rpm. Als negativ Kontrolle wurden analoge Biotransformationen von *rac*-1-Phenylethanol ohne Cofaktorregenerierung durch eine NOX durchgeführt. Das Reaktionsgefäß wurde in regelmäßigen Abständen geöffnet, um für einen ausreichenden Gasaustausch zu sorgen. Proben wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen, mit Ethylacetat extrahiert und mittels Gaschromatographie analysiert.

2.6.3 Darstellung von (*S*)-1-Phenylethanol aus *rac*-1-Phenylethanol durch den Einsatz von Ganzzellbiokatalysatoren mit *in vivo*-Cofaktorregenerierung

Für die Durchführung der Ganzzellbiotransformation mit *in situ*-Cofaktorregenerierung wurden *E. coli* BL21(DE3)/pADHLk/pACNOXD177A/M179H Zellen (Aktivitäten Rohextrakt 550 U ml⁻¹ LkADH und 16 U ml⁻¹ NOX (Oxidation von NADPH), 18,8 mg Protein ml⁻¹) und *E. coli* BL21(DE3)/pADHLb/pACNOXD177A/M179H Zellen (Aktivitäten Rohextrakt 587 U ml⁻¹ LbADH und 16 U ml⁻¹ NOX (Oxidation von NADPH), 16,2 mg Protein ml⁻¹) eingesetzt, die sowohl die (*R*)-spezifischen NADP(H)-abhängige ADH aus *L. kefir* (LkADH) bzw. *L. brevis* (LbADH) als auch die NOX-Mutante D177A/M179H exprimieren.

In der Biotransformation von 10 mM *rac*-1-Phenylethanol wurde eine Zellkonzentration von 15 mg ml⁻¹ eingesetzt. Die Zellen wurden in 100 mM TEA Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂ resuspendiert und die entsprechende Menge an Zellsuspension der Reaktionslösung zugesetzt, um die Biotransformation zu starten. Es wurden Zellen verwendet, die nach der Kultivierung und Expression zur Lagerung einmalig bei -18°C als Zellpellet gefroren wurden. Die Reaktion wurde als batch-Umsetzung in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen unter Schütteln (900 rpm) bei einer Reaktionstemperatur von 30°C durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wurde das Reaktionsgefäß geöffnet, um einen Gasaustausch zu ermöglichen.

Der Reaktionsansatz enthielt 10 mM *rac*-1-Phenylethanol, 100 mM TEA-Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂, und 0,1 mM NADP⁺ bei einem Gesamtvolumen von 1,0 ml. Als Kontrolle wurde eine analoge Biotransformation durchgeführt, bei der *E. coli* BL21(DE3)/pADHLk bzw. *E. coli* BL21(DE3)/pADHLb Zellen eingesetzt wurden, die ausschließlich die ADH und keine NOX zur Regenerierung von NADP⁺ besitzen (ADH-Aktivität im Rohextrakt: ADHLk 440 U ml⁻¹, ADHLb 50 U ml⁻¹). Proben wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen, mit Ethylacetat extrahiert und mittels Gaschromatographie analysiert.

III Ergebnisse

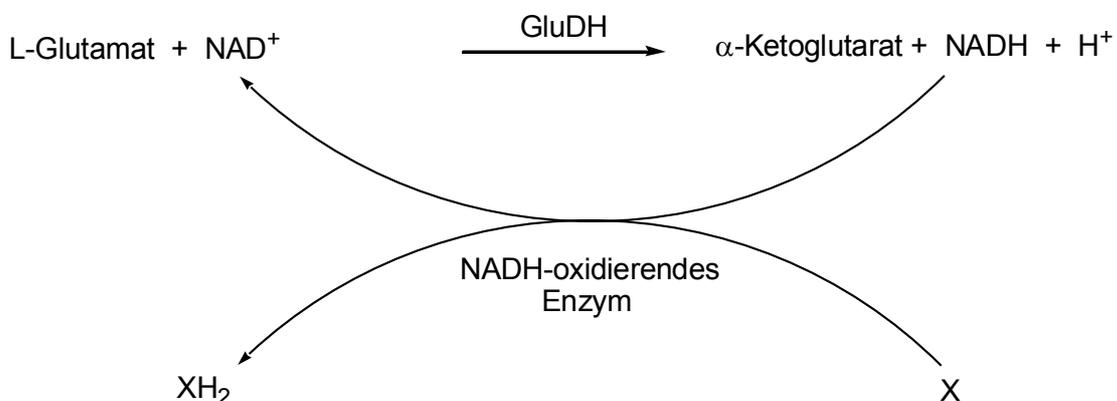
1. Darstellung von α -Ketoglutarat

Die Herstellung von α -Ketosäuren ist von großer industrieller Bedeutung für die chemische und pharmazeutische Industrie, wobei insbesondere α -Ketoglutarat (α -KG) aufgrund der vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten einen sehr interessanten Synthesebaustein darstellt [Blitzke et al., 1993, 1994; Stottmeister et al., 2005; Verseck et al., 2007; Otto et al., 2011; Verseck et al., 2009]. Bisher wurde α -KG auf chemischem Weg oder mit Hilfe von fermentativen Verfahren hergestellt, wobei beide Synthesemethoden verschiedene Nachteile mit sich bringen. Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war die biotechnologische Herstellung der Ketosäure α -KG mittels enzymatischer Biotransformation. Zur Herstellung von α -KG bietet es sich an, von der entsprechenden Aminosäure L-Glutamat (L-Glu) auszugehen, zumal diese Verbindung ein außerordentlich preisgünstiger und leicht erhältlicher Ausgangsstoff ist, der heute in hohen Tonnagen fermentativ synthetisiert wird [Hermann et al., 2003; Kataoka et al., 2006; Asakura et al., 2007; Schulz et al., 2007].

Prinzipiell sind für die Synthese von α -KG aus L-Glu verschiedene enzymatische Wege denkbar, beispielsweise die Nutzung einer Nicotinamid-abhängigen L-Glutamat-Dehydrogenase (GluDH), einer FAD-abhängigen L-Glutamat-Oxidase (GluOX) oder auch einer PLP-abhängigen L-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT).

1.1.1 Darstellung von α -KG mittels L-Glutamat-Dehydrogenasen (GluDHs)

Das folgende Schema 9 zeigt konkret die GluDH-katalysierte Reaktion, durch die α -KG synthetisiert werden kann.



Schema 9: GluDH-katalysierte Synthese von α -KG aus L-Glu. Die Reaktion benötigt die Kopplung mit einem NADH-oxidierenden Schritt, wobei der Elektronenakzeptor (X) hier in allgemeiner Form dargestellt ist.

Das Schema 9 verdeutlicht, dass die GluDH-katalysierte Primärreaktion zur Herstellung von α -KG mit einem NAD⁺-regenerierenden Schritt gekoppelt werden muss. Im Folgenden soll allerdings zuerst geeignete GluDHs gefunden und untersucht werden, die Coenzym-Regenerierung wird dann nachfolgend näher untersucht.

1.1.1 Evaluierung geeigneter GluDHs

Die meisten der heute bekannten GluDHs weisen hauptsächlich Aktivität gegenüber L-Glu auf, jedoch existieren auch Enzyme mit einer Nebenaktivität für andere Aminosäuren. Die in der Literatur beschriebenen GluDHs unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften wie spezifische Aktivität, Affinität gegenüber Substraten und Produkten, Temperatur- und pH-Optimum. Bezüglich der Darstellung von α -KG durch oxidative Desaminierung von L-Glu finden sich praktisch keine konkreten Informationen bzw. Angaben in der Literatur, daher sollte anfangs eine mit eigenen Daten erstellte Evaluierung geeigneter Enzyme inklusive der Produktion und Charakterisierung der rekombinanten Formen durchgeführt werden.

Ein Hinweis auf möglicherweise geeignete Enzyme ergab sich aus der natürlichen Funktion von GluDHs im Metabolismus. Dabei liefert die Cofaktorabhängigkeit eindeutige Hinweise auf metabolische Kreisläufe und Prozesse, in denen das jeweilige Enzym involviert ist [Hudson und Daniel, 1993]. So sind die NADP⁺-abhängigen GluDHs üblicherweise anabole Enzyme und katalysieren die Assimilation von Ammonium durch die reduktive Aminierung von α -KG, während NAD⁺-abhängige GluDHs zumeist katabolisch aktiv sind und Ammonium durch die oxidative Desaminierung von L-Glu dissimilieren [Brunhuber und Blanchard, 1994; Hudson und Daniel, 1993]. Daneben kommen auch NADP⁺/NAD⁺-abhängige GluDHs vor, sie besitzen sowohl eine anabolische als auch eine katabolische Funktion. Eine Reihe publizierter Enzyme kann also eindeutig katabolen (NAD⁺-abhängig) oder anabolen (NADP⁺-abhängig) Stoffwechselwegen zuordnet werden, wobei zu erwarten war, dass die katabolen Enzyme für das geplante Ziel eher geeignet sein sollten, da die natürliche Funktion dieser Enzyme im Abbau von L-Glu zu α -KG besteht. Durch eine umfangreiche Literaturrecherche konnten mehr als 30 NAD⁺-abhängige GluDHs unterschiedlicher Herkunft identifiziert werden, deren Aktivitäten in der oxidativen Desaminierung von L-Glu im Bereich von 7,8 U mg⁻¹ für *Peptostreptococcus asaccharolyticus* [Hornby und Engel, 1984] bis 270 U mg⁻¹ für *Amphibacillus xylanus* [Jahns et al., 1996] liegen. In der Tabelle 6 sind einige GluDHs verschiedener Herkunft sowie ihre biochemischen Eigenschaften, sofern bekannt bzw. publiziert, aufgeführt.

Die Literaturrecherche hat ergeben, dass praktisch keine publizierten Daten zur Inhibierung von GluDHs durch das Reaktionsprodukt α -KG existieren, was in Hinsicht auf die geplanten hohen Produktkonzentrationen hilfreich bei der Auswahl geeigneter enzymatischer Katalysatoren gewesen wäre. Lediglich zwei Publikationen zu den kommerziell verfügbaren Enzymen aus *Clostridium symbiosum* [Ödman et al., 2004] und aus Rinderleber [Engel und Chen, 1975] weisen auf eine Inhibierung durch α -KG hin.

Tabelle 6: Literaturbekannte GluDHs sowie ihre publizierten biochemischen Eigenschaften.

Herkunft GluDH	spez. Akt. (U mg ⁻¹)	K _M L-Glu (mM)	K _M NAD(P) ⁺ (mM)	Referenz
NAD ⁺ -abhängig				
<i>C. symbiosum</i>	12,5	22,5	0,39	Ödman et al., 2004
<i>A. xylanus</i>	270	56	0,35	Thomas Jahns, 1996
<i>T. thermophilus</i>	70	49	0,27	Ruiz et al., 1998
<i>S. ureae</i>	32	13,4	1,69	Jahns, 1994
<i>C. botulinum</i>	130	5,3	0,028	Hammer et al., 1988
<i>B. fragilis</i>	-	7,3	3	Yamamoto et al., 1987
<i>P. islandicum</i>	3,5	0,17	0,025	Kujo und Ohshima, 1998
<i>F. nucleatum</i>	34	-	-	Gharbia und Shah, 1991
<i>B. cereus</i>	-	7,7	0,56	Jahns und Kaltwasser, 1993
<i>J. lividum</i>	3,1	7,1	2,1	Kawakami et al., 2007
<i>P. asaccharolyticus</i>	7,8	5,8	0,345	Hornby und Engel, 1984
<i>B. subtilis</i>	-	0,34	0,08	Khan et al., 2005
<i>C. difficile</i>	146	4,3	0,8	Anderson et al., 1993
NADP ⁺ -abhängig				
<i>T. profundus</i>	60,1	6	0,1	Higuchi et al., 1997
<i>B. fastidiosus</i>	40	-	-	Op den Camp et al., 1989

Die Enzyme aus *Bacillus subtilis* [Khan et al., 2005; Belitsky und Sonenshein, 1998], *Thermus thermophilus* [Ruiz et al., 1998], *Fusobacterium nucleatum* [Gharbia und Shah, 1991] und *Clostridium difficile* [Anderson et al., 1993] wurden aufgrund ihrer teilweise publizierten biochemischen Eigenschaften, der bekannten Gensequenz sowie der vermuteten Beteiligung an katabolen Stoffwechselwegen ausgewählt. Nach Klonierung, heterologen Expression und Enzymreinigung sollte der Einsatz der verschiedenen GluDHs in der Biotransformation zur enzymatischen oxidativen Desaminierung von L-Glu zu α -KG untersucht werden.

1.1.2 Klonierung, heterologe Expression und Reinigung der ausgewählten GluDHs

Die genomische DNA der Stämme *B. subtilis* und *T. thermophilus* wurde mit Hilfe des „Blood and Tissue“ Kits von Qiagen aus den entsprechenden Wildtyp-Stämmen isoliert. Die präparierte DNA wurde im Elutionspuffer eluiert und bei 4°C gelagert. Die Reinheit der DNA sowie die Ausbeute wurden mittels Elektrophorese überprüft. Die genomische DNA der Stämme *F. nucleatum* und *C. difficile* wurde aufgrund der S2 Einstufung nicht selber präpariert, sondern von der DSMZ bezogen.

1.1.2.1 Klonierung des *gludh*-Gens aus *F. nucleatum*

Nach erfolgreicher Amplifizierung mittels PCR (Primer GluDHFnfor und GluDHFnrev), anschließender Restriktion und Reinigung wurde das *gludh*-Gen in den *E. coli* Expressionsvektors petDuet-1 (Schnittstellen *NcoI* und *SacI*) von Novagen ligiert (pDGluDHFn). Dieser Vektor enthält den T7-Promotor und T7-Terminator, eine Ampicillin-Resistenz, einen Replikationsursprung (*ori*) sowie zwei „multiple cloning sites“ (MCS). Nach Transformation in kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen und Selektion auf LB-Platten (Ampicillin 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) wurde die Vektor-DNA aus mehreren Transformanten isoliert und mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde der Vektor pDGluDHFn zur Produktion der rekombinanten GluDH in den *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert.

1.1.2.2 Heterologe Expression des *gludh* Gens aus *F. nucleatum* in *E. coli*

Die heterologe Expression des *gludh*-Gens aus *F. nucleatum* in *E. coli* BL21(DE3) wurde, wie im Material und Methoden Teil beschrieben, durchgeführt. Die spezifische Aktivität der rekombinanten GluDH im *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHFn Rohextrakt nach Ultraschall-Aufschluss der Zellen betrug je nach Zellcharge 6 bis 7 U mg^{-1} (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 2,5 mM NAD^+ , 30°C, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 9,0).

1.1.2.3 Reinigung der rekombinanten GluDH aus *F. nucleatum*

Die Reinigung der rekombinanten *F. nucleatum* GluDH aus dem *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHFn Zellrohextrakt erfolgte wie im Materialien und Methoden Teil beschrieben zunächst durch Hitzefällung, gefolgt von einer Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose sowie einer Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration.

Die Abtrennung von *E. coli* eigenen Fremdproteinen durch die Hitzedenaturierung bei 59°C konnte erfolgreich durchgeführt werden, die spezifische Aktivität der GluDH wurde von 6,7 U mg⁻¹ im Rohextrakt 2,7-fach auf 18,1 U mg⁻¹ mit einer Ausbeute von 74,2 % erhöht.

Mittels der folgenden Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose) konnten aus 7 ml geklärtem Rohextrakt mit einer Volumenaktivität von 164 U ml⁻¹ und einem Proteingehalt von 24,5 mg ml⁻¹ nach der Reinigung 595 U GluDH mit einer spezifischen Aktivität von 38,2 U mg⁻¹ gewonnen werden. Dies entspricht einem Reinigungsfaktor von 5,7 verbunden mit einer Ausbeute von 51,6 %, bezogen auf die Ausgangsaktivität im Rohextrakt.

Die Ergebnisse der Reinigung der rekombinanten *F. nucleatum* GluDH aus *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHF_n sind in Tabelle 7 zusammengefasst und dargestellt.

Tabelle 7: Reinigung der rekombinanten *F. nucleatum* GluDH aus *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHF_n (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 2,5 mM NAD⁺, 30°C, 50 mM Tris-HCl pH 9,0), UF: Ultrafiltration.

Reinigungsschritt	Spez. Aktivität (U mg ⁻¹)	Gesamt-Aktivität (U)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor (x-fach)
Rohextrakt	6,7	1152	100	1,0
Hitzefällung	18,1	855	74,2	2,7
Q-Sepharose + UF	38,2	595	51,6	5,7

Eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der Fraktionen entsprechend Tabelle 7 wurde zur Reinheitskontrolle und zur Dokumentation der Reinigung durchgeführt. Das SDS-Gel (Abb. 4) zeigt die GluDH mit Untereinheiten von ca. 48 kDa, wie aufgrund der Aminosäuresequenz berechnet. Die GluDH konnte nahezu bis zur Homogenität aufgereinigt werden, lediglich eine leichte Verunreinigung durch Fremdprotein konnte durch das SDS-Gel nachgewiesen werden.

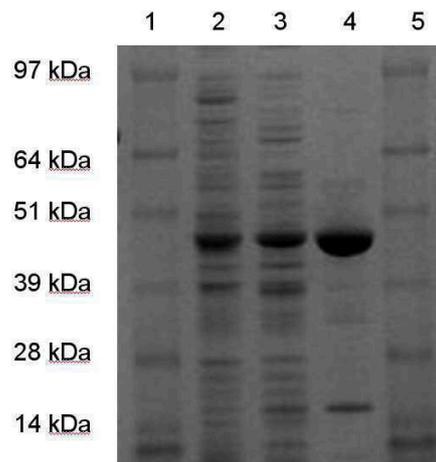


Abbildung 4: SDS-Gel: Reinigung der *Fusobacterium nucleatum* GluDH aus *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHF_n, Spur 1: Protein Standard SeeBlue2, Spur 2: Rohextrakt *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHF_n, Spur 3: rek. GluDH nach Hitzefällung. Spur 4: rek. GluDH nach Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose) und Ultrafiltration, Spur 5: Protein Standard SeeBlue2.

1.1.2.4 Klonierung des *gludh*-Gens aus *C. difficile*

Die Klonierung des *gludh*-Gens aus *C. difficile* in den *E. coli* Expressionsvektor petDuet-1 erfolgte analog zum Enzym aus *F. nucleatum*. Zur Produktion der rekombinanten GluDH wurde der Vektor pDGluDHCd in den *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) (Novagen) transformiert.

1.1.2.5 Heterologe Expression des *gludh* Gens aus *C. difficile* in *E. coli*

Die heterologe Expression des *gludh*-Gens aus *C. difficile* in *E. coli* BL21(DE3) wurde, wie im Material und Methoden Teil beschrieben, durchgeführt. Die spezifische Aktivität der rekombinanten GluDH im *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHCd Rohextrakt nach Ultraschall-Aufschluss der Zellen betrug $8,6 \text{ U mg}^{-1}$ (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 2,5 mM NAD^+ , 30°C , 50 mM Tris-HCl pH 9,0).

1.1.2.6 Reinigung der rekombinanten GluDH aus *C. difficile*

Die Reinigung der rekombinanten GluDH *C. difficile* aus dem *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHCd Zellrohextrakt erfolgte analog zum Enzym aus *F. nucleatum* durch Hitzefällung bei 59°C sowie Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose. Die Abtrennung von Fremdproteinen durch die Hitzedenaturierung konnte erfolgreich durchgeführt werden, die spezifische Aktivität wurde von $8,6 \text{ U mg}^{-1}$ im Rohextrakt 4-fach auf $34,1 \text{ U mg}^{-1}$ erhöht, mit einer Ausbeute von 89,9 %.

Aus 12 ml geklärtem Rohextrakt mit einer Volumenaktivität von 134,4 U ml⁻¹ und einem Proteingehalt von 15,6 mg ml⁻¹ konnten mittels anschließender Anionenaustauschchromatographie 1008 U GluDH nach allen Reinigungsschritten mit einer spezifischen Aktivität von 86,6 U mg⁻¹ gewonnen werden können. Dies entspricht einem Reinigungsfaktor von 10,1 verbunden mit einer Ausbeute von 62,5 %, bezogen auf die Ausgangsaktivität im Rohextrakt. Die Ergebnisse der Reinigung sind in Tabelle 8 zusammengefasst und dargestellt.

Tabelle 8: Reinigung der rekombinanten *C. difficile* GluDH aus *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHd (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 2,5 mM NAD⁺, 30°C, 50 mM Tris-HCl pH 9,0) UF: Ultrafiltration.

Reinigungsschritt	Spez. Aktivität (U mg ⁻¹)	Gesamt-Aktivität (U)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor (x-fach)
Rohextrakt	8,6	1613	100	1
Hitzefällung	34,1	1451	89,9	4,0
Q-Sepharose + UF	86,6	1008	62,5	10,1

Eine SDS-Page der Fraktionen entsprechend Tabelle x wurde zur Reinheitskontrolle und zur Dokumentation der Reinigung durchgeführt. Das SDS-Gel (Abb. 5) zeigt die GluDH mit Untereinheiten von ca. 46 kDa. Die GluDH *C. difficile* konnte annähernd bis zur Homogenität aufgereinigt werden, eine Verunreinigung durch Fremdprotein konnte mittels SDS-Page nur in leichten Spuren nachgewiesen werden.

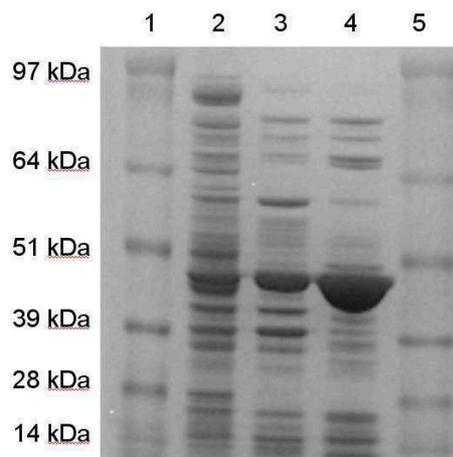


Abbildung 5: SDS-Gel: Reinigung der *C. difficile* GluDH aus *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHCd, Spur 1: Protein Standard SeeBlue2, Spur 2: Rohextrakt *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHCd, Spur 3: rek. GluDH nach Hitzefällung. Spur 4: rek. GluDH nach Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose) und Ultrafiltration, Spur 5: Protein Standard SeeBlue2.

1.1.2.7 Klonierung des *gludh*-Gens aus *B. subtilis*

Die Klonierung des *gludh*-Gens aus *B. subtilis* in den *E. coli* Expressionsvektor petDuet-1 erfolgte analog zum Enzym aus *F. nucleatum*. Zur Produktion der rekombinanten GluDH wurde der Vektor pDGluDHBs in den *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) (Novagen) transformiert.

1.1.2.8 Heterologe Expression des *gludh* Gens aus *B. subtilis* in *E. coli*

Die heterologe Expression des *gludh*-Gens aus *B. subtilis* in *E. coli* BL21(DE3) wurde, wie im Material und Methoden Teil beschrieben, durchgeführt. Die spezifische Aktivität der rekombinanten GluDH im *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHBs Rohextrakt nach Ultraschall-Aufschluss der Zellen betrug 3,5 U mg⁻¹ (Aktivitätsassay: 100 mM MSG, 2,5 mM NAD⁺, 30°C, 100 mM Kpi pH 8,0).

1.1.2.9 Reinigung der rekombinanten GluDH aus *B. subtilis*

Die Reinigung der rekombinanten *B. subtilis* GluDH aus dem *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHBs Zellrohextrakt erfolgte wie im Material und Methoden Teil beschrieben durch Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose sowie einer Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration. In den verschiedenen Fraktionen nach der Chromatographie und beim folgenden Umpuffern konnte eine deutliche Ausfällung von Enzym beobachtet werden, anscheinend ist die GluDH unter den Bedingungen der Reinigung nicht stabil und denaturiert zu einem großem Anteil. Die Ergebnisse der Reinigung sind in Tabelle 8 zusammengefasst und dargestellt.

Tabelle 8: Reinigung der rekombinanten *B. subtilis* GluDH aus *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHBs (Aktivitätsassay: 100 mM L-Glu, 2,5 mM NAD⁺, 30°C, 100 mM Kpi Puffer pH 8,0), UF: Ultrafiltration.

Reinigungsschritt	Spez. Aktivität (U mg ⁻¹)	Gesamt-Aktivität (U)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor (x-fach)
Rohextrakt	3,5	394	100	1
Q-Sepharose + UF	1,6	75	19,1	0,45

Eine SDS-PAGE der Fraktionen entsprechend Tabelle 8 wurde zur Kontrolle und zur Dokumentation der Reinigung durchgeführt. Das SDS-Gel (Abb. 6) zeigt die rekombinante *B. subtilis* GluDH mit Untereinheiten von ca. 46 kDa.

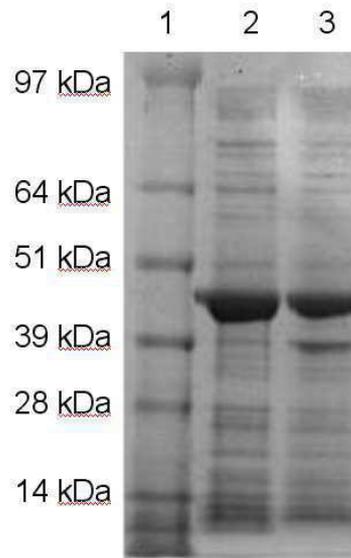


Abbildung 6: SDS-Gel: Reinigung der *B. subtilis* GluDH aus *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHBs, Spur 1: Protein Standard SeeBlue2, Spur 2: Rohextrakt *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHBs, Spur 3: rek. GluDH nach Chromatographie (Q-Sepharose) und Ultrafiltration.

Die Reinigung der rek. *B. subtilis* GluDH mittels Q-Sepharose konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Die spez. Aktivität des gereinigten Enzyms nach dem Umpuffern mittels Ultrafiltration war mit $1,6 \text{ U mg}^{-1}$ im Vergleich zur spez. Aktivität im Rohextrakt sogar deutlich niedriger. Ebenfalls konnte mittels SDS-PAGE keine Aufreinigung der GluDH nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche das geklärte und sterilfiltrierte Rohextrakt als Enzym-Präparat eingesetzt.

1.1.2.10 Klonierung des *gludh*-Gens aus *T. thermophilus*

Die Klonierung des *gludh*-Gens aus *T. thermophilus* in den *E. coli* Expressionsvektor petDuet-1 erfolgte analog zum Enzym aus *F. nucleatum*. Zur Produktion der rekombinanten GluDH wurde der Vektor pDGluDHTt in den *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) (Novagen) transformiert.

1.1.2.11 Heterologe Expression des *gludh* Gens aus *T. thermophilus* in *E. coli*

Die heterologe Expression des *gludh*-Gens aus *T. thermophilus* in *E. coli* BL21(DE3) wurde, wie im Material und Methoden Teil beschrieben, durchgeführt. Im Rohextrakt konnte keine GluDH-Aktivität nachgewiesen werden (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 2,5 mM NAD^+ , 30°C und 60°C, 50 mM Tris-HCl pH 9,0).

Eine SDS-Page der löslichen und unlöslichen Fraktion des Zellrohextraktes wurde zur Kontrolle durchgeführt und zeigte (Abb. 7), dass die GluDH mit Untereinheiten von ca. 46 kDa unter den gewählten Bedingungen in Form von „inclusion bodies“ gebildet wird und ausschließlich in der unlöslichen Fraktion vorliegt.

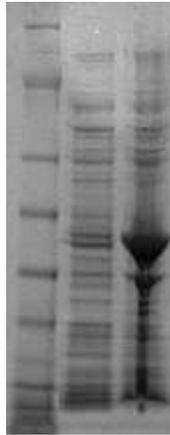


Abbildung 7: SDS-PAGE der löslichen und unlöslichen Fraktion *E. coli* BL21(DE3)/pDGDHTt; Spur 1: Prestained Protein Ladder Invitrogen SeeBlue2, Spur 2: Rohextrakt *E. coli* BL21(DE3)/pDGDHTt, lösliche Fraktion, Spur 3: Rohextrakt *E. coli* BL21(DE3)/pDGDHTt, unlösliche Fraktion.

1.1.2.12 Optimierung der heterologen Expression

Im Allgemeinen ist das Bakterium *E. coli* in Bezug auf die Produktion rekombinanter Enzyme sehr vielseitig, dennoch kann in manchen Fällen das gewünschte Enzym nicht rekombinant erzeugt oder die aktive Faltungs-Form nicht erreicht werden. Die Bildung von unlöslichen Zelleinschlüssen, sogenannten „inclusion bodies“, ist ein häufig auftretendes Problem bei der Expression rekombinanter Gene in *E. coli*. Diese Zelleinschlüsse bestehen zu einem hohen Anteil aus dem unlöslich gebildeten und aggregierten Enzym. Die Ursachen für die Bildung von „inclusion bodies“ sind vielfältig und teilweise bekannt und lösbar. So bevorzugen unterschiedliche Organismen beispielsweise verschiedene alternative Codons, die für eine bestimmte Aminosäure codieren. Gene aus anderen bakteriellen Organismen können Codons enthalten, die in *E. coli* nur selten vorkommen. Wird dieses Gen in großen Mengen transkribiert, kann sich Verfügbarkeit der korrespondierenden tRNA limitierend auswirken.

Es existieren unterschiedliche Strategien, um die Bildung von „inclusion bodies“ zu reduzieren und die Ausbeute an löslichem Enzym zu erhöhen. Dazu zählen unter anderem das Variieren der Expressionstemperatur sowie Expressionsdauer, die Wahl eines alternativen *E. coli* Expressionsstammes oder die Co-Expression von molekularen Chaperonen.

1.1.2.13 Variation der Expressionsbedingungen

Zunächst wurde eine *E. coli* BL21(DE3)/pDGLuDHt Vorkultur mit Volumina von 5 ml LB-Medium (Ampicillin 100 µg ml⁻¹) angeimpft und über Nacht bei 120 rpm und 37°C geschüttelt. Die Hauptkulturen (LB-Medium, Ampicillin 100 µg ml⁻¹) wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,05 beimpf und ebenfalls bei 120 rpm und 37°C geschüttelt. Die Expression der rekombinanten Gene wurde nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 mit IPTG (0,1 mM) induziert. Anschließend wurden die Kulturen bei verschiedenen Temperaturen (25°C, 30°C, 37°C) kultiviert. Nach 4 h wurden 20 ml der Kultur abgenommen und für Zellernte, Zellaufschluss und anschließende Aktivitätsuntersuchung eingesetzt. Die restliche Kultur wurde bis zur zweiten Zellernte insgesamt 24 h kultiviert. Auch nach Variation der Expressionstemperatur sowie Expressionsdauer konnte in keinem Falle eine GluDH-Aktivität im Rohextrakt nachgewiesen werden.

Eine SDS-Page der löslichen und unlöslichen Fraktionen wurde zur Kontrolle durchgeführt und zeigte (Abb. 8), dass die GluDH mit Untereinheiten von ca. 46 kDa auch unter den variierten Expressionsbedingungen als „inclusion bodies“ gebildet wird und jeweils ausschließlich in der unlöslichen Fraktion vorliegt.

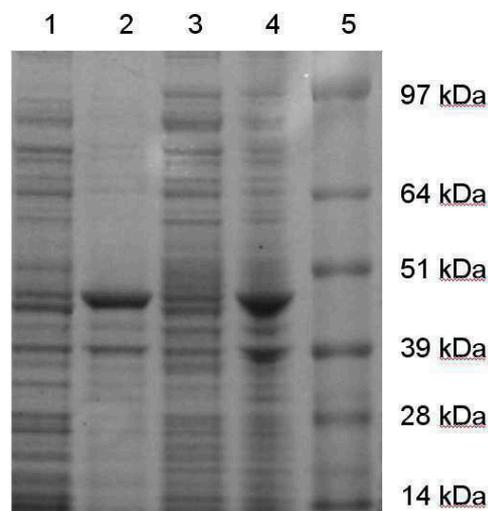


Abbildung 8: SDS-PAGE der löslichen und unlöslichen Fraktionen *E. coli* BL21(DE3)/pDGDHT; Spur 1: Rohextrakt, lösliche Fraktion, Expression 25°C, 4 h; Spur 2: Rohextrakt, unlösliche Fraktion, Expression 25°C, 4 h; Spur 3: Rohextrakt, lösliche Fraktion, Expression 30°C, 24 h; Spur 4: Rohextrakt, unlösliche Fraktion, Expression 30°C, 24 h, Spur 5: Prestained Protein Ladder Invitrogen SeeBlue2.

1.1.2.14 Klonierung des *gludh* Gens aus *T. thermophilus* in pTrc99a

Um die Expressionsleistung eines alternativen Expressionsvektors zu untersuchen, wurde der Vektor pTrc99a ausgewählt. Dieser Vektor enthält den T7-Promotor und T7-Terminator, eine Ampicillin-Resistenz, einen Replikationsursprung (*ori*) sowie eine MCS. Die Klonierung des *gludh* Gens der GluDH aus *T. thermophilus* in den Vektor pTrc99a (pTGluDHTt) wurde über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *SacI* durchgeführt. Nach Transformation in kompetente *E. coli* DH5 α Zellen und Selektion auf LB-Agarplatten (Ampicillin 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) sowie Kultivierung in Flüssigkultur wurde die Plasmid-DNA aus mehreren Transformanten isoliert und mittels Restriktionsanalyse überprüft. Die weitere Überprüfung der positiven Transformanten geschah durch Sequenzierung.

Das Konstrukt pTGluDHTt wurde zur Expression in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Zunächst wurden Vorkulturen angeimpft und über Nacht bei 120 rpm und 37°C geschüttelt. Die Hauptkulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,05 beimpft und ebenfalls bei 120 rpm und 37°C geschüttelt (LB-Medium, Ampicillin 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Die Expression der rekombinanten Gene wurde nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 mit IPTG (0,1 mM) induziert. Anschließend wurden die Kulturen bei einer Temperatur von 30°C kultiviert. Nach 4 h wurde ein Teil der Kultur abgenommen und für Zellernte, Zellaufschluss und anschließende Aktivitätsuntersuchung eingesetzt. Die GluDH aus *T. thermophilus* zeigte im Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)/pTGluDHTt keine Aktivität.

1.1.2.15 Transformation und Expression in *E. coli* Rosetta(DE3)

Um zu untersuchen, ob die Anwesenheit seltener tRNAs die (lösliche) Expression verbessern würde, wurde der Vektor pDGHTt in der Expressionsstamm *E. coli* Rosetta(DE3) transformiert. Dieser Stamm ist Träger eines Vektors, der in *E. coli* selten vorkommende tRNAs kodiert [Tegel et al., 2009]. Zunächst wurde eine Vorkulture von *E. coli* Rosetta (DE3)/pDGHTt angeimpft und über Nacht bei 120 rpm und 37°C geschüttelt. Die Hauptkultur in LB-Medium (Ampicillin 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,05 beimpft und ebenfalls bei 120 rpm und 37°C geschüttelt.

Die Gen-Expression wurde nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 mit IPTG (0,1 mM) induziert. Anschließend wurden die Kulturen bei einer Temperatur von 30°C kultiviert. Nach 4 h wurde ein Teil der Kultur abgenommen und für Zellernte, Zellaufschluss und anschließende Aktivitätsuntersuchung eingesetzt. Die GluDH zeigte im Rohextrakt von *E. coli* Rosetta(DE3)/pDGHTt keine Aktivität.

Um die Expression zu überprüfen, wurden das Rohextrakt mittels SDS-PAGE analysiert. Die SDS-PAGE (Abbildung 9) zeigt, dass die GluDH in *E. coli* Rosetta(DE3) ebenfalls nicht löslich expremiert wird und in der unlöslichen Fraktion als deutlich Bande zu erkennen ist. Also liegt das Enzym auch hier in Form von „inclusion bodies“ vor.

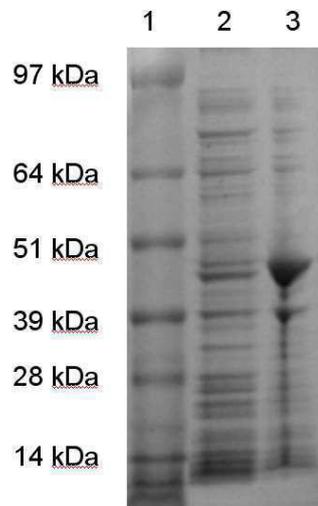


Abbildung 9: SDS-PAGE der löslichen und unlöslichen Fraktion; Spur 1: Prestained Protein Ladder Invitrogen SeeBlue2, Spur 2: Rohextrakt *E. coli* Rosetta(DE3)/pDGluDHTt, lösliche Fraktion; Spur 3: Rohextrakt *E. coli* Rosetta(DE3)/pDGluDHTt, unlösliche Fraktion.

1.1.2.16 Co-Expression von Chaperonen

Um zu untersuchen, ob die Anwesenheit von Chaperonen die löslichen Bildung der GluDH aus *T. thermophilus* verbessern kann, wurde der Vektor pDGDHTt in Kombination mit dem pGro7 Vektor des Chaperone Kits der Firma Takara untersucht. Dazu wurden die beiden Vektoren in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Vorkulturen wurden angeimpft und bis zum nächsten Tag bei 120 rpm und 37°C geschüttelt.

Zur Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes wurde dem Medium 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin und 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Chloramphenicol zugesetzt. Die Hauptkulturen wurden inokuliert, die Expression der Chaperone induziert (L-Arabinose 1 mg ml^{-1}) und bei 120 rpm und 37°C kultiviert. Die Gen-Expression wurde nach Erreichen einer OD_{600} von 0,5 mit IPTG (0,1 mM) induziert. Anschließend wurde die Kultur bei 30°C kultiviert. Nach 4 h wurden die Zellen geerntet und es folgten Zellaufschluss und Aktivitätsuntersuchung, bei der jedoch keine Aktivität für die rekombinante GluDH nachgewiesen werden konnte. Um die Expression zu überprüfen, wurden die Rohextrakte mittels SDS-PAGE analysiert. Beispielhaft ist das SDS-Gel von *E. coli* BL21(DE3)/ pDGDHTt/pGro7 nachfolgend dargestellt (Abbildung 10).

Die SDS-PAGE zeigte, dass die GluDH in Form von „inclusion bodies“ gebildet wird und in der unlöslichen Fraktion als deutliche Bande vorliegt. Durch die Anwesenheit von Chaperonen konnte die lösliche Bildung der GluDH aus *T. thermophilus* in löslicher Form nicht erreicht werden.

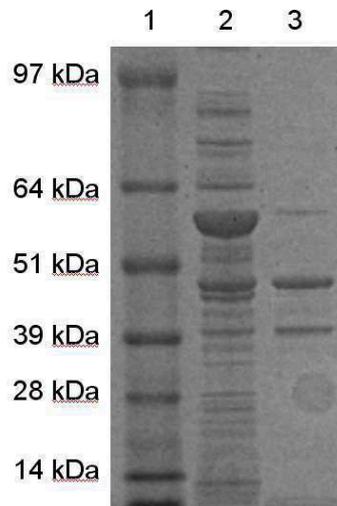


Abbildung 10: SDS-PAGE der löslichen und unlöslichen Fraktion; Spur 1: Prestained Protein Ladder Invitrogen SeeBlue2, Spur 2: Rohextrakt *E. coli* BL21(DE3)/pDGDHT/pGro7, lösliche Fraktion; Spur 3: Rohextrakt *E. coli* BL21(DE3)/pDGDHT/pGro7, unlösliche Fraktion.

1.1.2.17 Zusammenfassung zur GluDH aus *T. thermophilus*

Es wurden unterschiedliche Strategien angewandt, um die Bildung von „inclusion bodies“ zu reduzieren und die Bildung von löslichem Enzym zu erreichen. Dazu zählen das Variieren der Expressionstemperatur sowie der Expressionsdauer, die Wahl eines alternativen *E. coli* Expressionsvektors sowie Expressionsstammes und die Co-Expression von molekularen Chaperonen. Die GluDH aus *T. thermophilus* zeigte leider in keinem Fall eine messbare Aktivität. Bei der Kontrolle der Zellrohextrakte mittels SDS-PAGE zeigte sich deutlich, dass das Enzym durchweg unlöslich gebildet wird und in Form von „inclusion bodies“ vorliegt. Somit konnte trotz umfangreicher Variation der Expressionsparameter keine Produktion von löslicher GluDH erreicht werden.

Da keine positiven Ergebnisse mit diesem Enzym erzielt werden konnten, wurden die Arbeiten mit der GluDH aus *T. thermophilus* zu diesem Zeitpunkt eingestellt.

1.1.3 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten GluDHs

1.1.3.1 Bestimmung der pH-Optima

Zur Bestimmung der pH-Optima der rekombinanten GluDHs aus *B. subtilis*, *F. nucleatum* und *C. difficile* wurden die Aktivitäten im Bereich von pH 7,0 bis pH 9,5 bzw. von pH 6,5 bis pH 10,5 vermessen.

Die Untersuchungen zeigten deutlich, dass die Enzyme, mit Ausnahme der *B. subtilis* GluDH, ihr pH-Optimum im eher basischen Bereich mit pH-Werten von $\geq 9,5$ besitzen. Für die *B. subtilis* GluDH konnte ein pH-Optimum von 8,0 festgestellt werden (Abbildung 11). Die Aktivitäten bei pH 7,0 und pH 9,0 erreichen 41,1 % und 80,1 % bzw. 54,7 % des Wertes bei pH 8,0. Zudem zeigt die Abb. einen Einfluss der Puffersubstanz, in Tris-HCl Puffer werden höhere Aktivitätswerte erreicht als in Kpi Puffer.

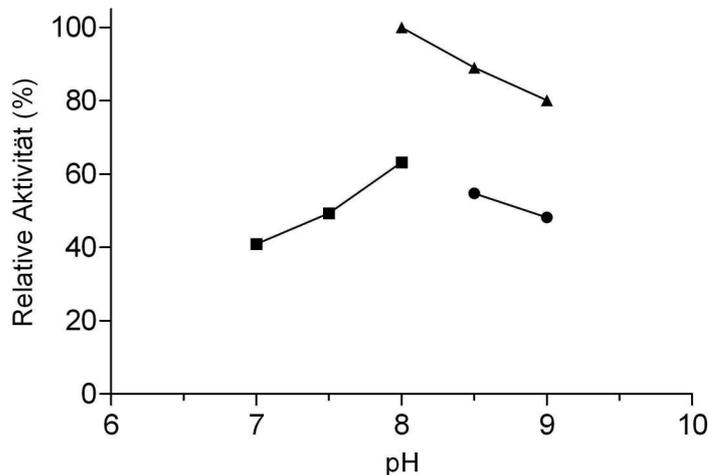


Abbildung 11: Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der GluDH aus *B. subtilis* in der Desaminierung von L-Glu. Die Enzymaktivität wurde in folgenden 50 mM Puffern bestimmt: (—■—) Kpi Puffer, pH 7,0-8,0; (—▲—) Tris-HCl Puffer, pH 8,0-9,0; (—●—) Gly-NaOH Puffer, pH 8,5-9,0; 50 mM L-Glu, 2,5 mM NAD⁺, 30°C.

Aus der nachfolgenden Abbildung 12 ergibt sich ein pH Optimum von pH 10,0 für die oxidative Desaminierung von L-Glu durch die GluDH aus *C. difficile*. Die Aktivitäten bei pH 8,0 und pH 9,0 erreichen 59,0 % und 88,7 % des Wertes bei pH 10,0, somit weist die *C. difficile* GluDH einen breiten Aktivitätsbereich auf, die Aktivität variiert im Bereich von pH 8,0 bis pH 10,0 um maximal 41 %.

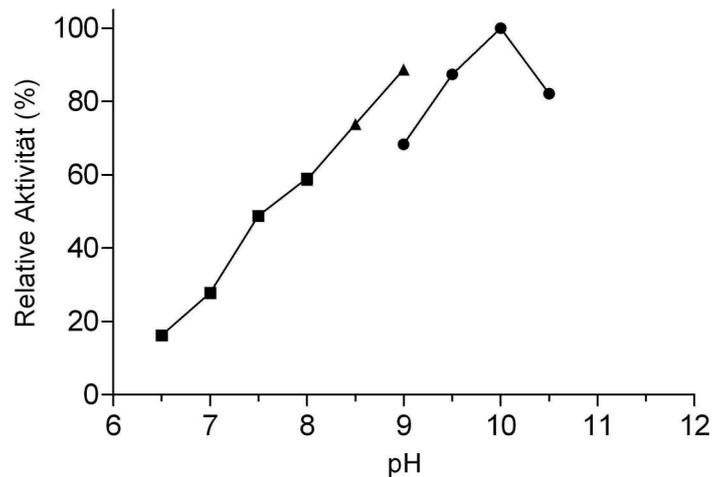


Abbildung 12: Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der GluDH aus *C. difficile* in der Desaminierung von L-Glu. Die Enzymaktivität wurde in folgenden 50 mM Puffern bestimmt: (■) Kpi Puffer, pH 6,5-8,0; (▲) Tris-HCl Puffer, pH 8,0-9,0; (●) Gly-NaOH Puffer, pH 9,0-10,5.

Die Ergebnisse der Untersuchung der GluDH aus *F. nucleatum* sind in der Abbildung 13 dargestellt. Das Enzym weist ein pH Optimum von pH 10,5 für die oxidative Desaminierung von L-Glu auf, die Aktivitäten bei pH 8,0 und pH 9,0 erreichen 51,8 % und 66,7 % des Wertes bei pH 10,5.

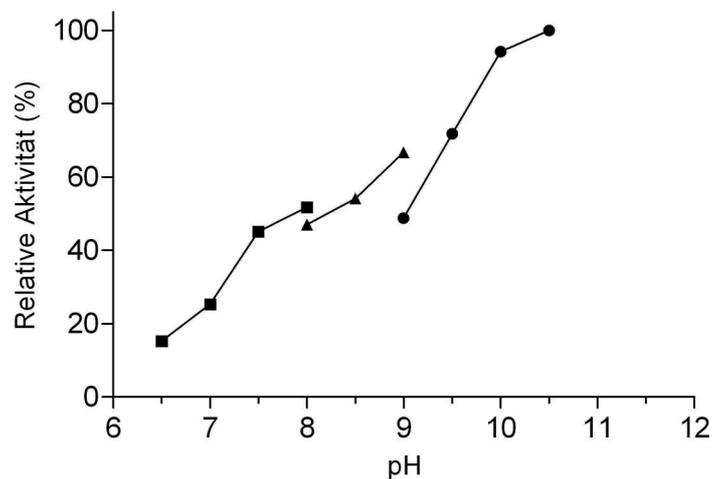


Abbildung 13: Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der GluDH aus *F. nucleatum* in der Desaminierung von L-Glu. Die Enzymaktivität wurde in folgenden 50 mM Puffern bestimmt: (■) Kpi Puffer, pH 6,5-8,0; (▲) Tris-HCl Puffer, pH 8,0-9,0; (●) Gly-NaOH Puffer, pH 9,0-10,5.

1.1.3.2 Lagerstabilität der gereinigten GluDHs

Um eine mögliche Inaktivierung der gereinigten rekombinanten GluDHs während der Lagerung bei 4°C auszuschließen, wurden die verschiedenen Enzyme in regelmäßigen Abständen auf ihre Aktivität hin untersucht. Bei der Untersuchung konnte eine hohe Lagerstabilität der gereinigten Enzyme über den untersuchten Zeitraum von 30 Tagen festgestellt werden. Lediglich die *B. subtilis* GluDH weist eine leichte Inaktivierung von 28 % nach 30 Tagen auf, für die *F. nucleatum* und *C. difficile* GluDHs konnte keine Inaktivierung nachgewiesen werden.

1.1.3.3 Untersuchung des Einflusses der Reaktionsprodukte auf die GluDHs

Um festzustellen, ob die rekombinanten GluDHs durch die Produkte der Biotransformation inhibiert werden, wurde der Einfluss von unterschiedlichen Produktkonzentrationen auf die Aktivität der Enzyme untersucht.

1.1.3.3.1 Untersuchung des Einflusses der Reaktionsprodukte auf die *F. nucleatum* GluDH

Die Untersuchung zur möglichen Produktinhibierung der rekombinanten *F. nucleatum* GluDH durch α -KG zeigte, dass das Enzym unter den gewählten Bedingungen durch α -KG deutlich mit zunehmender Konzentration in der oxidativen Desaminierung von L-Glu gehemmt wird (Abbildung 14).

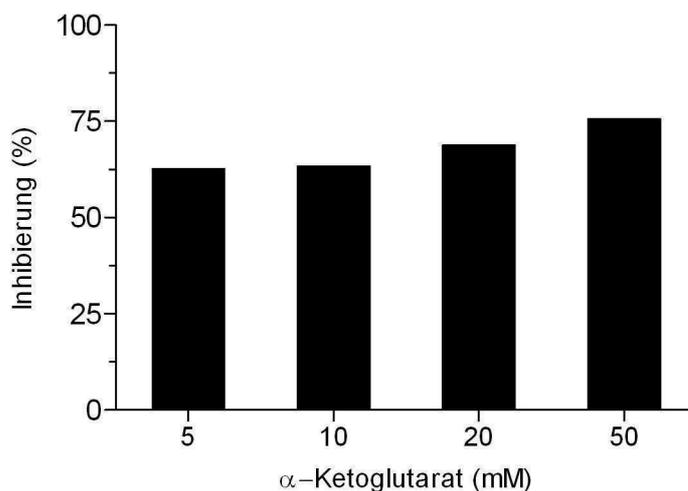


Abbildung 14: Untersuchung des Einflusses von α -KG auf die Aktivität der rekombinanten *F. nucleatum* GluDH in der oxidativen Desaminierung von L-Glu (Aktivitätsassay: 100 mM L-Glu, 1 mM NAD^+ , 30°C, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0, Zusatz von α -KG in entsprechender Konzentration). Die Aktivität des Enzyms ohne und mit Zusatz von α -KG wurde bestimmt und die ermittelte Aktivität ohne Zusatz gleich 100 % gesetzt. Für die Untersuchung wurde gereinigtes Enzym eingesetzt.

Die GluDH weist bei einer Konzentration von 5 mM α -KG eine Inhibierung von 62,6 % in der oxidativen Desaminierung von 100 mM L-Glu auf, bei einer Konzentration von 20 mM beträgt die Inhibierung 68,8 %, bei einer Konzentration von 50 mM α -KG wird das Enzym zu 75,6 % inhibiert.

In der Untersuchung zur möglichen Produktinhibierung durch das sekundäre Reaktionsprodukt Ammonium konnte ein deutlich geringerer Einfluss auf die Aktivität der GluDH in der Desaminierung von L-Glu festgestellt werden (Abbildung 15). In Anwesenheit von 10 mM wird das Enzym zu 5,8% inhibiert, bei einer Konzentration von 50 mM Ammonium beträgt die Inhibierung 23,2 %.

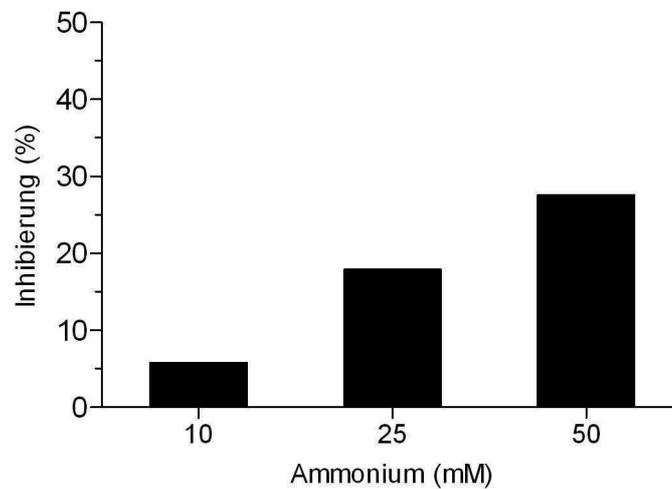


Abbildung 15: Untersuchung des Einflusses von Ammonium auf die rekombinante *F. nucleatum* GluDH in der oxidativen Desaminierung von L-Glu (Aktivitätsassay: 100 mM L-Glu, 1 mM NAD⁺, 30°C, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0, Zusatz von Ammonium in entsprechender Konzentration). Die Aktivität des Enzyms ohne und mit Zusatz von Ammonium wurde und die ermittelte Aktivität ohne Zusatz gleich 100 % gesetzt. Für die Untersuchung wurde gereinigtes Enzym eingesetzt.

Die Untersuchung der Beeinflussung durch beide Reaktionsprodukte, α -KG und Ammonium, zeigte eine signifikante Inhibierung der rekombinanten *F. nucleatum* GluDH auf, in Gegenwart von 10 mM und 50 mM α -KG sowie Ammonium konnte keine photometrische Aktivität in der Desaminierung von 100 mM L-Glu (Aktivitätsassay: 100 mM L-Glu, 1 mM NAD⁺, 30°C, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0) beobachtet werden, was für eine vollständige Inhibierung der Reaktion spricht.

Weiterhin war es von Interesse, inwiefern sich der reduzierte Cofaktor NADH auf die Aktivität der GluDH auswirkt. In der Untersuchung zur möglichen Produktinhibierung der rekombinanten *F. nucleatum* GluDH wurde ein deutlicher Einfluss auf die Aktivität in der Desaminierung von L-Glu (100 mM) festgestellt (Abbildung 16). In Anwesenheit von 0,05 mM NADH wird das Enzym bereits zu 29% inhibiert, bei einer Konzentration von 0,2 mM beträgt die Inhibierung 40,4 %.

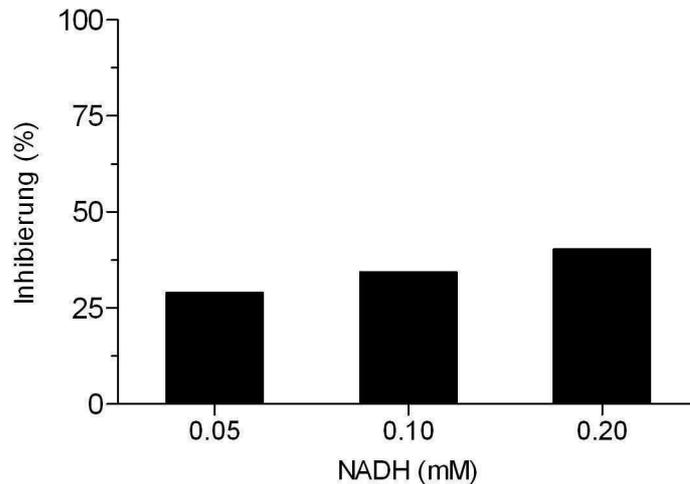


Abbildung 16: Untersuchung des Einflusses von NADH auf die rekombinante *F. nucleatum* GluDH in der oxidativen Desaminierung von L-Glu (Aktivitätsassay: 100 mM L-Glu, 1 mM NAD⁺, 30°C, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0, Zusatz von NADH in entsprechender Konzentration). Die Aktivität des Enzyms ohne und mit Zusatz von NADH wurde bestimmt und die ermittelte Aktivität ohne Zusatz gleich 100 % gesetzt. Für die Untersuchung wurde gereinigtes Enzym eingesetzt.

1.1.3.3.2 Untersuchung des Einflusses der Reaktionsprodukte auf die *C. difficile* GluDH

Die Untersuchungen zur möglichen Produktinhibierung der rekombinanten GluDH aus *C. difficile* durch α -KG zeigten, dass das Enzym unter den gewählten Bedingungen durch α -KG deutlich mit zunehmenden Konzentration in seiner Aktivität in der Desaminierung von L-Glu gehemmt wird (Abbildung 17). Die rekombinante GluDH weist bei einer Konzentration von 5 mM α -KG eine Inhibierung von 32,4 % in der oxidativen Desaminierung von 100 mM L-Glu auf, bei einer Konzentration von 20 mM beträgt die Inhibierung 52,4 %, bei einer Konzentration von 50 mM α -KG 65,1 %.

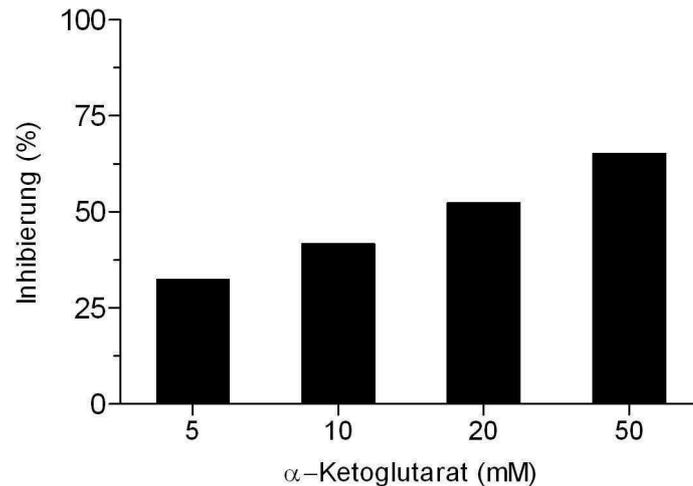


Abbildung 17: Untersuchung des Einflusses von α -KG auf die Aktivität der rekombinanten *C. difficile* GluDH in der oxidativen Desaminierung von L-Glu (Aktivitätsassay: 100 mM L-Glu, 1 mM NAD^+ , 30°C, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0, Zusatz von α -KG in entsprechender Konzentration). Die Aktivität des Enzyms ohne und mit Zusatz von α -KG wurde bestimmt und die ermittelte Aktivität ohne Zusatz gleich 100 % gesetzt. Für die Untersuchung wurde gereinigtes Enzym eingesetzt.

In der Untersuchung zur möglichen Produktinhibierung der rekombinanten *C. difficile* GluDH durch das Reaktionsprodukt Ammonium (Abbildung 18) konnte analog zur Untersuchung der *F. nucleatum* GluDH ein deutlicher Einfluss auf die Aktivität festgestellt werden. In Anwesenheit von 50 mM Ammonium wird das Enzym zu 19,8 % in der Desaminierung von 100 mM L-Glu inhibiert, bei einer Konzentration von 50 mM beträgt die Inhibierung 38,4 %, bei einer Konzentration von 100 mM 47,4%.

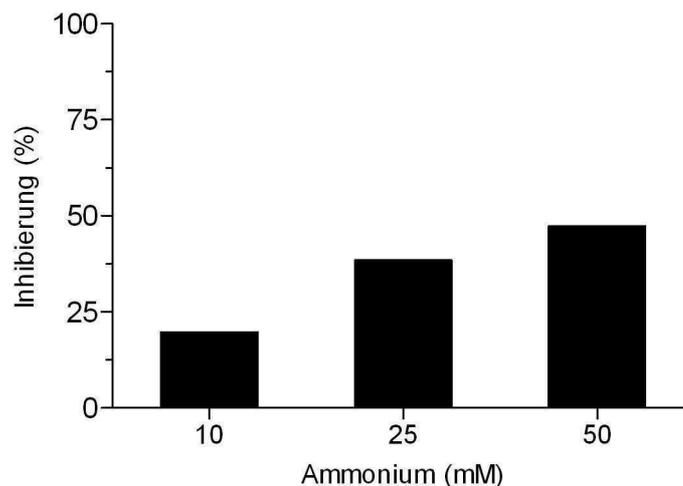


Abbildung 18: Untersuchung des Einflusses von Ammonium auf die rekombinante *C. difficile* GluDH in der oxidativen Desaminierung von L-Glu (Aktivitätsassay: 100 mM L-Glu, 1 mM NAD^+ , 30°C, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0, Zusatz von Ammonium in entsprechender Konzentration). Die Aktivität des Enzyms ohne und mit Zusatz von Ammonium wurde bestimmt und die ermittelte Aktivität ohne Zusatz gleich 100 % gesetzt. Für die Untersuchung wurde gereinigtes Enzym eingesetzt.

Die Untersuchung der Inhibierung durch beide Reaktionsprodukte, α -KG und Ammonium, zeigte eine deutliche Inhibierung der rekombinanten *C. difficile* GluDH auf, in Gegenwart von 10 mM und 50 mM α -KG sowie Ammonium konnte keine photometrische Aktivität der GluDH in der Desaminierung von 100 mM L-Glu (Aktivitätsassay: 100 mM L-Glu, 1 mM NAD⁺, 30°C, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0) beobachtet werden, was für eine vollständige Inhibierung der Reaktion spricht.

Weiterhin war es von Interesse, inwiefern sich der reduzierte Cofaktor NADH auf die Aktivität der GluDH auswirkt. In der Untersuchung zur möglichen Produktinhibierung der rekombinanten *C. difficile* GluDH wurde ein signifikanter Einfluss auf die Aktivität festgestellt. In Anwesenheit von 0,05 mM NADH wird das Enzym bereits zu 43,6 % in der Desaminierung von 100 mM L-Glu inhibiert, bei einer Konzentration von 0,2 mM beträgt die Inhibierung 75,5 % (Abbildung 19).

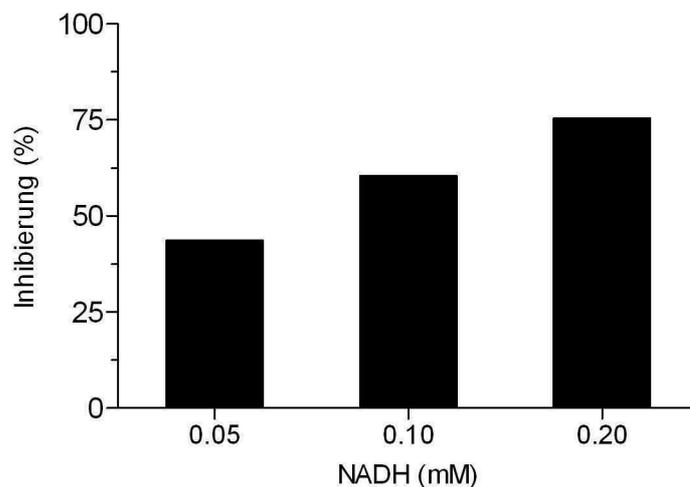


Abbildung 19: Untersuchung des Einflusses von NADH auf die rekombinante *C. difficile* GluDH in der oxidativen Desaminierung von L-Glu (Aktivitätsassay: 100 mM L-Glu, 1 mM NAD⁺, 30°C, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0, Zusatz von NADH in entsprechender Konzentration). Die Aktivität des Enzyms ohne und mit Zusatz von NADH wurde bestimmt und die ermittelte Aktivität ohne Zusatz gleich 100 % gesetzt. Für die Untersuchung wurde gereinigtes Enzym eingesetzt.

1.1.3.3.3 Untersuchung des Einflusses der Reaktionsprodukte auf die *B. subtilis* GluDH

Die Untersuchungen zur möglichen Produktinhibierung der rekombinanten *B. subtilis* GluDH durch α -KG zeigten, dass das Enzym bei pH 8,0 durch α -KG deutlich mit zunehmenden Konzentration in seiner Aktivität gehemmt wird (Abbildung 20).

So wird das Enzym bereits bei einer Konzentration von 5 mM α -KG zu 47,8 % inhibiert, bei einer Konzentration von 20 mM beträgt die Inhibierung 64,1 %, bei einer Konzentration von 50 mM sogar 79,9 %.

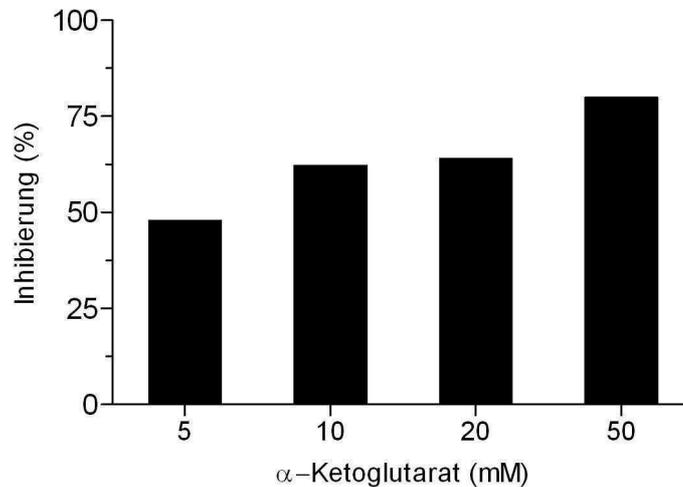


Abbildung 20: Untersuchung des Einflusses von α -KG auf die Aktivität der rekombinante *B. subtilis* GluDH in der oxidativen Desaminierung von L-Glu (Aktivitätsassay: 100 mM L-Glu, 1 mM NAD^+ , 30°C, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0, Zusatz von α -KG in entsprechender Konzentration). Die Aktivität des Enzyms ohne und mit Zusatz von α -KG wurde bestimmt und die ermittelte Aktivität ohne Zusatz gleich 100 % gesetzt. Für die Untersuchung wurde Zellrohextrakt eingesetzt.

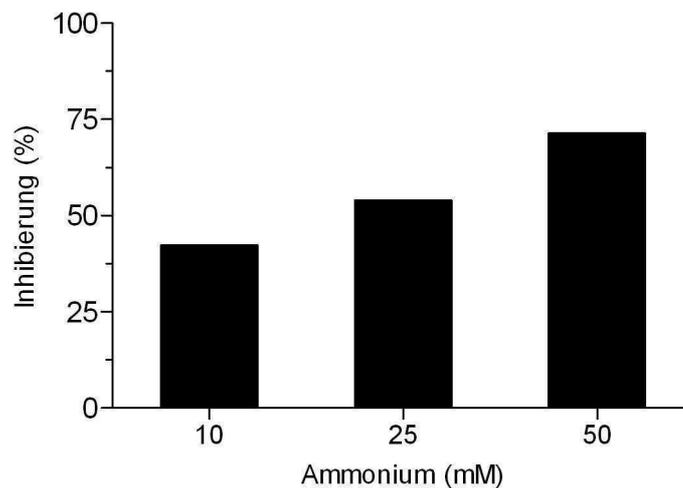


Abbildung 21: Untersuchung des Einflusses von Ammonium auf die rekombinante *B. subtilis* GluDH in der oxidativen Desaminierung von L-Glu (Aktivitätsassay: 100 mM L-Glu, 1 mM NAD^+ , 30°C, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0, Zusatz von Ammonium in entsprechender Konzentration). Die Aktivität des Enzyms ohne und mit Zusatz von Ammonium wurde bestimmt und die ermittelte Aktivität ohne Zusatz gleich 100 % gesetzt. Für die Untersuchung wurde Zellrohextrakt eingesetzt.

In der Untersuchung zur möglichen Produktinhibierung der rekombinanten GluDH durch das sekundäre Reaktionsprodukt Ammonium konnte analog zu α -KG ein deutlicher Einfluss auf die Aktivität in der Desaminierung von 100 mM L-Glu festgestellt werden (Abbildung 21). In Anwesenheit von 20 mM Ammonium wird das Enzym zu 43 % inhibiert, bei einer Konzentration von 50 mM bzw. 100 mM beträgt die Inhibierung 54 % bzw. 71,4 %.

Da die Reaktionsprodukte α -KG und Ammonium einen deutlichen negativen Einfluss auf die Aktivität der rekombinanten *B. subtilis* GluDH besitzen, wurde ebenfalls untersucht, inwiefern sich die Gegenwart von beiden Reaktionsprodukten auf die Aktivität des Enzyms auswirkt. In Gegenwart von 10 mM und 50 mM α -KG sowie Ammonium konnte keine photometrische Aktivität der GluDH in der Desaminierung von 100 mM L-Glu (Aktivitätsassay: 100 mM L-Glu, 1 mM NAD^+ , 30°C, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0) beobachtet werden, was für eine vollständige Inhibierung der Reaktion spricht.

In der Untersuchung zur möglichen Produktinhibierung der GluDH durch NADH wurde ein signifikanter Einfluss auf die Aktivität festgestellt. In Anwesenheit von 0,05 mM NADH wird das Enzym zu ca. 25 % in der Desaminierung von L-Glu (100 mM) inhibiert, bei einer Konzentration von 0,3 mM beträgt die Inhibierung 71,1 % (Abbildung 22).

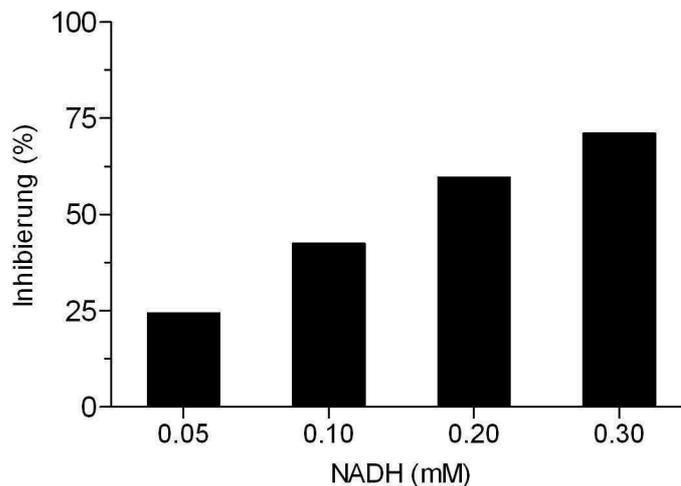
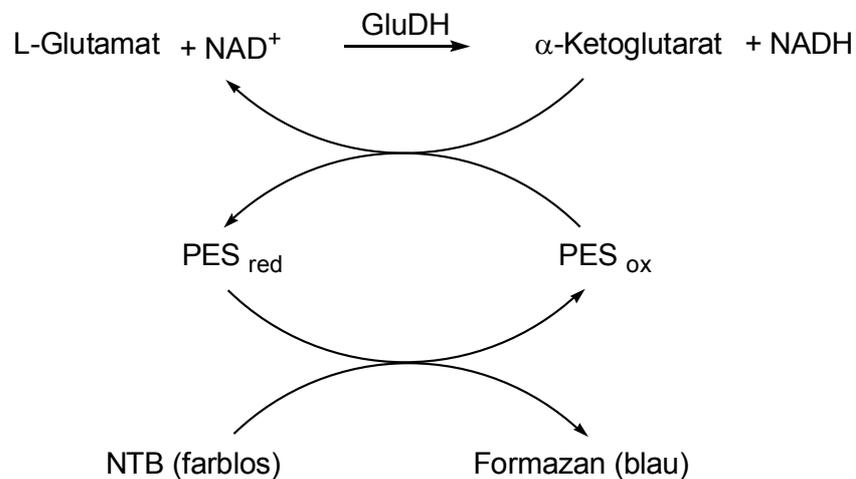


Abbildung 22: Untersuchung des Einflusses von NADH auf die rekombinante *B. subtilis* GluDH in der oxidativen Desaminierung von L-Glu (Aktivitätsassay: 100 mM L-Glu, 1 mM NAD^+ , 30°C, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0, Zusatz von NADH in entsprechender Konzentration). Die Aktivität des Enzyms ohne und mit Zusatz von NADH wurde bestimmt und die ermittelte Aktivität ohne Zusatz gleich 100 % gesetzt. Für die Untersuchung wurde Zellrohextrakt eingesetzt.

1.1.3.3.4 Untersuchung des Einflusses von α -KG und Ammonium auf die GluDH mittels NTB-Aktivitätsfärbung

In diesem Experiment wurde untersucht, ob es möglich ist, mit Hilfe der NTB-Aktivitätsfärbung einen Umsatz von L-Glu durch die GluDH in Gegenwart der sekundären Reaktionsprodukte α -KG und Ammonium nachzuweisen.

Die GluDH reduziert in der katalysierten Reaktion NAD^+ zu NADH , wobei die Elektronen auf die Verbindung Phenazinmethosulfat (PMS) übertragen werden. PMS wiederum reagiert mit Nitrotetrazoliumblausulfat (NTB) und reduziert dieses zu Formazan (siehe Schema 10). NTB besitzt eine gelbliche Farbe und ist gut wasserlöslich, dagegen ist Formazan nicht in Wasser löslich und bildet einen blauen Niederschlag aus.



Schema 10: Untersuchung des Einflusses von α -KG und Ammonium mittels NTB-Aktivitätsfärbung

Für die Untersuchung mittels NTB-Aktivitätsfärbung wurden die rekombinanten GluDHs aus *F. nucleatum* und *C. difficile* verwendet. Es wurden Konzentrationen von 100 mM bzw. 200 mM α -KG sowie von 10 mM bzw. 50 mM α -KG und Ammonium eingesetzt, die Durchführung erfolgte wie im Material und Methoden Teil beschrieben. Es zeigte sich, dass beide rekombinanten GluDHs die oxidative Desaminierung von L-Glu (10 mM) in Gegenwart von 100 mM bzw. 200 mM α -KG katalysieren können, jedoch ist ein deutliche messbare Farbumschlag bzw. Absorptionsänderung erst nach längerer Reaktionszeit zu vermessen (Abb. 23 und 24).

Mittels NTB-Aktivitätsfärbung konnte also (mit langer Reaktionszeit) in Gegenwart von 10 mM α -KG und Ammonium eine oxidative Desaminierung von L-Glu nachgewiesen werden. Die Reaktion findet somit statt, allerdings mit einer sehr niedrigen Reaktionsgeschwindigkeit. In Gegenwart einer erhöhten Konzentration beider Reaktionsprodukte von 50 mM konnte im Einklang mit den Untersuchungen im Küvetten-Photometer keine Absorptionsänderung und damit Aktivität beobachtet werden, was für eine vollständige Inhibierung der Reaktion durch das Zusammenwirken von α -KG und Ammonium unter den experimentellen Bedingungen spricht.

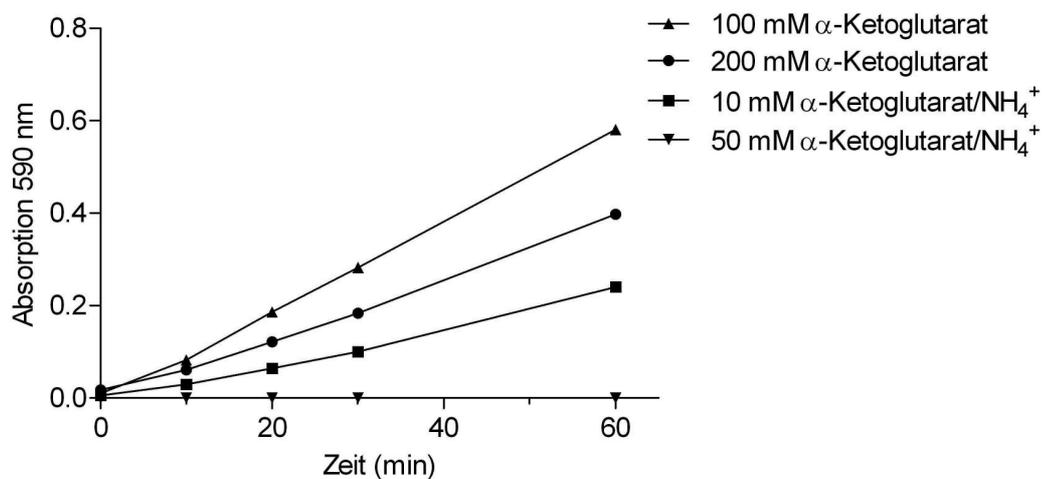


Abbildung 23: Untersuchung des Einflusses von α -KG und Ammonium auf die Aktivität rekombinanten *C. difficile* GluDH in der oxidativen Desaminierung von L-Glu mittels NTB-Aktivitätsfärbung (10 mM L-Glu, 2,5 mM NAD^+ , 0,1 mg ml⁻¹ NBT und 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ PMS, 200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 30°C).

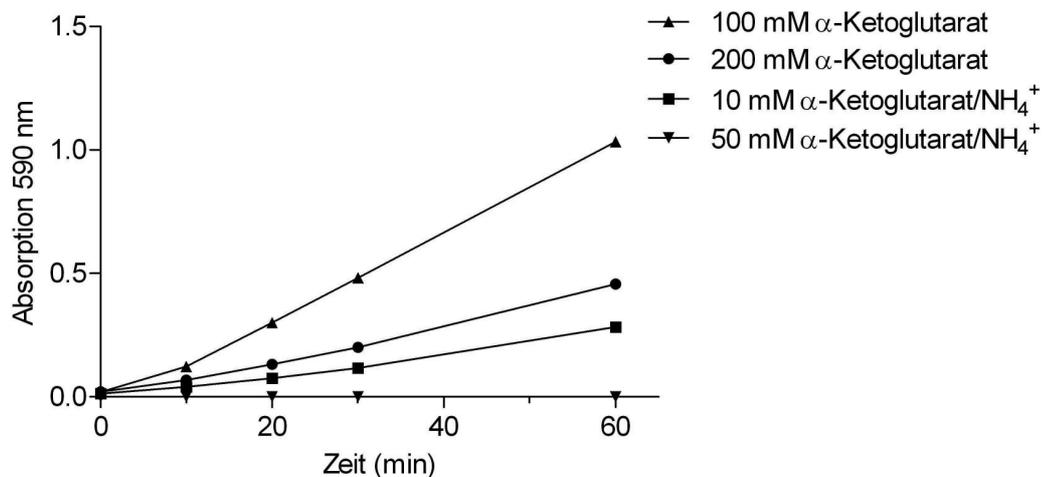


Abbildung 24: Untersuchung des Einflusses von α -KG und Ammonium auf die Aktivität rekombinanten *F. nucleatum* GluDH in der oxidativen Desaminierung von L-Glu mittels NTB-Aktivitätsfärbung (10 mM L-Glu, 2,5 mM NAD^+ , 0,1 mg ml⁻¹ NBT und 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ PMS, 200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 30°C).

1.1.4 Screening nach neuen GluDHs

Bei der Charakterisierung der rekombinant verfügbaren Enzyme stellte sich heraus, dass die GluDHs aus *B. subtilis*, *F. nucleatum* und *C. difficile* unter den untersuchten Bedingungen einer Produktinhibierung durch α -KG unterliegen, was für eine präparative Umsetzung höherer Konzentrationen von L-Glu limitierend sein kann. Aus diesem Grund sollten neue mikrobielle GluDHs zur Verfügung gestellt werden, die vorzugsweise eine niedrige bzw. keine Inhibierung durch α -KG aufweisen. Um für die Biotransformation geeignete Enzyme verfügbar zu machen, wurden verschiedene Strategien verfolgt:

Strategie I. Gerichtete Evolution, um ein bereits rekombinant verfügbares Enzym hinsichtlich seiner biochemischen Eigenschaften für die Biotransformation gezielt zu optimieren.

Strategie II. Screening von Sammlungsstämmen um neue Enzyme zu identifizieren.

Strategie III. Screening von Bodenisolaten um neue Enzyme zu identifizieren.

1.1.4.1 Strategie I: Gerichtete Evolution einer GluDH

Die Zielsetzung der Mutagenese war es, die Produktinhibierung einer GluDH herabzusetzen bzw. in der Form zu ändern, dass die Umsetzung von hohen Konzentrationen an L-Glu zu α -KG ermöglicht wird. Als Ausgangsenzym für eine Mutagenese mittels gerichteter Evolution wurde die GluDH aus *C. difficile* aus den folgenden Gründen ausgewählt:

- Gutes Expressionssystem und Reinigungsprotokoll in dieser Arbeit entwickelt
- Enzym zeigt eine hohe spezifische Aktivität in der oxidativen Desaminierung von L-Glu
- Hohe Temperaturstabilität (bis 60°C), dadurch einfache partielle Reinigung möglich
- Strukturmodell ist verfügbar
- Erkenntnisse potentiell übertragbar auf andere GluDHs

1.1.4.1.1 Vorversuche zur gerichteten Evolution

Nach Auswahl der am besten geeigneten GluDH aus *C. difficile* wurden zunächst die Kultivierungsparameter des rekombinanten *E. coli* Stammes in Deep-Well-Platten optimiert und geeignete Protokolle für die Inhibierungsuntersuchung im Mikrotiterplatten-Maßstab entwickelt.

1.1.4.1.2 Wachstumsbasiertes Selektionssystem

Weiterhin wurde untersucht, ob es *E. coli* möglich ist, auf Minimalmedium mit L-Glu als C- und N-Quelle in Gegenwart von α -KG zu wachsen. Könnten hier nur die Mutanten mit aktiver bzw. wenig inhibierter GluDH wachsen, wäre so eine Vorselektion der mittels epPCR hergestellten Mutanten möglich. Dazu wurden *E. coli* BL21(DE3)/petDuet-1 (Leervektor) sowie *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHCd auf Platten mit L-Glu Minimalmedium (Anreicherungsmedium A) kultiviert, die neben L-Glu auch ansteigende Konzentrationen an α -KG enthielten. Die Platten wurden nach Inkubation bei 37°C auf das Wachstum der Kolonien sowie deren Größe untersucht. Es zeigte sich, dass *E. coli* BL21(DE3)/petDuet-1 sowie *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHCd in der Lage sind, auf den Platten mit Minimalmedium und unter Zusatz von bis zu 300 mM α -KG zu wachsen (Tabelle 9). Auf den Platten mit 200 mM und 300 mM α -KG wurden deutlich sichtbare *E. coli* Kolonien erst nach 48 h bzw. 96 h festgestellt. Anscheinend beeinflussen erhöhte Konzentration von α -KG (> 200 mM) das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) negativ, jedoch war kein Unterschied zwischen dem rekombinanten Stamm mit GluDH und der negativ Kontrolle (mit Leervektor) hinsichtlich der Dauer des Wachstums oder der Größe der Kolonien festzustellen. Somit war auf diese Weise keine Vorselektion der Mutanten möglich.

Tabelle 9: Wachstum von *E. coli* BL21(DE3)/petDuet-1 sowie *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHCd auf L-Glu Minimalmedium-Platten in Gegenwart von α -KG.

Minimalmedium mit Zusatz von α -KG (mM)	Wachstum <i>E. coli</i> BL21(DE3)/petDuet-1	Wachstum <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pDGluDHCd
0	+++ (24 h)	+++ (24 h)
50	+++ (24 h)	+++ (24 h)
100	+++ (24 h)	+++ (24 h)
200	++ (48 h)	++ (48 h)
300	+ (96 h)	+ (96 h)

1.1.4.1.3 „Random Mutagenese“ mittels „error-prone“ PCR (epPCR)

Die Methode der „error-prone“ PCR (epPCR) wurde zur „Random Mutagenese“ der für die GluDH aus *C. difficile* kodierenden DNA angewandt. Es wurde ein epPCR Protokoll verwendet, das eine mittlere Mutationsrate in Höhe von 2-6 aufweist. Fünf Parallelansätze zu je 50 μ l wurden durchgeführt, um so eine höhere biologische Diversität zu gewährleisten. Es wurde die Goldstar Taq Polymerase verwendet, die keine „Proofreading“ Aktivität besitzt, das bedeutet, sie verfügt nicht über die Möglichkeit, über eine 3'-5'-Exonucleaseaktivität fehlerhaft eingebaute Nucleotide zu erkennen und zu ersetzen.

Mittels epPCR (Primerpaar GluDHCdfor und GluDHCdrev) konnte das Gen amplifiziert und gleichzeitig die Restriktionsschnittstellen *BsaI* und *SacI* an das 5'- bzw. 3'-Ende des Gens eingefügt werden. Die mit den Restriktionsenzymen *BsaI* und *SacI* geschnittenen und gereinigten epPCR Fragmente wurden durch Ligation in die MCS (*NcoI* und *SacI*) des Vektors petDuet-1 eingefügt (pDGluDHCdep).

1.1.4.1.4 Herstellung und Screening der Mutantenbibliothek auf neue Enzymvarianten

Die Kultivierung erfolgte in zwei Schritten. Nach Transformation von pDGluDHCdep in *E. coli* BL21(DE3) und Kultivierung auf Festmedium wurden die hergestellten Mutanten mit sterilen Zahnstochern in 96-Deep-Well Mikrotiterplatten überimpft (1 ml Kulturvolumen) und unter Selektionsdruck (Ampicillin 100 µg ml⁻¹) in LB-Medium bis zum Erreichen der stationären Phase bei 37 °C und 800 rpm kultiviert. Jede Deep-Well-Mikrotiterplatte enthielt als Positiv-Kontrolle je vier Wells mit der rekombinanten Wildtyp-GluDH (*E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHCd) und je zwei Wells mit *E. coli* BL21(DE3)/petDuet-1 als Negativ-Kontrolle. Der erste Wachstumsschritt bei 37 °C bis zum Erreichen der stationären Phase sorgt hier dafür, dass die Zellen in den verschiedenen Wells der 96-Deep-Well Mikrotiterplatte eine ähnliche optische Dichte erreichen. Die Kulturen wurden in neue Mikrotiterplatten mit Autoinduktionsmedium überimpft (1 ml Kulturvolumen), die Kultivierung wurde unter Selektionsdruck über Nacht für 16 h bei 30 °C und 800 rpm durchgeführt. Durch die Verwendung von Autoinduktionsmedium war gewährleistet, dass Kultivierung und Genexpression der verschiedenen Mutanten der Bibliothek stets unter gleichen Bedingungen ablaufen. Die Zellen der Deep-Well-Platte mit Autoinduktionsmedium wurden nach der Kultivierung mittels Zentrifugation sedimentiert, vom Medium abgetrennt und mittels Lysepuffer aufgeschlossen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der geklärte Zellrohextrakt für die Aktivitäts- und Inhibierungsuntersuchung im Mikrotiterplatten-Photometer eingesetzt. Es wurde die Aktivität mit und ohne Zusatz an α-KG untersucht (100 mM Kpi Puffer pH 8,0, 25 mM L-Glu, 2,5 mM NAD⁺, Zusatz 25 mM α-KG, 30°C).

Es wurden ca. 11500 Mutanten auf eine erniedrigte Inhibierung durch α-KG hin getestet. Ca. 70 % der untersuchten Klone zeigten Aktivität in der oxidativen Desaminierung von L-Glu, ca. 30 % waren durch die eingeführten Mutationen inaktiv. Es gelang nicht, einen positiven Klon mit verändertem Inhibierungsverhalten zu identifizieren.

Allerdings konnte der negative Klon M16H9 isoliert werden, der im Vergleich zu dem Wildtyp-Enzym eine verstärkte Inhibierung aufweist, so beträgt die Restaktivität in der oxidativen Desaminierung von 25 mM L-Glu in Gegenwart von 25 mM α -KG 12,5 %, das Wildtyp-Enzym weist unter den getesteten Bedingungen eine Restaktivität von ca. 25 % auf. Die Sequenzierung der Mutante M16H9 wies eine Mutation der Aminosäure Threonin 326 in Serin auf. In der Literatur ist dieser Aminosäureposition keine katalytische Funktion zugeschrieben. Da jedoch die Möglichkeit bestand, dass ein anderer Aminosäureaustausch an dieser Position eine positive Veränderung nach sich zog, stellte diese Mutante den Ausgangspunkt für eine Sättigungsmutagenese an der Aminosäureposition 326 dar.

1.1.4.1.5 Sättigungsmutagenese an Position 326

Die mittels epPCR identifizierte Aminosäure Serin an Position 326 sollte gegen alle anderen möglichen Aminosäuren ausgetauscht werden. Die Sättigungsmutagenese erfolgte nach dem Prinzip der sogenannten „Quick Change“ PCR. Bei dieser Methode werden Primer verwendet, welche die gewünschte Mutation in der Sequenz tragen. Diese Primer werden in einer PCR zur Amplifizierung des gesamten Vektors eingesetzt. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass die mutierte DNA bereits in transformationsfähiger zirkulärer Form vorliegt und nicht für die Transformation vorbereitet werden muss. Das Prinzip der Sättigungsmutagenese der GluDH aus *C. difficile* an Position 326 ist in Abbildung 25 dargestellt.

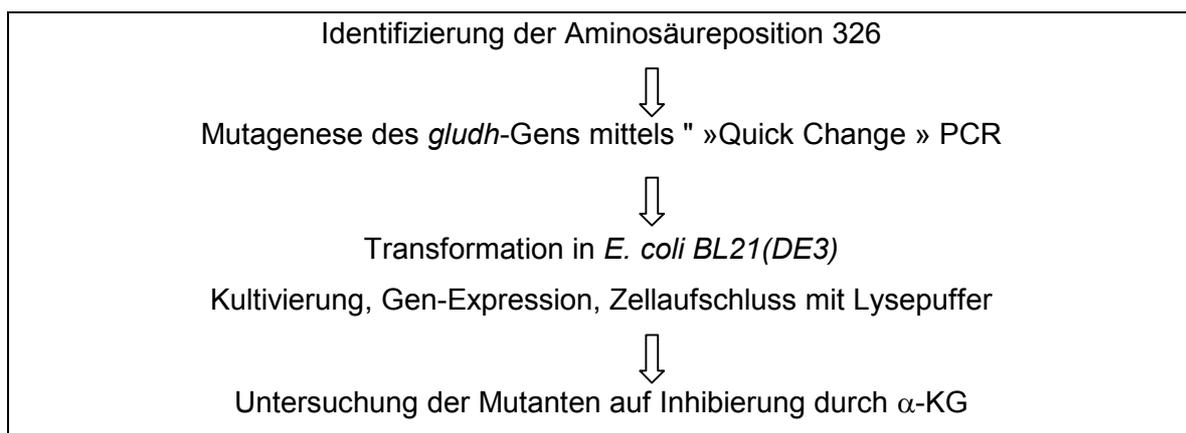


Abbildung 25: Die einzelnen Schritte der Sättigungsmutagenese der GluDH aus *C. difficile* an Position 326.

1.1.4.1.6 Herstellung und Screening der Sättigungsmutagenesebibliothek

Für die Sättigungsmutagenese mittels „Quick Change“ PCR wurden Mutageneseprimer konstruiert, die zueinander komplementär sind und an der betreffenden Stelle innerhalb der Sequenz die Degenerierung NNK (N: Adenin/Cytosin/Guanin/Thymin; K: Guanin/Thymin) trugen (Primer Ser326for und Ser326rev). Die Degenerierung NNK beinhaltet 32 Codons, die den theoretischen Austausch gegen alle proteinogenen Aminosäuren ermöglichen [Reetz, 2011]. Die kleinste Größe der NNK-Mutantenbibliothek, die untersucht werden muss, damit alle möglichen Mutationen enthalten sind, wird durch die Häufigkeit der am wenigsten repräsentierten Aminosäuren bzw. des am wenigsten repräsentierten Codons festgelegt (hier 1/32). Das bedeutet, dass mind. 100 verschiedene Mutanten untersucht werden müssen, um mit hoher Wahrscheinlichkeit alle möglichen Enzymvarianten zu erfassen.

Nach Durchführung der „Quick Change“ PCR wurde die Template-DNA durch einen Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *DpnI* abgebaut. Die verbliebene mutierte DNA wurde in kompetente *E. coli* BL21(DE3) Zellen transformiert. Nach Selektion auf LB-Platten (Ampicillin 100 µg ml⁻¹) wurden die hergestellten Mutanten mit sterilen Zahnstochern in 96-Deep-Well Mikrotiterplatten überimpft und unter Selektionsdruck in LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 800 rpm kultiviert. Jede Platte enthielt als Kontrolle zwei Wells mit der Wildtyp-GluDH (*E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHCd), mit der Mutante M16H9 (*E. coli* BL21(DE3)/pDM16H9) und zwei Wells mit *E. coli* BL21(DE3)/petDuet-1 als Leervektor-Kontrolle. Die Kulturen wurden in neue Mikrotiterplatten mit Autoinduktionsmedium überimpft (1 ml Kulturvolumen) und unter Selektionsdruck über Nacht für 16 h bei 30 °C und 800 rpm kultiviert. Durch die Verwendung von Autoinduktionsmedium war gewährleistet, dass Kultivierung und Genexpression der verschiedenen Mutanten der Bibliothek stets unter gleichen Bedingungen ablaufen. Die Zellen der Deep-Well-Platte mit Autoinduktionsmedium wurden mittels Zentrifugation sedimentiert, vom Medium abgetrennt und mittels Lysepuffer aufgeschlossen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der geklärte Zellrohextrakt für die Aktivitäts- und Inhibierungsuntersuchung im Mikrotiterplatten Photometer eingesetzt. Es wurde die Aktivität mit und ohne Zusatz an α -KG untersucht (100 mM Kpi Puffer pH 8,0, 25 mM L-Glu, 2,5 mM NAD⁺, Zusatz 25 mM α -KG, 30°C).

Es wurden ca. 200 Klone der NNK-Sättigungsmutagenesebibliothek auf eine erniedrigte Inhibierung durch α -KG hin getestet, wobei es nicht gelang, einen positiven Klon mit im Vergleich zum Wildtyp-Enzym erniedrigter Inhibierung zu identifizieren.

Ca. 90 % der untersuchten Mutanten zeigten Aktivität in der oxidativen Desaminierung von L-Glu, ca. 10 % waren inaktiv bzw. es war unter den experimentellen Bedingungen keine Aktivität zu vermessen. Von der Anzahl der aktiven Mutanten wiesen ca. 80 % eine dem Wildtyp ähnliche Inhibierung auf, ca. 20 % zeigten der Mutante M16H9 ähnliche Werte.

1.1.4.2 Strategie II: Screening von Sammlungsstämmen

Mikroorganismen einer institutsinternen Stammsammlung wurden auf GluDH Aktivität untersucht. Diese Methode bietet den entscheidenden Vorteil, dass die Stämme bekannt sind und es so möglich ist, eine gezielte Datenbanksuche nach genomischen Sequenzinformationen durchzuführen, um die *gludh* codierenden Sequenzen zu identifizieren.

Stämme verschiedener Gattungen wie z.B. *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Lactobacillus*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces* sowie *Bacillus* wurden im Screening auf GluDH-Aktivität hin untersucht. Dazu wurden 120 Sammlungsstämme in den von der DSMZ empfohlenen Flüssigmedien mit Zusatz an L-Glu (1 %) sowie den entsprechenden Temperaturen kultiviert und nach ausreichendem Zellwachstum (2 bis 7 Tage) geerntet. Die Kultivierung wurde standardmäßig in Schüttelkolben ohne Schikanen bei 120 rpm durchgeführt (20 ml Kultur). Die Zellen wurden aufgeschlossen und die erhaltenen Zellrohextrakte auf GluDH-Aktivität hin untersucht, wobei für die Aktivitätsmessung beide Cofaktoren (NADP⁺ und NAD⁺) eingesetzt wurden. Die Aktivitätsmessungen wurden bei einem eher basischen pH-Wert von 9,0 durchgeführt, da GluDHs im Allgemeinen in diesem pH-Bereich eine höhere Aktivität in der oxidativen Desaminierung von L-Glu zeigen (50 mM L-Glu, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 9,0, 2,5 mM NADP⁺/NAD⁺, 30°C). Im Falle einer im Photometertest deutlich messbaren Aktivität (> 0,25 U ml⁻¹ Rohextrakt), wurde die Cofaktorabhängigkeit des Enzyms durch entsprechende Aktivitätsmessungen mit jeweils einem Cofaktor bestimmt. Anschließend wurden die identifizierten Stämme mit nachweisbarer Aktivität auf eine Inhibierung durch α -KG untersucht.

Im Screening konnten 15 Stämme identifiziert werden, die eine ausreichende GluDH-Aktivität aufwiesen, um näher auf ihre Cofaktorabhängigkeit untersucht zu werden. Es zeigte sich, dass 11 Stämme eine eindeutige NAD⁺-Abhängigkeit und 3 Stämme eine duale Cofaktorabhängigkeit besitzen, wobei im letzteren Fall ungeklärt ist, ob es sich um zwei verschiedenen GluDHs handelt oder nicht. Nur der Stamm *Candida succiphila* konnte als eindeutig NADP⁺-abhängig identifiziert werden.

Um festzustellen, ob die identifizierten Enzyme durch das Reaktionsprodukt α -KG inhibiert werden, wurde der Einfluss von 50 mM an α -KG auf die Aktivität der GluDHs in der oxidativen Desaminierung von L-Glu untersucht (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 50 mM α -KG, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 9,0, 30°C), die Ergebnisse sind in der Tabelle 10 dargestellt. Es konnten 8 Stämme identifiziert werden, die bei der photometrischen Untersuchung keine Inhibierung in der oxidativen Desaminierung von L-Glu zeigten, 6 Stämme wurden zwischen 30 % und 70 % in ihrer Aktivität inhibiert und nur ein Stamm zeigte eine vollständige Inhibierung.

Tabelle 10: Untersuchung des Einflusses von α -KG auf die Aktivität der oxidativen Desaminierung von L-Glu im Screening identifizierte Stämme mit GluDH-Aktivität (50 mM L-Glu, 50 mM α -KG, 2,5 mM NAD⁺, 30°C, 50 mM Tris-HCl pH 9,0), ¹ Volumenaktivität ohne Zusatz von α -KG.

Eintrag	Stamm	Cofaktor	Volumenaktivität ¹ (U ml ⁻¹)	Inhibierung (%)
1	<i>Kluyveromyces lactis</i>	NAD ⁺	0,69	0
2	<i>Rhodotorula glutinis</i>	NAD ⁺	0,69	0
3	<i>Debaryomyces hansenii</i>	NAD ⁺ /NADP ⁺	0,66	45
4	<i>Candida cariosilignicola</i>	NAD ⁺	0,40	0
5	<i>Pichia jadinii</i>	NAD ⁺	0,58	0
6	<i>Kluyveromyces corticis</i>	NAD ⁺ /NADP ⁺	0,78	29
7	<i>Candida succiphila</i>	NADP ⁺	0,52	73
8	<i>Pachysolen tannophilus</i>	NAD ⁺ /NADP ⁺	0,51	100
9	<i>Pichia pastoris</i>	NAD ⁺	1,00	0
10	<i>Pichia finlandica</i>	NAD ⁺	1,70	45
11	<i>Rhodotorula bogoriensis</i>	NAD ⁺	0,21	0
12	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	NAD ⁺	0,40	0
13	<i>Pichia angusta</i>	NAD ⁺	0,63	38
14	<i>Pichia anomala</i>	NAD ⁺	1,39	0
15	<i>Pichia carsonii</i>	NAD ⁺	0,95	60

Die 10 Stämme mit den niedrigsten Inhibierungswerten wurden nach erneuter Kultivierung und Zellrohextraktherstellung nochmals untersucht, die Ergebnisse des Screenings konnten hierbei bestätigt werden. Es wurden auch Kontrollansätze ohne L-Glu bzw. nur mit Zusatz von α -KG untersucht, auffällig hierbei waren hohe Aktivitäten (50 % bis 100 % der Aktivität mit L-Glu) in den Aktivitätsmessungen ohne Zusatz von Substrat, in welchen lediglich Rohextrakt und NAD⁺ bzw. Rohextrakt, NAD⁺ und α -KG eingesetzt wurden.

Die Aktivitäten in den Ansätzen mit oder ohne Zusatz von α -KG unterscheiden sich hierbei nicht, so dass eine Störreaktion durch α -KG-abhängige Enzyme weitgehend ausgeschlossen werden kann. Die hohe Hintergrundaktivität ist wahrscheinlich auf L-Glu zurückzuführen, welches aus dem Kultivierungsmedium stammt und intrazellulär vorliegt.

Zusammenfassend konnten 8 Stämme identifiziert werden, die eine eindeutige NAD^+ -Abhängigkeit aufweisen und unter den untersuchten Bedingungen im Photometertest keine signifikante Inhibierung in der oxidativen Desaminierung von L-Glu durch das Reaktionsprodukt α -KG aufweisen. Aufgrund der durchweg relative niedrigen Aktivitäten im Zellrohextrakt sollten die identifizierten GluDHs für die weiteren Arbeiten rekombinant zugänglich gemacht werden.

1.1.4.3 Strategie III: Screening von Bodenisolaten aus Anreicherungskulturen

Die Kultivierung von Mikroorganismen aus Bodenproben bietet ein fast unbegrenztes Potential für die Isolierung von neuen Biokatalysatoren, so können in einem Gramm Erde bis zu 10^7 Mikroorganismen enthalten sein. Jedoch können Limitierungen in der Kultivierbarkeit dazu führen, dass potentielle Mikroorganismen bzw. Biokatalysatoren nicht detektiert und isoliert werden können. Um potentielle GluDH bildende Mikroorganismen anzureichern, wurden 10 Bodenproben verschiedener Herkunft mit jeweils 20 ml Anreicherungsmedium A bzw. B vermischt und bei 30°C und 120 rpm inkubiert, bis eine deutliche Trübung des Mediums zu erkennen war. Durch Zugabe von L-Glu als alleinige Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle (Anreicherungsmedium A) bzw. Stickstoff-Quelle (Anreicherungsmedium B) in dem Minimalnährmedium können selektiv Mikroorganismen angereichert werden, die in der Lage sind, L-Glu zu metabolisieren und als Nährstoffquelle zu nutzen. Nach ein bis zwei Tagen wurden die Zellen in frisches Anreicherungsmedium überimpft, wobei dieser Schritt insgesamt 3 mal wiederholt wurde. Um Reinkulturen für die Kultivierung sowie eine mögliche Stammidentifizierung zu erhalten, wurden Ausstriche des Anreicherungsmediums auf Platten mit Minimalmedium durchgeführt. Es konnte ein Wachstum von vielen optisch verschiedenen Stämmen festgestellt werden. Von diesen Platten wurden einzeln erkennbare Kolonien mittels Verdünnungsausstrich auf Platten mit Anreicherungsmedium überimpft. Diese Reinkulturen wurden in 10 ml Minimalmedium bei 30°C und 120 rpm angezogen und nach ausreichendem Zellwachstum geerntet, wobei die Zeit, bis ausreichend Zellmasse gebildet wurde, je nach Stamm zwischen 2 und 7 Tagen lag.

Die Zellen wurden aufgeschlossen und die erhaltenen Zellrohextrakte auf Aktivität in der oxidativen Desaminierung von L-Glu untersucht, wobei hier für die Aktivitätsmessung beide Cofaktoren eingesetzt wurden, um das Screening nicht auf NAD⁺- oder NADP⁺-abhängige GluDHs zu beschränken (50 mM L-Glu, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 9,0, 30°C, 2,5 mM NAD⁺/NADP⁺). Im Falle einer im Photometertest messbaren GluDH-Aktivität wurde die Cofaktorabhängigkeit durch entsprechende Aktivitätsmessungen bestimmt. Anschließend wurden die identifizierten Stämme mit GluDH-Aktivität auf die Inhibierung durch α -KG untersucht (50 mM L-Glu, 50 mM α -KG, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 9,0, 30°C, 2,5 mM NAD⁺ bzw. NADP⁺).

Insgesamt 323 Isolate aus Bodeproben wurden in Reinkultur kultiviert und nach Herstellung des zellfreien Rohextraktes auf GluDH-Aktivität untersucht, wobei 19 Isolate eine deutlich messbare Aktivität aufwiesen. Die gewachsenen Kolonien wurden ebenfalls auf einen Zusammenhang von Wuchsverhalten, Farbe und Größe der Kolonien mit ihrer Aktivität untersucht, hierbei konnte jedoch kein Zusammenhang festgestellt werden. Um zu untersuchen, ob die Isolate durch das Reaktionsprodukt α -KG inhibiert werden, wurde der Einfluss von 50 mM an α -KG auf die Aktivität der GluDHs (im Rohextrakt) in der oxidativen Desaminierung von L-Glu bestimmt. Hierbei konnte ein Stamm identifiziert werden, der eine vermeintlich niedrige Inhibierung durch α -KG aufweist. Das Isolat P7 zeigte deutlich messbare Aktivität in Anwesenheit von α -KG, die Inhibierung betrug 23,7 %, bei eindeutiger NAD⁺-Abhängigkeit, während alle anderen Enzyme unter diesen Bedingungen eine vollständige oder hohe (>80%) Inhibierung aufwiesen. Die Ergebnisse zur Messung der GluDH-Aktivität sowie der Inhibierung durch α -KG konnten nach erneuter Kultivierung des Isolates P7 reproduziert werden und sind in der Tabelle 11 dargestellt. Nach Präparation von genomischer DNA und einer PCR (Primer 609V und 907R) wurde das Isolat P7 mittels 16SrRNA Analyse als *Bacillus pumilus* ATCC7061 identifiziert.

Tabelle 11: Untersuchung des Einflusses von α -KG auf die NAD⁺-abhängige GluDH des Isolates P7 (50 mM L-Glu, 50 mM α -KG, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 9,0, 30°C, 2,5 mM NAD⁺).

Bodenisolat	Cofaktor	Volumenaktivität (U ml ⁻¹)		Inhibierung durch α -KG (%)
		L-Glu	L-Glu/ α -KG	
P7	NAD ⁺	0,97	0,74	23,7

1.1.4.4 Klonierung der identifizierten GluDHs

Um die Klonierung der im Screening von Sammlungsstämmen und Bodenisolaten identifizierten GluDHs zu ermöglichen, wurde eine gezielte Datenbanksuche durchgeführt. Die Suche innerhalb der Datenbank UniProt lieferte drei putative Gensequenzen für GluDHs, die Identifizierung als GluDH war hierbei auf der Sequenzhomologie zur literaturbekannten GluDH aus *Saccharomyces cerevisiae* (UniProt P33327) begründet. Mit den Aminosäuresequenzen wurden Aligments (Programm ClustelW) durchgeführt, um die Sequenzidentität zu ermitteln.

Das Aligment der identifizierten Sequenzen mit der GluDH aus *S. cerevisiae* lieferte folgende Identitätswerte:

1. <i>P. pastoris</i>	UniProt C4R0A2	47 %
2. <i>K. lactis</i>	UniProt Q6CRJ9	64 %
3. <i>K. thermotolerans</i>	UniProt C5DD00	68 %

Weiterhin konnte bei der Datenbanksuche ein hypothetisches Gen einer GluDH im Genom von *B.pumilus* ATCC7061 identifiziert werden (Uniprot B4AKG2_BACPU).

Nach erneuter Kultivierung der Stämme und Präparation genomischer DNA wurden Restriktionskarten der *gludh*-Gene erstellt, um die Auswahl von Schnittstellen für die Klonierung in *E. coli* Expressionsvektoren zu ermöglichen. Auf Grundlage der Sequenzinformationen wurden spezifische Primer konstruiert. Eine PCR wurde zur Amplifizierung der *gludh*-Gene aus genomischer DNA durchgeführt. Die geschnittenen und gereinigten DNA-Fragmente wurden durch Ligation in die Vektoren petDuet-1 und ptrc99a eingefügt und die Konstrukte in kompetente *E. coli* DH5 α Zellen transformiert. Nach Selektion auf LB-Platten mit dem jeweiligem Antibiotikum sowie Kultivierung in Flüssigkulturen wurde die Vektor-DNA aus mehreren Transformanten isoliert und mittels Restriktionsanalyse überprüft. Die weitere Überprüfung der positiven Transformanten geschah durch Sequenzierung. Die *gludh*-Gene der GluDHs aus *K. lactis* (in ptrc99a = pTGluDHKI) sowie *B. pumilus* (in petDuet-1 = pDGluDHBp) konnten erfolgreich kloniert werden, die Klonierung der *gludh*-Gene aus *P. pastoris* sowie *K. thermotolerans* gelang nicht. Anschließend wurden die Vektoren pTGluDHKI und pDGluDHBp zur rekombinanten Produktion der GluDHs in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

1.1.4.5. Heterologe Expression des *gludh* Gens aus *K. lactis* in *E. coli*

Eine Einzelkolonie von *E. coli* BL21(DE3)/pTGluDHKI wurde von Platte in 20 ml LB-Medium (Ampicillin 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) überimpft. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C und 120 rpm. Mit der Vorkultur wurde die Hauptkultur (1 L) auf eine OD_{600} von 0,05 beimpft (LB-Medium, Ampicillin 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Die Kultivierung erfolgte im Schüttelkolben (5 L Volumen) unter Schütteln (120 rpm) bei 37°C bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5. Die Genexpression wurde durch die Zugabe von IPTG (0,1 mM) induziert und für weitere 22 h bei 25°C unter Schütteln (120 rpm) kultiviert. Danach wurde die Zellmasse durch Zentrifugation (30 min, 5000 rpm bei 4°C, Hettich Zentrifuge) von dem Medium abgetrennt.

Entweder wurden die Zellen direkt genutzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -18°C gelagert. Die spez. Aktivität der rekombinanten GluDH im Rohextrakt nach Ultraschall-Aufschluss der Zellen betrug 23,2 U mg^{-1} (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 9,0, 5 mM NAD^+ , 30°C).

1.1.4.6 Reinigung der rekombinanten *K. lactis* GluDH

Die Reinigung der rekombinanten GluDH aus *K. lactis* aus dem Zellrohextrakt erfolgte wie im Material und Methoden Teil beschrieben durch Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose. Für die Chromatographie wurde ein ÄKTA-System der Firma Pharmacia verwendet. Die Reinigung der *K. lactis* GluDH aus *E. coli* BL21(DE3)/pTGluDHKI Zellen konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die als aktiv identifizierten Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mit Hilfe einer Ultrafiltrationseinheit eingeengt, anschließend wurde die Enzymlösung mit einer PD10 Sephadex G 25 Säule (Pharmacia) umgepuffert (50 mM Kpi Puffer pH 7,5). Die Lagerung der gereinigten GluDH erfolgte bei 4°C.

Die Ergebnisse der Reinigung sind in Tabelle 12 zusammengefasst und dargestellt. Aus 10 ml geklärtem Rohextrakt mit einer Volumenaktivität von 609 U ml^{-1} und einem Proteingehalt von 23,3 mg ml^{-1} konnten nach der Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose sowie der Ultrafiltration 3833 U GluDH, mit einer spezifischen Aktivität von 84,1 U mg^{-1} gewonnen werden können. Dies entspricht einem Reinigungsfaktor von 3,6 bei einer Ausbeute von 62,9 %.

Tabelle 12: Reinigung der rekombinanten *K. lactis* GluDH aus *E. coli* BL21(DE3)/pTGluDHKL (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 50 mM Tris-HCl pH 9,0, 5 mM NAD⁺, 30°C), UF: Ultrafiltration.

Reinigungsschritt	Spez. Aktivität (U mg ⁻¹)	Gesamt-Aktivität (U)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor (x-fach)
Rohextrakt	23,2	6094	100,0	1
Q-Sepharose + UF	84,1	3833	62,9	3,6

1.1.4.7 Heterologe Expression des *gludh*-Gens aus *Bacillus pumilus* in *E. coli*

Eine Einzelkolonie von *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHBp wurde von Platte in 20 ml LB-Medium (Ampicillin 100 µg ml⁻¹) überimpft. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C und 120 rpm. Mit der Vorkultur wurde die Hauptkultur (1 L) auf eine OD₆₀₀ von 0,05 beimpft (LB-Medium, Ampicillin 100 µg ml⁻¹). Die Kultivierung erfolgte im Schüttelkolben (5 L Volumen) unter Schütteln (120 rpm) bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5. Die Genexpression wurde durch die Zugabe von IPTG (0,1 mM) induziert und für weitere 4 h bei 37°C unter Schütteln (120 rpm) kultiviert. Danach wurde die Zellmasse durch Zentrifugation (30 min, 5000 rpm bei 4°C, Hettich Zentrifuge) von dem Medium abgetrennt. Entweder wurde die Zellen direkt genutzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -18°C gelagert. Die spez. Aktivität der rekombinanten GluDH im Rohextrakt nach Ultraschall-Aufschluss der Zellen betrug 4,9 U mg⁻¹ (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 2,5 mM NAD⁺, 30°C, 100 mM Kpi pH 8,0).

1.1.4.8 Reinigung der *B. pumilus* GluDH

Zur Reinigung der *B. pumilus* GluDH aus *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHBp Rohextrakt mittels Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose wurde ein ÄKTA-System der Firma Pharmacia verwendet. Die Reinigung der GluDH mittels Q-Sepharose konnte analog zur Reinigung des Enzyms aus *B. subtilis* nicht erfolgreich durchgeführt werden. Im Verlauf der Chromatographie an Q-Sepharose konnte in den Elutionsfraktionen eine deutliche Ausfällung von Protein beobachtet werden, das Enzym scheint unter den gewählten Bedingungen relativ instabil zu sein. Eine GluDH-Aktivität konnte in keiner der Fraktionen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche das geklärte und sterilfiltrierte Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)/pDGluDHBp eingesetzt.

1.1.5. Charakterisierung der GluDHs aus dem Screening

1.1.5.1 Untersuchung des Einflusses der Reaktionsprodukte auf die GluDH aus *K. lactis*

Um festzustellen, ob die rekombinante GluDH aus *K. lactis* durch die Produkte der Biotransformation inhibiert wird, wurde der Einfluss von α -KG und Ammonium auf die Aktivität der GluDH untersucht. Analog zur Inhibierungsuntersuchung der Enzyme aus *B. subtilis*, *C. difficile* und *F. nucleatum* wurde ein signifikanter Einfluss von α -KG auf die Aktivität der rekombinanten *K. lactis* GluDH in der Desaminierung von L-Glu festgestellt (Tabelle 13), in Anwesenheit von 50 mM α -KG wird das Enzym zu ca. 79 % inhibiert. Ebenfalls wurde die Produktinhibierung durch das zweite, während der Reaktion akkumulierende Reaktionsprodukt Ammonium, sowie in Gegenwart von beiden Reaktionsprodukten untersucht. Es zeigte sich, dass die Inhibierung durch 50 mM Ammonium 31,3 % beträgt, in Gegenwart von 50 mM α -KG sowie Ammonium konnte keine photometrische Aktivität mehr beobachtet werden, was für eine vollständige Inhibierung der Reaktion spricht.

Tabelle 13: Untersuchung des Einflusses von α -KG und Ammonium auf die Aktivität der rekombinanten *K. lactis* GluDH in der oxidativen Desaminierung von L-Glu (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 2,5 mM NAD⁺, 30°C, 100 mM Kpi Puffer pH 8,0). Die Aktivität des Enzyms ohne und mit Zusatz von α -KG und Ammonium wurde jeweils für den entsprechenden Ansatz bestimmt und die ermittelte Aktivität ohne Zusatz gleich 100 % gesetzt. Für die Untersuchung wurde gereinigtes Enzym eingesetzt.

Eintrag	pH-Wert	α -KG (mM)	Ammonium (mM)	Relative Aktivität (%)	Inhibierung (%)
1	8,0	50	0	21,0	79,0
2	8,0	0	50	68,7	31,3
3	8,0	50	50	0,0	100,0

Aufgrund der Ergebnisse aus dem Screening der Stammsammlung wurde eine signifikante Inhibierung durch α -KG nicht erwartet. In Anlehnung an die vorangegangenen Inhibierungsuntersuchung der anderen rekombinanten GluDHs wurde die Inhibierungsuntersuchung der *K. lactis* GluDH bei pH 8,0 durchgeführt. Im Gegensatz hierzu wurden die Aktivitäts- sowie Inhibierungsuntersuchung im Verlauf des Screenings bei einem pH von 9,0 durchgeführt, da GluDHs im Allgemeinen in diesem pH-Bereich eine höhere Aktivität in der oxidativen Desaminierung von L-Glu zeigen.

1.1.5.2 Untersuchung des Einflusses von α -KG auf die GluDH *K. lactis* in Abhängigkeit vom pH-Wert

Um die Produktinhibierung durch α -KG näher zu untersuchen, wurde der Einfluss auf die Aktivität der rekombinante *K. lactis* GluDH in Abhängigkeit vom pH-Wert bestimmt. In der Abbildung 26 sind die Ergebnisse der Inhibierungsuntersuchung durch α -KG in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt.

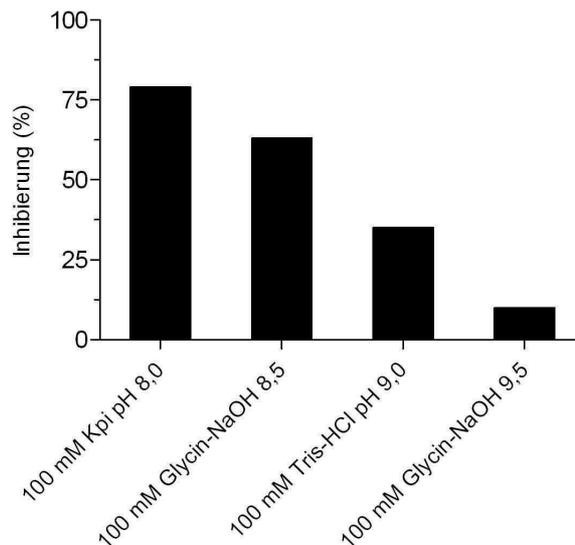


Abbildung 26: Einfluss von α -KG auf die Aktivität der rekombinanten *K. lactis* GluDH in der oxidativen Desaminierung von L-Glu in Abhängigkeit vom pH-Wert (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 50 mM α -KG, 2,5 mM NAD^+ , 30°C, 100 mM Puffer). Die Aktivität des Enzyms ohne und mit Zusatz von α -KG wurde jeweils für den entsprechenden pH-Wert bestimmt und die ermittelte Aktivität ohne Zusatz gleich 100 % gesetzt. Für die Untersuchung wurde gereinigtes Enzym eingesetzt.

Die Untersuchungen zeigten, dass die Inhibierung stark vom pH-Wert abhängig ist. So ist aus Abbildung 26 ersichtlich, dass die Inhibierung mit zunehmendem pH-Wert deutlich abnimmt. In Anwesenheit von 50 mM α -KG und einem pH-Wert von 8,0 wird das Enzym zu 79,3 % inhibiert, bei einem pH-Wert von 8,5 beträgt die Inhibierung 63,4 %, bei pH 9,0 nur noch 34,7 % und bei einem pH von 9,5 schließlich lediglich 10 %.

1.1.5.3 Untersuchung des Einflusses der Reaktionsprodukte auf die GluDH *B. pumilus*

Im Folgenden wurde der Einfluss von α -KG und Ammonium auf die Aktivität der rekombinanten *B. pumilus* GluDH in der Desaminierung von L-Glu untersucht.

Für die Untersuchung wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart von der Reaktionsprodukte α -KG und Ammonium vermessen. Es wurde ein signifikanter Einfluss von α -KG auf die Aktivität der rekombinanten *B. pumilus* GluDH in der Desaminierung von L-Glu festgestellt, in Anwesenheit von 50 mM α -KG wird das Enzym zu 77,0 % inhibiert. In Gegenwart von 50 mM Ammonium wurde das Enzym zu 45,7 % inhibiert; in Gegenwart von 50 mM α -KG sowie Ammonium konnte keine photometrische Aktivität mehr beobachtet werden (Tabelle 14).

Tabelle 14: Untersuchung des Einflusses von α -KG und Ammonium auf die Aktivität der rekombinanten *B. pumilus* GluDH in der oxidativen Desaminierung von L-Glu (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 2,5 mM NAD⁺, 30°C, 100 mM Kpi-Puffer pH 8,0). Die Aktivität des Enzyms ohne und mit Zusatz von α -KG und Ammonium wurde jeweils für den entsprechenden Ansatz bestimmt und die ermittelte Aktivität ohne Zusatz gleich 100 % gesetzt. Für die Untersuchung wurde Zellrohextrakt (sterilfiltriert) eingesetzt.

Eintrag	pH-Wert	α -KG (mM)	Ammonium (mM)	Relative Aktivität (%)	Inhibierung (%)
1	8,0	50	0	23,0	77,0
2	8,0	0	50	54,3	45,7
3	8,0	50	50	0,0	100,0

Analog zur Inhibierungsuntersuchung der rekombinanten *K. lactis* GluDH, wurde ein im Vergleich zum Screening, bei dem ein pH-Wert von 9,0 verwendet wurde, deutlich verändertes Inhibierungsverhalten festgestellt. Im Gegensatz zum Enzym aus *K. lactis* erschien es so, dass die rekombinante *B. pumilus* GluDH durch α -KG in diesem eher basischen pH-Bereich jedoch nicht nur deutlich weniger in ihrer Aktivität inhibiert, sondern zusätzlich noch aktiviert zu werden. So konnte unter Erhöhung des pH-Wertes von 8,0 auf 9,0 und in Gegenwart von 50 mM α -KG eine nahezu 4-fache Steigerung der zu messenden Aktivität (415 %) im Vergleich zum Ansatz ohne α -KG beobachtet werden (Tabelle 15). In der durchgeführten Kontrolle zur Aktivität mit α -KG ohne den Zusatz von L-Glu als Substrat konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Der Zusatz von α -KG während den laufenden Aktivitätsmessung mit L-Glu führte interessanterweise nicht zu einem Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit, was bei einer Aktivierung zu erwarten gewesen wäre. Wird die Konzentration des Substrates L-Glu im Messansatz von 50 mM auf 100 mM erhöht, wird das Enzym unter den ansonsten gleichbleibenden Bedingungen zu 29,2 % in der oxidativen Desaminierung inhibiert.

Das Enzym schien unter den Bedingungen der Aktivitätsmessung bei pH 9,0 (100 mM Tris-HCl Puffer pH 9,0) sehr instabil zu sein und anscheinend wurde es bereits innerhalb des Zeitraumes der Aktivitätsmessung (1 min) inaktiviert. Im Reaktionsansatz zur Inhibierungsuntersuchung wurde das Enzym anscheinend durch das Reaktionsprodukt α -KG vor der Inaktivierung geschützt, so dass eine höhere Aktivität zu messen war als in dem Reaktionsansatz ohne α -KG. Dafür sprach auch eine augenscheinliche Stabilisierung durch erhöhte Substratkonzentrationen von 100 mM L-Glu.

Interessanterweise erscheint eine Substratkonzentration von 50 mM nicht auszureichen, um die GluDH zu stabilisieren bzw. vor Inaktivierung zu schützen. Unter Zusatz von 15 Vol.-% Glycerol konnte das Enzym ebenfalls stabilisiert werden, die Inhibierung beträgt in diesem Fall unter ansonsten gleichbleibenden Bedingungen 27,1 % (Tabelle 15).

Tabelle 15: Untersuchung des Einflusses von α -KG auf die Aktivität der rekombinanten *B. pumilus* GluDH in der oxidativen Desaminierung von L-Glu (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 2,5 mM NAD⁺, 30°C, 100 mM Kpi Puffer pH 8,0, 100 mM Tris-HCl Puffer pH 9,0). Die Aktivität des Enzyms ohne und mit Zusatz von α -KG wurde jeweils für den entsprechenden Ansatz bestimmt und die ermittelte Aktivität ohne Zusatz gleich 100 % gesetzt. Für die Untersuchung wurde Zellrohextrakt (sterilfiltriert) eingesetzt.

Eintrag	pH-Wert	L-Glu (mM)	Zusatz 50 mM α -KG +	Relative Aktivität (%)	Inhibierung (%)
1	8,0	50	-	23	77,0
2	9,0	50	-	415	-
3	9,0	100	-	70,8	29,2
4	9,0	50	15 Vol.-% Glycerol	72,9	27,1

1.1.6 Untersuchung des Einflusses von α -KG auf die GluDH aus *B. subtilis*, *C. difficile* und *F. nucleatum* in Abhängigkeit vom pH-Wert

Um zu untersuchen, ob analog zur Inhibierungsuntersuchung der rekombinanten *K. lactis* GluDH eine pH-Abhängigkeit der Inhibierung durch α -KG auch bei den anderen GluDHs auftritt, wurde der Einfluss von α -KG auf die Aktivität der rekombinanten GluDHs *B. subtilis*, *C. difficile* und *F. nucleatum* in Abhängigkeit vom pH-Wert bestimmt. Die Untersuchungen zeigten, dass die Inhibierung der verschiedenen GluDHs in der oxidativen Desaminierung von L-Glu tatsächlich stark vom pH-Wert abhängig ist. Der Trend, dass die Inhibierung mit zunehmendem pH-Wert signifikant abnimmt, war bei allen untersuchten Enzymen zu beobachten, wenn auch in unterschiedlicher Intensität.

So wird die rekombinante *B. subtilis* GluDH aus in Anwesenheit von 50 mM α -KG und einem pH-Wert von 8,0 (100 mM Kpi Puffer) zu 81,7 % inhibiert, bei einem pH-Wert von 8,5 beträgt die Inhibierung 53,8 % und bei einem pH von 9,0 25,9 %, die Ergebnisse sind in der Abbildung 27 dargestellt.

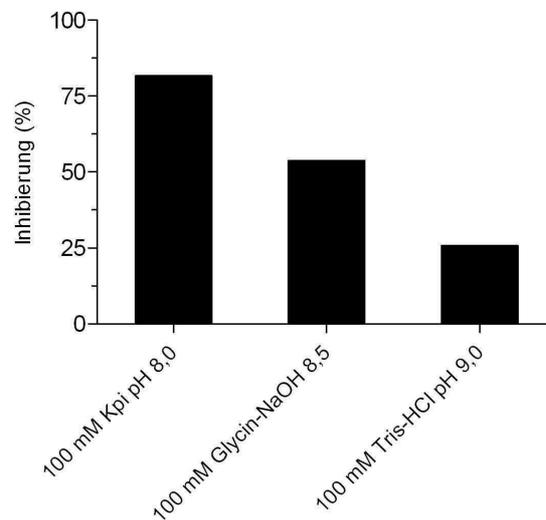


Abbildung 27: Einfluss von α -KG auf die rekombinante *B. subtilis* GluDH in Abhängigkeit vom pH-Wert (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 2,5 mM NAD^+ , 30°C, 100 mM Puffer). Die Aktivität des Enzyms ohne und mit Zusatz von α -KG wurde jeweils für den entsprechenden pH-Wert bestimmt und die ermittelte Aktivität ohne Zusatz gleich 100 % gesetzt. Für die Untersuchung wurde sterilfiltrierter Rohextrakt eingesetzt.

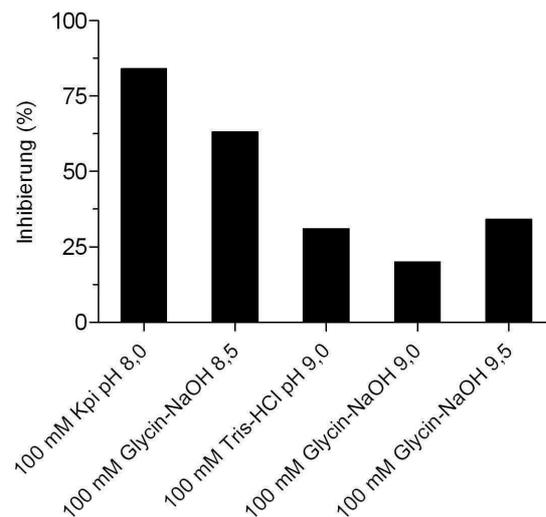


Abbildung 28: Einfluss von α -KG auf die rekombinante *C. difficile* GluDH in Abhängigkeit vom pH-Wert (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 2,5 mM NAD^+ , 30°C, 100 mM Puffer). Die Aktivität des Enzyms ohne und mit Zusatz von α -KG wurde jeweils für den entsprechenden pH-Wert bestimmt und die ermittelte Aktivität ohne Zusatz gleich 100 % gesetzt. Für die Untersuchung wurde gereinigtes Enzym eingesetzt.

Die rekombinante *C. difficile* GluDH wird in Anwesenheit von 50 mM α -KG und einem pH-Wert von 8,0 (100 mM Kpi Puffer) zu 84,3 % inhibiert, bei einem pH-Wert von 8,5 beträgt die Inhibierung 63,1 %, bei einem pH von 9,0 schließlich 20,2 % (Abbildung 28).

Die Inhibierung der *F. nucleatum* GluDH in Anwesenheit von 50 mM α -KG und einem pH-Wert von 8,0 (100 mM Kpi Puffer) war mit 96,1 % deutlich ausgeprägter, als bei den anderen untersuchten Enzymen. Der abnehmende Trend der Inhibierung mit zunehmendem pH-Wert war hier jedoch ebenfalls nachweisbar, bei einem pH-Wert von 8,5 beträgt die Inhibierung 75,3 %, bei einem pH von 9,5 nur 39,2 %, die Ergebnisse sind in der Abbildung 29 dargestellt.

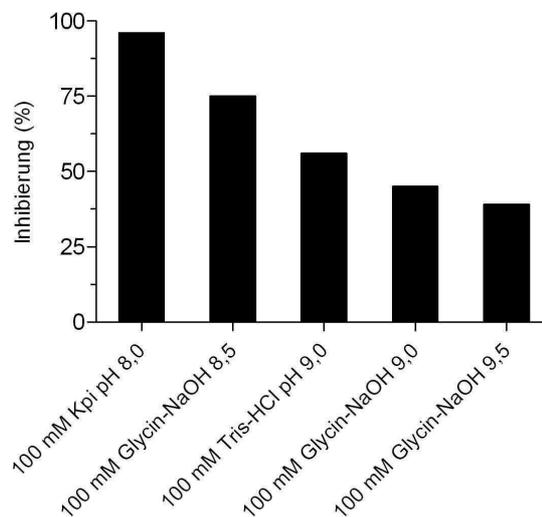


Abbildung 29: Einfluss von α -KG auf die rekombinante *F. nucleatum* GluDH in Abhängigkeit vom pH-Wert (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 2,5 mM NAD^+ , 30°C, 100 mM Puffer). Die Aktivität des Enzyms ohne und mit Zusatz von α -KG wurde jeweils für den entsprechenden pH-Wert bestimmt und die ermittelte Aktivität ohne Zusatz gleich 100 % gesetzt. Für die Untersuchung wurde gereinigtes Enzym eingesetzt.

Die Untersuchung zur Inhibierung der GluDHs in der oxidativen Desaminierung von L-Glu unter Zusatz beider Reaktionsprodukte, α -KG und Ammonium bei einem eher basischen pH-Wert von 9,0, zeigte eine vollständige Inhibierung der verschiedenen untersuchten rekombinanten GluDHs auf, in Gegenwart von 50 mM α -KG sowie Ammonium wurden alle Enzyme vollständig inhibiert (Tabelle 16).

Tabelle 16: Untersuchung des Einflusses von α -KG und Ammonium auf die rekombinanten GluDHs bei einem basischen pH-Wert von 9,0 (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 2,5 mM NAD⁺, 30°C, 100 mM Tris-HCl Puffer pH 9,0). Die Aktivität der Enzyme ohne und mit Zusatz von α -KG und Ammonium wurde jeweils bestimmt und die ermittelte Aktivität ohne Zusatz gleich 100 % gesetzt.

Eintrag	GluDH Herkunft	α -KG (mM)	Ammonium (mM)	Relative Aktivität (%)	Inhibierung (%)
1	<i>B. subtilis</i>	50	50	0	100
2	<i>C. difficile</i>	50	50	0	100
3	<i>F. nucleatum</i>	50	50	0	100
4	<i>K. lactis</i>	50	50	0	100

1.1.6.1 Untersuchung der Produktinhibierung einer alternativen L-Aminosäure-Dehydrogenase in Abhängigkeit vom pH-Wert

Da in der Literatur faktisch keine Informationen bezüglich des Inhibierungsverhaltens von bakteriellen L-Aminosäure-Dehydrogenasen durch die entsprechenden Ketosäuren vorliegen, erschien es ebenfalls interessant zu sein, das pH-abhängige Verhalten mit einer alternativen bakteriellen L-Aminosäure-Dehydrogenase genauer zu untersuchen. Die L-Leucin-Dehydrogenase (LeuDH) aus *B. cereus* stand aufgrund der mit diesem Enzym durchgeführten Experimenten zur Verfügung und bot sich somit für die Untersuchung hinsichtlich einer möglichen Ketosäure-bedingten Produktinhibierung an.

Die Untersuchung zur möglichen Produktinhibierung der rekombinanten *B. cereus* LeuDH durch α -Ketoisocaproat zeigte, dass die Inhibierung analog zu den untersuchten GluDHs stark pH-Wert abhängig ist. Aus der nachfolgenden Abbildung 30 wird ersichtlich, dass die Inhibierung mit zunehmendem pH-Wert deutlich abnimmt. So wird das Enzym in Anwesenheit von 50 mM α -Ketoisocaproat und einem pH-Wert von 8,0 zu 97,9 % inhibiert, bei einem pH-Wert von 9,0 beträgt die Inhibierung 83,7 %, bei pH 9,5 noch 74,8 % und bei einem pH von 10,5 schließlich 40,8 %.

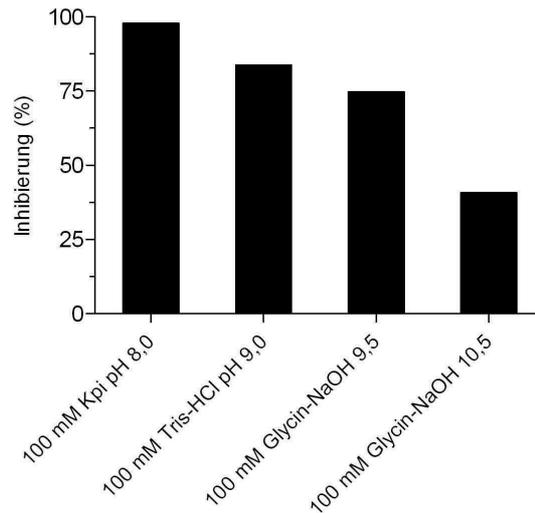


Abbildung 30: Untersuchung des Einflusses von α -Ketoisocaproat auf die rekombinante *B. cereus* LeuDH in Abhängigkeit vom pH-Wert. (Aktivitätsassay: 10 mM L-Leu, 50 mM α -Ketoisocaproat, 100 mM Puffer, 2,5 mM NAD^+ , 23°C). Die Aktivität des Enzyms ohne und mit Zusatz von α -Ketoisocaproat wurde jeweils für den entsprechenden pH-Wert bestimmt und die ermittelte Aktivität ohne Zusatz gleich 100 % gesetzt. Für die Untersuchung wurde gereinigtes Enzym eingesetzt.

1.1.7 Bereitstellung eines enzymatischen Systems zur NAD^+ -Regenerierung: Klonierung und heterologe Expression der NOX aus *L. brevis*

Das Reaktionsschema der GluDH zeigt, dass ein GluDH-katalysiertes Verfahren zur Biotransformation von L-Glu unbedingt auch die Kopplung mit einem NAD^+ -regenerierenden Schritt beinhaltet. Für die Regenerierung der oxidierten Coenzyme gibt es bislang kein etabliertes Standard-Verfahren. Wie in der Einleitung dargelegt, weist eine wasserbildende NOX eine Reihe von Vorteilen auf, insbesondere wird außer O_2 kein weiteres Regenerierungssubstrat benötigt bzw. in die Reaktionslösung eingetragen und es entsteht als Produkt dieser Regenerierungsreaktion lediglich Wasser, so dass aus dieser gekoppelten Reaktion keine weitere Aufarbeitungsproblematik hinsichtlich der Produktisolierung entsteht. Im Arbeitskreis stand eine NOX aus *L. brevis* zur Verfügung, die für die Kopplung mit der GluDH untersucht und eingesetzt werden sollte. Dazu wurde geprüft, ob es möglich ist, aktive NOX mit einem Hexahistidin-Tag zu exprimieren, dies würde die Gewinnung von reinem Enzym zur NAD^+ -Regenerierung durch eine einstufige Reinigung mittels Metallaffinitätschromatographie unter Verwendung von Ni-NTA beträchtlich vereinfachen.

1.1.7.1 Klonierung des *nox*-Genes aus *L. brevis*

Das Gen der NOX aus *L. brevis* sollte in den Vektor pET28a kloniert werden. Dieser Vektor enthält den T7-Promotor und T7-Terminator, eine Kanamycin-Resistenz, einen Replikationsursprung (*ori*) sowie eine 'multiple cloning site'. Auf Grundlage der *nox* Sequenz wurde das Primerpaar NOXLb*NdeI* und NOXLb*XhoI* konstruiert. Über die Auswahl der *NdeI* und *XhoI* Restriktionsschnittstellen sollte die NOX N-terminal mit einem His-Tag fusioniert werden. Mittels PCR konnte das *nox* Gen amplifiziert und gleichzeitig die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* an das 5'- bzw. 3'-Ende des Gens eingefügt werden. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines präparativen Agarosegels und Gel-Extraktion gereinigt. Anschließend erfolgte die Restriktion mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI*. Die geschnittenen und gereinigten PCR-Fragmente wurden durch Ligation in die MCS des Vektors pet28a eingefügt (pHISNOX). Ein Teil der Ligation wurde zur Transformation in kompetente *E. coli* DH5 α Zellen verwendet. Nach Selektion auf LB-Platten (Kanamycin 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) und Kultivierung wurde die Vektor-DNA aus mehreren Transformanten isoliert und mittels Restriktionsanalyse überprüft. Die weitere Überprüfung eines positiven Transformanten geschah durch Sequenzierung. Anschließend wurde der Vektor pHISNOX zur rekombinanten Produktion der NOX in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

1.1.7.2 Heterologe Expression der NOX aus *L. brevis* in *E. coli*

Eine Einzelkolonie von mit pHISNOX transformierten *E. coli* BL21(DE3) wurde in 20 ml LB-Medium (Kanamycin 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) überimpft. Die Kultivierung erfolgte für 16 bis 24 h bei 120 rpm und 37°C. Mit dieser Vorkultur wurde die Hauptkultur (Autoinduktionsmedium, Kanamycin 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) auf eine OD₆₀₀ von 0,05 eingestellt. Die Kultivierung erfolgte im Schüttelkolben bei 120 rpm und 30°C für 16 h. Die Zellmasse wurde durch Zentrifugation (30 min, 5000 rpm bei 4°C, Hettich Zentrifuge) von dem Medium abgetrennt. Entweder wurden die Zellen direkt genutzt oder bis zur weiteren Verwendung als Pellet bei -18°C gelagert.

1.1.7.3 Reinigung der rekombinanten der NOX

Zur Reinigung der rekombinanten *L. brevis* NOX aus *E. coli* BL21(DE3)/pHISNOX mittels Metallaffinitätschromatographie erfolgte wie im Material und Methoden Teil beschrieben. Da aus früheren Arbeiten bekannt war [Kuzu, 2005], dass das zellinterne Level an FAD von *E. coli* BL21(DE3) bei einer starken Überexpression der *L. brevis* NOX nicht ausreicht, um das Enzym vollständig mit Cofaktor abzusättigen, wurde dem Rohextrakt externes FAD in einer Konzentration von 150 und 200 μM zugesetzt.

Anschließend wurde der Rohextrakt für 30 min auf Eis inkubiert. Der Vergleich der spezifischen Aktivität der NOX im Rohextrakt vor und nach der Inkubation mit FAD zeigte eine deutliche Steigerung durch die Inkubation, so wurde die Wildtyp-NOX durch die Zugabe von 150 μM FAD von 79,3 U mg^{-1} um das 1,6-fache auf 127,9 U mg^{-1} aktiviert. Eine weitere Aktivierung wurde auch bei erhöhter FAD Konzentration nicht beobachtet, das Enzym konnte demzufolge durch die Zugabe von 150 μM FAD vollständig mit dem Cofaktor abgesättigt werden. Die Aktivierung durch externes FAD zeigt deutlich, dass die intrazelluläre Konzentration an FAD nicht ausreicht um die NOX vollständig mit dem Cofaktor abzusättigen. Offensichtlich wird inaktives Apo-Enzym gebildet, welches sich *in vitro* durch Inkubation mit FAD jedoch in das Holo-Enzym überführen und damit aktivieren lässt. Um weiterhin sicherzustellen, dass die NOX im Verlauf der Aufreinigung nicht durch ein "Auswaschen" des Cofaktors FAD inaktiviert wird, wurde dem aufgereinigten Enzym ebenfalls FAD in einer Konzentration von 150 μM zugesetzt. Nach 30 min Inkubation der Enzymlösung auf Eis konnte keine Aktivierung der gereinigten NOX festgestellt werden, was dafür spricht, dass kein FAD im Verlauf der Reinigung aus dem Enzym ausgewaschen wird.

Die rekombinante NOX ließ sich in nur einem Chromatographieschritt unter Verwendung von Ni-NTA bis zur Homogenität aufreinigen. Aus 5,5 ml geklärtem Rohextrakt (1,8 g *E. coli* BL21(DE3)/pHISNOX) mit einer Volumenaktivität von 1758 U ml^{-1} (nach der Zugabe von FAD) und einem Proteingehalt von 13,8 mg ml^{-1} konnten 8076 U NOX mit einer spezifischen Aktivität von 285,6 U mg^{-1} gewonnen werden können. Unter Berücksichtigung der Enzym-Aktivierung durch die Zugabe von externen FAD entspricht dies einer Ausbeute von 85,1 %, bezogen auf die Ausgangsaktivität im Rohextrakt. Die Ergebnisse der Reinigung sind in Tabelle 17 zusammengefasst und dargestellt.

Tabelle 17: Reinigung der rekombinanten *L. brevis* NOX mittels Metallaffinitätschromatographie (Ni-NTA) aus *E. coli* BL21(DE3)/pHISNOX (Aktivitätsassay: 0,2 mM NADH, 50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C). Die Ausbeute und der Reinigungsfaktor wurden unter Berücksichtigung der Aktivierung durch FAD auf die Ausgangsaktivität des Rohextraktes bezogen.

Reinigungsschritt	Spez. Aktivität (U mg^{-1})	Gesamt-Aktivität (U)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor (-fach)
Rohextrakt	127,9	9673	100,0	1,0
Ni-NTA	285,6	8076	85,1	2,2

Eine SDS-PAGE der Fraktionen entsprechend Tabelle 17 wurde zur Reinheitskontrolle und zur Dokumentation der Reinigung durchgeführt. Das SDS-Gel zeigt die homogene NOX mit Untereinheiten von ca. 49,8 kDa (Abbildung 31), dies entspricht der Molmasse, wie sie aufgrund der Aminosäuresequenz berechnet wurde (49765,1Da, mit Hexahistidin-Tag). Die NOX konnte nahezu bis zur vollständigen Homogenität aufgereinigt werden (>99 %), lediglich eine sehr geringere Verunreinigung durch Fremdprotein kann durch das SDS-Gel nachgewiesen werden.

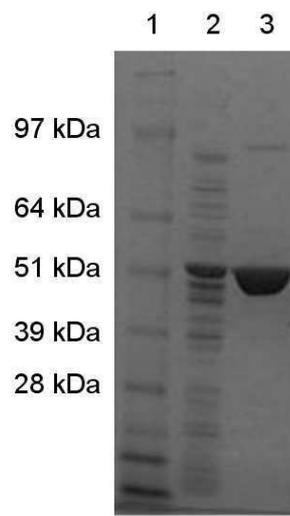


Abbildung 31: SDS-Gel: Reinigung der rekombinanten *L. brevis* NOX aus *E. coli* BL21(DE3)/pHISNOX, Spur 1: Protein Standard SeeBlue2, Spur 2: Rohextrakt *E. coli* BL21(DE3)/pHISNOX, Spur 3: rekombinante *L. brevis* NOX nach Metallaffinitätschromatographie (Ni-NTA) und Ultrafiltration.

1.1.7.4 Biochemische Charakterisierung der NOX aus *L. brevis*

1.1.7.4.1 Bestimmung des pH-Optimums

Für die Bestimmung des pH-Optimums der *L. brevis* NOX wurde der Standardaktivitätsassay mit einer NADH Konzentration von 0,2 mM genutzt, der pH Wert wurde hierbei im Bereich von pH 5,0 bis pH 9,0 unter Verwendung der aufgeführten Puffern variiert. Aus der Abbildung 32 ergibt sich ein pH Optimum von pH 6,0 für die Oxidation von NADH, was dem in der Literatur angeführten Wert entspricht [Hummel und Riebel, 2003]. Die *L. brevis* NOX ist aktiv über einen breiten pH-Bereich, die Aktivitäten bei pH 5,0 und pH 9,0 erreichen 74 % und 24 % der Aktivität bei pH 6,0.

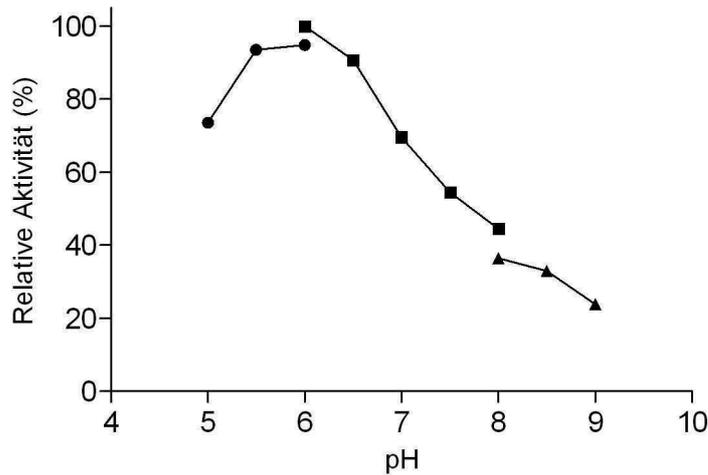


Abbildung 32. Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der *L. brevis* NOX. Die Enzymaktivität wurde in folgenden Puffern bestimmt: (—●—) 50 mM Na-Acetat Puffer, pH 5,0-6,0; (—■—) 50 mM Kpi Puffer, pH 6,0-8,0; (—▲—) 50 mM Tris-HCl, pH 8,0-9,0 (Standardaktivitätsassay, 30°C).

1.1.7.4.2 pH-Stabilität der NOX aus *L. brevis*

Um die Stabilität der NOX aus *L. brevis* bei unterschiedlichen pH-Werten zu untersuchen, wurde das Enzyme in verschiedenen 50 mM Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten inkubiert (bei 30°C und 120 rpm) und nach bestimmten Zeitabständen mittels Standardaktivitätsassay auf die verbliebende Aktivität hin untersucht.

Im Verlauf der Untersuchung konnte eine deutliche Inaktivierung der NOX festgestellt werden, die stark vom pH-Wert abhängig ist. Insbesondere im eher basischen Bereich mit pH-Werten von > 9,0 stellte sich die NOX als relativ instabil heraus. So wurde bei einem pH-Wert von 9,5 eine nahezu vollständige Inaktivierung bereits innerhalb eines Zeitraumes von 4 h beobachtet. In einem eher neutralen pH-Bereich mit Werten von 6,0 bis 8,0 weist die NOX eine moderate Stabilität mit einer Halbwertszeit von ca. 20 h auf (Abb.33).

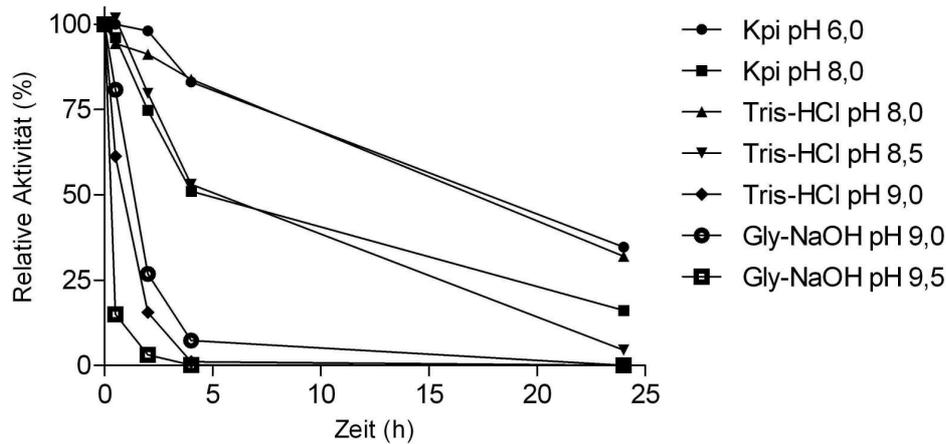


Abbildung 33: Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität der *L. brevis* NOX (50 mM Puffer, Inkubation bei 30°C und 120 rpm).

1.1.7.4.3 Untersuchung des Einflusses der Reaktions-Substrate und Produkte

Um einen negativen Einfluss von Substraten und Produkten der GluDH-katalysierten Reaktion auf die NOX auszuschließen, wurde der Einfluss auf die Aktivität der *L. brevis* NOX untersucht. Dazu wurden L-Glu, α -KG sowie Ammonium dem photometrischen Aktivitätsassay in Konzentrationen von 10 mM bis 100 mM (L-Glu) bzw. 10 bis 50 mM (α -KG und Ammonium) zugesetzt und die Enzymaktivität bestimmt (0,2 mM NADH, 200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 30°C). Der photometrische Aktivitätsassay war nur bis zu einer maximalen Konzentration an α -KG von 50 mM möglich, da oberhalb dieser Konzentration die Eigenabsorption der Reaktionslösung zu hoch lag. Als Kontrolle wurde der Standardaktivitätstest ohne Zusatz durchgeführt und die ermittelte Aktivität gleich 100 % gesetzt.

Aus den ermittelten Messwerten wurde ersichtlich, dass der Zusatz von L-Glu, α -KG sowie Ammonium keinen Einfluss auf die Aktivität der NOX ausübt. Um weiterhin eine mögliche Inaktivierung durch das Substrat und die Produkte der eigentlichen Synthesereaktion zu untersuchen, wurde die NOX in Gegenwart von L-Glu, α -KG sowie Ammonium (0, 50 und 100 mM in 200 mM Kpi Puffer pH 8,0) inkubiert (120 rpm, 30°C) und nach unterschiedlichen Zeitpunkten die Restaktivität der NOX vermessen. Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zur Kontrolle ohne Zusatz kein Einfluss durch L-Glu, α -KG sowie Ammonium zu beobachten war.

Da nur unzureichende Literaturdaten für die NOX aus *L. brevis* bezüglich einer möglichen Produktinhibierung vorlagen [Findrik et al, 2007], wurde die rekombinante NOX ebenfalls auf eine Produktinhibierung durch NAD^+ hin untersucht. Dazu wurde der Cofaktor dem photometrischen Aktivitätsassay zugesetzt und die Enzymaktivität bestimmt (Abb. 34).

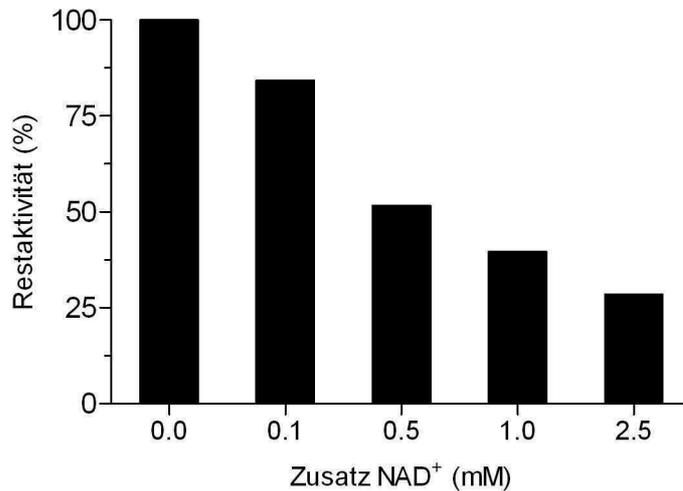


Abbildung 34: Untersuchung des Einflusses von NAD^+ auf die rekombinante *L. brevis* NOX (Aktivitätsassay: 0,2 mM NADH, 30°C, 200 mM Kpi Puffer pH 8,0). Die Aktivität des Enzyms ohne und mit Zusatz von NAD^+ wurde bestimmt und die ermittelte Aktivität ohne Zusatz gleich 100 % gesetzt. Für die Untersuchung wurde gereinigtes Enzym eingesetzt.

Es zeigte sich ein deutlicher Einfluss von NAD^+ auf die Aktivität der *L. brevis* NOX, so wird das Enzym bei einer Konzentration von 0,5 mM zu 48,4 % inhibiert, bei einer Konzentration von 2,5 mM NAD beträgt die Inhibierung 71,5 %. Eine erhöhte Konzentration an NAD^+ besitzen also einen deutlichen negativen Einfluss auf die Aktivität der NOX aus *L. brevis*.

Dieser vermeintliche Nachteil der NOX für die gekoppelte Biotransformation mit der GluDH kann jedoch verfahrenstechnisch recht einfach durch die Erhöhung der eingesetzten Enzymmenge ausgeglichen werden. Praktisch geschieht dies durch die Aktivitätsbestimmung für die Biotransformation in Gegenwart der jeweils eingesetzten Konzentration an NAD^+ . Aufgrund der hohen Ausgangsaktivität der *L. brevis* NOX war von dieser Seite aus eine Verwendung ohne weiteres möglich.

1.1.8 Darstellung von α -KG mittels GluDHs

1.1.8.1 Vorversuche

1.1.8.1.1 Prozessstabilität der GluDHs

Um eine mögliche Inaktivierung der GluDHs während der Biotransformation auszuschließen, wurden die Enzyme auf ihre Stabilität unter Umsatzbedingungen charakterisiert. Hierzu wurden die gereinigten rekombinanten *C. difficile*, *F. nucleatum*, *B. subtilis* sowie *K. lactis* GluDHs für 24 h unter den Bedingungen der Biotransformation inkubiert (200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 30°C sowie 120 rpm) und in regelmäßigen Abständen auf ihre Aktivität hin untersucht. Im untersuchten Zeitraum konnte für die meisten Enzyme keine Inaktivierung festgestellt werden, lediglich die GluDH aus *B. subtilis* weist eine leichte Inaktivierung von 36,4 % nach 24 h auf. Somit können die eingesetzten GluDHs als sehr stabil bzw. stabil unter den Umsatzbedingungen charakterisiert werden.

1.1.8.1.2 Ermittlung eines gemeinsamen pH-Wertes für die Biotransformation

Ziel war das Auffinden eines gemeinsamen pH-Wertes, bei dem die NOX sowie die verschiedenen GluDHs, die im Folgenden für die Biotransformation eingesetzt werden sollten, eine ausreichend hohe Aktivität aufweisen. Die Untersuchungen zeigten deutlich, dass die GluDHs, mit Ausnahme der *B. subtilis* GluDH, ihr pH-Optimum in der oxidativen Desaminierung von L-Glu im eher basischen Bereich mit pH Werten von > 9,0 besitzen, die Aktivität steigt mit steigendem pH-Wert bis pH 10 weiter deutlich an. Die GluDH aus *B. subtilis* verhält sich diesbezüglich deutlich anders und zeigt ein pH-Optimum von 8,0. Da für die NOX eine eingeschränkte Aktivität und Stabilität im basischen pH-Bereich von > pH 9,0 ermittelt wurde, war es nötig, bei der Wahl des pH-Wertes für die Biotransformation einen Kompromiss einzugehen und einen pH-Bereich zu wählen, bei dem alle eingesetzten Enzyme ausreichend aktiv sind. Um die unterschiedlichen pH-Optima sowie den optimalen Überschneidungsbereich der Aktivitäten der Enzyme zu verdeutlichen, wurden die pH-abhängigen Aktivitäten der *L. brevis* NOX und der jeweiligen GluDH zusammen in einer Graphik aufgetragen (Abb. 35, 36 und 37), anhand derer der optimale pH-Bereich für die gekoppelte Biotransformation ausgewählt wurde. Für die Biotransformation wurde ein pH-Wert von 8,0 als optimal in Hinsicht auf die Aktivität der beiden Enzyme ermittelt, NOX und die unterschiedlichen GluDHs zeigen hier jeweils mind. 45 % ihrer maximalen Aktivität.

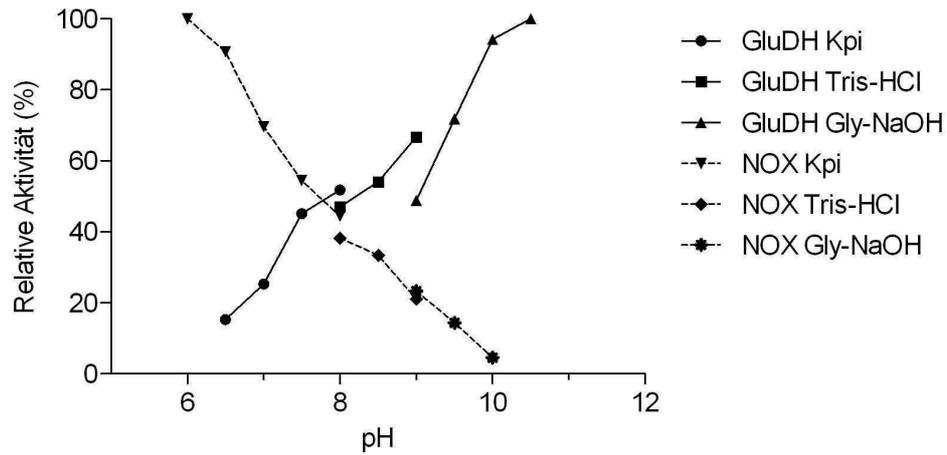


Abbildung 35. Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der *L. brevis* NOX und der GluDH aus *F. nucleatum*.

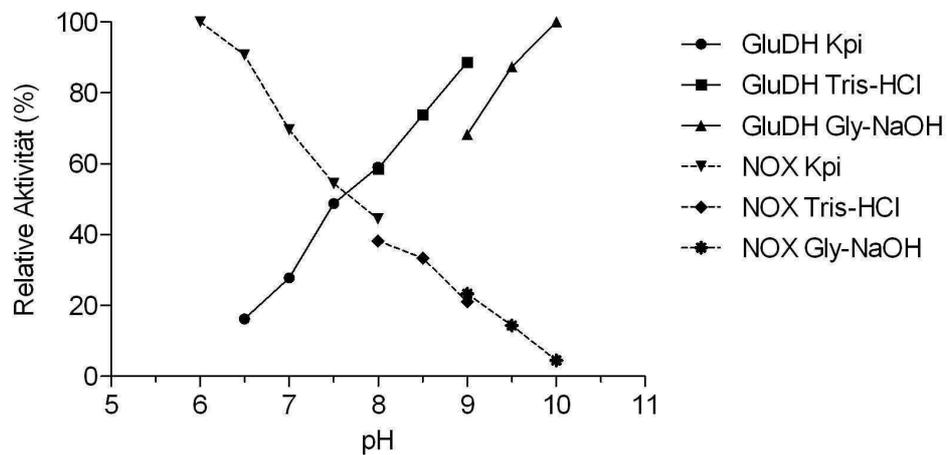


Abbildung 36 Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der *L. brevis* NOX und der GluDH aus *C. difficile*.

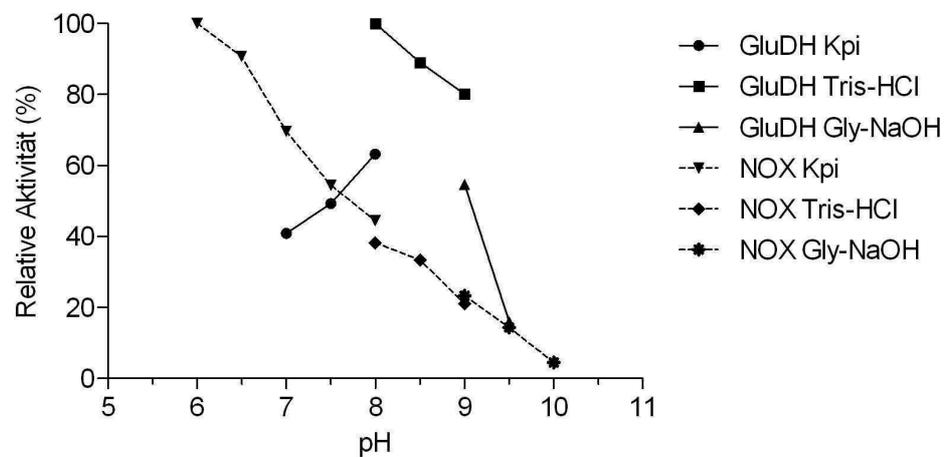
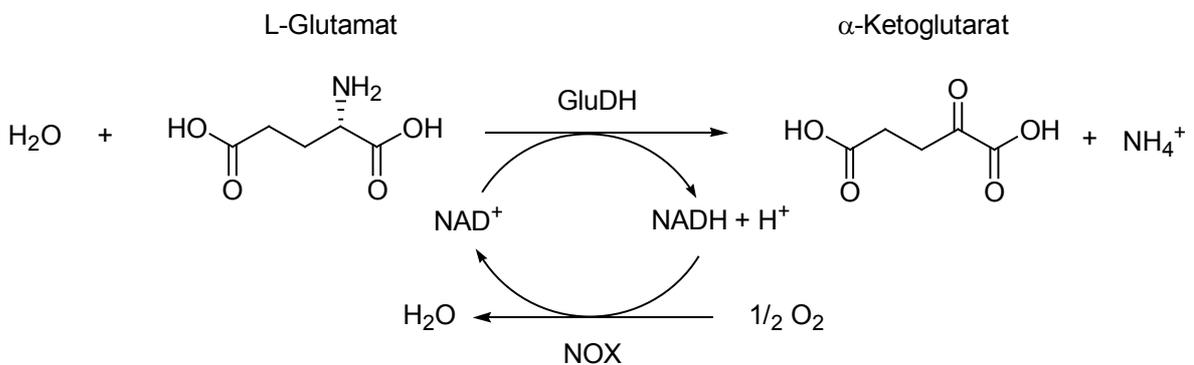


Abbildung 37. Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der *L. brevis* NOX und der GluDH aus *B. subtilis*.

1.1.8.2 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz von GluDHs unter *in situ*-Regenerierung des Cofaktors NAD^+ mittels einer NOX

L-Glu wird in diesem System entsprechend Schema 11 durch die NAD^+ abhängige oxidative Desaminierung mit Hilfe von GluDHs in α -KG umgewandelt. Der Einsatz von NAD^+ -abhängigen GluDHs erfordert ein effizientes Regenerierungssystem für NAD^+ , das in Form der NOX aus *L. brevis* verfügbar war. Durch die sauerstoffabhängige Oxidation von NADH durch die NOX kann die Regenerierung des Cofaktors NAD^+ bewerkstelligt werden. Da die Reaktion der NOX irreversibel verläuft, kann die reduktive Rückreaktion von α -KG zu L-Glu weitgehend ausgeschlossen werden.



Schema 11: Biotransformation von L-Glu zu α -KG mittels GluDH und der NOX aus *L. brevis* zur *in situ*-Regenerierung von NAD^+ .

Die ersten Biotransformationen wurden bei einer Substratkonzentration von 15 mM L-Glu unter Einsatz der GluDH aus *C. difficile* in Kombination mit der NOX aus *L. brevis* zur Regenerierung von NAD^+ durchgeführt. Hierbei wurden unterschiedliche Verhältnisse an GluDH und NOX verwendet, um zu untersuchen, inwiefern sich unterschiedliche Katalysatorkonzentrationen auf die Biotransformation auswirken.

Die Biotransformation wurde als batch-Umsetzung (2 ml, 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß) unter Schütteln bei 120 rpm durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wurde das Reaktionsgefäß geöffnet, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Proben wurden nach 4 h entnommen, durch Ultrafiltration (10 kDa) aufgearbeitet und mittels $^1\text{H-NMR}$ untersucht. Die Ergebnisse der Biotransformationen sind in der Tabelle 26 wiedergegeben.

Tabelle 26: Biotransformation von L-Glu mit der GluDH aus *C. difficile* und der NOX aus *L. brevis* zur *in situ*-Regenerierung von NAD⁺ (15 mM L-Glu, 100 mM Kpi Puffer pH 8,0, 2 mM NAD⁺, 120 rpm, 30°C). Mittels ¹H-NMR wurden die Konzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α -KG bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und α -KG.

Eintrag	GluDH (U ml ⁻¹)	NOX (U ml ⁻¹)	NAD ⁺ (mM)	pH	L-Glu (mM)	Zeit (h)	Umsatz (%)
1	2	10	2	8,0	15	4	89,1
2	10	10	2	8,0	15	4	86,4
3	10	5	2	8,0	15	4	72,9

Wie aus der Tabelle 26 ersichtlich wird, kann nach 4 h ein maximaler Umsatz von 89,1 % unter Verwendung von 2 U *C. difficile* GluDH und 10 U NOX nachgewiesen werden.

Mit dem ermittelten optimalen Verhältnis an GluDH zu NOX wurden analoge Biotransformationen mit den GluDHs aus *F. nucleatum* sowie *B. subtilis* durchgeführt. Die Ergebnisse der Biotransformationen sind in der Tabelle 27 wiedergegeben.

Tabelle 27: Biotransformation von L-Glu mit der GluDH aus *F. nucleatum* sowie *B. subtilis* und der NOX aus *L. brevis* zur *in situ*-Regenerierung von NAD⁺ (15 mM L-Glu, 100 mM Kpi Puffer pH 8,0, 2 mM NAD⁺, 120 rpm, 30°C). Mittels ¹H-NMR wurden die Konzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α -KG bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und α -KG.

Eintrag	GluDH (U ml ⁻¹)	GluDH	NOX (U ml ⁻¹)	pH	L-Glu (mM)	Zeit (h)	Umsatz (%)
1	2	<i>F. nucleatum</i>	10	8,0	15	4	86,2
2	2	<i>B. subtilis</i>	10	8,0	15	4	70,1

Mit der GluDH aus *F. nucleatum* wurde mit 86,2 % ein annähernd gleicher Umsatz erreicht wie mit der *C. difficile* GluDH. Unter Einsatz des Enzyms aus *B. subtilis* konnte ein niedrigerer Umsatz von 70,1 % erreicht werden.

In den nächsten Versuchen wurde zunächst die Substratkonzentration an L-Glu auf 25 mM erhöht. Es wurden die GluDHs aus *F. nucleatum*, *C. difficile* sowie *B. subtilis* in der Biotransformation eingesetzt. Die Ergebnisse der Biotransformationen sind in der Tabelle 28 wiedergegeben. Für die GluDH aus *C. difficile* ist in der Abbildung 38 zusätzlich der zeitliche Verlauf der Biotransformation dargestellt.

Tabelle 28: Biotransformation von L-Glu mittels verschiedener GluDHs und der NOX aus *L. brevis* zur *in situ*-Regenerierung von NAD^+ (25 mM L-Glu, 200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 2 mM NAD^+ , 120 rpm, 30°C). Mittels $^1\text{H-NMR}$ wurden die Konzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α -KG bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und α -KG.

Eintrag	GluDH (U ml ⁻¹)	GluDH	NOX (U ml ⁻¹)	pH	L-Glu (mM)	Zeit (h)	Umsatz (%)
1	2	<i>C. difficile</i>	10	8,0	25	4	82,6
						24	89,1
2	2	<i>F. nucleatum</i>	10	8,0	25	4	89,4
						24	90,5
3	2	<i>B. subtilis</i>	10	8,0	25	4	64,2
						24	70,9

Wie aus der Abbildung 38 und der Tabelle 28 ersichtlich wird, sinkt nach 4 h die Geschwindigkeit, mit der die Biotransformationsreaktion stattfindet, deutlich ab. Die Umsätze steigen bis zu einer Reaktionszeit von 24 h zwar weiter an, die Steigerungen liegen jedoch lediglich im Bereich von 0,9 % bis 6,7 %. Unter Einsatz der GluDHs aus *C. difficile*, *F. nucleatum* sowie *B. subtilis* wurden in der Biotransformation von 25 mM L-Glu durchaus hohe Umsatzraten von 90,5 %, 89,1 % und 70,9 % nach 24 h erzielt. Eine verlängerte Reaktionszeit von 48 h erbrachte keine weitere Umsatzsteigerung.

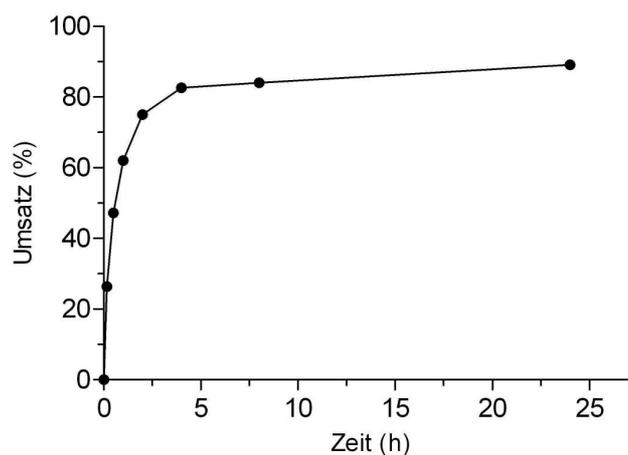


Abbildung 38: Zeitlicher Verlauf der Biotransformation von 25 mM L-Glu mittels GluDH *C. difficile* und der NOX aus *L. brevis* zur *in situ*-Regenerierung von NAD^+ (200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 2 U GluDH, 10 U NOX, 2 mM NAD^+ , 120 rpm, 30°C). Mittels $^1\text{H-NMR}$ wurden die Konzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α -KG bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und α -KG.

In den folgenden Biotransformationen unter weiterer Erhöhung der Substratkonzentration an L-Glu auf 50 mM wurden die beiden GluDHs aus *F. nucleatum* sowie *C. difficile* eingesetzt, das Enzym aus *B. subtilis* wurde aufgrund der vorangegangenen niedrigeren Umsatzraten hier nicht verwendet. Die Biotransformationen wurden als batch-Umsetzung (5 ml, 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß) unter Schütteln bei 120 rpm durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wurde das Reaktionsgefäß geöffnet, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Proben wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen, durch Ultrafiltration (10 kDa) aufgearbeitet und mittels $^1\text{H-NMR}$ untersucht. Die Ergebnisse der Biotransformationen sind in der Tabelle 29 wiedergegeben.

Tabelle 29: Biotransformation von L-Glu mittels GluDHs aus *C. difficile* sowie *F. nucleatum* und der NOX aus *L. brevis* zur *in situ*-Regenerierung von NAD^+ (200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 0,5 mM NAD^+ , 120 rpm, 30°C). Mittels $^1\text{H-NMR}$ wurden die Konzentrationen von L-Glu und $\alpha\text{-KG}$ bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt $\alpha\text{-KG}$ bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und $\alpha\text{-KG}$.

Eintrag	GluDH (U ml ⁻¹)	GluDH	NOX (U ml ⁻¹)	pH	L-Glu (mM)	Zeit (h)	Umsatz (%)
1	2	<i>C. difficile</i>	10	8,0	50	8	54,2
						24	60,1
2	2	<i>F. nucleatum</i>	10	8,0	50	8	51,3
						24	54,0

Bei der einleitenden Biotransformation von 50 mM L-Glu unter Verwendung der GluDHs aus *C. difficile* sowie *F. nucleatum* in Kombination mit der NOX aus *L. brevis* zur *in situ*-Regenerierung von NAD^+ wurden Umsätze von 54,2 % und 51,3 % nach 8 h erzielt. Nach einer Reaktionszeit von 24 h konnte nur eine leichte weitere Umsatzsteigerung auf 60,1 % (GluDH *C. difficile*) und 54,0 % (GluDH *F. nucleatum*) nachgewiesen werden. Eine verlängerte Reaktionszeit von 48 h erbrachte keine weitere Umsatzsteigerung.

Aufbauend auf den bisher erzielten Ergebnissen, sollte untersucht werden, inwiefern sich eine veränderte Cofaktorkonzentration auf die Biotransformation von 50 mM L-Glu unter Verwendung der GluDHs aus *C. difficile* auswirkt. Hierzu wurde die NAD^+ -Konzentration im Bereich von 0,2 mM bis 5 mM variiert. Die Ergebnisse der Biotransformationen sind in der Tabelle 30 wiedergegeben. Ein weiterer Ansatz enthielt eine erhöhte Menge an GluDH und NOX (Tabelle 30, Eintrag 5).

Tabelle 30: Biotransformation von L-Glu mittels GluDH aus *C. difficile* und der NOX aus *L. brevis* zur *in situ*-Regenerierung von NAD⁺ unter Variation der NAD⁺ Konzentration (200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 120 rpm, 30°C). Mittels ¹H-NMR wurden die Konzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α -KG bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und α -KG.

Eintrag	GluDH (U ml ⁻¹)	NOX (U ml ⁻¹)	NAD ⁺ (mM)	L-Glu (mM)	Zeit (h)	Umsatz (%)
1	2	10	0,2	50	24	53,1
2	2	10	1	50	24	68,5
3	2	10	2	50	24	71,7
4	2	10	5	50	24	73,5
5	5	25	5	50	24	70,9

Bei der Verwendung einer Cofaktorkonzentration von 0,2 mM und der GluDH aus *C. difficile* wurde ein Umsatz von 53,1 % nach 24 h erzielt. Unter Einsatz erhöhter Konzentrationen von 1 mM, 2 mM und 5 mM NAD⁺ wurden um ca. 20 % erhöhte Umsätze erreicht, wobei sie untereinander nur leicht abweichen. Der K_M für L-Glu ist in der Literatur mit 4,3 mM angegeben [Anderson et al., 1993], jedoch unterscheiden sich die erzielten Umsätze mit 1 mM bzw. 5 mM NAD⁺ nur geringfügig. Der Ansatz mit einer erhöhten Menge an GluDH und NOX (2,5-fach) weist im Vergleich zu den anderen Biotransformationen keine Steigerung des Umsatzes jedoch auch keine signifikante Abweichung auf.

In den nächsten Experimenten wurde untersucht, ob eine erhöhte Einsatzmenge an NOX oder deren Nachdosierung im Verlauf der Biotransformation, eine positive Auswirkung auf die Umsatzrate besitzt (5 ml, 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß, 120 rpm, 30°C).

Ein weiterer Ansatz wurde bei einer erhöhten Schüttelfrequenz von 800 rpm durchgeführt (1 ml, 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß, 30°C) (Tabelle 31, Eintrag 4), um den Sauerstoffeintrag in die Reaktionslösung zu erhöhen. In regelmäßigen Abständen wurde das Reaktionsgefäß geöffnet, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 31: Biotransformation von L-Glu mittels GluDH aus *C. difficile* und der NOX aus *L. brevis* zur *in situ*-Regenerierung von NAD⁺ (200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 120 rpm bzw. 800 rpm, 2 mM NAD⁺, 30°C). Mittels ¹H-NMR wurden die Konzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α -KG bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und α -KG.

Eintrag	GluDH (U ml ⁻¹)	NOX (U ml ⁻¹)		L-Glu (mM)	Zeit (h)	Umsatz (%)
1	2	10	-	50	24	71,4
2	2	20	-	50	24	70,5
3	2	10	Nachdosierung 10 U nach 8 h	50	24	72,8
					48	71,2
4	2	10	800 rpm	50	24	72,1

Durch die erhöhte Einsatzmenge an NOX oder deren Nachdosierung im Verlauf der Biotransformation konnten keine höheren Umsätze erreicht werden, die Werte weichen untereinander nur leicht voneinander ab. Die Erhöhung der Schüttelfrequenz und damit des Sauerstoffeintrages erbrachte ebenfalls keine Steigerung des Umsatzes.

Eine weitere Biotransformationen von 50 mM L-Glu unter den ermittelten optimalen Bedingungen der Biotransformation (Tabelle 31, Eintrag 1) wurde ebenfalls mit der GluDH aus *F. nucleatum* durchgeführt. Nach 24 h wurde ein Umsatz von 65,0 % erreicht.

In der Biotransformation von 50 mM L-Glu unter Einsatz der GluDHs aus *C. difficile* und *F. nucleatum* konnte nach 24 h ein maximaler Umsatz von 73,5 % bzw. 65,0 % erreicht werden, die Produktendkonzentrationen der Biotransformationen betragen 5,4 g l⁻¹ und 4,7 g l⁻¹, die Raum-Zeit-Ausbeuten betragen 0,2 g l⁻¹ h⁻¹.

1.1.8.3 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz der rekombinanten GluDHs aus dem Screening

Die ersten Biotransformationen von L-Glu unter Einsatz der im Screening identifizierten und rekombinant hergestellten GluDHs aus *B. pumilus* und *K. lactis* wurden bei einer Substratkonzentration von 25 mM bzw. 50 mM L-Glu in Kombination mit der NOX zur NAD⁺-Regenerierung durchgeführt. Die Biotransformation wurde als batch-Umsetzung (2 ml, 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß, 120 rpm) durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wurde das Reaktionsgefäß geöffnet, um einen Gasaustausch zu ermöglichen.

Proben wurden nach 24 h entnommen, durch Ultrafiltration (10 kDa) aufgearbeitet und mittels $^1\text{H-NMR}$ untersucht. Die Ergebnisse der Biotransformationen sind in der Tabelle 32 wiedergegeben. Bei der Verwendung der GluDH aus *B. pumilus* wurde nach 24 h ein Umsatz von 66,1 % nachgewiesen. Unter Einsatz der GluDH aus *K. lactis* wurde im Vergleich dazu ein deutlich höherer Umsatz erreicht, mittels $^1\text{H-NMR}$ wurde nach 24 h für 25 mM L-Glu ein Umsatz von 93,2 %, für 50 mM L-Glu ein Umsatz von 70,0 % nachgewiesen, im Vergleich mit den vorab getesteten Enzymen ist dies der höchste erreichte Umsatz für eine Substratkonzentration von 25 mM L-Glu.

Tabelle 32: Biotransformation von L-Glu mittels der im Screening identifizierten und rekombinant hergestellten GluDHs aus *B. pumilus* und *K. lactis* und der NOX aus *L. brevis* zur *in situ*-Regenerierung von NAD^+ (200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 2 mM NAD^+ , 120 rpm, 30°C). Mittels $^1\text{H-NMR}$ wurden die Konzentrationen von L-Glu und $\alpha\text{-KG}$ bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt $\alpha\text{-KG}$ bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und $\alpha\text{-KG}$.

Eintrag	GluDH (U ml ⁻¹)	GluDH	NOX (U ml ⁻¹)	pH	L-Glu (mM)	Zeit (h)	Umsatz (%)
1	2	<i>B. pumilus</i>	10	8,0	25	24	66,1
2	2	<i>K. lactis</i>	10	8,0	25	24	93,2
3	2	<i>K. lactis</i>	10	8,0	50	24	70,0

1.1.8.4 Darstellung von $\alpha\text{-KG}$ aus L-Glu durch den Einsatz von GluDHs unter Erhöhung der Substratkonzentration

Weitere Biotransformationen mit deutlich erhöhten L-Glu-Konzentrationen von 100 mM, 200 mM und 500 mM wurden durchgeführt, um die erreichbaren maximalen Umsätze bei hohen Substratkonzentrationen zu untersuchen. Hierbei wurden die rekombinant hergestellten und gereinigten GluDHs aus *F. nucleatum*, *C. difficile*, *B. subtilis* sowie *K. lactis* eingesetzt, wobei die 500 mM Biotransformation nur mit der *C. difficile* GluDH durchgeführt wurde.

Die Biotransformationen wurden als batch-Umsetzung (2 ml, 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß) unter Schütteln bei 120 rpm durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wurde das Reaktionsgefäß geöffnet, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Proben wurden nach 24 h entnommen, durch Ultrafiltration (10 kDa) aufgearbeitet und mittels $^1\text{H-NMR}$ untersucht. Die Ergebnisse der Biotransformationen sind in der Tabelle 33 wiedergegeben.

Tabelle 33: Biotransformation von L-Glu mittels verschiedener GluDHs und der NOX aus *L. brevis* zur *in situ*-Regenerierung von NAD⁺ (200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 2 mM NAD⁺, 120 rpm, 30°C). Mittels ¹H-NMR wurden die Konzentrationen von L-Glu und α-KG bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α-KG bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und α-KG. Die Raum-Zeit-Ausbeute bezieht sich auf die Gesamtdauer der Biotransformation.

Eintrag	GluDH	L-Glu (mM)	Zeit (h)	Umsatz (%)	Raum-Zeit-Ausbeute (g l ⁻¹ h ⁻¹)	α-KG (g l ⁻¹)
1	<i>C. difficile</i>	100	24	48,2	0,29	7,0
2	<i>C. difficile</i>	200	24	32,4	0,40	9,5
3	<i>C. difficile</i>	500	24	31,1	0,95	22,7
4	<i>F. nucleatum</i>	100	24	47,0	0,29	6,9
5	<i>F. nucleatum</i>	200	24	32,7	0,40	9,6
6	<i>B. subtilis</i>	100	24	45,3	0,28	6,6
7	<i>K. lactis</i>	100	24	47,5	0,29	6,9
8	<i>K. lactis</i>	200	24	34,0	0,41	9,9

Bei der Biotransformation einer erhöhten Substratkonzentrationen von 100 mM L-Glu unter Verwendung der verschiedenen GluDHs in Kombination mit der NOX zur Regenerierung von NAD⁺ wurden Umsätze zwischen 45,3 % und 48,2 % nach 24 h erzielt. In der Biotransformation von 200 mM L-Glu wurde eine niedrigere Umsatzrate zwischen 32,4 % und 34,0 % nachgewiesen. 500 mM L-Glu konnten unter Einsatz der *C. difficile* GluDH zu 31,1 % in das Zielprodukt α-KG transformiert werden. In keiner der durchgeführten Biotransformationen konnte die Bildung eines unerwünschten Nebenproduktes beobachtet werden.

1.1.8.5 Darstellung von α-KG aus L-Glu durch den Einsatz von GluDHs unter Erhöhung des pH-Wertes

Im Folgenden wurden Biotransformationen bei einem leicht erhöhten pH-Wert von 9,0 durchgeführt, da dieser Ansatz zwei Vorteile zu haben schien: Zum einen sind die GluDHs in Hinsicht auf die oxidative Desaminierung von L-Glu bei diesem pH-Wert deutlich aktiver, zum anderen hat sich die Produktinhibierung durch α-KG in dem eher basischen pH-Bereich von 9,0 als deutlich niedriger als bei einem pH-Wert von 8,0 erwiesen. Für diese Umsetzungen wurden die rekombinant hergestellten und gereinigten GluDHs aus *C. difficile* sowie *K. lactis* eingesetzt.

Da die biochemische Charakterisierung der NOX aus *L. brevis* einen pH-abhängigen Aktivitäts- sowie Stabilitäts-Verlust bei erhöhten pH-Werten aufzeigte, wurde die Biotransformation unter Nachdosierung der NOX durchgeführt, wodurch eine Limitierung aufgrund einer vorzeitigen Inaktivierung des Cofaktorregenerierungssystems ausgeschlossen werden sollte. Die Biotransformationen wurden als batch-Umsetzung (2 ml, 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß) unter Schütteln bei 120 rpm durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wurde das Reaktionsgefäß geöffnet, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 34 wiedergegeben.

Tabelle 34: Biotransformation von L-Glu mittels der GluDHs aus *C. difficile* sowie *K. lactis* und der NOX aus *L. brevis* zur *in situ*-Regenerierung von NAD⁺ (200 mM Gly-NaOH Puffer pH 9,0, 2 mM NAD⁺, 120 rpm, 30°C). Mittels ¹H-NMR wurden die Konzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α -KG bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und α -KG.

Eintrag	GluDH	GluDH (U ml ⁻¹)	NOX (U ml ⁻¹)	pH	L-Glu (mM)	Zeit (h)	Umsatz (%)
1	<i>C. difficile</i>	2	10/10 (6 h)	9,0	50	24	82,7
2	<i>C. difficile</i>	2	10/10 (6 h)	9,0	100	4/24	45,3/47,2
3	<i>C. difficile</i>	2	10/10 (6 h)	9,0	200	24	31,7
4	<i>K. lactis</i>	2	10/10 (6 h)	9,0	50	24	80,8

In der Biotransformation von 50 mM L-Glu bei einem eher basischen pH-Wert von 9,0 konnten unter Verwendung der GluDHs aus *C. difficile* sowie *K. lactis* nach 24 h Umsätze von 82,7 % und 80,8 % erzielt werden. 100 mM und 200 mM L-Glu konnten unter Einsatz der *C. difficile* GluDH zu 47,2 % bzw. 31,7 in das Zielprodukt α -KG umgewandelt werden. Im Vergleich zu den Biotransformationen von 50 mM L-Glu bei einem pH von 8,0, wurden unter Verwendung der GluDHs aus *C. difficile* sowie *K. lactis* bei einem eher basischen pH-Wert von 9,0 um 10 % erhöhte Umsätze von 82,7 % bzw. 80,8 % nach 24 h erzielt. Die Umsätze von 100 mM und 200 mM L-Glu unterscheiden sich nicht von denen bei pH 8,0.

1.1.8.6 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz von GluDHs unter Zusatz der Reaktionsprodukte α -KG und Ammonium

Aufbauend auf den bisher erzielten Ergebnissen aus der Inhibierungsuntersuchung und den vorangegangenen Biotransformationen sollte untersucht werden, inwiefern sich die externe Zugabe von Reaktionsprodukten und damit die Simulation einer bereits stattgefundenen Biotransformation, auf die erreichbaren Umsätze auswirkt.

Hierbei wurde insbesondere der Einfluss von α -KG untersucht. Für die Experimente wurde die rekombinant hergestellte und gereinigte GluDH aus *C. difficile* eingesetzt. Die Biotransformationen unter Zugabe von 0 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM α -KG sowie jeweils 50 mM α -KG und Ammonium wurden als batch-Umsetzungen unter Schütteln bei 120 rpm durchgeführt. Proben wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen, durch Ultrafiltration (10 kDa) aufgearbeitet und mittels $^1\text{H-NMR}$ untersucht. Die Ergebnisse der Biotransformation sind in der Tabelle 35 wiedergegeben.

Tabelle 35: Biotransformation von L-Glu mittels der GluDH aus *C. difficile* und der NOX aus *L. brevis* zur *in situ*-Regenerierung von NAD^+ unter Zusatz der Reaktionsprodukte α -KG und Ammonium (GluDH 2 U ml^{-1} , NOX 10 U ml^{-1} , 200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 2 mM NAD^+ , 120 rpm, 30°C). Mittels $^1\text{H-NMR}$ wurden die Konzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α -KG bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und α -KG abzüglich des Zusatzes an α -KG.

Eintrag	GluDH	α -KG (mM)	Ammonium (mM)	L-Glu (mM)	Zeit (h)	Umsatz (%)
1	<i>C. difficile</i>	-	-	50	4	56,8
					24	71,6
2	<i>C. difficile</i>	10	-	50	4	33,4
					24	47,1
3	<i>C. difficile</i>	50	-	50	4	25,5
					24	36,2
4	<i>C. difficile</i>	100	-	50	4	14,4
					24	21,0
5	<i>C. difficile</i>	50	50	50	24	0,0

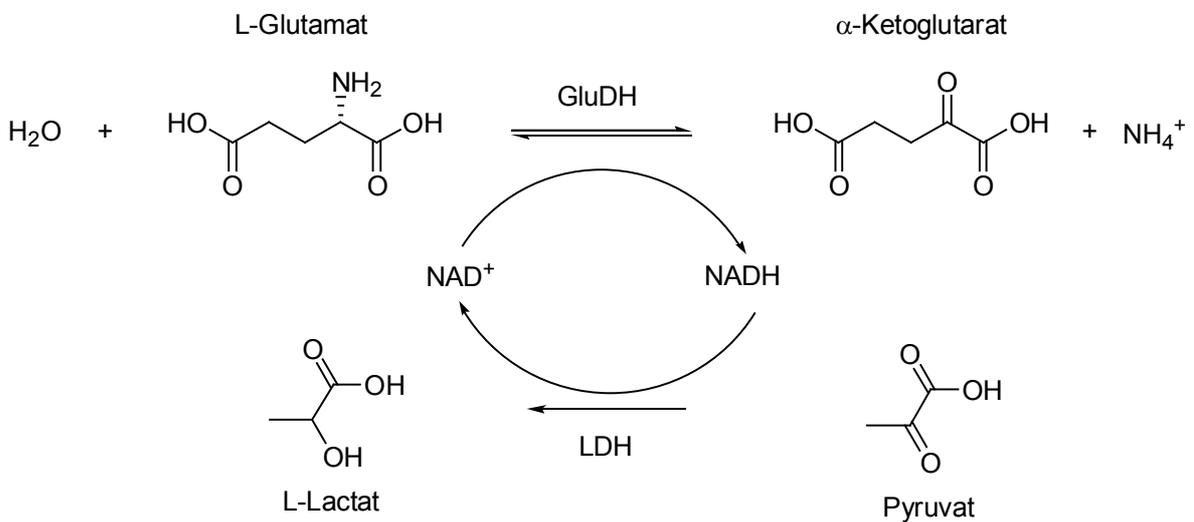
Wie in der Tabelle 35 ersichtlich wird, konnten unter Zugabe von α -G, im Vergleich zur Biotransformation ohne Zusatz, mit steigender Produktkonzentration deutlich niedrigere Umsätze erzielt werden. Durch den Zusatz von 50 mM und 100 mM α -KG sinkt der erzielbare Umsatz auf 50,5 % bzw. 29,3 % des Wertes vom Benchmark Versuch. Für die Biotransformation unter Zusatz von 50 mM der Reaktionsprodukte α -KG und Ammonium konnte nach 24 h kein Umsatz mittels $^1\text{H-NMR}$ nachgewiesen werden.

1.1.8.7 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GluDH unter *in situ*-Regenerierung des Cofaktors NAD^+ mittels alternativer Systeme

Aufgrund der mit dem System GluDH/NOX erreichten Ergebnisse sollte vergleichend untersucht werden, ob der Einsatz eines alternativen Systems zur Cofaktorregenerierung von NAD^+ zu einer Erhöhung der Umsätze bzw. der maximalen Produktkonzentrationen führt. Als alternative Systeme zur Regenerierung von NAD^+ wurden in dieser Arbeit eine L-Lactat-Dehydrogenase sowie eine L-Aminosäure-Dehydrogenase ausgewählt.

1.1.8.7.1 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GluDH unter *in situ*-Regenerierung des Cofaktors NAD^+ mittels einer L-Lactat-Dehydrogenase

Als zu verwendendes Regenerierungsenzym wurde die L-Lactat-Dehydrogenase (LDH) aus *B. subtilis* ausgewählt [Richter et al., 2011]. Die Kopplung der GluDH und der LDH als System zur Cofaktorregenerierung ist im Schema 12 dargestellt. Hier erfolgt die Regenerierung von NAD^+ in der oxidativen Desaminierung von L-Glu als Enzymgekoppelter Ansatz durch Zugabe von Pyruvat, welches von der eingesetzten LDH zu L-Lactat reduziert wird, während NADH zu NAD^+ oxidiert wird.



Schema 12: Biotransformation von L-Glu mit der GluDH aus *C. difficile* und LDH aus *B. subtilis* zur *in situ*-Regenerierung von NAD^+ .

Die einleitenden Biotransformationen von 50 mM L-Glu unter Einsatz der rekombinanten GluDH aus *C. difficile* und LDH aus *B. subtilis* zur *in situ* Cofaktorregenerierung wurde bei pH-Werten von 7,0 und 8,0 durchgeführt. Die Aktivitäten der Enzyme wurden unter den Bedingungen der Biotransformation bestimmt und die entsprechenden Enzymmengen eingesetzt. Die Biotransformationen wurden als batch-Umsetzungen unter Schütteln bei 120 rpm durchgeführt. Die Ergebnisse der Biotransformation sind in der Tabelle 36 wiedergegeben.

Tabelle 36: Biotransformation von L-Glu mit der rekombinanten GluDH aus *C. difficile* und LDH aus *B. subtilis* zur *in situ*-Cofaktorregenerierung von NAD⁺ (200 mM Kpi Puffer pH 7,0 bzw. 8,0, 0,5 mM NAD⁺, 120 rpm, 30°C). Mittels ¹H-NMR wurden die Konzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α -KG bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und α -KG.

Eintrag	GluDH (U ml ⁻¹)	LDH (U ml ⁻¹)	Pyruvat (mM)	pH	L-Glu (mM)	Zeit (h)	Umsatz (%)
1	5	25	100	7,0	50	4	31,8
						24	44,5
						48	45,4
2	5	25	100	8,0	50	4	37,8
						24	48,5
						48	50,9

Wie aus der Tabelle 36 ersichtlich wird, sinkt nach 24 h die Geschwindigkeit, mit der die Biotransformationsreaktion weiterläuft, deutlich ab. Die Umsätze steigen nach einer Reaktionszeit von 24 h auf 44,5 % und 48,5 % an, eine weitere Verlängerung der Reaktionszeit auf 48 h erbringt jedoch nur eine leichte weitere Steigerung im Bereich von 0,9 % (pH 7,0) bis 2,4 % (pH 8,0).

Aufgrund der ausreichenden Aktivität der LDH bei einem pH-Wert von 8,0 und dem leicht erhöhten Umsatz im Vergleich zur Biotransformation bei pH 7,0, wurden die weiterführenden Versuche unter Erhöhung der Substratkonzentration in der Biotransformationsreaktion von 50 mM auf 100 mM bei diesem pH-Wert durchgeführt, die Ergebnisse sind in der Tabelle 37 wiedergegeben. Für 100 mM L-Glu konnte nach 24 h ein maximaler Umsatz von 48,0 % nachgewiesen werden. Der Umsatz des Benchmark Versuches von 50 mM lag hier mit 56,0 % nach 24 h leicht höher als in der ersten Biotransformation.

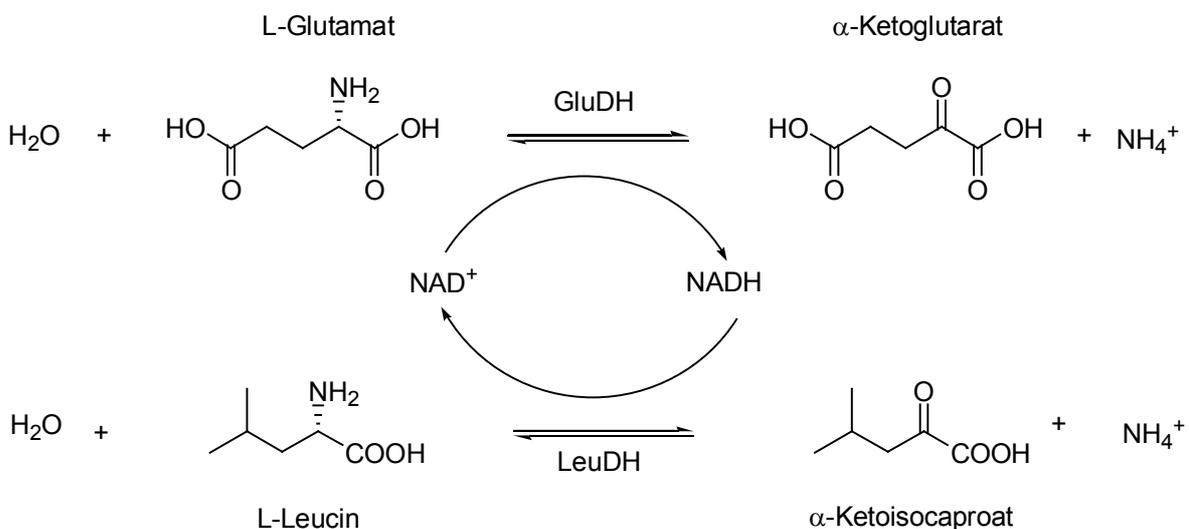
Tabelle 37: Biotransformation von L-Glu mit der rekombinanten GluDH aus *C. difficile* und LDH aus *B. subtilis* zur *in situ*-Cofaktorregenerierung von NAD^+ (200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 120 rpm, 30°C). Mittels $^1\text{H-NMR}$ wurden die Konzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α -KG bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und α -KG.

Eintrag	GluDH (U ml ⁻¹)	L-LDH (U ml ⁻¹)	Pyruvat (mM)	NAD^+ (mM)	L-Glu (mM)	Zeit (h)	Umsatz (%)
1	5	25	100	0,5	50	24	56,0
2	5	25	200	0,5	100	24	48,0

In der Biotransformation von 50 mM bzw. 100 mM L-Glu unter Einsatz GluDH aus *C. difficile* und LDH aus *B. subtilis* zur *in situ* Cofaktorregenerierung konnte nach 24 h ein maximaler Umsatz von 56,0 % bzw. 48,0 % erreicht werden, die Produktendkonzentrationen der Biotransformationen betragen 4,1 g l⁻¹ und 7,0 g l⁻¹, die Raum-Zeit-Ausbeuten betragen 0,2 g l⁻¹ h⁻¹ bzw. 0,3 g l⁻¹ h⁻¹, bezogen auf die Gesamtdauer der Biotransformation.

1.1.8.7.2 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GluDH unter *in situ*-Regenerierung des Cofaktors NAD^+ mittels einer L-Aminosäure-Dehydrogenase

Weiterhin sollte ein gekoppelter Umsatz mit einer zweiten Aminosäure-Dehydrogenase durchgeführt werden. Als Regenerierungsenzym wurde die L-Leucin-Dehydrogenase (LeuDH) aus *Bacillus cereus* [Stoyan et al. 1997] eingesetzt. Die Kopplung der GluDH und der LeuDH als System zur Cofaktorregenerierung ist im Schema 13 dargestellt.



Schema 13: Biotransformation von L-Glu mit der GluDH aus *C. difficile* und der LeuDH aus *B. cereus* zur *in situ*-Cofaktorregenerierung von NAD^+ .

Hier erfolgt die Regenerierung von NAD^+ in der oxidativen Desaminierung von L-Glu als substratgekoppelter Ansatz durch Zugabe von α -Ketoisocaproat, welches von der LeuDh in Gegenwart von Ammonium zu L-Leucin (L-Leu) reduziert wird, während NADH oxidiert wird. Die Biotransformationen wurde bei einem basischen pH-Wert von 9,5 durchgeführt, da dieser Ansatz zwei Vorteile zu haben schien: Zum einen ist die Produktinhibierung der GluDH durch α -KG bei diesem pH-Wert deutlich erniedrigt, zum anderen liegt hier das pH-Optimum der LeuDh in Hinsicht auf die reduktive Aminierung von α -Ketoisocaproat, sowie der GluDH in Hinsicht auf die oxidative Desaminierung von L-Glu.

Ein wichtiger Aspekt hierbei war es, dass durch die Reaktion der LeuDh kontinuierlich das inhibierende Nebenprodukt Ammonium aus der Reaktionslösung entfernt wird. Da die Reaktion der LeuDh thermodynamisch bevorzugt in Richtung L-Leu-Bildung verläuft, sollte es mit diesem System möglich sein den Cofaktor NAD^+ zu regenerieren, gleichzeitig das stark inhibierende Ammonium zu entfernen und somit die Reaktion in die Richtung der Produktbildung von α -KG vorantreiben. Einem Teil der Biotransformationen wurde Ammonium zugesetzt, um den möglichen Einfluss auf die Cofaktorregenerierung zu untersuchen. Die Biotransformationen wurden als batch-Umsetzungen unter Schütteln bei 120 rpm durchgeführt. Proben wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen, durch Ultrafiltration (10 kDa) aufgearbeitet und mittels $^1\text{H-NMR}$ untersucht. Die Ergebnisse der Biotransformation sind in der Tabelle 38 wiedergegeben.

Tabelle 38: Biotransformation von L-Glu mit der GluDH aus *C. difficile* und der LeuDh aus *B. cereus* zur *in situ*-Regenerierung von NAD^+ (200 mM Gly-NaOH Puffer pH 9,5, 2,5 mM NAD^+ , 120 rpm, 30°C). Mittels $^1\text{H-NMR}$ wurden die Konzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α -KG bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und α -KG.

Eintrag	GluDH (U ml ⁻¹)	LeuDh (U ml ⁻¹)	Ammonium (mM)	α -Ketoisocaproat (mM)	L-Glu (mM)	Zeit (h)	Umsatz (%)
1	5	25	0	75	50	24	11,0
2	5	25	0	150	100	24	18,3
3	5	25	10	75	50	24	20,2
4	5	25	10	150	100	24	20,1

In den Biotransformationen von 50 mM und 100 mM L-Glu mittels GluDH und LeuDh zur Regenerierung von NAD^+ , konnte nach 24 h ein maximaler Umsatz von ca. 20 % nachgewiesen werden, die Produktendkonzentrationen der Biotransformationen betragen 1,5 g l⁻¹ und 2,9 g l⁻¹, die Raum-Zeit-Ausbeuten betragen 0,06 g l⁻¹ h⁻¹ bzw. 0,12 g l⁻¹ h⁻¹, bezogen auf die Gesamtdauer der Biotransformation.

1.1.8.8 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GluDH unter *in situ*-Entfernung von Ammonium mittels Zeolith

Um zu untersuchen, ob die *in situ*-Entfernung des Nebenproduktes Ammonium aus der Reaktionslösung der Biotransformation zu einer Erhöhung des Umsatzes führt, wurden Umsetzungen in Gegenwart von Zeolith durchgeführt. Zeolithe sind mineralische Ionenaustauscher auf der Basis von natürlich vorkommenden Aluminiumsilikaten (Klinoptiloith). Dieser mineralische Ionenaustauscher ist in der Lage, Ammonium aus wässrigen Lösungen zu entfernen [Demir et al., 2002; Nyguen und Tanner, 1998]. Das Verfahren beruht hierbei auf dem Austausch von am Zeolith gebundenen Calcium- oder Natrium-Ionen gegen die in der Umgebungslösung befindlichen Ammonium-Ionen. Der optimale pH-Wert für den Ionenaustausch liegt hierbei im Bereich von pH 4 bis pH 8 [Koon und Kaufmann, 1975]. Die Bindekapazität von Zeolith beträgt 10 bis 13,5 mg (NH_4^+) g^{-1} Zeolith (Delphin Umwelttechnik GmbH, 2007). Zeolith wurde in granulierter Form (Firma Zeolithe) eingesetzt. Vor der Verwendung wurde das Material zusätzlich mechanisch zerkleinert (1,5-4 mm) und dreimal für je 5 min mit sterilem H_2O gespült.

Es wurden 2 g Feuchtmaterial für ein Reaktionsvolumen von 5 ml eingesetzt, die Reaktion wurde als batch-Umsetzung bei 120 rpm durchgeführt. Es wurde ein Tris-HCl Puffer verwendet, da Zeolith in der Lage ist Kalium-Ionen zu binden, was den Einsatz eines Kpi Puffers verhindert. Proben wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen, durch Ultrafiltration (10 kDa) aufgearbeitet und mittels ^1H -NMR untersucht. Kontrollexperimente wurden durchgeführt, bei denen festgestellt werden sollte, ob der Ionenaustauscher in der Lage ist, das Substrat L-Glu bzw. das Produkt α -KG zu binden bzw. einen Einfluss auf deren Stabilität besitzt. Proben wurden nach 1 h, 4 h und 24 h entnommen und mittels ^1H -NMR untersucht. Dabei zeigte sich innerhalb von 24 h keine Abnahme der Konzentrationen an L-Glu bzw. α -KG. Zeolith besitzt also keinen negativen Einfluss auf Substrat und Produkt der Reaktion.

Die Ergebnisse der Biotransformation mit und ohne Zusatz von Zeolith sind in der Abbildung 39 dargestellt. Die Ergebnisse der Umsetzung zeigen eine leichte Verbesserung in der Umsatzrate bzw. der Produktbildungsrate bei der Verwendung von Zeolith zur Absenkung der Ammonium-Konzentration in der Reaktionslösung. Nach 24 h wird ein Umsatz von 78,2 % erreicht, was im Vergleich zur Biotransformation ohne Zusatz von Zeolith mit 71,6 % Umsatz eine leichte Steigerung darstellt. Jedoch können die angestrebten hohen Umsätze von >98 % nicht durch den Einsatz von Zeolith zur Entfernung von Ammonium erreicht werden.

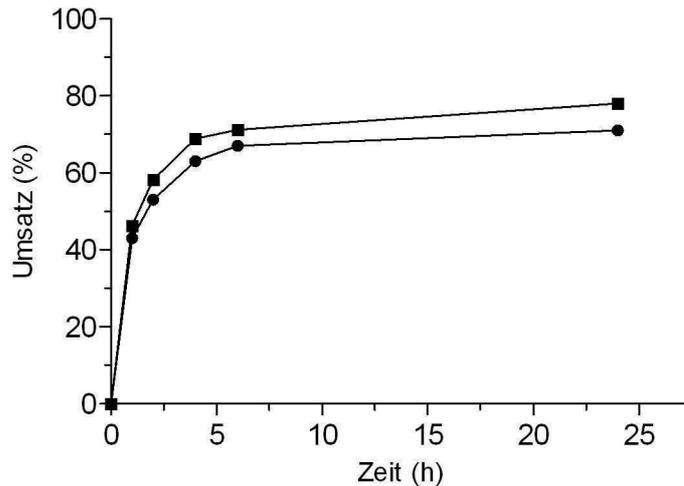


Abbildung 39: Biotransformation von L-Glu mit der GluDH aus *C. difficile* und der NOX aus *L. brevis* zur *in situ* Cofaktorregenerierung mit (—■—) bzw. ohne (—●—) Zusatz von Zeolith zur *in situ*-Entfernung von Ammonium (Zeolith 0,4 g ml⁻¹, 200 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0, GluDH 2 U ml⁻¹, NOX 10 U ml⁻¹, 2 mM NAD⁺, 30°C, 120 rpm). Mittels ¹H-NMR wurden die Konzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α -KG bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und α -KG.

1.1.8.9 *In situ*-Bereitstellung von C¹³-markiertem α -KG in der MenD-abhängigen Synthese von 4-Hydroxy-5-oxo-hexansäure

Um die biotechnologische Einsatzmöglichkeit des entwickelten Systems zu überprüfen, wurde die GluDH aus *C. difficile* und die NOX aus *L. brevis* in Zusammenarbeit mit der Universität Freiburg für die Synthese von C¹³-markiertem α -KG aus C¹³-markiertem L-Glu eingesetzt [Beigi et al., 2013].

Im genaueren dient die α -KG-Synthese mittels GluDH zur *in situ*-Bereitstellung des C¹³-markierten Substrates für das Enzym MenD aus *Escherichia coli* K12. Das Thiaminidindiphosphat-abhängige Enzym katalysiert die Reaktion von α -KG und Pyruvat zu 4-Hydroxy-5-oxo-hexansäure. Mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Systems aus GluDH und NOX konnten die eingesetzten Substratkonzentrationen von 30 mM C¹³-markiertem L-Glu vollständig in C¹³-markiertes α -KG umgesetzt werden [Beigi et al., 2013].

1.2 Darstellung von α -KG mittels L-Glutamat-Oxidase (GluOX)

1.2.1 Evaluierung einer geeigneter GluOX

In der Literatur sind verschiedene L-Aminosäure-Oxidasen beschrieben und charakterisiert worden, wobei die meisten Enzyme ein ausgesprochen breites Substratspektrum aufweisen und neben basischen auch aromatische und einige aliphatische L-Aminosäuren als Substrat akzeptieren. Im Allgemeinen wird L-Glu durch diese Enzyme jedoch nicht oder nur in geringem Maße als Substrat akzeptiert [Geueke et al., 2002; Ponnudurai et al., 1994]. Im Vergleich zu den L-AAOs mit einem breiten Substratspektrum weisen jedoch einige wenige Enzyme ein deutlich eingeschränktes Substratspektrums auf, sie katalysieren ausschließlich die Oxidation einer oder einiger weniger L-Aminosäuren, wie z.B. die L-Phenylalanin-Oxidase oder die L-Glutamat-Oxidase.

L-Glutamat-Oxidasen (GluOX) konnten bisher ausschließlich in verschiedenen *Streptomyces* Arten wie *Streptomyces* sp. X-119 [Kusakabe et al., 1983; Arima et al., 2003], *Streptomyces violascens* [Kamei et al., 1983], *Streptomyces* sp. P 106 [Bang-Ce et al., 1995], *Streptomyces* sp. 18G [Wachiratianchai et al., 1995], *Streptomyces* sp. Z-11-6 [Sukhacheva et al., 2000; Sukhacheva et al., 2004], *Streptomyces* sp. N14 [Li et al., 1996] sowie *Streptomyces endus* [Böhmer et al., 1989] nachgewiesen werden. In der Tabelle 39 sind GluOX verschiedener Herkunft sowie ihre biochemischen Eigenschaften aufgeführt.

Tabelle 39: Literaturbekannte GluOX sowie ihre biochemischen Eigenschaften (¹ Arima et al., 2003; ² Wachiratianchai et al., 1995; ³ Böhmer et al., 1989; ⁴ Kamei et al., 1983; ⁵ Sukhacheva et al., 2004).

Eigenschaft GluOX	<i>Streptomyces</i> sp. X-119-6 ¹	<i>Streptomyces</i> sp. 18G ²	<i>Streptomyces</i> <i>endus</i> ³	<i>Streptomyces</i> <i>violascens</i> ⁴	<i>Streptomyces</i> sp. Z 11-6 ⁵
Spez. Aktivität (U mg ⁻¹)	55	152	6	60	50
K _M (mM)	0,23	n.p.	1,1	n.p.	0,34
pH-Optimum	7,0 - 8,5	7,0 - 7,4	6,5 – 8,0	6,0 – 8,0	5,5 - 8,5
MW (kDa)	140	120	90	62	95
Sequenz bekannt	ja	nein	nein	nein	nein
Rek. Expression	<i>E. coli</i>	nein	nein	nein	nein
Substrate	L-Glu	L-Glu	L-Glu	L-Glu	L-Glu
	L-Asp (0,6 %)	L-Asp (0,5 %)		L-His	

Von den bisher bekannten GluOX konnte lediglich das Enzym aus *Streptomyces* sp. X-119-6 rekombinant in *E. coli* hergestellt und gereinigt werden [Arima et al., 2003; Utsumi et al., 2012]. Die Arbeiten zeigen, dass die rekombinante GluOX als eine „one chain polypeptide“ Vorstufe gebildet wird, die sich hinsichtlich der Struktur, der Aktivität sowie Stabilität deutlich von dem Wildtyp-Enzym unterscheidet. Der rekombinante Vorläufer kann durch die proteolytische Prozessierung mit der Metalloendopeptidase Sgmp aus *Streptomyces griseus* in seine natürliche Form überführt werden [Arima et al., 2003]. Das Enzym ist hoch spezifisch für L-Glu, lediglich L-Asp wird mit 0,6 % relativer Aktivität als Substrat akzeptiert. Weiterhin konnte die Struktur des Enzyms gelöst und näher charakterisiert werden [Utsumi et al., 2012].

Nach einer intensiven Literaturrecherche wurde die GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 aufgrund ihrer vorteilhaften Eigenschaften als geeignetes Enzym für die geplante Anwendung in der oxidativen Desaminierung von L-Glu ausgewählt. Das Enzym ist hoch spezifisch für L-Glu, besitzt sowohl eine hohe Affinität als auch Aktivität über einen breiten pH-Bereich und kann rekombinant in *E. coli* hergestellt werden [Kusakabe et al., 1983; Arima et al., 2003; Utsumi et al., 2012].

1.2.2 Klonierung und heterologe Expression der GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6

1.2.2.1 Codon usage Optimierung des *gluox*-Gens

Die ursprüngliche Sequenz des *gluox*-Gens weist einen deutlich erhöhten GC-Gehalt von 69,0 % auf, was in *E. coli* zu Problemen mit der Expression führen kann. Um eine optimale Expression zu gewährleisten, wurde eine computergestützte „codon usage“ Optimierung des *gluox*-Gens bezüglich der heterologen Expression in *E. coli* durchgeführt. Dadurch konnte der GC-Gehalt deutlich auf 55,8% gesenkt werden. Das N-terminale Codon GCC des *gluox*-Gens (ohne N-terminale Signalsequenz) wurde gegen das Startcodon ATG ausgetauscht. Im Anhang sind die ursprüngliche *gluox* Sequenz sowie die optimierte *gluox* Sequenz in Abbildung 116 vergleichend dargestellt. Die „codon usage“ optimierte *gluox* Sequenz wurde als synthetisches Gen von der Firma Eurofins hergestellt.

1.2.2.2 Klonierung des *glox* Gens

Aus der Literatur war ersichtlich, dass das *gluox*-Gen aus *Streptomyces* sp. X-119-6 eine N-terminale Signalsequenz besitzt. Die meisten der bisher beschriebenen GluOXs sind extrazelluläre Enzyme und das Vorkommen solcher Signalsequenzen (Signalpeptide) ist bei diesen weit verbreitet. Das *gluox*-Gen sollte ohne die N-terminale Signalsequenz kloniert werden. Nach erfolgreicher Amplifizierung des „codon usage“ optimierten *gluox*-Gens mittels PCR (primer *Gloxfor* und *Gloxrev*), anschließender Restriktion und Gelreinigung wurde das Gen in den *E. coli* Expressionsvektors *pet28a* (Schnittstellen *NdeI* und *XhoI*) von Novagen ligiert. Dieser Vektor enthält den T7-Promotor und T7-Terminator, eine Kanamycin Resistenz, einen Replikationsursprung (*ori*) sowie eine „multiple cloning site“ (Novagen). Über die Auswahl der *NdeI* und *XhoI* Restriktionsschnittstellen wurde die GluOX N-terminal mit einem His-Tag fusioniert. Nach Transformation in kompetente *E. coli DH5 α* Zellen, Selektion auf LB-Platten (Kanamycin 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) und Kultivierung wurde die Vektor-DNA aus mehreren Transformanten isoliert und mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde der Vektor pGLOXHIS zur rekombinanten Produktion der GluOX in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

1.2.2.3 Heterologe Expression in *E. coli*

Eine Einzelkolonie von mit pGLOXHIS transformierten *E. coli* wurde in 20 ml LB-Medium (Kanamycin 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) überimpft. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C und 120 rpm. Mit der Vorkultur wurde die Hauptkultur (1 L Expressionsmedium) auf eine OD₆₀₀ von 0,05 beimpft. Die Kultivierung erfolgte im Schüttelkolben (5 L Volumen) bei 22°C und 120 rpm für 24 h, die Genexpression wurde durch die Zugabe von IPTG (0,5 mM) induziert und für weitere 24 h bei 22°C und 120 rpm kultiviert. Anschließend wurde die Zellmasse durch Zentrifugation (30 min, 5000 rpm bei 4°C, Hettich Zentrifuge) von dem Medium abgetrennt. Entweder wurde die Zellen direkt genutzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -18°C gelagert. Die Aktivität der rekombinanten GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 im Rohextrakt nach Ultraschall-Aufschluss der Zellen betrug ca. 9 U mg^{-1} (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 10 U POX, 30°C).

1.2.2.4 Untersuchung der GluOX-Produktion in Abhängigkeit von der Temperatur

Um in der geplanten Hochzelldichte-Fermentation der rekombinanten *E. coli* Zellen eine möglichst hohe Produktion der GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 zu erzielen, wurde die Produktionsleistung bei verschiedenen Temperaturen untersucht.

Dazu wurde *E. coli* BL21(DE3)/pHISGLOX in Schüttelkolben (100 ml Volumen, 10 ml LB-Medium, 120 rpm.) bei 22°C, 30°C und 37°C kultiviert und die Genexpression durch die Zugabe von IPTG (0,5 mM) induziert und für weitere 24 h kultiviert. Nach Zellernte und Zellaufschluss wurden die Aktivitäten der GluOX im Rohextrakt verglichen. Alle Aktivitätstests erfolgten mit dem o-Dianisidin-Standardassay. Die relativen Aktivitäten der GluOX im Rohextrakt in Abhängigkeit von der jeweiligen Expressionstemperatur sind in Abbildung 40 dargestellt. Bei einer Expressionstemperatur von 37°C konnte keine GluOX-Aktivität im Zellrohextrakt nachgewiesen werden, bei einer Expressionstemperatur von 22°C zeigt die GluOX die höchste Aktivität im Rohextrakt.

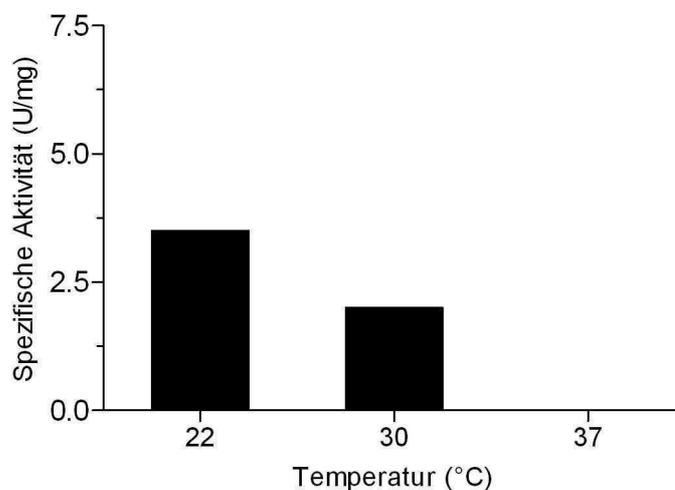


Abbildung 40: Spez. Aktivitäten der rekombinanten GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 im zellfreien Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)/pHISGLOX in Abhängigkeit von der Expressionstemperatur (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 10 U POX, 30°C).

1.2.2.5 Hochzelldichte-Fermentation von *E. coli* zur Produktion von GluOX

Durch die Möglichkeit der Kultivierung von rekombinanten Stämme in Hochzelldichte-Fermentationen können in kurzer Zeit große Chargen an Zellen und damit auch eine nahezu unbegrenzte Menge an Biokatalysator zur Verfügung gestellt werden. Zur Produktion der GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 wurde eine Hochzelldichte-Fermentation von *E. coli* BL21(DE3)/pHISGLOX in einem 40 L Fermenter der Fa. Infors AG durchgeführt, das Fermentationsmedium war hierbei HZD-Batchmedium. Die Fermentation erfolgte im sog. Feed-Batch Modus. Aus technischen Gründen war es während der Hochzelldichte-Fermentation nur möglich, die Temperatur bis ca. 28°C abzusenken. Die Voruntersuchung zur Expressionsleistung in diesem Temperaturbereich hatte gezeigt, dass auch bei dieser Temperatur eine zufriedenstellende Produktion und Aktivität der GluOX erreicht werden kann.

Die Kultivierung erfolgte unter Glucose limitierten Wachstumsbedingungen. Die Zudosierung des HZD-Feedmediums wurde nach einem optimierten Protokoll für die *E. coli* Kultivierung durchgeführt, die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von IPTG (0,5 mM) nach einer Kultivierungsdauer von 27 h. Die gesamte Fermentationsdauer betrug 32 h, der Verlauf der Fermentation wurde in einem Fermentationsprotokoll dokumentiert.

Nach Beendigung der Fermentation wurde die Zellen von der Fermentationsmedium mittels Zentrifugation (15 min, 8000 x g, 4°C) abgetrennt und in Chargen zu je ca. 0,5 kg Feuchtbioasse bei -18°C eingefroren. Die spez. Aktivität der rekombinanten GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 im Rohextrakt nach Ultraschall-Aufschluss (25 % Zellsuspension, 250 mg Zellen ml⁻¹) betrug 5,8 U mg⁻¹ (Volumenaktivität 101,9 U ml⁻¹, Proteingehalt 17,7 mg ml⁻¹; Reaktionsansatz: 50 mM L-Glu, 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 10 U POX, 30°C). Aus einem Volumen von 15 L Fermentations-Kultur konnten insgesamt 3,3 kg Zellen und somit 1344444 U GluOX gewonnen werden.

1.2.2.6 Reinigung und Prozessierung der rekombinanten GluOX *Streptomyces* sp. X-119-6

Für die GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 ist in der Literatur beschrieben, dass das rekombinante Enzym als eine „one chain polypeptide“ Vorstufe gebildet wird, die sich hinsichtlich der Struktur, der Aktivität sowie Stabilität deutlich von dem Wildtyp-Enzym unterscheidet [Arima et al., 2003, Utsumi et al., 2012]. Der rekombinante Vorläufer kann durch die proteolytische Prozessierung mit der Metalloendopeptidase Sgmp aus *Streptomyces griseus* in seine natürliche Form überführt werden [Arima et al., 2003; Arima et al., 2009]. Für die Prozessierung im Verlauf der Reinigung wurde das Protease Präparat Pronase (Sigma) aus *Streptomyces griseus* eingesetzt, welches die Metalloendopeptidase Sgmp enthält.

Die Aminosäuresequenz der GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 ist in der Abbildung 41 dargestellt, die Sequenzabschnitte der α -, β - und γ -Untereinheit sowie identifizierte und vermutete Protease-Schnittstellen sind markiert.

10	20	30	40	50	60
MTTDTARRHT	GAERANEMTY	EQLARELLLV	GPAPTNECLK	LRYLVDLIDN	GLNPPGPPKR
70	80	90	100	110	120
LLIVGAGIAG	LVAGDLLTRA	GHDVTILEAN	ANRVGGRIKT	PHAKKGEPSP	FADPAQYAEA
130	140	150	160	170	180
GAMRLPSFHP	LTLALIDKLG	LKRRLEFNVD	IDPQTGNQDA	PVPPVFKSP	KDGKTWTNGA
190	200	210	220	230	240
PSPEFKEPDK	RNHTWIRTNR	EQVRRACQYAT	DPSSINEGFH	LTGCETRLTV	SDMVNQALEE
250	260	270	280	290	300
VRDYYSVKQD	DGTRVNKPKK	EWLAGWADV	RDFDGYSMGR	FLREYAEPFD	EAVEAIGTIE
310	320	330	340	350	360
NMTRSRLHAF	FHSFLGRSDI	DPRATYWEIE	GSSRMLPETL	AKDLRDQIVM	GORMVRLEYY
370	380	390	400	410	420
DPGRDGHGE	LTGPGGPAVA	IQTVPGEPEY	AATQTTWTGDL	AIVTIPFSSL	RFVKVTPPPS
430	440	450	460	470	480
YKRRRAVIET	HYDQATKULL	EFSRRWWEFT	EADWKRELD	IAPGLYDYYQ	QWGEDDABAA
490	500	510	520	530	540
LALPQSVRNL	PTGLLGAHPS	VDESRIEEO	VEYYRNSLR	GGVRPATNAY	GGSTTDNPN
550	560	570	580	590	600
RFMYPSHPV	PGTQGGVLA	AYSMSDDAAR	WDSFDDAERY	GYALENLQSV	HGRRIEVFYT
610	620	630	640	650	660
GAGQTQSWLR	DPYACGAAV	YTPHQMTAFH	LDVVRPEGPV	YFAGEHVSLK	HAWIEGAVET
670	680	690	700		
AVRAAIAVNE	APVGDVGVT	AAGRRGAAAA	TEPMREALT	S	

Abbildung 41: Aminosäuresequenz der GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6. Die Untereinheiten sind farblich markiert: α -Untereinheit, β -Untereinheit und γ -Untereinheit. Identifizierte Protease-Schnittstellen sind mit einem Pfeil markiert, vermutete Protease-Schnittstellen sind mit einem Rahmen dargestellt. Wichtige FAD-Bindestelle GAGIAG, Aminosäuren 65-70, Aminosäuren 1-14 vermutete Signalsequenz [Arima et al., 2009].

Da aus der Literatur [Kuzu, 2005] und eigenen Versuchen mit der NOX aus *L. brevis* bekannt war, dass das zellinterne FAD Level von *E. coli* BL21(DE3) bei einer starken Überexpression FAD-abhängiger Enzyme teilweise nicht ausreicht um das Enzym vollständig mit Cofaktor abzusättigen, wurde dem Rohextrakt FAD in unterschiedlichen Konzentration (10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M und 100 μ M) zugesetzt. Anschließend wurden die Lösungen für 15 min auf Eis inkubiert. Der Vergleich der spezifischen Aktivitäten im Rohextrakt vor und nach der Inkubation mit FAD (spez. Aktivität jeweils 9,2 U mg^{-1}) zeigte, dass keine *in vitro* Aktivierung bzw. Aktivitätsänderung durch die externe Zugabe von FAD stattgefunden hat. Offensichtlich reicht das zellinterne FAD aus, um das Enzym abzusättigen so dass die GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 in *E. coli* BL21(DE3) ausschließlich als aktives Holo-Enzym gebildet wird. Als rekombinante Vorstufe liegt die GluOX *Streptomyces* sp. X-119-6 als Dimer mit einem Molekulargewicht von 77 kDa pro Untereinheit (mit His-Tag) vor.

Zur Reinigung der „one chain polypeptide“ Vorstufe der GluOX mittels Metallaffinitätschromatographie wurde ein Tropfsäulen-System eingesetzt, für die Reinigung mittels Q-Sepharose wurde ein ÄKTA-System verwendet. Die rekombinante GluOX ließ sich in nur zwei Chromatographieschritten mittels Metallaffinitätschromatographie unter Verwendung von Ni-NTA und Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose bis zur Homogenität aufreinigen. Die als aktiv identifizierten Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mit Hilfe einer Ultrafiltrationseinheit eingeeengt, anschließend wurde die Enzymlösung mit einer PD10 Sephadex G 25 Säule (Pharmacia) umgepuffert (20 mM Kpi Puffer pH 7,4) (Lagerung bei 4°C).

Aus 32 ml geklärtem Rohextrakt (*E. coli* BL21 (DE3)/pHISGLOX) mit einer Volumenaktivität von 152 U ml⁻¹ und einem Proteingehalt von 16,6 mg ml⁻¹ konnten 1340 U unprozessierte GluOX, mit einer spezifischen Aktivität von 40,8 U mg⁻¹ gewonnen werden können. 20 % dieser Enzymlösung wurden für spätere Biotransformationsversuche sowie die kinetische Untersuchung zurückgestellt, die Lagerung erfolgte durchgehend bei 4°C. Die Ergebnisse der Reinigung sind in Tabelle 40 zusammengefasst und dargestellt.

Die restliche GluOX wurde durch den Einsatz von Pronase (3,6 µg mg⁻¹ GluOX) prozessiert (2 h bei 20°C, für weitere 22 h bei 4°C), so dass das Enzym die korrekte heteropolymere Struktur ausbilden konnte ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$; 42 kDa bzw. 40 kDa, 17 kDa und 10 kDa). Das für die Prozessierung eingesetzte Präparat Pronase stellt ein Protease-Gemisch dar, das neben der Metalloendopeptidase Sgmp auch andere Proteasen aus *S. griseus* enthält. Wie mittels SDS-PAGE nachgewiesen wurde, führt die Anwesenheit dieser Proteasen jedoch nicht zu einem weiteren Abbau der GluOX. Die SDS-PAGE (nachfolgende Abbildung 42) zeigt die aufgrund der Literaturlage erwarteten charakteristischen Banden bei 42 kDa bzw. 40 kDa, 17 kDa und 10 kDa.

Anschließend wurde die GluOX erneut mittels Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose gereinigt, um die eingesetzte Protease sowie entstandene Protein-Fragmente abzutrennen. Die als aktiv identifizierten Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mit Hilfe einer Ultrafiltrationseinheit eingeeengt, anschließend wurde die Enzymlösung mit einer PD10 Sephadex G 25 Säule (Pharmacia) umgepuffert (20 mM Kpi Puffer pH 7,4).

Durch die Prozessierung wurde die spez. Aktivität der GluOX um den Faktor 1,7 von 40,8 U mg⁻¹ auf 72,6 U mg⁻¹ erhöht. Nach allen Reinigungsschritten konnten insgesamt 1037 Units U mg⁻¹ aus 10,6 g *E. coli* BL21 (DE3)/pHISGLOX Zellen isoliert werden, die in ihrer prozessierten Form vorliegt. Dies entspricht einer Ausbeute von 21,5 %, bezogen auf die Ausgangsaktivität im Rohextrakt, ohne Berücksichtigung der Rückstellprobe der unprozessierten GluOX sowie die Aktivierung durch die Prozessierung. Die Ergebnisse der Reinigung sind in Tabelle 40 zusammengefasst und dargestellt.

Tabelle 40: Reinigung der rek. *Streptomyces* sp. X-119-6 GluOX aus *E. coli* BL21 (DE3)/pHISGLOX (Aktivitätsassay: 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 10 U POX, 30°C). * Die Ausbeute wurde auf die Ausgangsaktivität des Rohextraktes bezogen, ohne Berücksichtigung der Rückstellung von Enzym nach der Q-Sepharose 1 und Aktivierung durch die Prozessierung. ** Daten nach der Prozessierung mittels Pronase.

Reinigungsschritt	Spez. Aktivität (U mg ⁻¹)	Gesamt-Aktivität (U)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor (x-fach)
Rohextrakt	9,2	4879	100,0	1
Ni-NTA	35,7	2064	42,3	3,9
Q-Sepharose 1	40,8	1340	27,4	4,4
Q-Sepharose 2**	72,6	1037	21,5*	7,9

Um sicherzustellen, dass die GluOX im Verlauf der Aufreinigung nicht durch ein Auswaschen des Cofaktors FAD inaktiviert wird, wurde den Enzymlösungen der verschiedenen Stufen der Aufreinigung FAD in einer Konzentration von 10 µM zugesetzt. Anschließend wurden die Lösungen für 30 min auf Eis inkubiert. Der Vergleich der Aktivitäten vor und nach der Inkubation mit FAD erbrachte keine Abweichung, folglich wird kein FAD aus dem Enzym ausgewaschen.

Eine SDS-PAGE der Fraktionen entsprechend Tabelle 40 wurde zur Reinheitskontrolle sowie der Bestimmung des Molekulargewichts durchgeführt. Das SDS-Gel (Abbildung 42) zeigt die homogene GluOX in ihrer unprozessierten Form mit Untereinheiten von ca. 77 kDa sowie die prozessierte Form mit Untereinheiten von 42 kDa, 17 kDa und 10 kDa. Interessanterweise wird durch die α -Untereinheit im SDS Gel eine Doppelbande bei 42 kDa bzw. ca. 41 kDa ausgebildet (Abbildung 42, Spur 5 und 6), dieses Phänomen wurde bereits vorher beobachtet und ist in der Literatur beschrieben [Arima et al., 2003].

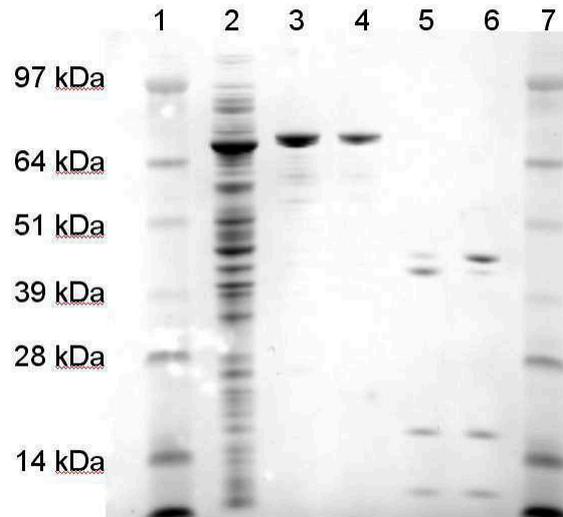


Abbildung 42: SDS-PAGE Reinigung der rek. *Streptomyces* sp. X-119-6 GluOX aus *E. coli* BL21 (DE3)/pHISGLOX, Spur 1: Protein Standard SeeBlue2, Spur 2: Rohextrakt *E. coli* BL21 (DE3)/pHISGLOX, Lösliche Fraktion, Spur 3: rek. GluOX nach Ni-NTA und Ultrafiltration, Spur 4 rek. GluOX nach Q-Sepharose 1 und Ultrafiltration, Spur 5: rek. GluOX nach Prozessierung mittels Pronase und Hitzeinaktivierung der Protease, Spur 6: rek. prozessierte GluOX nach Q-Sepharose 2 und Ultrafiltration, Spur 7: Protein Standard SeeBlue2. Die Spuren 2-4 zeigen die unprozessierte GluOX, 5 und 6 die prozessierte.

1.2.3 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten GluOX

1.2.3.1 Lagerstabilität der Hochzelldichte-Fermentations-Zellen und der gereinigten GluOX

Um eine mögliche Inaktivierung der GluOX innerhalb von *E. coli* BL21(DE3)/pHISGLOX während der Lagerung bei -18°C auszuschließen, wurden die Zellen aus der Hochzelldichte-Fermentation in regelmäßigen Zeitabständen aufgeschossen und auf die Aktivität der GluOX im Rohextrakt hin untersucht. Es konnte keine Inaktivierung der GluOX bis zu einer Dauer von 240 Tagen festgestellt werden (siehe auch Abbildung 43). Somit können die Zellen als sehr stabil hinsichtlich der Lagerung bei -18°C charakterisiert werden.

Ebenfalls wurden die GluOX-Präparate während der Lagerung bei 4°C in regelmäßigen Abständen auf ihre Aktivität hin untersucht. Interessanterweise unterscheiden sich die prozessierte und die unprozessierte Form der GluOX hinsichtlich der Lagerstabilität deutlich. So weist die GluOX nach der proteolytischen Prozessierung mittels Pronase eine deutlich ausgeprägtere Stabilität hinsichtlich der Lagerung bei 4°C auf, es konnte im gesamten Untersuchungszeitraum von 260 Tagen keine Verminderung der Aktivität festgestellt werden.

Die Abb. 44 zeigt, dass die unprozessierten Form instabiler ist als die prozessierte, sie verliert relativ konstant an Aktivität, so beträgt der Verlust nach 5 Tagen ca. 4 % und nach 260 Tagen ca. 50 %. Beide Formen der GluOX können als ausreichend stabil bzw. sehr stabil hinsichtlich der Lagerung (in 20 mM Kpi Puffer pH 7,4) bei 4°C charakterisiert werden (siehe auch Abbildung 44).

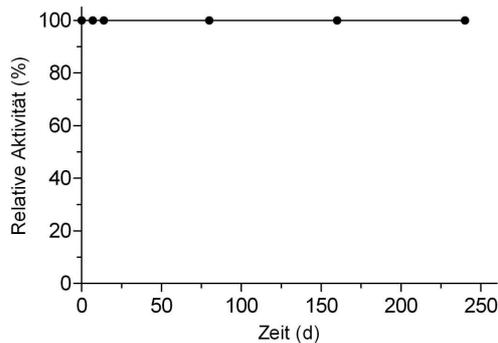


Abbildung 43: Langzeitstabilität von *E. coli* BL21(DE3)/pHISGLOX Hochzelldichte-Fermentations-Zellen im Verlauf der Lagerung bei -18°C bis zu einer Dauer von 240 d. Der 100%-Wert entspricht einer GluOX-Aktivität im Zellrohextrakt von $5,8 \text{ U mg}^{-1}$ (Aktivitätsassay: 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 10 U POX, 30°C).

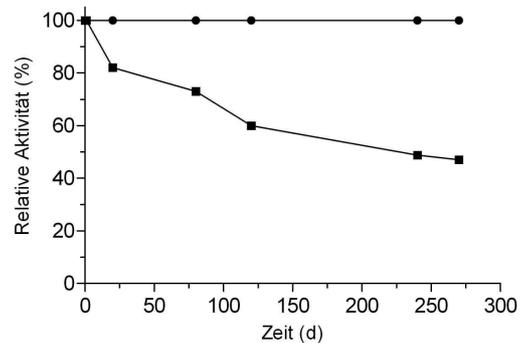


Abbildung 44: Lagerstabilität der gereinigten prozessierten (—●—) und unprozessierten (—■—) rek. GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 bei 4°C bis zu einer Dauer von 240 d. Der 100%-Wert entspricht bei der unprozessierten GluOX einer Aktivität von $40,8 \text{ U mg}^{-1}$, bei der prozessierten GluOX einer Aktivität von $72,6 \text{ U mg}^{-1}$. (Aktivitätsassay: 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 10 U POX, 30°C).

1.2.3.2 Bestimmung des pH-Optimums der GluOX

Zur Bestimmung des pH-Optimums der prozessierten und unprozessierten GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 wurden die Aktivitäten im pH-Bereich von 5,0 bis 9,0 vermessen. Für die Bestimmung des pH-Optimums wurde der Standardaktivitätsassay mit 50 mM L-Glu genutzt, der pH Wert wurde von 5,0 bis 9,0 unter Verwendung der aufgeführten Puffern variiert. Aus der Abbildung 45 ergibt sich ein pH-Optimum von pH 7,5 für die oxidative Desaminierung von L-Glu durch die prozessierte und unprozessierte Form der GluOX. Die Aktivitäten bei pH 6,5 und pH 8,5 erreichen ca. 80 und 85 % des Wertes bei pH 7,5. Somit weisen sowohl die prozessierte als auch die unprozessierte Form kein enges pH-Optimum auf, die Aktivität variiert im Bereich von pH 5,0 bis pH 9,0 nur um maximal 40 %.

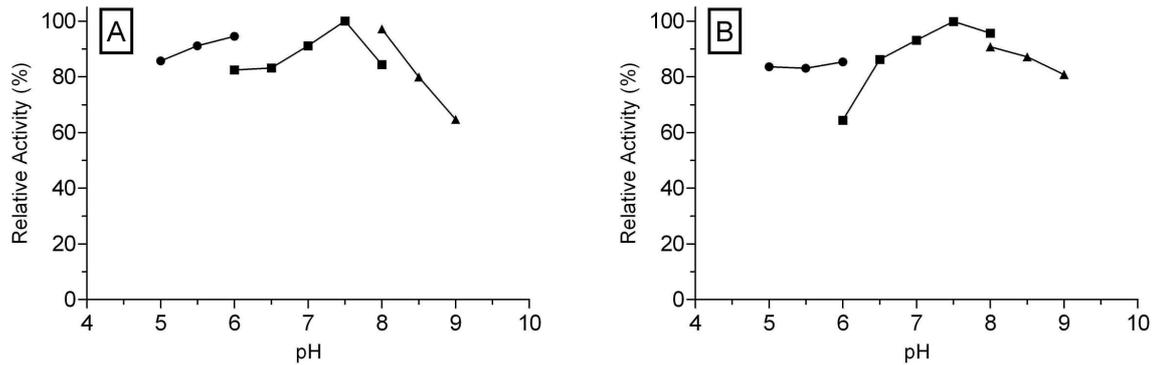


Abbildung 45 A und B: Effekt des pH-Wertes auf die Aktivität der prozessierten (A) und unprozessierten (B) rek. GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119 in der oxidativen Desaminierung von L-Glu. Die Enzymaktivität wurde in folgenden 50 mM Puffern bestimmt: (●) Na-Acetat Puffer, pH 5,0-6,0; (■) Kpi Puffer, pH 6,0-8,0; (▲) Tris-HCl, pH 8,0-9,0. Der 100%-Wert entspricht bei A einer Aktivität von 22,1 U mg⁻¹, bei B einer Aktivität von 37,6 U mg⁻¹ (Aktivitätsassay: 50 mM L-Glu, 10 U POX, 22°C).

1.2.3.3 Bestimmung der kinetischen Konstanten v_{max} und K_M

Für die Charakterisierung der unprozessierten sowie prozessierten Form der rekombinanten GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119 bezüglich der kinetischen Parameter gegenüber L-Glu wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ermittelt. Da in der Literatur für die unprozessierte rek. GluOX eine thermisch bedingte Inaktivierung bei Temperaturen von > 20°C beschrieben wurde, war es vorgesehen, die Biotransformationen sowie die kinetische Charakterisierung bei einer Temperatur von 15°C durchzuführen (in 200 mM Kpi Puffer pH 7,0). Die unprozessierte sowie prozessierte Form der rekombinanten GluOX wurden als gereinigtes Enzym (siehe 1.2.2.6) eingesetzt. Zur Aufnahme der Michaelis-Menten-Kinetik wurden die Ansätze bei konstanter Enzymmenge in Dreifachbestimmung im Photometer vermessen. Dabei wurden Substratkonzentrationen zwischen 0,125 mM und 150 mM L-Glu für die unprozessierte, sowie zwischen 0,01 mM und 50 mM L-Glu für die prozessierte GluOX eingesetzt. Im untersuchten Konzentrationsbereich konnte bei keinem der beiden Enzyme eine Substratüberschussinhibition beobachtet werden. Die Auswertung und Bestimmung der Parameter v_{max} und K_M durch nicht-lineare Regression sowie die Modellierung der Diagramme erfolgte mit dem Computerprogramm PRISM. Die Berechnung der k_{cat} Werte, auch als Wechselzahl bezeichnet, erfolgte auf Grundlage der Molekulargewichte der monomeren Formen von 77973 Da für die unprozessierte und 71597 Da für die prozessierte GluOX (Molekulargewichte wurden auf Grundlage der Aminosäuresequenz berechnet, mit Hexahistidin-Tag, ohne FAD).

1.2.3.3.1 Bestimmung der kinetischen Konstanten der unprozessierten GluOX

In Abbildung 46 ist der Kurvenverlauf der Kinetikmessung der unprozessierten GluOX zur Bestimmung der kinetischen Parameter v_{\max} und K_M für das Substrat L-Glu dargestellt.

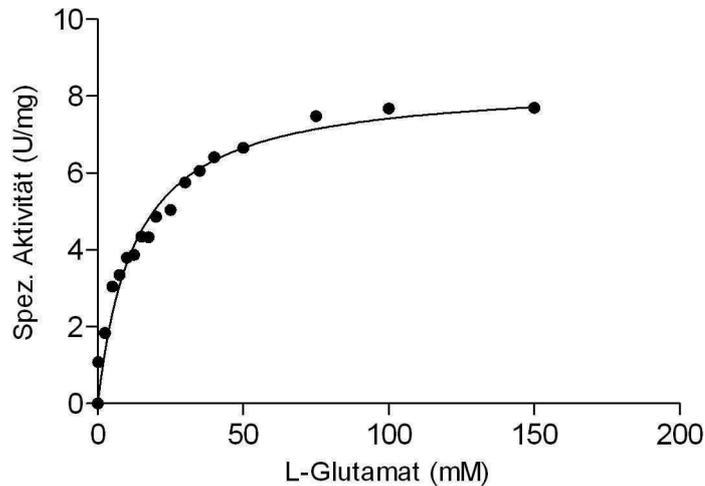


Abbildung 46: Kinetikmessung zur Bestimmung der Parameter v_{\max} und K_M der unprozessierten rek. GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 für das Substrat L-Glu (200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 15°C).

Die Aktivität wurde bei konstanter Enzymmenge und aufsteigender Substratkonzentration bis zu 150 mM L-Glu vermessen. Die nicht-lineare Regression der Messwerte ergab für L-Glu einen V_{\max} von $8,37 \text{ U mg}^{-1}$ und einen K_M von 12,97 mM für die unprozessierte rek. GluOX, was einem k_{cat} Wert von $10,9 \text{ s}^{-1}$ (Wechselzahl) sowie einem k_{cat}/K_M Wert von $0,83 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (katalytische Effizienz) entspricht.

1.2.3.3.2 Bestimmung der kinetischen Konstanten der prozessierten GluOX

In Abbildung 47 ist der Kurvenverlauf der Kinetikmessung der prozessierten GluOX zur Bestimmung der kinetischen Parameter v_{\max} und K_M für das Substrat L-Glu dargestellt.

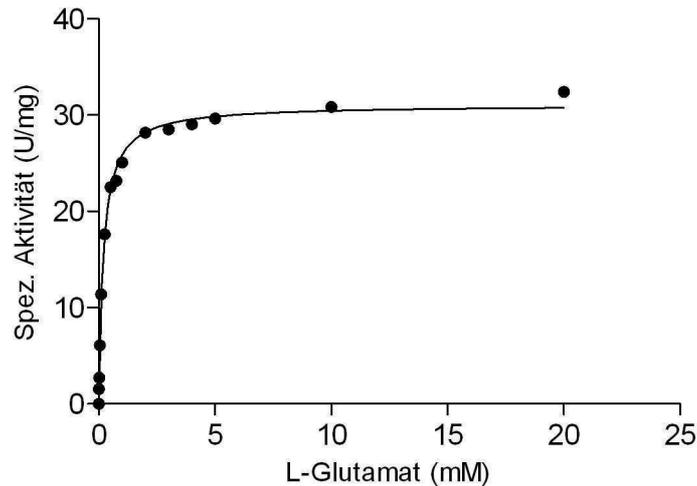


Abbildung 47: Kinetikmessung zur Bestimmung der Parameter v_{\max} und K_M der prozessierten rek. GluOX *Streptomyces* sp. X-119-6 für das Substrat L-Glu (200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 15°C).

Die Aktivität wurde bei konstanter Enzymmenge und aufsteigender Substratkonzentration bis zu 20 mM L-Glu vermessen. Die nicht-lineare Regression der Messwerte ergab für L-Glu einen v_{\max} von 31,06 U mg⁻¹ und einen K_M von 0,20 mM für die prozessierte rek. GluOX, dies entspricht einem k_{cat} Wert von 37,1 s⁻¹ sowie einem k_{cat}/K_M Wert von 185 x 10⁻³ μM⁻¹ s⁻¹.

1.2.3.3.3 Zusammenfassung der kinetischen Daten der unprozessierten und prozessierten GluOX

In der Tabelle 41 sind die ermittelten kinetischen Daten der gereinigten prozessierten und unprozessierten rek. GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 aufgeführt.

Tabelle 41: Kinetische Daten der prozessierten und unprozessierten rek. GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 (200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 15°C).

rek. GluOX	v_{\max} (U mg ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (μM ⁻¹ s ⁻¹)
unprozessiert	8,37	12,97	10,9	0,83 x 10 ⁻³
prozessiert	31,06	0,20	37,1	185 x 10 ⁻³

1.2.3.4 Untersuchung des Einflusses der Reaktionsprodukte auf die GluOX

Um festzustellen, ob und inwiefern die prozessierte und unprozessierte GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 durch die Produkte der Biotransformation beeinflusst werden, wurde der Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen an α -G, Ammonium und H_2O_2 auf die Aktivität der beiden Formen der GluOX untersucht.

1.2.3.4.1 Untersuchung des Einflusses von α -KG auf die GluOX

Da keine Literaturdaten vorlagen, wurde die rekombinante GluOX auf eine mögliche Produktinhibierung hin untersucht. In ersten Experimenten zur Inhibierung der GluOX durch das Reaktionsprodukt α -KG wurde untersucht, ob der photometrische Peroxidase/o-Dianisidin Standardaktivitätsassay eingesetzt werden kann. Dieser beruht auf einer durch die Meerrettich-Peroxidase (POX) katalysierten Farbstoffbildung aus dem Reaktionsprodukt H_2O_2 und o-Dianisidin. Wird die Aktivität der GluOX in Gegenwart von α -KG mittels o-Dianisidin Standardaktivitätsassay untersucht, kann die zugesetzte Ketosäure das entstehende H_2O_2 durch die unerwünschte Decarboxylierungsreaktion abfangen und somit den Messwert negativ beeinflussen. Es wurden verschiedenen Kontrollexperimente durchgeführt, um diesen möglichen Einfluss von α -KG auf die Messergebnisse zu untersuchen. Dem o-Dianisidin Standardaktivitätsassay wurde eine definierte Menge an H_2O_2 (18 μ M und 4,5 μ M) zugesetzt und nach einer Wartezeit von 2 min wurde die Endabsorption bei 436 nm vermessen, danach war keine weitere Änderung der Absorption zu beobachten (Reaktionsansatz: 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 10 U POX, 25°C). Analogen Ansätzen wurden unterschiedliche Mengen an α -KG zugegeben. Es zeigte sich ein deutlicher Einfluss von α -KG auf den End-Absorptionswert, er erreicht bei einer Konzentration von 50 mM nur noch ca. 70 % des Wertes ohne α -KG Zusatz. Dies zeigt, dass ca. 30 % des eingesetzten H_2O_2 durch α -KG abgefangen und nicht mehr für die Farbreaktion zur Verfügung steht, was eine Verfälschung der Messwerte in der Inhibierungsuntersuchung mit dem POX/o-Dianisidin-Assay nach sich zieht. Aufgrund dieser Ergebnisse war der Peroxidase/o-Dianisidin Standardaktivitätsassay als Messmethode ungeeignet für die Inhibierungsuntersuchung und ein alternativer Ansatz musste gefunden werden.

Um eine Aussage bezüglich einer möglichen Inhibierung durch α -KG treffen zu können, wurden Umsetzungen von 50 mM L-Glu in Gegenwart von ansteigenden Konzentrationen an α -KG durchgeführt (Reaktionsansatz: 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 200 U ml^{-1} Katalase *M. luteus*, 2 U ml^{-1} GluOX, 15°C, Zusatz von 0 mM, 50 mM und 100 mM α -KG). In den Experimenten wurde sowohl die unprozessierte als auch prozessierte Form der GluOX eingesetzt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 48 und 49 dargestellt.

In den verschiedenen Ansätzen konnte zu keinem Zeitpunkt des Experimentes ein Einfluss von α -KG auf die Umsatzraten der beiden Enzyme beobachtet werden. Für die unprozessierte sowie die prozessierte GluOX wurde mit und ohne Zusatz von α -KG nach 3 h ein hoher Umsatz von > 98 % erreicht. Die erhaltenen Werte sprechen dafür, dass weder die unprozessierte noch die prozessierte Form durch das Reaktionsprodukt α -KG in ihrer Aktivität beeinflusst bzw. gehemmt wird.

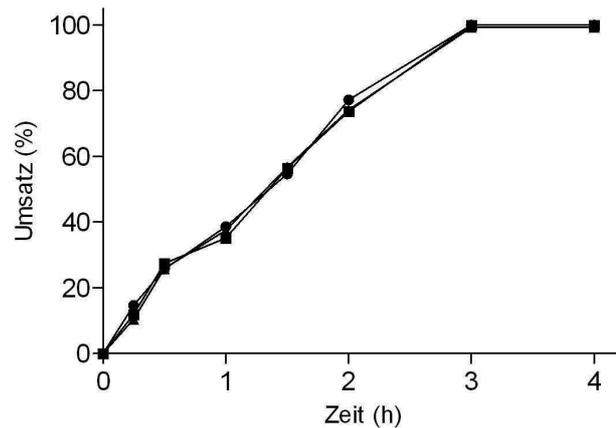


Abbildung 48: Untersuchung des Einflusses von α -KG auf die unprozessierte rek GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6; Biotransformation von 50 mM L-Glu unter Zusatz von 0 mM (\bullet), 50 mM (\blacksquare) und 100 mM (\blacktriangle) α -KG (2 U ml^{-1} GluOX, 200 U ml^{-1} Katalase, 15°C , 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 120 rpm). Mittels photometrischem Nachweis bei 260 nm wurde die Konzentration von α -KG bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α -KG bezogen auf mol eingesetztes L-Glu.

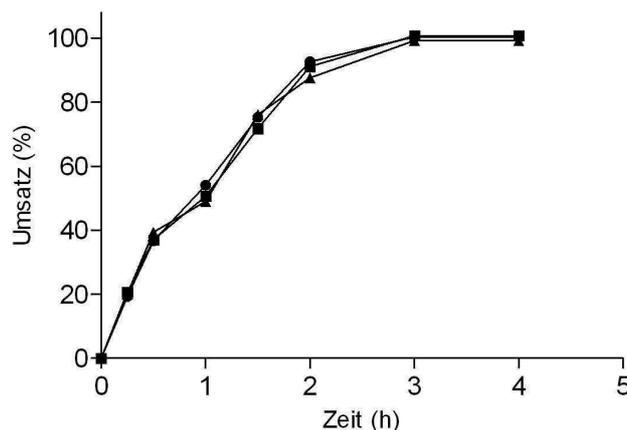


Abbildung 49: Untersuchung des Einflusses von α -KG auf die prozessierte rek. GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6; Biotransformation von 50 mM L-Glu unter Zusatz von 0 mM (\bullet), 50 mM (\blacksquare) und 100 mM (\blacktriangle) α -KG (2 U ml^{-1} GluOX, 200 U ml^{-1} Katalase, 15°C , 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 120 rpm). Mittels photometrischem Nachweis bei 260 nm wurde die Konzentration von α -KG bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α -KG bezogen auf mol eingesetztes L-Glu.

1.2.3.4.2 Untersuchung des Einflusses von Ammonium auf die GluOX

Ebenfalls wurden Experimente zur Inhibierung der GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 durch das zweite Reaktionsprodukt Ammonium durchgeführt, hierzu wurde der photometrische POX/o-Dianisidin-Assay eingesetzt. Der Einfluss von Ammonium auf die Peroxidase wurde in den entsprechenden Konzentrationen überprüft und wenn nötig korrigiert. Die Experimenten wurden sowohl für die unprozessierte als auch für die prozessierte Form der GluOX durchgeführt, es wurden ansteigende Konzentrationen an Ammonium bis zu 200 mM eingesetzt. Die Ergebnisse der Untersuchung zur Inhibierung durch Ammonium sind in den Tabelle 42 und 43 dargestellt.

Tabelle 42: Untersuchung des Einflusses von Ammonium auf die unprozessierte Form der GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 (Aktivitätsassay: 100 mM L-Glu, 0-200 mM Ammonium (NH₄Cl), 10 U POX, 15°C).

Eintrag	pH-Wert	L-Glu (mM)	Ammonium (mM)	Relative Aktivität (%)	Inhibierung (%)
1	7,0	100	0	100,0	0,0
2	7,0	100	50	82,1	17,9
3	7,0	100	100	55,0	45,0
4	7,0	100	200	22,1	77,9

Tabelle 43: Untersuchung des Einflusses von Ammonium auf die prozessierte Form der GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 (Aktivitätsassay: 100 mM L-Glu, 0-200 mM Ammonium (NH₄Cl), 10 U POX, 15°C).

Eintrag	pH-Wert	L-Glu (mM)	Ammonium (mM)	Relative Aktivität (%)	Inhibierung (%)
1	7,0	100	0	100,0	0,0
2	7,0	100	50	100,0	0,0
3	7,0	100	100	100,0	0,0
4	7,0	100	200	100,0	0,0

Es konnte ein deutlicher Unterschied der beiden Formen bezüglich der Inhibierung durch Ammonium festgestellt werden. So wird die prozessierte Form auch durch eine Konzentration an Ammonium von 200 mM in keiner Weise in ihrer Aktivität beeinflusst. Die unprozessierte Form der GluOX hingegen wird durch ansteigende Konzentrationen an Ammonium deutlich beeinflusst, so beträgt die Inhibierung bei 50 mM 17,9%, bei 100 mM 45,0 % und bei 200 mM 77,9 %.

1.2.3.4.3 Untersuchung des Einflusses von Wasserstoffperoxid auf die GluOX

Für den Einsatz von Enzymen als Katalysator in biotechnologischen Prozessen ist die Stabilität von größter Wichtigkeit, insbesondere unter den entsprechenden Reaktionsbedingungen. In der durch die GluOX katalysierten Oxidation von L-Glu zu α -KG wird nach der Reaktionsgleichung Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in äquimolaren Mengen gebildet. Es ist hinlänglich bekannt, dass H_2O_2 Enzyme inaktivieren bzw. destabilisieren kann, daher war es von Interesse, die Empfindlichkeit der GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 gegenüber dieser stark oxidierenden Verbindung zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde gereinigte homogene GluOX mit einer H_2O_2 -Konzentrationen von 5 mM inkubiert (200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 15°C und 120 rpm). Das vollständige Abreagieren von H_2O_2 wurde mittels photometrischem o-Dianisidin/Peroxidase Assay überprüft bevor die Restaktivität der GluOX photometrisch bestimmt wurde, da es sonst zu einer Verfälschung der Messwerte kommen kann. Nach einer Inkubationszeit von 3 h, konnte kein H_2O_2 mehr in der Lösung nachgewiesen werden. Als Kontrolle diente ein entsprechender Enzym Ansatz, der keinen Zusatz von H_2O_2 enthielt. Sowohl die unprozessierte als auch die prozessierte Form der GluOX reagieren empfindlich auf H_2O_2 als Nebenprodukt der Reaktion. Durch die Inkubation in Anwesenheit von 5 mM H_2O_2 wurden beide Formen der GluOX inaktiviert, wobei der Effekt bei der unprozessierten Form mit einer Inaktivierung von 35,4 % deutlich ausgeprägter auftritt, als bei der prozessierten Form, mit einer Inaktivierung von 12,0 %.

1.2.4 Einführung Immobilisierung

Im Vergleich zur Verwendung von freien Enzymen kann durch eine Immobilisierung von enzymatischen Biokatalysatoren die Abtrennung des Katalysators vom Reaktionsgemisch nach erfolgter Reaktion deutlich erleichtert werden, womit eine einfache Wiederverwendbarkeit des Biokatalysators gegeben ist und die Kosten für den Gesamtprozess deutlich gesenkt werden können. Weiterhin kann durch eine Immobilisierung die Stabilität von Enzymen unter Prozessbedingungen oft deutlich gesteigert werden. Ebenfalls bieten immobilisierte Biokatalysatoren die Möglichkeit einer kontinuierlichen Prozessführung sowie einer einfachen Produktaufreinigung. Nachteilig kann sich allerdings ein Aktivitätsverlust bzw. eine Inaktivierung des enzymatischen Biokatalysators durch den Immobilisierungsprozess auswirken sowie ein mögliches Auswaschen des Biokatalysators aus dem Immobilisat während der Reaktionsführung. Weiterhin können, in Abhängigkeit von der verwendeten Methode, Limitierungen durch Diffusionsvorgänge auftreten.

Das gebräuchlichste Verfahren zur Immobilisierung von Enzymen ist die Bindung bzw. Fixierung an feste Trägermaterialien („solid support“) [Boller et al., 2002]. Heute sind verschiedene kommerzielle Trägermaterialien für diesen Zweck verfügbar, die Immobilisierung ist schnell und einfach durchzuführen. Standardmäßig wird das Trägermaterial mit dem zu immobilisierenden Enzymen in wässrigen Puffern vermischt und nach einer gewissen Zeitspanne ist die Immobilisierung abgeschlossen. Die hierbei am häufigsten verwendete reaktive Gruppe ist die Epoxid-Gruppe, welche in der Lage ist, mit Enzymen über einen nukleophilen Angriff zu reagieren und sehr stabile C-N und C-S Bindungen auszubilden [Cantone et al., 2013; Mateo et al., 2000].

1.2.4.1 Co-Immobilisierung der GluOX und der Katalase

Die prozessierte rek. GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 und die Katalase aus *M. luteus* wurden auf dem kommerziellen Immobilisierungsträger EP113/S der Firma Resindion co-immobilisiert. Die Immobilisierung erfolgt bei diesem Träger über die Epoxid-Gruppen ohne weitere Zusätze wie z.B. Quervernetzungsreagenzien. Der Träger EP113/S besitzt laut Herstellerangabe eine Porengröße von 20 bis 50 nm sowie eine Epoxid-Gruppen Dichte von 50 $\mu\text{mol g}^{-1}$. Als Vorversuch zur Immobilisierung wurden die Stabilität der prozessierten GluOX sowie der Katalase getestet, um auszuschließen, dass beide oder eines der Enzyme durch die Durchführung oder den verwendeten Puffer bzw. den pH-Wert an Aktivität verliert. Beide Enzyme weisen eine hohe Stabilität unter den Immobilisierungsbedingungen auf. Die GluOX (prozessierte Form) lag vor der Immobilisierung in 25 mM Kpi-Puffer pH 7,4 vor. 100 mg Trägermaterial wurden mittels einer Analysewaage eingewogen und mit GluOX (0,4 mg prozessierte rek. GluOX, entsprechend 9,88 U) sowie Katalase (entsprechend 500 U) versetzt. Anschließend wurde mit 1 M Kpi Puffer pH 7,0 bis auf 500 μl aufgefüllt. Zur Immobilisierung wurde die Träger mit der Enzymlösung für 24 h bei 4°C und 120 rpm inkubiert. Nach Sedimentation wurde der Überstand abgenommen und das Trägermaterial wurde anschließend dreimal mit 5 ml 50 mM Kpi Puffer pH 7,0 gewaschen und in 200 μl Puffer resuspendiert.

Je nach Menge des zu für die Immobilisierung eingesetzten Biokatalysators ist es möglich, dass der Immobilisierungsträger EP113/S bzw. die auf der Oberfläche befindlichen Epoxid-Gruppen nicht vollständig abgesättigt worden sind. Dies bedeutet, dass ein Teil der Epoxid-Gruppen keine Bindung mit dem Enzym ausgebildet hat und für weitere Reaktionen zur Verfügung stehen. Da die Aminosäure L-Glu als Ausgangssubstrat Träger einer Aminogruppe ist, ist eine Bindung des Substrates analog der Enzymbindung hier möglich und durchaus auch zu erwarten.

Um mögliche negative Einflüsse auf die eingesetzte Substratkonzentration auszuschließen, wurden die restlichen freien Epoxid-Gruppen des Trägermaterials EP113/S daher nach der Immobilisierung mit der Aminosäure L-Gly abgesättigt. Dazu wurde das Immobilisat sedimentiert und der Überstand verworfen. Dem Immobilisat wurde L-Gly in einer Endkonzentration von 200 mM zugesetzt (in 1 M Kpi Puffer pH 7,0), anschließend wurde der Ansatz für 24 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Sedimentation des Immobilisates wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das nun abgesättigte Trägermaterial wurde zweimal mit 5 ml Puffer (25 mM Kpi pH 7,4) gewaschen, um überschüssiges und nicht gebundenes L-Gly zu entfernen. Nach der Immobilisierung wurde das Trägermaterial in 25 mM Kpi Puffer pH 7,4 bei 4°C gelagert.

Unter den gewählten Bedingungen wurden sowohl die Katalase als auch die prozessierte rek. GluOX erfolgreich immobilisiert. Die Immobilisierungsausbeute der Katalase beträgt 10,6 %, die der GluOX 23,3 % (die Berechnung der Ausbeute erfolgte auf der Aktivität des Immobilisates bezogen auf die eingesetzte Ausgangsaktivität der beiden Enzyme). Es werden 23 U GluOX sowie 529 U Katalase pro g Immobilisat (Feuchtmasse) gebunden.

1.2.5 Entwicklung Ganzzellkatalysator GluOX und Katalase

Als ein alternativer Ansatz zu der Verwendung isolierter Enzyme sollte ein Ganzzellkatalysator mit GluOX und Katalase konstruiert werden. Da die Klonierung und Expression der Katalase aus *M. luteus* nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde die Katalase HPII aus *E. coli* K12 für die Klonierung ausgewählt.

1.2.5.1 Isolierung und Klonierung des *hplI*-Gens

Für die Isolierung des *hplI*-Gens wurde eine PCR mit genomischer DNA aus *E. coli* K12 durchgeführt. Durch die verwendeten Restriktionsprimer wurden die Schnittstellen *BsaI/SacI* sowie *SacI/NotI* an den Enden angefügt. Nach Restriktion mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wurde das *hplI*-Gen in die zweite MCS des Expressionsvektors pACYC kloniert (pACHPIIa *BsaI/SacI* und pACHPIIb *SacI/NotI*). Anschließend erfolgte die Transformation in kompetente *E. coli* DH5 α Zellen. Die auf LB Platten (34 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Chloramphenicol) gewachsenen Kolonien wurden in Flüssigmedium kultiviert, die Vektoren isoliert und mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung auf die korrekte Ligation des *hplI*-Gens hin überprüft. Anschließend wurden die Vektoren pACHPIIa und pACHPIIb in den *E. coli* Expressionsstamm BL21 (DE3) transformiert. Die Expression wurde in Expressions-Medium bei 22°C für 24 h durchgeführt.

Nach Induktion (0,5 mM IPTG) der Enzymexpression wurde für weitere 24 h bei 22°C kultiviert. Nach Zellaufschluss wurden die geklärten Rohextrakte auf die Aktivität der Katalase hin untersucht, siehe auch Tabelle 44. In diesem Vorversuch zeigte es sich, dass die Klonierung über die *Bsal/SacI* Schnittstellen eine deutlich höhere Produktion an rekombinanter Katalase mit sich brachte, so beträgt die spezifische Aktivität der Katalase im Rohextrakt hier 135,3 U mg⁻¹. Die Klonierung über die *SacI/NotI* Schnittstellen erbrachte im *E. coli* Rohextrakt eine deutlich niedrigere spezifische Aktivität von 2,6 U mg⁻¹.

Tabelle 44: Aktivitäten der Katalase HPII im *E. coli* BL21(DE3) Rohextrakt nach Zellaufschluss (Aktivitätsassay, 3 mM H₂O₂, 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 15°C).

Vektor	Volumenaktivität (U ml ⁻¹)	Proteingehalt (mg ml ⁻¹)	Spez. Aktivität (U mg ⁻¹)
pACHPIIa	2083	15,4	135,3
pACHPIIb	33,3	12,6	2,6

1.2.5.2 Konstruktion Ganzzellkatalysator GluOX und Katalase

Der Vektor pACHPIIa wurde zusammen mit dem Vektor pHISGLOX (*gluox* aus *Streptomyces* sp. X-119-6 in pet28a) in den Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert und für die weiteren Arbeiten als Ganzzellkatalysator *E. coli* BL21(DE3)/pACHPIIa/pHISGLOX bezeichnet. Die Kultivierung des Ganzzellkatalysators wurde in Expressions-Medium bei 22°C für 24 h durchgeführt. Nach Induktion (0,5 mM IPTG) der Genexpression wurde für weitere 24 h bei 22°C kultiviert. Nach Ernte und Aufschluss der Zellen (25 % Zellsuspension) wurde der geklärte Rohextrakt auf die Aktivität der GluOX und der Katalase hin untersucht. Um ein Stören bei der Aktivitätsbestimmung der GluOX durch die Katalase im Rohextrakt mittels o-Dianisidin Assay auszuschließen, wurde die Peroxidase (POX) in hohem Überschuss (50 U ml⁻¹) zugesetzt. Die benötigte Menge an POX wurde im Vorfeld experimentell ermittelt, indem dem Reaktionsansatz zur Aktivitätsmessung der GluOX-Aktivität neben einer festen Menge an H₂O₂ auch Katalase (*E. coli* BL21(DE3)/pACHPIIa/pHISGLOX Rohextrakt in Verdünnung) und steigende Konzentrationen an POX (bis zu 50 U) zugefügt wurden. Im Vergleich zu einem Kontrollansatz ohne Zugabe von Katalase (also nur mit POX und H₂O₂), konnte festgestellt werden, ab welcher POX-Menge die Katalase nicht mehr stört. Die Aktivitäten der GluOX und der Katalase im Zellrohextrakt sind in der Tabelle 45 dargestellt.

Unter den gewählten Expressionsbedingungen werden sowohl die GluOX als auch die Katalase HP11 mit ca. 200 Units GluOX und ca. 10700 Units Katalase pro g Bakterienfeuchtmasse in hohem Maße rekombinant gebildet.

Tabelle 45: Volumen- und spez. Aktivitäten der GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 und der Katalase HP11 im Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)/pACHP11a/pHISGLOX-Zellen (Aktivitätsassay Katalase: 3 mM H₂O₂, 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 15°C; Aktivitätsassay GluOX: 50 mM L-Glu, 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 50 U ml⁻¹ POX, 15°C).

Enzym	Vol.-Aktivität (U ml ⁻¹)	Spez. Aktivität (U mg ⁻¹)
GluOX	51	3
Katalase HP11	2683	157

Eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde zur Expressionskontrolle durchgeführt. Das SDS-Gel (Abbildung 50) zeigt die GluOX in ihrer unprozessierten Form mit Untereinheiten von ca. 77 kDa sowie die Katalase HP11 mit Untereinheit von ca. 84 kDa (Anmerkung: Der verwendete Protein-Standard lief im Gel anscheinend nicht optimal, so dass die kDa Angabe des Herstellers nicht genau zutrifft). Beide Enzyme werden in *E. coli* BL21 (DE3) in einem hohem Maße rekombinant gebildet.

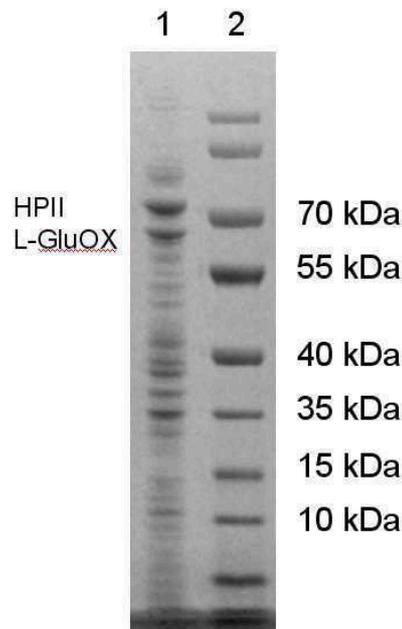


Abbildung 50: SDS-PAGE Spur 1: Prestained Protein Standard Fermentas, Spur 2: Rohextrakt Ganzzellkatalysator *E. coli* BL21(DE3)/pACHP11-a/pHISGLOX.

1.2.6 Darstellung von α -KG mittels GluOX

1.2.6.1 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz der isolierten rekombinanten GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6

Die einleitende Biotransformation wurde mit Hilfe der rek. gereinigten GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 als isoliertes Enzym durchgeführt. Es wurde die gereinigte GluOX vor der proteolytischen Prozessierung mittels Pronase eingesetzt (unprozessierte Form). Die Reaktion wurde als batch-Umsetzung unter Schütteln bei 120 rpm durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wurde das Reaktionsgefäß geöffnet, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Proben wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen und mittels Photometer und $^1\text{H-NMR}$ analysiert. Der zeitliche Verlauf der Produktausbeute (Substrat-bezogene Produktausbeute) der Biotransformation ist in Abbildung 51 dargestellt. Mittels $^1\text{H-NMR}$ wurde nach einer Reaktionszeit von 5 h für die Biotransformation ein vollständiger Umsatz (100 %) nachgewiesen, allerdings lag die Produktausbeute (mol gebildetes Produkt pro mol eingesetztes Substrat) nur bei 69,0 % des maximal erreichbaren Wertes, was einem Verlust von 31,0 % Ketosäure entspricht. Die Raum-Zeit-Ausbeute der Reaktion beträgt $2,0 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (die Raum-Zeit-Ausbeute bezieht sich auf die Gesamtdauer der Biotransformation). Überraschenderweise konnte in der $^1\text{H-NMR}$ Messung kein sekundäres Reaktionsprodukt bzw. ein mögliches Zerfallsprodukt von α -KG nachgewiesen werden.

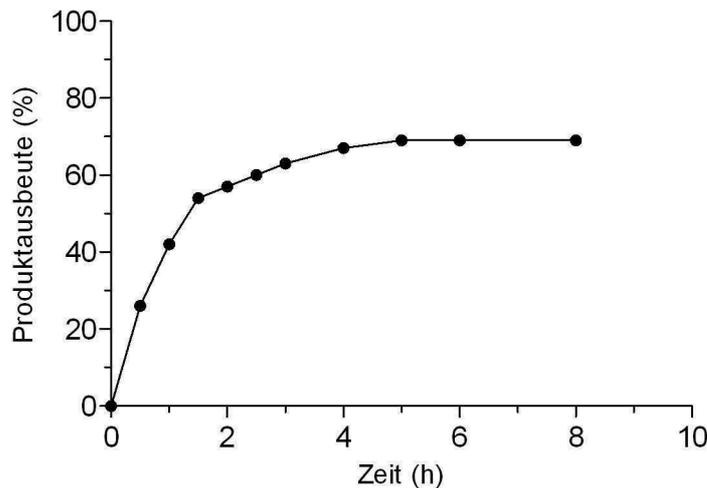
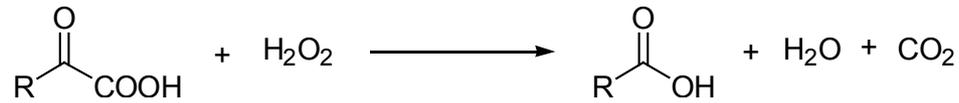


Abbildung 51: Biotransformation von 100 mM L-Glu mit unprozessierter GluOX ohne den Zusatz von Katalase (2 U ml^{-1} unprozessierte GluOX, 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 120 rpm, 15°C). Mittels photometrischem Nachweis bei 260 nm wurde die Konzentration von α -KG bestimmt, mittels $^1\text{H-NMR}$ wurden die Endkonzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Die Produktausbeute bezieht sich auf mol gebildetes α -KG bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge an L-Glu.

1.2.6.2 Untersuchung der Stabilität und Decarboxylierung von α -KG

Es ist bekannt, dass α -Ketosäuren in Gegenwart von Wasserstoffperoxid wenig stabil sind und zu Decarboxylierungsreaktionen neigen (Schema 14) [Findrik et al. 2005, Trost and Fischer 2002, Fernandez-Lafuente et al. 1998, Upadhya et al. 1999].



Schema 14: Decarboxylierung von α -Ketosäuren in Gegenwart von Wasserstoffperoxid.

In der vorab beschriebenen Biotransformation unter Verwendung von GluOX wurde kein System zur *in situ*-Eliminierung von H_2O_2 eingesetzt. Anscheinend geht der deutliche Verlust an α -KG auf eine Reaktion mit H_2O_2 zurück, daher war es von Interesse, die Stabilität des Zielproduktes unter Reaktionsbedingungen und die Empfindlichkeit gegenüber dem Nebenprodukt H_2O_2 zu untersuchen.

Dazu wurde α -KG unter den Bedingungen der Biotransformation inkubiert (100 mM α -KG, 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 15°C, 120 rpm). In bestimmten Zeitabständen wurden Proben entnommen und mittels ^1H -NMR analysiert. Die Ketosäure α -KG weist eine hohe Stabilität unter den Reaktionsbedingungen im Untersuchungszeitraum (24 h) auf, mittels ^1H -NMR konnte weder eine Abnahme der Konzentration (Abbildung 52) noch ein mögliches Abbauprodukt nachgewiesen werden.

Ein Versuch zur gezielten Nebenproduktbildung bzw. Decarboxylierung von α -KG durch die Reaktion mit H_2O_2 wurde durchgeführt, indem der α -KG-Lösung aus der Stabilitätsuntersuchung nach der letzten Messung (24 h) zusätzlich H_2O_2 in einer Endkonzentration von 25 mM zugegeben wurde. Hierdurch sollte der Umsatz einer Biotransformation ohne Katalase Zusatz simuliert werden sollte.

Nach weiterer Inkubation für 24 h, wurde eine Probe entnommen und mittels ^1H -NMR analysiert. Eine Kontrolle mittels o-Dianisidin-Assay zeigte, dass das H_2O_2 vollständig abreagiert war und nicht mehr in der Lösung vorlag. Bei der Analyse der Probe konnte eine Abnahme von α -KG um ca. 25 % nachgewiesen werden, wobei allerdings kein Signal für ein mögliches Abbau- bzw. Nebenprodukt (wie z.B. Bernsteinsäure für die Decarboxylierung von α -KG) im ^1H -NMR Spektrum auftrat bzw. nachzuweisen war.

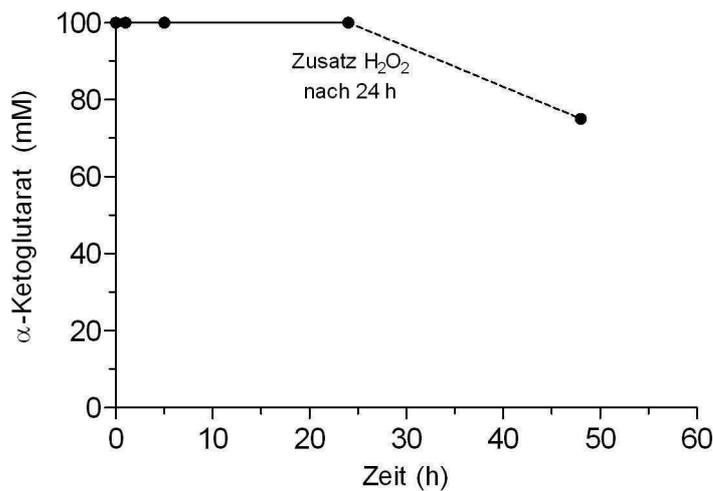
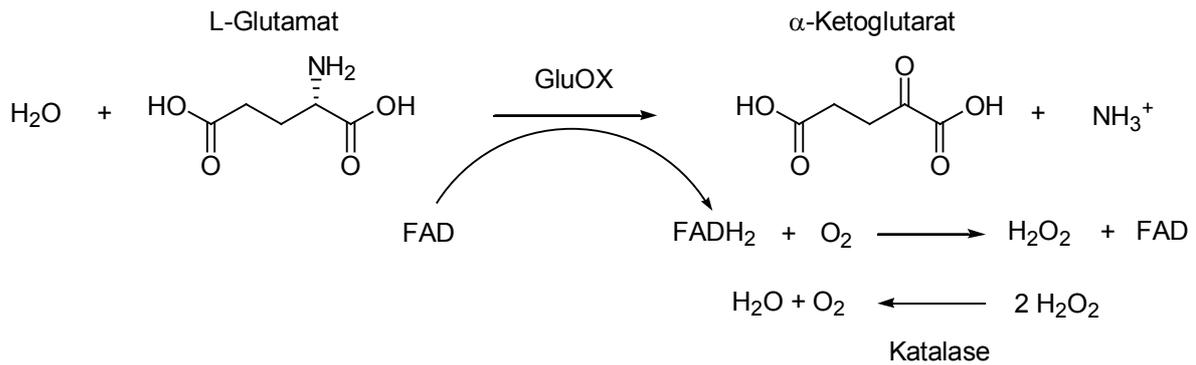


Abbildung 52: Stabilität und gezielte Decarboxylierung von α -KG (100 mM) unter Biotransformationsbedingungen bzw. unter Zusatz von H_2O_2 (25 mM nach 24 h, gestrichelte Linie), (200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 120 rpm, 15°C). Mittels $^1\text{H-NMR}$ wurde die Konzentration von α -KG bestimmt.

1.2.7 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz der GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 unter *in situ*-Eliminierung von H_2O_2 mittels der Katalase aus *M. luteus*

Es ist bekannt, dass enzymatische Biokatalysatoren durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in ihrer Aktivität sowie Stabilität negativ beeinflusst werden können [Findrik und Vasić-Rački 2008, Szwajcer et al. 1982], dies wurde im Verlauf dieser Arbeit auch für beide Formen der GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 nachgewiesen.

Um zum einen die unerwünschte Nebenreaktion von α -KG und H_2O_2 sowie zum anderen eine Inaktivierung der beteiligten Biokatalysatoren auszuschließen, sollte das Enzym Katalase zum *in situ*-Abbau von H_2O_2 eingesetzt werden. Katalase (E.C. 1.11.1.6) katalysiert die irreversible Reaktion von H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff [Chelikani et al. 2003]. Eine der heute am besten untersuchten und charakterisierten Katalasen stammt aus *Micrococcus luteus* (auch als *Micrococcus lysodeikticus* bezeichnet). Diese kommerziell verfügbare Katalase weist eine exzellente Stabilität, einen breiten pH-Aktivitätsbereich sowie eine hohe spezifische Aktivität auf [Few et al., 1957; Switala und Loewen, 2002; Trost und Fischer, 2002]. Die Katalase aus *M. luteus* wurde als geeignetes Enzym für den *in situ*-Abbau von H_2O_2 in der Biotransformation von L-Glu mittels GluOX ausgewählt. Die Kopplung der GluOX und der Katalase als System zum *in situ*-Abbau von H_2O_2 ist im Schema 15 dargestellt.



Schema 15: Biotransformation von L-Glu mit der GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 und der Katalase aus *M. luteus* zum *in situ*-Abbau von H₂O₂.

1.2.7.1 Vorversuche zur Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz der GluOX *Streptomyces* sp. X-119-6

1.2.7.1.1 Bestimmung des pH-Optimums der Katalase aus *M. luteus*

Zur Bestimmung des pH-Optimums der Katalase aus *M. luteus* wurde die Aktivität im pH-Bereich von 6,0 bis 9,0 vermessen. Es wurde der Standardaktivitätsassay mit 2,9 mM H₂O₂ genutzt, der pH Wert wurde von 6,0 bis 9,0 unter Verwendung der aufgeführten Puffern variiert. Aus der Abbildung 53 ergibt sich kein klares pH-Optimum für die Katalase aus *M. luteus*. Die Katalase weist einen breiten pH-Aktivitätsbereich auf, mit annähernd der gleichen spezifischen Aktivität von pH 6,0 bis pH 9,0, was den Literaturdaten entspricht [Switala et al., 2002; Nadler et al., 1985].

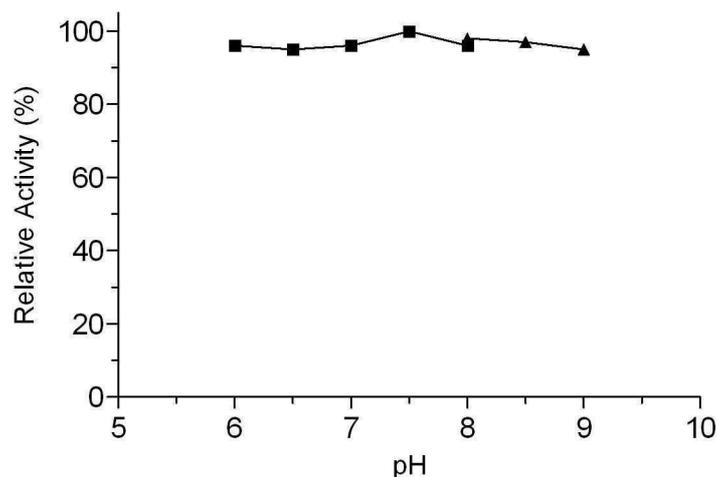


Abbildung 53: pH-Optimum der Katalase aus *M. luteus*. Die Enzymaktivität wurde in folgenden 50 mM Puffern bestimmt: (■) Kpi Puffer, pH 6,0-8,0; (▲) Tris-HCl, pH 8,0-9,0, (Aktivitätsassay: 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 2,9 mM H₂O₂, 15°C).

1.2.7.1.2 Ermittlung eines gemeinsamen pH-Wertes für die Biotransformation

Ziel war das Auffinden eines gemeinsamen pH-Wertes für die Biotransformation, bei dem die beide Formen der GluOX sowie die Katalase eine möglichst hohe Aktivität aufweisen. Aus der Untersuchung ergab sich ein optimaler pH-Bereich von pH 7,0 bis pH 7,5 für die oxidative Desaminierung von L-Glu durch die prozessierte und unprozessierte Form der GluOX, die Katalase weist einen breiten pH-Aktivitätsbereich auf, mit annähernd der gleichen spezifischen Aktivität von pH 6,0 bis pH 9,0. Ein pH-Wert von 7,0 für die Biotransformation wurde als optimal ausgewählt.

1.2.7.1.3 Prozessstabilität der beiden Formen der GluOX sowie der Katalase

Um eine mögliche Inaktivierung der beiden Formen der GluOX sowie der Katalase während der Biotransformation auszuschließen, wurde die Stabilität der Enzyme unter den gewählten Bedingungen der Biotransformation untersucht. Hierzu wurden die Enzyme für 48 h bei 15°C und 120 rpm in 200 mM Kpi Puffer pH 7,0 inkubiert und in regelmäßigen Abständen auf ihre Aktivität hin untersucht. Im untersuchten Zeitraum konnte für keines der Enzyme eine Inaktivierung festgestellt werden. Somit können die unprozessierte und die prozessierte GluOX sowie die Katalase als sehr stabil unter den gewählten Bedingungen der Biotransformation charakterisiert werden.

1.2.7.1.4 Ermittlung des optimalen Verhältnisses an GluOX und Katalase

Um das optimale Enzymverhältnis für die Protektion der Ketosäure vor der unerwünschten Nebenreaktion mit H₂O₂ zu ermitteln, wurden Biotransformationen mit verschiedenen Verhältnissen an Katalase zu GluOX (U Katalase / U GluOX) durchgeführt. Es wurde die gereinigte GluOX vor der proteolytischen Prozessierung sowie die kommerzielle Katalase aus *M. luteus* eingesetzt. Die Ansätze enthielten neben den beiden Enzymen 100 mM L-Glu in 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, Gesamtvolumen 3 ml. Die Reaktionstemperatur betrug 15°C, die Reaktion wurde als batch-Umsetzung unter Schütteln bei 120 rpm durchgeführt. Proben wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen, durch Ultrafiltration (10 kDa) aufgearbeitet und mittels ¹H-NMR analysiert.

Die zeitlichen Verläufe der Produktausbeuten (Substrat-bezogene Produktausbeute) in den Biotransformationen mit unterschiedlichen Verhältnissen an Katalase zu GluOX sind in der Abbildung 54 dargestellt.

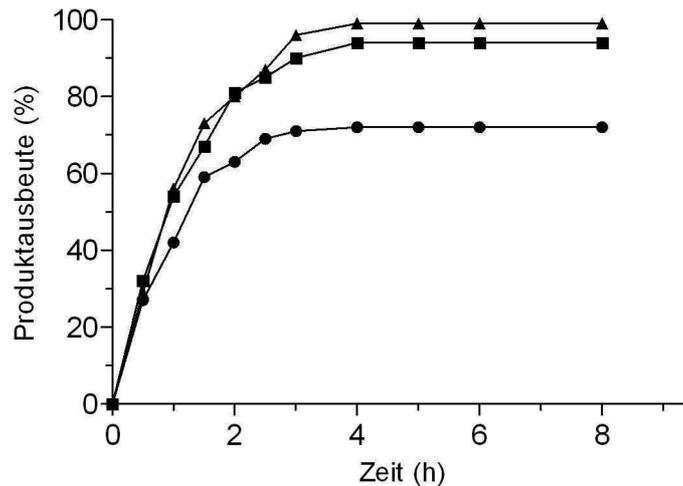


Abbildung 54: Biotransformation von 100 mM L-Glu mit unterschiedlichen Verhältnissen an Katalase zu GluOX (GluOX unprozessiert: 2 U ml⁻¹ in allen Ansätzen, Katalase: 2 U ml⁻¹ (—●—), 20 U ml⁻¹ (—■—) und 200 U ml⁻¹ (—▲—); 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 120 rpm, 15°C). Mittels photometrischem Nachweis bei 260 nm wurde die Konzentration von α -KG bestimmt, mittels ¹H-NMR wurden die Endkonzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Die Produktausbeute bezieht sich auf mol gebildetes α -KG bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge an L-Glu.

Bei den Biotransformationen zeigte es sich, dass die Katalase in hohem Überschuss eingesetzt werden muss, um einen Verlust von α -KG durch die Nebenreaktion mit H₂O₂ zu verhindern. So reichte der Einsatz von einem ausgeglichenen Aktivitäts-Verhältnis nicht aus, um den Produktverlust zu verhindern. Es wurde ein vollständiger Umsatz von L-Glu mittels ¹H-NMR-Untersuchung nachgewiesen, allerdings lag die Produktausbeute an α -KG bei maximal 71,8 %, was im Vergleich zur Biotransformation ohne Zusatz von Katalase keine signifikante Steigerung bedeutet.

Eine weitere Erhöhung der eingesetzten Units an Katalase bzw. des Verhältnisses an Katalase zu GluOX erbrachte jedoch eine deutliche Steigerung der Ketosäureausbeute. So liegt die Produktausbeute nach vollständigem L-Glu Umsatz bei einem GluOX/Katalase Verhältnis von 1/10 bei 93,8 % und bei 1/100 bei 98,3 %. Durch die Erhöhung der Produktausbeute konnte ebenfalls die Raum-Zeit-Ausbeute (die Raum-Zeit-Ausbeute bezieht sich auf die Gesamtdauer der Biotransformation) um 80 % auf 3,6 g l⁻¹ h⁻¹ gesteigert werden.

Die Biotransformationen von 100 mM L-Glu unter Einsatz der prozessierten Form wurde ebenfalls mit dem ermittelten optimalen Verhältnis an Katalase zu GluOX durchgeführt (Abb. 55). Nach 4 h wurde ein vollständiger Umsatz erreicht, mit einer Produktausbeute von 98,4 %, was einer Raum-Zeit-Ausbeute von $3,6 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ entspricht, bezogen auf die Gesamtdauer der Biotransformation.

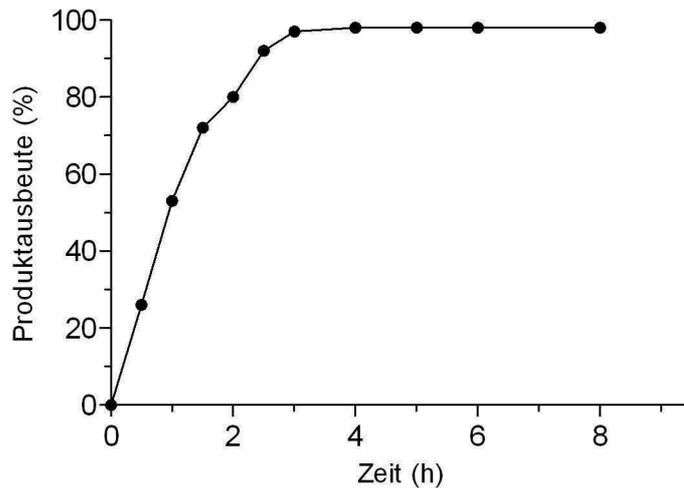


Abbildung 55: Biotransformation von 100 mM L-Glu mit dem ermittelten optimalen Verhältnis an Katalase zu GluOX (GluOX prozessiert 2 U ml^{-1} , Katalase 200 U ml^{-1} , 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 120 rpm, 15°C). Mittels photometrischem Nachweis bei 260 nm wurde die Konzentration von α -KG bestimmt, mittels $^1\text{H-NMR}$ wurden die Endkonzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Die Produktausbeute bezieht sich auf mol gebildetes α -KG bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge an L-Glu.

1.2.7.2 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz der GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 unter *in situ*-Eliminierung von H_2O_2 mittels der Katalase aus *M. luteus* - Erhöhung der Substratkonzentration

Weitere Biotransformationen mit L-Glu Konzentrationen von 50 bis 500 mM wurden durchgeführt. Dabei wurden sowohl die prozessierte als auch die unprozessierte GluOX eingesetzt. Wie in den Tabellen 46 und 47 gezeigt ist, konnten alle eingesetzten Konzentrationen an L-Glu mit hervorragenden Produktausbeuten und Raum-Zeit-Ausbeuten umgesetzt werden. Bezogen auf die eingesetzte Menge an L-Glu werden jedoch bei vollständigem Substratumsatz keine 100 % Produktausbeute erhalten, auch bei Einsatz von sehr hohen Mengen an Katalase kommt es in geringem Maße zu einer unerwünschten Nebenreaktion von α -KG mit dem Reaktionsnebenprodukt H_2O_2 , allerdings ist der Verlust an Produkt mit 0,6-5,5 % relativ gering. Analog zu den Versuchen zur gezielten Nebenproduktbildung bzw. Decarboxylierung von α -KG konnte kein Nebenprodukt der Reaktion mit H_2O_2 nachgewiesen werden.

Tabelle 46: Biotransformation von L-Glu mit der rek. unprozessierten GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 unter Zusatz von Katalase aus *M. luteus* zur *in situ*-Eliminierung von H_2O_2 (GluOX 2 U ml^{-1} , Katalase 200 U ml^{-1} , in 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 120 rpm , 15°C). Mittels photometrischem Nachweis bei 260 nm wurde die Konzentration von α -KG bestimmt (¹), mittels ¹H-NMR wurden die Endkonzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt (²). Die Produktausbeute bezieht sich auf mol gebildetes α -KG bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge an L-Glu. Die Raum-Zeit-Ausbeute bezieht sich auf die Gesamtdauer der Biotransformation.

Eintrag	L-Glu (mM)	Produktausbeute (%)	Zeit (h)	Raum-Zeit-Ausbeute ($\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	α -KG (g l^{-1})
1	50 ^{1,2}	99,4	3	2,4	7,2
2	100 ^{1,2}	98,3	4	3,6	14,3
3	200 ^{1,2}	94,5	12	2,3	27,6
4	500 ¹	94,6	51	1,4	69,1

Tabelle 47: Biotransformation von L-Glu mit der rek. prozessierten GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 unter Zusatz von Katalase aus *M. luteus* zur *in situ*-Eliminierung von H_2O_2 (GluOX 2 U ml^{-1} , Katalase 200 U ml^{-1} , in 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 120 rpm , 15°C). Mittels photometrischem Nachweis bei 260 nm wurde die Konzentration von α -KG bestimmt (¹), mittels ¹H-NMR wurden die Endkonzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt (²). Die Produktausbeute bezieht sich auf mol gebildetes α -KG bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge an L-Glu. Die Raum-Zeit-Ausbeute bezieht sich auf die Gesamtdauer der Biotransformation.

Eintrag	L-Glu (mM)	Produktausbeute (%)	Zeit (h)	Raum-Zeit-Ausbeute ($\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	α -KG (g l^{-1})
1	50 ^{1,2}	99,0	3	2,4	7,2
2	100 ^{1,2}	98,4	4	3,6	14,3
3	200 ^{1,2}	94,7	12	2,3	27,7
4	500 ¹	94,8	51	1,4	69,3

Die zeitlichen Verläufe der Produktausbeuten (Substrat-bezogene Produktausbeute) in den Biotransformationen sind in den Abbildung 56 bis 61 dargestellt.

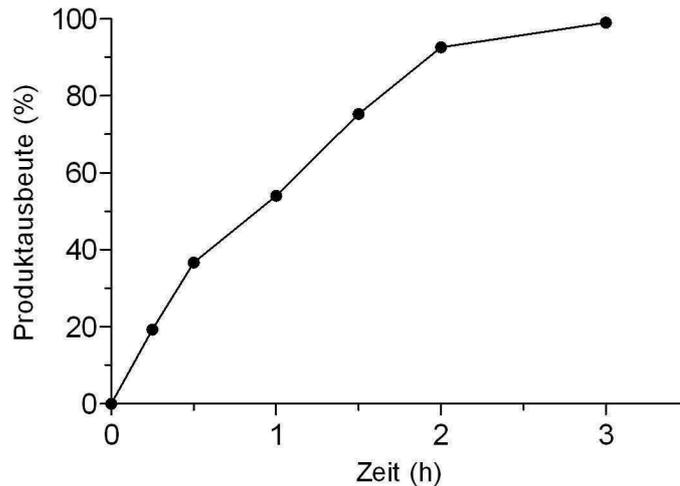


Abbildung 56: Biotransformation von 50 mM L-Glu mit der unprozessierten GluOX unter Zusatz von Katalase zur *in situ*-Eliminierung von H_2O_2 (GluOX 2 U ml^{-1} , Katalase 200 U ml^{-1} , in 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 120 rpm, 15°C). Mittels photometrischem Nachweis bei 260 nm wurde die Konzentration von α -KG bestimmt, mittels $^1\text{H-NMR}$ wurden die Endkonzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Die Produktausbeute bezieht sich auf mol gebildetes α -KG bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge an L-Glu.

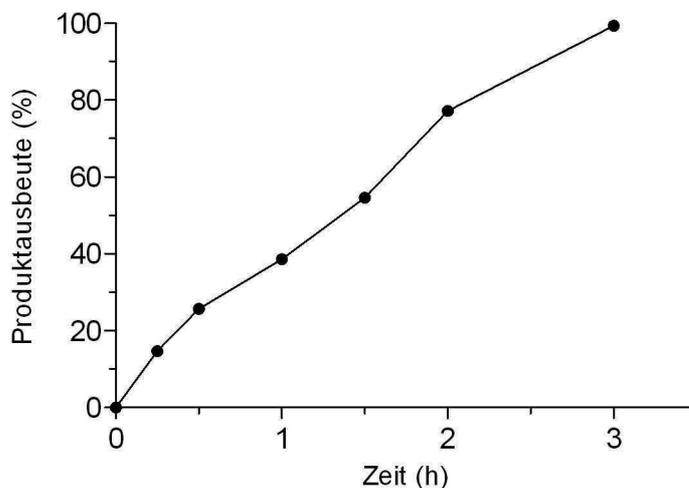


Abbildung 57: Biotransformation von 50 mM L-Glu mit der prozessierten GluOX unter Zusatz von Katalase zur *in situ*-Eliminierung von H_2O_2 (GluOX 2 U ml^{-1} , Katalase 200 U ml^{-1} , in 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 120 rpm, 15°C). Mittels photometrischem Nachweis bei 260 nm wurde die Konzentration von α -KG bestimmt, mittels $^1\text{H-NMR}$ wurden die Endkonzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Die Produktausbeute bezieht sich auf mol gebildetes α -KG bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge an L-Glu.

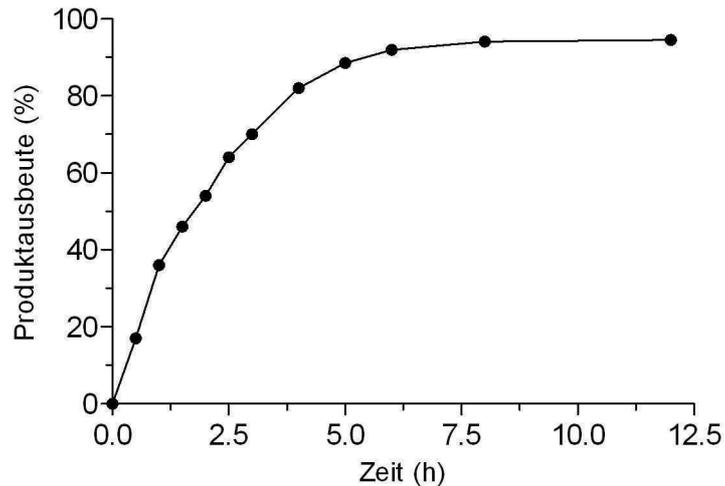


Abbildung 58: Biotransformation von 200 mM L-Glu mit der unprozessierten GluOX unter Zusatz von Katalase zur *in situ*-Eliminierung von H_2O_2 (GluOX 2 U ml^{-1} , Katalase 200 U ml^{-1} , in 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 120 rpm, 15°C). Mittels photometrischem Nachweis bei 260 nm wurde die Konzentration von α -KG bestimmt, mittels $^1\text{H-NMR}$ wurden die Endkonzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Die Produktausbeute bezieht sich auf mol gebildetes α -KG bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge an L-Glu.

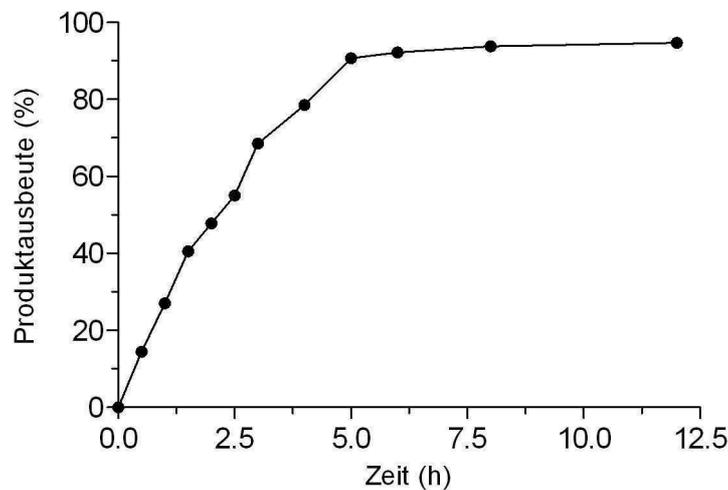


Abbildung 59: Biotransformation von 200 mM L-Glu mit der prozessierten GluOX unter Zusatz von Katalase zur *in situ*-Eliminierung von H_2O_2 (GluOX 2 U ml^{-1} , Katalase 200 U ml^{-1} , in 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 120 rpm, 15°C). Mittels photometrischem Nachweis bei 260 nm wurde die Konzentration von α -KG bestimmt, mittels $^1\text{H-NMR}$ wurden die Endkonzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Die Produktausbeute bezieht sich auf mol gebildetes α -KG bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge an L-Glu.

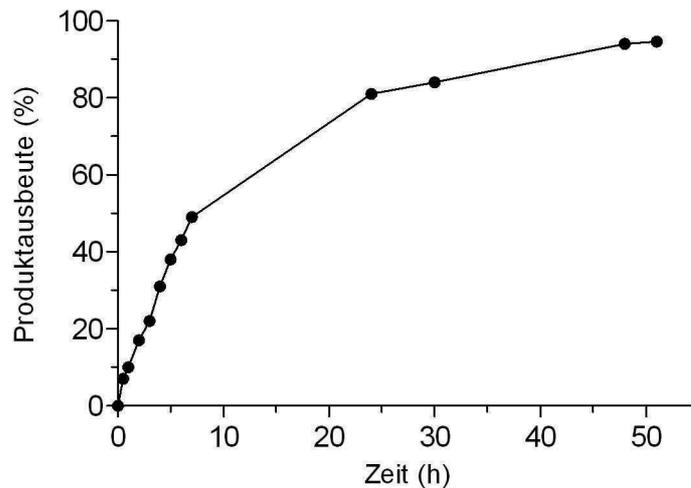


Abbildung 60: Biotransformation von 500 mM L-Glu mit der unprozessierten GluOX unter Zusatz von Katalase zur *in situ*-Eliminierung von H_2O_2 (GluOX 2 U ml^{-1} , Katalase 200 U ml^{-1} , in 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 120 rpm, 15°C). Mittels photometrischem Nachweis bei 260 nm wurde die Konzentration von α -KG bestimmt. Die Produktausbeute bezieht sich auf mol gebildetes α -KG bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge an L-Glu.

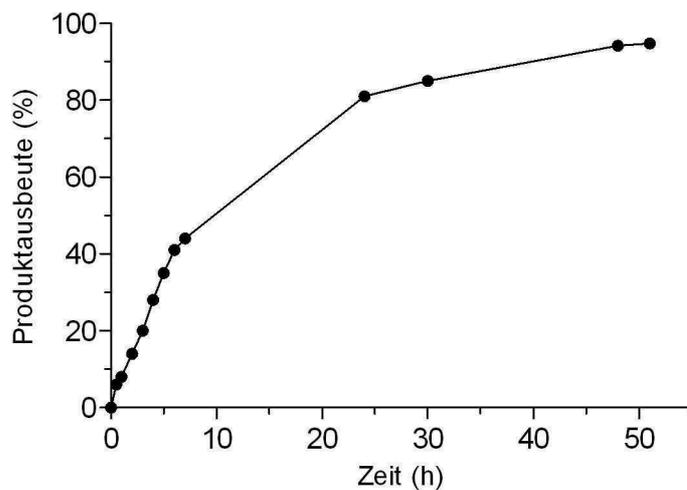


Abbildung 61: Biotransformation von 500 mM L-Glu mit der prozessierten GluOX unter Zusatz von Katalase zur *in situ*-Eliminierung von H_2O_2 (GluOX 2 U ml^{-1} , Katalase 200 U ml^{-1} , in 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 120 rpm, 15°C). Mittels photometrischem Nachweis bei 260 nm wurde die Konzentration von α -KG bestimmt. Die Produktausbeute bezieht sich auf mol gebildetes α -KG bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge an L-Glu.

1.2.8 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz des GluOX/Katalase-Immobilisates

Um die Einsatzfähigkeit, die Wiederverwendbarkeit sowie die Stabilität des GluOX/Katalase-Immobilisates unter Reaktionsbedingungen zu testen, wurden der Träger in mehreren Biotransformations-Zyklen unter Standardbedingungen eingesetzt. Die Ansätze enthielten jeweils 90 mg Immobilisat (dies entspricht einer GluOX Aktivität von 2,1 U bzw. einer Katalase Aktivität von 47,6 U) bei einem Gesamtvolumen von 5 ml, (Reaktionsansatz 50 mM L-Glu, 200 mM Kpi Puffer pH 7,0). Die Reaktionstemperatur betrug 15°C, die Biotransformation wurde als repetitive-batch-Umsetzung unter Schütteln bei 120 rpm durchgeführt. Proben wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen und analysiert. Nach vollständigem Umsatz von L-Glu wurde die Reaktionslösung vom Immobilisat getrennt, dieses wurde einmalig mit Puffer (25 mM Kpi Puffer pH 7,4) gewaschen und ein neuer Reaktionszyklus wurde durch Zugabe von Substrat und Puffer gestartet. Die Ergebnisse der durchgeführten repetitive-batch Biotransformation sind in der Abbildung 62 und der Tabelle 48 dargestellt.

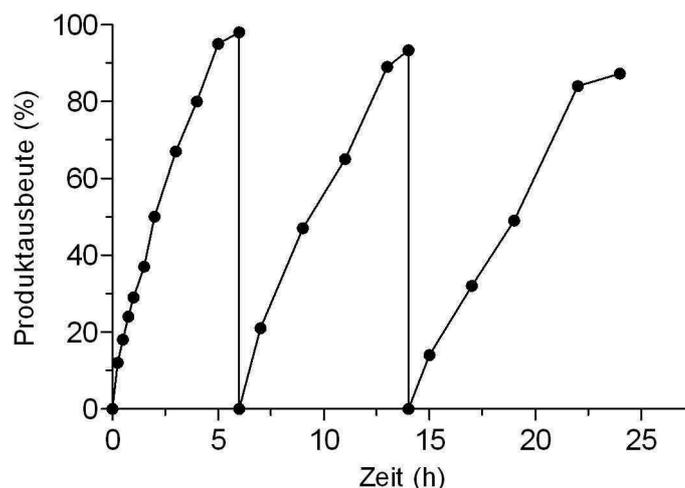


Abbildung 62: Repetitive-batch-Biotransformation von 50 mM L-Glu unter Verwendung des EP113/S GluOX/Katalase-Immobilisates (18 mg Immobilisat ml⁻¹ (Aktivität: 2,3 U GluOX und 52,9 U Katalase pro 100 mg Immobilisat (Feuchtmasse)), 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 120 rpm, 15°C). Mittels photometrischem Nachweis bei 260 nm wurde die Konzentration von α -KG bestimmt, mittels ¹H-NMR wurden die Endkonzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Die Produktausbeute bezieht sich auf mol gebildetes α -KG bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge an L-Glu.

In jedem der drei Biotransformations-Zyklen werden hohe Substrat-bezogene Produktausbeuten bei vollständigem Umsatz von L-Glu erreicht, jedoch ist eine leichte Abnahme von 98,1 % im ersten Zyklus auf 95,5 % im zweiten und 87,3 % im dritten Zyklus zu beobachten. Ebenfalls verlängert sich die Zeit, die für einen vollständigen Umsatz benötigt wird.

Die Daten zeigen, dass das hergestellte GluOX/Katalase-Immobilisat für eine Vielzahl von Biotransformations-Zyklen einsetzbar ist, auch wenn die Produktausbeute mit steigender Zyklenzahl leicht abnimmt und sich die Reaktionszeit verlängert.

Tabelle 48: Biotransformation von 50 mM L-Glu unter Verwendung des EP113/S GluOX/Katalase-Immobilisates (18 mg Immobilisat ml⁻¹, 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 120 rpm, 15°C). Mittels ¹H-NMR wurden die Endkonzentrationen von L-Glu und α-KG bestimmt. Die Produktausbeute bezieht sich auf mol gebildetes α-KG bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge an L-Glu. Die Raum-Zeit-Ausbeute bezieht sich auf die Gesamtdauer der Biotransformation.

Eintrag	Zyklus	Umsatz/ Produktausbeute (%)	Zeit (h)	Raum-Zeit-Ausbeute (g l ⁻¹ h ⁻¹)	α-KG (g l ⁻¹)
1	1	100 / 98,1	6	1,2	7,2
2	2	100 / 95,5	8	0,9	7,0
3	3	100 / 87,3	10	0,6	6,4

1.2.9 Darstellung von α-KG aus L-Glu durch den Einsatz des GluOX/Katalase Ganzzellkatalysators

Der konstruierte Ganzzellkatalysator *E. coli* BL21(DE3)/pACHPII-a/pHISGLOX wurde in der Biotransformation von 50 mM L-Glu eingesetzt. Um den möglicherweise limitierenden Transport von Substrat und Produkt in und aus der Zelle bei Ganzzellumsetzungen zu erleichtern, wurden ein Teil der Zellen vor den Biotransformationen mit Toluol (1 %) permeabilisiert. Zum Vergleich wurden die nicht permeabilisierten sowie die mit Toluol permeabilisierten Zellen unter ansonsten gleichen Bedingungen eingesetzt. In der Biotransformation wurde eine Zellkonzentration von 12,5 mg ml⁻¹ genutzt, was unter den Bedingungen der Biotransformation einer GluOX-Aktivität von 2,5 U ml⁻¹ bzw. einer Katalase-Aktivität von 133,8 U ml⁻¹ entspricht (Aktivität Zellrohextrakt). Es wurden Zellen verwendet, die nach der Kultivierung und Expression zur Lagerung einmalig bei -18°C als Zellpellet gefroren wurden. Die Ganzzellbiokatalysatoren wurden in Puffer (25 mM Kpi Puffer pH 7,4) resuspendiert und die entsprechende Menge an Zellsuspension der Reaktionslösung zugesetzt. Die Reaktion wurde als batch-Umsetzung unter Schütteln bei 120 rpm durchgeführt (200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 15°C). In regelmäßigen Abständen wurde das Reaktionsgefäß geöffnet, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Um ein mögliches Zellwachstum während der Biotransformation zu verhindern und die Zelle als ruhenden Biokatalysator zu nutzen, wurde Gentamycin (20 µg ml⁻¹) zugesetzt. Als Kontrolle wurde die Biotransformation analog mit *E. coli* BL21(DE3)-Zellen ohne die entsprechenden Plasmide durchgeführt. Die Ergebnisse der Biotransformationen sind in der Tabelle 49 wiedergegeben.

Tabelle 49: Biotransformation von L-Glu unter Verwendung des Ganzzellbiokatalysators *E. coli* BL21(DE3)/pACHPII-a/pHISGLOX (200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 12,5 mg Zellen ml⁻¹, 15°C, 120 rpm). Mittels ¹H-NMR wurden die Konzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Die Produktausbeute bezieht sich auf mol gebildetes α -KG bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge an L-Glu. Die Raum-Zeit-Ausbeute bezieht sich auf die Gesamtdauer der Biotransformation.

Eintrag	L-Glu (mM)	Permeabilisierung mit Toluol	Zeit (h)	Produktausbeute (%)	Raum-Zeit-Ausbeute (g l ⁻¹ h ⁻¹)	α -KG (g l ⁻¹)
1	50	nein	6	98,5	1,2	7,2
2	50	ja	8	95,6	0,9	7,0

In der Biotransformation von 50 mM L-Glu unter Verwendung des nicht permeabilisierten Ganzzellbiokatalysators *E. coli* BL21(DE3)/pACHPII-a/pHISGLOX konnte nach 6 h ein vollständiger Umsatz von L-Glu nachgewiesen werden, die Endkonzentration der Biotransformation an α -KG beträgt 7,2 g l⁻¹, die Raum-Zeit-Ausbeute beträgt 1,2 g l⁻¹ h⁻¹. Unter Verwendung des mit Toluol permeabilisierten Ganzzellbiokatalysators wurde nach 8 h ein vollständiger Umsatz von L-Glu erreicht, die Endkonzentration der Biotransformation an α -KG beträgt 7,0 g l⁻¹, die Raum-Zeit-Ausbeute beträgt 0,9 g l⁻¹ h⁻¹. In der Kontroll-Biotransformation mit *E. coli* BL21(DE3)-Zellen konnte kein Umsatz und keine Abnahme von L-Glu nachgewiesen werden.

Wie aus dem Vergleich der Kinetiken (Abbildung 63 und 64) ersichtlich wird, liegen die Umsatzraten der Ganzzell-Biotransformationen mit und ohne Permeabilisierung in der gleichen Größenordnung, so dass die Permeabilisierung der Zellmembran mit Toluol keinen positiven Einfluss auf die Biotransformation zu haben scheint.

Interessanterweise verläuft die Umsetzung von L-Glu nach Permeabilisierung der Zellmembran etwas langsamer als ohne Behandlung der Zellen mit Toluol, so wird der vollständige L-Glu-Umsatz bei Einsatz der identischen Zellkonzentration erst nach 2 h längerer Reaktionszeit erreicht. Eine abweichende Zellmenge in den Biotransformationen wurde hierbei ausgeschlossen, indem die sedimentierte Zellmasse (Feuchtgewicht) von Proben nach Zentrifugation bestimmt wurde. Abgesehen von der leicht verlängerten Reaktionszeit wurden jedoch keine deutlichen Unterschiede in der Umsatzkinetik festgestellt. Aus den ermittelten Daten kann man schließen, dass der Transport des Substrates L-Glu und des Produktes α -KG in bzw. aus der Zelle hier nicht limitierend auf die Reaktion wirkt.

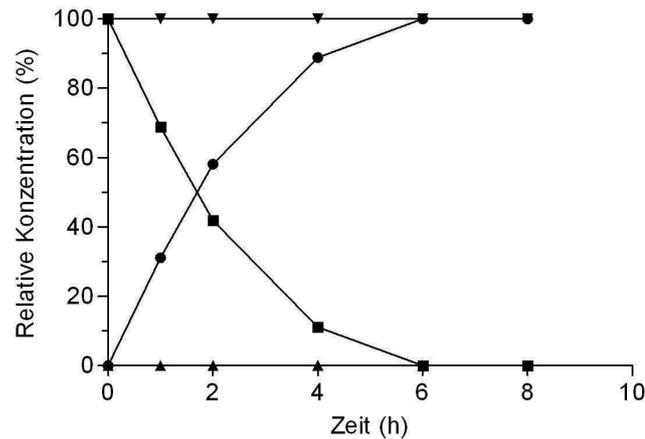


Abbildung 63: Kinetik der Biotransformationen von 50 mM L-Glu unter Verwendung des Ganzzellbiokatalysators (200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 12,5 mg ml⁻¹ *E. coli* BL21(DE3)/pACHPII-a/pHISGLOX, 15°C, 120 rpm). Gezeigt sind die relativen Konzentrationen an L-Glu und α-KG über einen Reaktionszeitraum von 8 h. Symbolerklärung: *E. coli* BL21(DE3)/pACHPII-a/pHISGLOX: L-Glu (■), α-KG (●); Kontroll-Biotransformation: *E. coli* BL21(DE3) L-Glu (▼), α-KG (▲). Mittels ¹H-NMR wurden die Konzentrationen von L-Glu und α-KG bestimmt.

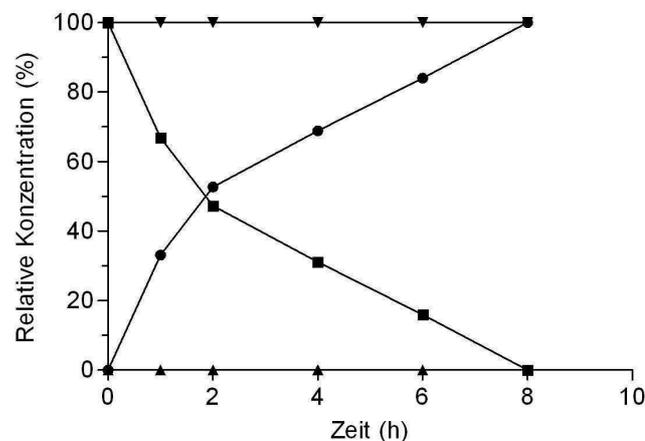


Abbildung 64: Kinetik der Biotransformationen von 50 mM L-Glu unter Verwendung des permeabilisierten Ganzzellbiokatalysators (200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 12,5 mg ml⁻¹ *E. coli* BL21(DE3)/pACHPII-a/pHISGLOX, 15°C, 120 rpm). Gezeigt sind die relativen Konzentrationen an L-Glu und α-KG über einen Reaktionszeitraum von 8 h. Symbolerklärung: *E. coli* BL21(DE3)/pACHPII-a/pHISGLOX: L-Glu (■), α-KG (●); Kontroll-Biotransformation: *E. coli* BL21(DE3) L-Glu (▼), α-KG (▲). Mittels ¹H-NMR wurden die Konzentrationen von L-Glu und α-KG bestimmt.

Um die Wiederverwendbarkeit des Ganzzellbiokatalysators zu testen, wurden die Zellen mit und ohne Zellpermeabilisierung in einem zweiten Zyklus zur Synthese von α -KG eingesetzt. Nach vollständigem Umsatz von L-Glu wurde die restliche Reaktionslösung vom Ganzzell-Katalysator getrennt (Zentrifugation bei 10000 rpm und 4°C, 20 min) und ein neuer Reaktionszyklus wurde durch Zugabe von Substrat und Puffer (der restlichen Zellmasse entsprechendes Volumen) gestartet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 50 aufgeführt. Auch bei einer Wiederverwendung des Ganzzellbiokatalysators wurden unabhängig von der Zellpermeabilisierung vollständige L-Glu-Umsätze und hohe Produktausbeuten erreicht, jedoch ist eine leichte Abnahme der α -KG-Ausbeute von 98,5 % bzw. 95,6 % (permeabilisiert) im ersten Zyklus auf 96,1 % und 94,2 % (permeabilisiert) im zweiten Zyklus zu beobachten.

Tabelle 50: Biotransformationen von L-Glu unter Wiederverwendung (2. Zyklus) des Ganzzellbiokatalysators *E. coli* BL21(DE3)/pACHPII-a/pHISGLOX. Mittels $^1\text{H-NMR}$ wurden die Konzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Die Produktausbeute bezieht sich auf mol gebildetes α -KG bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge an L-Glu. Die Raum-Zeit-Ausbeute bezieht sich auf die Gesamtdauer der Biotransformation.

Eintrag	L-Glu (mM)	Permeabilisierung mit Toluol	Zeit (h)	Produktausbeute (%)	Raum-Zeit-Ausbeute ($\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$)	α -KG (g l^{-1})
1	50	nein	6	96,1	1,2	7,0
2	50	ja	8	94,2	0,9	6,9

1.2.10 Screening nach neuen GluOX

Ein Nebenaspekt dieser Arbeit war es, bisher unbekannte mikrobielle L-Aminosäure bzw. GluOX zu identifizieren. Dazu wurden unterschiedliche Sammlungsstämme auf eine mögliche GluOX-Aktivität hin untersucht. Die Stämme wurden in dem von der DSMZ empfohlenen Medien mit Zusatz von 1 % L-Glu kultiviert. Anschließend wurden die Zellrohextrakte hergestellt und auf GluOX-Aktivität untersucht. Teilweise wurde für die Untersuchung auch auf Rohextrakte zurückgegriffen, die im Institut vorhanden waren. Für das Screening wurde der o-Dianisidin-Aktivitätsassay eingesetzt, die Untersuchung wurde im Mikrotiterplattenformat durchgeführt. Insgesamt 200 Stämme wurden auf GluOX-Aktivität im Rohextrakt untersucht. Für *Streptomyces* Stämme wurde der Kultur-Überstand ebenfalls in der Aktivitätsuntersuchung eingesetzt.

Bei der Analyse der Rohextrakte mit dem o-Dianisidin-Assay trat die Bildung eines deutlich messbaren Farbumschlages erst nach einer langen Inkubation von 24 bis 48 h auf.

Insgesamt 19 verschiedene Stämme zeigten im Mikrotiterplattenformat GluOX-Aktivität, wobei die identifizierten Stämme auffälligerweise vermehrt den Gattungen *Streptomyces*, *Rhodococcus* sowie *Lactobacillus* angehörten (Tabelle 51). Leider war es bei keinem der über das Screening identifizierten Stämme möglich, die Aktivität im photometrischen o-Dianisidin-Assay zu quantifizieren. Eine Untersuchung der Rohextrakte auf Katalase-Aktivität wurde ebenfalls durchgeführt, um eine mögliche Störreaktion durch den Abbau von Wasserstoffperoxid auszuschließen. Bei 11 der identifizierten Stämme wurde zum Teil eine hohe Katalase Aktivität im Rohextrakt nachgewiesen (Tabelle 51).

Tabelle 51: Sammlungsstämme mit GluOX-Aktivität (k.A. keine Angabe in der Stammsammlung, n.b. nicht bestimmbar).

Stammname	DSM Nr.	GluOX-Aktivität		Katalase-Aktivität	
		(+/-)	(U ml ⁻¹)	(+/-)	(U ml ⁻¹)
<i>Streptomyces bottropensis</i>	40262	+	n.b.	+	34
<i>Streptomyces antibioticus</i>	40725	+	n.b.	+	178
<i>Streptomyces virginia</i>	k.A.	+	n.b.	+	2000
<i>Streptomyces</i> sp.	40239	+	n.b.	+	17
<i>Pichia finlandica</i>	70280	+	n.b.	-	0.
<i>Alcaligenes</i> sp.	30002	+	n.b.	-	0
<i>Nocardioides simplex</i>	20130	+	n.b.	+	21
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	43296	+	n.b.	+	83
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	43347	+	n.b.	-	0
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	43199	+	n.b.	+	275
<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	43304	+	n.b.	+	432
<i>Lactobacillus bifermantans</i>	k.A.-	+	n.b.	+	134
<i>Lactobacillus paracasei</i>	20312	+	n.b.	-	0
<i>Lactobacillus sakei</i>	20017	+	n.b.	-	0
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	20203	+	n.b.	+	68
<i>Lactobacillus collinoides</i>	20515	+	n.b.	+	87
<i>Lactobacillus bifermantans</i>	20003	+	n.b.	-	0.
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	20176	+	n.b.	-	0
<i>Lactobacillus salivarius</i>	20554	+	n.b.	-	0

Über das Screening gelang die Identifizierung von mehreren neuen potenziellen GluOX-Produzenten (bzw. L-AAO-Produzenten), auch wenn es bei keinem der identifizierten Stämme möglich war die Aktivität im Zellrohextrakt zu quantifizieren. Aufgrund der guten Eignung der rekombinant hergestellten GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 und den durchweg nicht quantifizierbaren Aktivitäten wurden die potenziellen GluOX-Produzenten im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter bearbeitet, stehen jedoch als vielversprechender Ausgangspunkt für weitere Arbeiten zur Verfügung.

1.3 Darstellung von α -KG mittels L-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)

Die Biotransformation sollte mit Hilfe der kommerziell verfügbare GPT aus dem Schweineherz (Sigma) [De Rosa et al., 1979] durchgeführt werden. Als Systeme zur Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat war es beabsichtigt, die L-Alanin-Dehydrogenase (AlaDH) aus *Bacillus subtilis* sowie die kommerziell verfügbare L-Aminosäure-Oxidase (L-AAO) aus *Crotalus atrox* einzusetzen

1.3.1 Klonierung und heterologe Expression des *aladh*-Gens aus *B. subtilis*

Die AlaDH aus *B. subtilis* sollte rekombinant verfügbar gemacht und in *E. coli* produziert werden. Nach erfolgreicher Amplifizierung des *aladh*-Gens mittels PCR (Primer AlaDHBsfor und AlaDHBsrev) aus genomischer DNA von *B. subtilis*, anschließender Restriktion und Gelreinigung wurde das *aladh*-Gen in den *E. coli* Expressionsvektors petDuet-1 (Schnittstellen *NcoI* und *XhoI*) von Novagen ligiert (pDAIaBs). Nach Transformation in kompetente *E. coli* DH5 α Zellen, Selektion auf LB-Platten (Ampicillin 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) und Kultivierung wurde die Vektor-DNA aus mehreren Transformanten isoliert und mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde der Vektor zur rekombinanten Produktion der AlaDH in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)/pDAIaBs erfolgte für 16 bis 24 h unter Schütteln bei 120 rpm und 37°C (10 ml LB-Medium im 100 ml Schüttelkolben, Ampicillin 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Die Kultivierung der Hauptkultur erfolgte im Schüttelkolben (5 L) bei 25°C und 120 rpm für 16 h in Autoinduktions-Medium (1 L, Ampicillin 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Anschließend wurde die Zellmasse durch Zentrifugation (30 min, 5000 rpm bei 4°C) von dem Medium abgetrennt. Entweder wurden die Zellen direkt genutzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -18°C gelagert. Die spezifische Aktivität der AlaDH im zellfreien Rohextrakt betrug 4,0 U mg^{-1} (Aktivitätsassay: 5 mM L-Ala, 0,5 mM NAD⁺, 200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 30°C).

1.3.2 Prozessstabilität der GPT sowie der AlaDH

Um eine mögliche Inaktivierung der GPT sowie der AlaDH während der Biotransformation auszuschließen, wurden die beiden Enzyme auf ihre Stabilität unter Umsatzbedingungen hin untersucht. Die GPT sowie die AlaDH wurden für 24 h unter den Umsatzbedingungen (200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 30°C sowie 120 rpm) inkubiert und in regelmäßigen Abständen auf ihre Aktivität hin untersucht.

Für die GPT konnte im untersuchten Zeitraum keine Inaktivierung festgestellt werden. Die AlaDH hingegen zeigt eine leichte Inaktivierung, allerdings beträgt diese nach einem Zeitraum von 8 h lediglich 8,1 % und nach 24 h 15,2 %. Somit können sowohl die GPT als auch die AlaDH als sehr stabil bzw. stabil unter den Umsatzbedingungen charakterisiert werden. Die Stabilität der eingesetzten NOX aus *L. brevis* unter den gewählten Reaktionsbedingungen ist zufriedenstellend und wurde im Zusammenhang mit der GluDH bereits beschrieben (siehe 1.1.7.4.2).

1.3.3 Untersuchung des Einflusses von Substraten und Produkten der Biotransformation auf die AlaDH aus *B. subtilis*

Eine Inhibierung der AlaDH durch den Aminogruppen-Akzeptor Pyruvat analog zu der Produktinhibierung der GluDHs war hier vorstellbar, ebenso eine Inhibierung durch α -KG sowie das sekundäre Reaktionsprodukt Ammonium, welches im Verlauf der Biotransformation in der Reaktionslösung akkumuliert, bzw. durch das Zusammenspiel des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat und Ammonium. Um festzustellen, ob die rekombinante AlaDH aus *B. subtilis* durch das Edukt bzw. die Produkte der Biotransformation inhibiert wird, wurde der Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen auf die Aktivität der AlaDH untersucht. Hierzu wurde der photometrische Standardaktivitätstest unter Zugabe ansteigender Konzentrationen an L-Glu, α -KG, Pyruvat, Ammonium sowie Pyruvat und Ammonium durchgeführt.

In der Untersuchung zur Inhibierung durch L-Glu und α -KG konnte bei ansteigenden Konzentrationen von bis zu 50 mM keine Inhibierung der Aktivität der AlaDH aus *B. subtilis* festgestellt werden (200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 30°C). Die durchgeführten Aktivitätsmessungen zur Inhibierung durch den Aminogruppen-Akzeptor Pyruvat zeigten einen deutlich negativen Einfluss auf die Aktivität der AlaDH, so beträgt die Inhibierung bei einer Konzentration von 2,5 mM Pyruvat 30,1 %, bei 10 mM ca. 48,9 % und bei 50 mM 86,2%. Analog zu den Untersuchungen der GluDHs und der LeuDH konnte durch das sekundäre Reaktionsprodukte Ammonium ein inhibitorischer Effekt festgestellt werden, auch wenn dieser schwächer ausgeprägt ist. So wird die AlaDH aus *B. subtilis* durch eine Konzentration an Ammonium von 2,5 mM zu 4,7 %, bei 10 mM zu 12,2 % und bei 50 mM zu 32,6 % in der oxidativen Desaminierung von L-Ala gehemmt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in den Abbildungen 65 und 66 dargestellt.

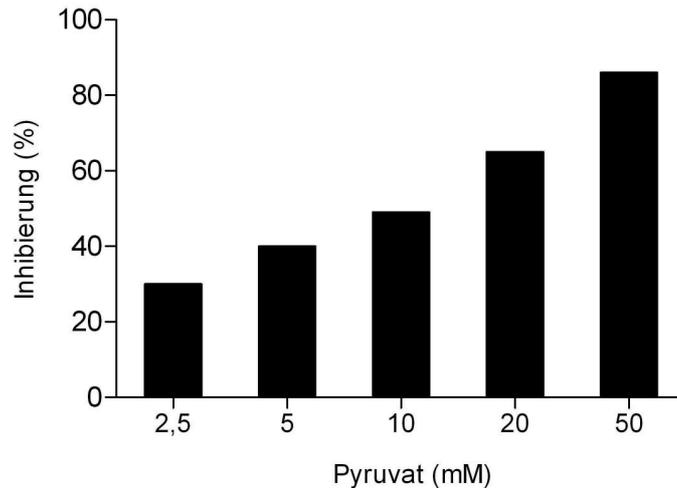


Abbildung 65: Untersuchung des Einflusses von Pyruvat auf die rekombinante AlaDH aus *B. subtilis* (Aktivitätsassay: 5 mM L-Ala, 1 mM NAD⁺, 0-50 mM Pyruvat, 200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 30°C).

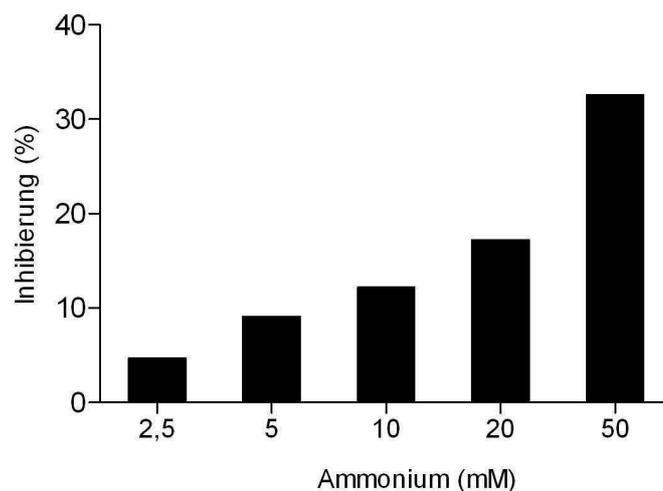


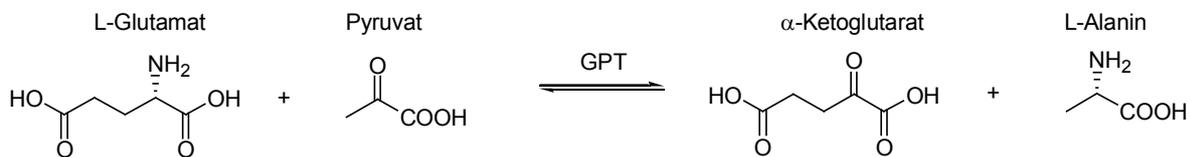
Abbildung 66: Untersuchung des Einflusses von Ammonium auf die rekombinante AlaDH aus *B. subtilis* (Aktivitätsassay: 5 mM L-Ala, 1 mM NAD⁺, 0-50 mM Ammonium, 200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 30°C).

Da während der Biotransformation neben dem Aminogruppen-Akzeptor Pyruvat auch das sekundäre Reaktionsprodukt Ammonium in der Reaktionslösung in steigenden Konzentrationen vorliegt, sollte im Folgenden auch eine gleichzeitige Inhibierungswirkung von Pyruvat und Ammonium auf die AlaDH untersucht werden. Hierbei konnte ein deutlicher synergetischer Effekt von Pyruvat und Ammonium bezüglich der Inhibierung festgestellt werden (5 mM L-Ala, 1 mM NAD⁺, 200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 30°C, 2,5 mM Pyruvat, 0-50 mM Ammonium).

So wird die AlaDH aus *B. subtilis* durch eine Konzentration an Pyruvat und Ammonium von jeweils 2,5 mM mit 92,8 % bereits fast vollständig in ihrer Aktivität in der oxidativen Desaminierung von L-Ala gehemmt. Bei einer Konzentration an Ammonium von 5 mM (Pyruvat 2,5 mM), konnte keine photometrische Aktivität nachgewiesen werden, was für eine vollständige Inhibierung spricht.

1.3.4 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GPT

Die Biotransformation wurde mit Hilfe der kommerziell verfügbaren L-Glutamat-Pyruvat Transaminase (Sigma) aus dem Schweineherz [De Rosa et al. 1979] als isoliertes Enzym durchgeführt (Schema 16).



Schema 16: Biotransformation von L-Glu mit der GPT aus dem Schweineherz ohne *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat.

Proben wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen und mittels H-NMR analysiert. Bei der einleitenden Biotransformation von 50 mM L-Glu (100 mM Pyruvat, 200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 0,5 U GPT, 120 rpm, 30°C) unter alleinigem Einsatz der GPT ohne Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors konnte ein maximaler Umsatz von 26,1 % nachgewiesen werden. Der Umsatz wird nach einer Reaktionszeit von 24 h erreicht und steigt bis zu einer Reaktionszeit von 72 h nicht weiter an, was für ein Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes unter den gewählten Bedingungen spricht.

Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern eine Erhöhung der Konzentration des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat eine Steigerung der Umsatzrate erbringen kann. Dazu wurden Biotransformation von 50 mM L-Glu unter Variation der eingesetzten Pyruvatmenge durchgeführt (2-, 3- 10-facher molarer Überschuss). Die Ergebnisse der Umsetzungen nach 24 h sind in der Tabelle 52 dargestellt. Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass der Einsatz eines 3-fachen molaren Überschusses an Pyruvat mit 82,4 % die besten Umsatzraten liefert. Interessanterweise scheint sich der Einsatz von sehr hohen Konzentrationen des Aminogruppen-Akzeptors eher negativ auf die Biotransformation auszuwirken, so wird bei einem 10-fachem molaren Überschuss nach einer Reaktionszeit von 24 h lediglich ein Umsatz von 27,4 % erreicht.

Tabelle 52: Biotransformation von 50 mM L-Glu mittels GPT aus dem Schweineherz unter Variation des molaren Überschusses an Pyruvat (200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 0,5 U GPT, 120 rpm, 30°C). Mittels $^1\text{H-NMR}$ wurden die Konzentrationen von L-Glu und $\alpha\text{-KG}$ bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt $\alpha\text{-KG}$ bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und $\alpha\text{-KG}$.

Eintrag	Pyruvat (mM)	L-Glu (mM)	Zeit (h)	Umsatz (%)
1	100	50	24	26,1
2	150	50	24	82,4
3	500	50	24	27,4

Anschließend wurde der pH-Wert der Biotransformation im Bereich des literaturbekannten Optimums der GPT (Optimum pH 7,5 bis pH 8,5) [De Rosa et al., 1979] variiert (pH 7,0 bis 9,0), um zu untersuchen, inwiefern sich der pH-Wert auf das Gleichgewicht der Reaktion auswirkt und welcher pH-Wert optimal in Hinsicht auf die Synthese von $\alpha\text{-KG}$ ist. Proben wurden nach 24 h entnommen und mittels $^1\text{H-NMR}$ analysiert. Die Ergebnisse der Umsetzungen sind in der Tabelle 53 dargestellt. Bei einem pH-Wert von 8,0 liefert die Biotransformation im Vergleich zu denen bei pH 7,0 und 9,0 eine höhere Produktbildung, so wird nach 24 h ein Umsatz von 82,4 % erreicht.

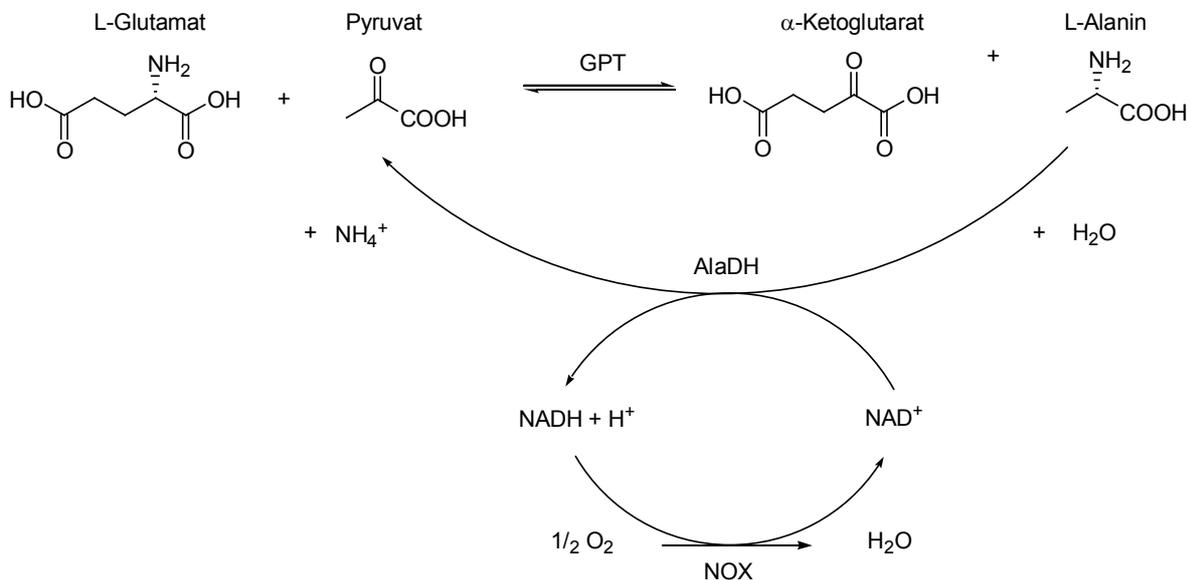
Tabelle 53: Biotransformation von 50 mM L-Glu mittels GPT aus dem Schweineherz unter Variation des pH-Wertes (200 mM Kpi Puffer pH 7,0 und 8,0, 200 mM Glycin-NaOH Puffer pH 9,0, 0,5 U GPT, 120 rpm, 30°C). Mittels $^1\text{H-NMR}$ wurden die Konzentrationen von L-Glu und $\alpha\text{-KG}$ bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt $\alpha\text{-KG}$ bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und $\alpha\text{-KG}$.

Eintrag	Pyruvat (mM)	L-Glu (mM)	pH-Wert	Zeit (h)	Umsatz (%)
1	150	50	7,0	24	77,3
2	150	50	8,0	24	82,4
3	150	50	9,0	24	70,4

In der Biotransformation von 50 mM L-Glu unter Einsatz der GPT aus dem Schweineherz ohne *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat, wurde ein maximaler Umsatz von 82,4 % nach 24 h nachgewiesen, die Endkonzentration der Reaktion (Tabelle 53, Eintrag 2) an $\alpha\text{-KG}$ beträgt $6,0 \text{ g l}^{-1}$, die Raum-Zeit-Ausbeute beträgt $0,25 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, bezogen auf die Gesamtdauer der Biotransformation.

1.3.5 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GPT unter Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat mittels der AlaDH aus *B. subtilis*

Die Transaminase Reaktion sollte mit der AlaDH aus *B. subtilis* [Grimshaw und Cleland, 1981] gekoppelt werden, um das entstehende L-Ala durch oxidative Desaminierung in Pyruvat zu überführen und dadurch *in situ* zu regenerieren. Der Einsatz der AlaDH zur Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors macht ein effizientes NAD^+ -Regenerierungssystem nötig, was in Form der NOX aus *L. brevis* verfügbar war. Da die Oxidation von NADH durch die NOX irreversibel verläuft, kann die reduktive Rückreaktion von Pyruvat zu L-Ala weitgehend ausgeschlossen werden. Das Reaktionsschema der Biotransformation ist im Schema 17 dargestellt.



Schema 17: Biotransformation von L-Glu mit der GPT aus dem Schweineherz und der AlaDH aus *B. subtilis* zur *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat. NOX aus *L. brevis* zur NAD^+ -Regenerierung.

Bei der einleitenden Biotransformation von 100 mM L-Glu unter Einsatz der GPT aus dem Schweineherz und der AlaDH aus *B. subtilis* zur Regenerierung von Pyruvat konnte nach 48 h ein maximaler Umsatz von 35,6 % nachgewiesen werden. Wie aus der Abbildung 67 ersichtlich wird, sinkt nach 4 h bis 8 h bzw. ab einer Produktkonzentration von 20 bis 25 mM α -KG die Reaktionsgeschwindigkeit der Biotransformation deutlich ab. Der Umsatz steigt bis zu einer Reaktionszeit von 48 h weiter an, wenn auch deutlich langsamer als zu Beginn der Reaktion.

Für die AlaDH aus *B. subtilis* konnte ein deutlicher synergetischer Effekt von Pyruvat und Ammonium bezüglich der Inhibierung der oxidativen Desaminierung von L-Ala festgestellt werden. So wird die AlaDH durch eine Konzentration an Pyruvat und Ammonium von 2,5 mM bzw. 5 mM vollständig in ihrer Aktivität in der oxidativen Desaminierung von L-Ala gehemmt. Anscheinend wirkt sich diese Inhibierung bei steigendem Umsatz und damit auch steigender Ammonium-Konzentration negativ auf die Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors und damit auf den Reaktionsverlauf der Biotransformation aus.

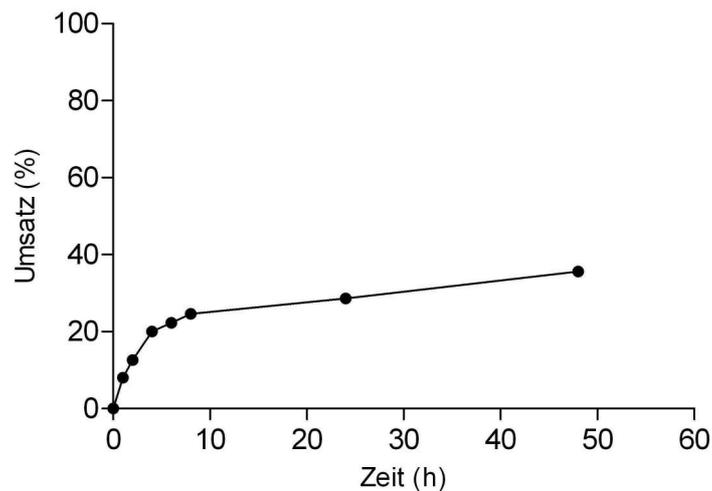


Abbildung 67: Kinetik der Biotransformation von 100 mM L-Glu mittels der GPT aus dem Schweineherz und der AlaDH aus *B. subtilis* zur *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat (2,5 mM Pyruvat, 1 mM NAD⁺, 200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 10 U NOX, 1,5 U AlaDH, 0,5 U GPT, Nachdosierung 10 U NOX nach 8 h, 120 rpm, 30°C). Mittels ¹H-NMR wurden die Konzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α -KG bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und α -KG.

Ausgehend von der einleitenden Biotransformation sollte versucht werden, durch Variation der Reaktionsbedingungen eine Optimierung der Biotransformation zu erreichen. Zunächst wurde untersucht, inwiefern sich eine Variation der Konzentration von Pyruvat auf die Biotransformation und den erreichbaren Umsatz auswirkt. Hierzu wurde der Versuch unter Erhöhung der Pyruvatkonzentration mit ansonsten gleichen Parametern durchgeführt, wobei im Vergleich zum Benchmark-Versuch allerdings lediglich eine leichte Erhöhung und somit keine signifikante Veränderung des Umsatzes nach 24 h festgestellt wurde (Tabelle 54).

Tabelle 54: Biotransformation von L-Glu mittels der GPT aus dem Schweineherz und der AlaDH aus *B. subtilis* zur *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat unter Variation der Pyruvatkonzentration (1 mM NAD⁺, 200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 120 rpm, 30°C). Mittels ¹H-NMR wurden die Konzentrationen von L-Glu und α-KG bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α-KG bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und α-KG.

Eintrag	GPT (U ml ⁻¹)	AlaDH (U ml ⁻¹)	NOX (U ml ⁻¹)	Pyruvat (mM)	L-Glu (mM)	Zeit (h)	Umsatz (%)
1	0,5	1,5	10	2,5	100	24	24,6
2	0,5	1,5	10	5	100	24	28,7

Weiterhin wurde die Biotransformation unter Variation der Konzentration an NAD⁺ durchgeführt, um zu untersuchen, ob sich eine niedrigere Konzentration an Cofaktor positiv auf die AlaDH bzw. die NOX und damit den erreichbaren Umsatz auswirkt. Da der Literaturwert zur Inhibierung der AlaDH aus *B. subtilis* durch NAD⁺ mit K_i 0,33 mM angegeben ist [Grimshaw und Cleland, 1981], wurde die Cofaktorkonzentration im Reaktionsgemisch aus Rücksicht auf eine erwünschte maximale Reaktionsgeschwindigkeit der AlaDH auf 0,25 mM gesenkt. In diesem Konzentrationsbereich wird die für die NAD⁺-Regenerierung eingesetzte NOX aus *L. brevis* ebenfalls nur gering durch NAD⁺, das Reaktionsprodukt der von ihr katalysierten Oxidation von NADH, inhibiert. Im Vergleich zum Benchmark-Versuch (Eintrag 1) konnte jedoch keine Erhöhung des Umsatzes von L-Glu nach 24 h festgestellt wurde (Tabelle 55).

Tabelle 55: Biotransformation von L-Glu mittels der GPT aus dem Schweineherz und der AlaDH aus *B. subtilis* zur *in situ*-Regenerierung des Amino-Akzeptors Pyruvat unter Variation der NAD⁺ Konzentration (5 mM Pyruvat, 200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 120 rpm, 30°C). Mittels ¹H-NMR wurden die Konzentrationen von L-Glu und α-KG bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α-KG bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und α-KG.

Eintrag	GPT (U ml ⁻¹)	AlaDH (U ml ⁻¹)	NOX (U ml ⁻¹)	NAD ⁺ (mM)	L-Glu (mM)	Zeit (h)	Umsatz (%)
1	0,5	1,5	10	1	100	24	28,7
2	0,5	1,5	10	0,25	100	24	26,1

Um eine unzureichende Aktivität sowie Enzyminaktivierung auszuschließen, wurden die Experimente unter Erhöhung der Einsatzmenge an GPT, AlaDH und NOX sowie deren Nachdosierung wiederholt.

Nach 4 h wurde die Enzyme nachdosiert, um einen Einfluss durch frühzeitige Inaktivierung auszuschließen, obwohl diese in den entsprechenden Experimenten nicht nachgewiesen werden konnte und in der ersten Biotransformation die NOX ebenfalls nach 8 h nachdosiert wurde. Weiterhin wurde untersucht, ob der kovalent an die GPT gebundene Cofaktor PLP ausgewaschen bzw. abgelöst wird, hierzu wurde die Biotransformation unter Zusatz von PLP durchgeführt.

Tabelle 56: Biotransformation von L-Glu mittels der GPT aus dem Schweineherz und der AlaDH aus *B. subtilis* zur *in situ*-Regenerierung des Amino-Akzeptors Pyruvat unter Variation und Nachdosierung der Biokatalysatoren sowie des Cofaktors PLP (5 mM Pyruvat, 200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 1 mM NAD⁺, 120 rpm, 30°C). Mittels ¹H-NMR wurden die Konzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Der Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α -KG bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und α -KG.

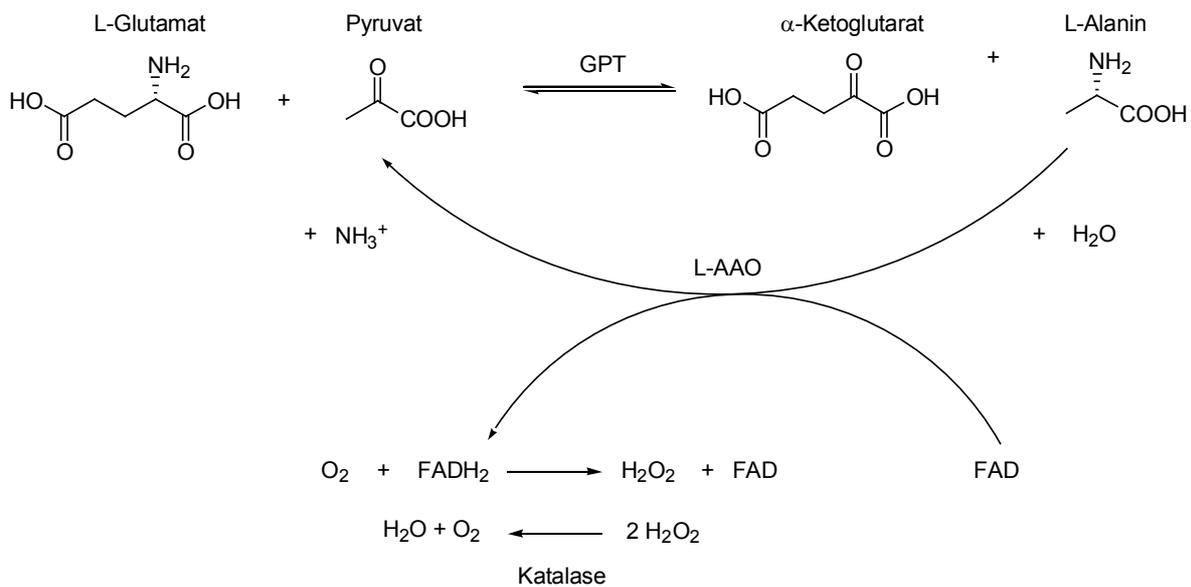
Eintrag	GPT (U ml ⁻¹)	AlaDH (U ml ⁻¹)	NOX (U ml ⁻¹)	Nachdosierung 4 h	L-Glu (mM)	Zeit (h)	Umsatz (%)
1	0,5	1,5	10	-	100	24	26,1
2	1,5	1,5	10	-	100	24	33,6
3	0,5	2,5	20	-	100	24	26,3
4	0,5	2,5	20	PLP (2,5 μ M)	100	24	26,1
5	0,5	1,5	10	GPT (0,5 U), L-AlaDH (1,5 U), NOX (10 U)	100	24	26,3

Zusammenfassend konnte weder durch die Nachdosierung der verschiedenen Enzyme, dem Zusatz von PLP noch durch die Variation der Konzentration an Pyruvat und NAD⁺ eine signifikante Steigerung des Umsatzes von L-Glu erreicht werden, die ermittelten Werte unterscheiden sich nur geringfügig. Lediglich durch die Erhöhung der Anfangskonzentration der GPT konnte ein leichte Steigerung des Umsatzes nach 24 h erreicht werden.

In der Biotransformation von 100 mM L-Glu unter Einsatz der GPT aus dem Schweineherz und der AlaDH aus *B. subtilis* zur *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat, wurde ein maximaler Umsatz von 33,6 % nach 24 h nachgewiesen, die Endkonzentration der Reaktion an α -KG beträgt 4,9 g l⁻¹, die Raum-Zeit-Ausbeute beträgt 0,20 g l⁻¹ h⁻¹, bezogen auf die Gesamtdauer der Biotransformation.

1.3.6 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GPT unter *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat mittels der L-AAO aus *C. atrox*

Als alternativer Ansatz wurde die GPT aus dem Schweineherz mit der L-AAO aus *C. atrox* (kommerzielles Präparat von Sigma) als zweites Enzym zur *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors gekoppelt. Um die oxidationsempfindliche Ketosäure sowie die Biokatalysatoren vor dem Nebenprodukt H_2O_2 der L-AAO zu schützen, wurde die *in situ*-Eliminierung von H_2O_2 mittels der Katalase aus *M. luteus* durchgeführt. Das Reaktionsschema der Biotransformation ist im Schema 18 dargestellt.



Schema 18: Biotransformation von L-Glu mittels der GPT aus dem Schweineherz und der L-AAO aus *C. atrox* zur *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat. Katalase aus *M. luteus* zur *in situ*-Eliminierung von H_2O_2 .

Bei der einleitenden Biotransformation von 100 mM L-Glu unter Einsatz der GPT aus dem Schweineherz und der L-AAO aus *C. atrox* zur Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat kann nach 72 h ein maximaler Umsatz von 29,7 % nachgewiesen werden (Tabelle 57). Da ein Ansatz zur Kontrolle einer möglichen ungewollten direkten Oxidation von L-Glu durch die L-AAO ebenfalls einen Umsatz von 21,3 % aufweist, kann hier von einem realen Umsatz durch die GPT von nur 8,4 % ausgegangen werden. Laut Literatur besitzt die L-AAO aus *C. atrox* keine Aktivität für L-Glu, die Kontrollbiotransformation sowie anschließend durchgeführte Aktivitätsmessungen mit deutlich verlängerter Reaktionszeit (> 30 min) weisen jedoch auf eine nicht erwartete leichte Nebenaktivität der L-AAO für L-Glu hin.

Tabelle 57: Biotransformation von L-Glu mittels der GPT aus dem Schweineherz und der L-AAO aus *C. atrox* zur *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat (200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 0,5 U GPT, 2 U L-AAO, 200 U Katalase *M. luteus*, 120 rpm, 30°C). Mittels ¹H-NMR wurden die Konzentrationen von L-Glu und α -KG bestimmt. Der angegebene Umsatz bezieht sich auf mol gebildetes Produkt α -KG bezogen auf die Gesamtstoffmenge aus L-Glu und α -KG. Eintrag 3 zeigt den realen Umsatz durch die GPT (Umsatz GPT/L-AAO abzüglich Umsatz L-AAO-Kontrollbiotransformation).

Eintrag	Biokatalysator	Pyruvat (mM)	L-Glu (mM)	Zeit (h)	Umsatz (%)
1	GPT/L-AAO	2,5	100	24	29,7
2	L-AAO	2,5	100	24	21,3
3	GPT real	2,5	100	24	8,4

Aufgrund der Nebenaktivität und den schlechten Umsatzraten wurde der Syntheseansatz unter *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat mittels der L-AAO aus *C. atrox* nicht weiter bearbeitet.

In der Biotransformation von 100 mM L-Glu unter Einsatz der GPT aus dem Schweineherz sowie der L-AAO aus *C. atrox* zur *in situ*-Regenerierung des Amino Akzeptors Pyruvat, wurde ein maximaler Umsatz von 29,7 % nach 24 h nachgewiesen, die Endkonzentration der Reaktion an α -KG beträgt 4,3 g l⁻¹, die Raum-Zeit-Ausbeute beträgt 0,18 g l⁻¹ h⁻¹, bezogen auf die Gesamtdauer der Biotransformation.

2. Entwicklung eines enzymatischen Systems zur NADP⁺-Regenerierung

2.1 „Protein Engineering“ der NOX aus *Lactobacillus brevis*

In den letzten Jahren werden NAD(H)- bzw. NADP(H)-abhängige Oxidoreduktasen, welche für ihre katalytische Aktivität entweder auf die reduzierten bzw. oxidierten Cofaktoren angewiesen sind, in einer wachsenden Anzahl an biotechnologischen Verfahren zur enzymatischen Synthese verschiedenster Zielsubstanzen eingesetzt [Hummel und Kula 1989; Bommarius et al. 1995; Devaux-Basseguy et al., 1997; Hummel, 1999; Stottmeister et al., 2005; Arterburn, 2001; Kroutil et al., 2004; Romano et al., 2012; Schrittwieser et al., 2010]. Da der Zusatz von stöchiometrischen Konzentrationen an Cofaktor in den Syntheseverfahren mit sehr hohen Kosten verbunden ist, erscheint die *in situ*-Cofaktorregenerierung von größter Wichtigkeit in Hinsicht auf eine ökonomische Reaktionsführung [van der Donk und Zhao, 2003; Zhao und van der Donk, 2003; Riebel et al., 2003; Hummel, 1999; Romano et al., 2012]. Nach dem heutigen Stand der Technik existieren kaum funktionelle enzymatische Regenerierungssysteme für die oxidierten Cofaktoren [Woodyer et al., 2003], wobei insbesondere die effiziente und ökonomische Regenerierung von NADP⁺ eine große Herausforderung darstellt. Daher war es ein wesentliches Ziel dieser Arbeit, mittels Methoden der gerichteten Evolution sowie des rationalen Proteindesigns die Substratspezifität der NOX aus *L. brevis* zu verändern, um die Oxidation von NADPH zu ermöglichen.

Ein Nebenaspekt bei der gerichteten Evolution war die Erhöhung der pH-Stabilität im eher basischen pH Bereich, was in Hinsicht auf den kombinierten Einsatz mit den NAD⁺-abhängigen GluDHs vorteilhaft wäre. Im Allgemeinen besitzen die GluDHs ein eher basisches pH-Optimum in der oxidativen Desaminierung von L-Glu mit pH-Werten von > 9,0. Auch könnte durch eine erhöhte pH-Stabilität im eher basischen pH-Bereich die Einsatzbreite der NOX mit anderen Dehydrogenasen erhöht werden.

2.1.1 Gerichtete Evolution der NOX aus *L. brevis*

Die einzelnen Schritte der gerichteten Evolution sind in der Abbildung 68 dargestellt und deren Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben.

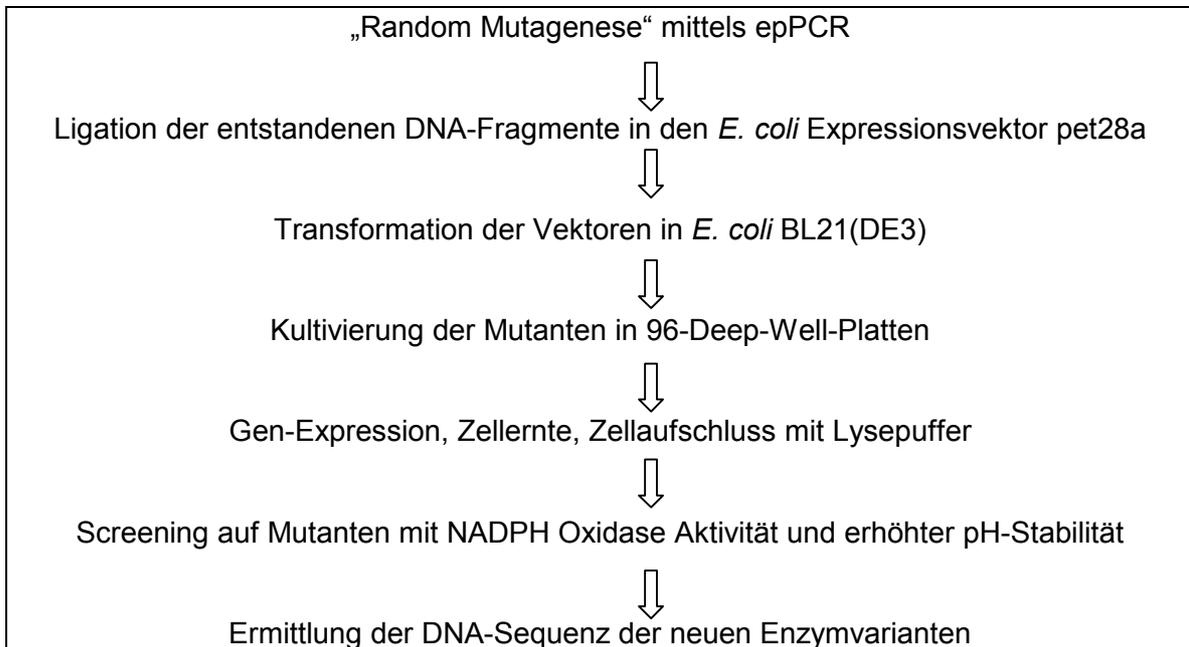


Abbildung 68: Die einzelnen Schritte der gerichteten Evolution der NOX aus *L. brevis*

2.1.1.1. Random Mutagenese mittels „error-prone“ PCR (epPCR)

Die Methode der „error-prone“ PCR (epPCR) [Cadwell und Joyce, 1992] wurde zur zufälligen Mutagenese angewandt, um unspezifisch Mutationen in das *nox*-Gen einzufügen. Ausgangspunkt der zufälligen Mutagenese war der vorher konstruierte *E. coli* Vektor pHISNOX (pet28a mit dem Wildtyp *nox* Gen aus *L. brevis*). Fünf Parallelansätze wurden durchgeführt, um so eine höhere biologische Diversität zu gewährleisten. Es wurde eine Goldstar Taq Polymerase verwendet, die keine „Proofreading“ Aktivität besitzt, was bedeutet, dass sie nicht über die Möglichkeit verfügt, mittels einer 3′-5′-Exonucleaseaktivität fehlerhaft eingebaute Nucleotide zu erkennen und zu ersetzen. Nach Ablauf des Programms wurden die verschiedenen Ansätze miteinander vereinigt. Es wurde ein epPCR Protokoll mit einer Mutationsrate von 1-3 verwendet. Die durch die epPCR eingeführten Schnittstellen ermöglichten die nachfolgende Restriktion mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI*. Die geschnittenen und gereinigten DNA-Fragmente der epPCR wurden durch Ligation in den Vektor pet28a eingefügt (pHISNOXep) und die Konstrukte wurden in *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

2.1.1.2 Herstellung und Screening der Mutantenbibliothek auf neue Enzymvarianten

Die Herstellung der Mutantenbibliothek erfolgte in zwei Schritten wie im Materialien und Methoden Teil (2.2.19) beschrieben. Die Untersuchung der Mutanten wurde sowohl hinsichtlich einer möglichen Aktivität in der Oxidation von NADPH (bei pH 6,0) als auch hinsichtlich einer erhöhten Stabilität bei einem eher basischen pH-Wert von pH 9,0 durchgeführt. Zur Bestimmung des Inaktivierungsverhaltens der verschiedenen Varianten wurde der geklärte Zellrohextrakt mit 50 mM Tris-HCl Puffer pH 9,0 geeignet verdünnt und über einen definierten Zeitraum von 4 h bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurde die verbliebene Restaktivität in der Oxidation von NADH mittels Photometermessung bestimmt.

Insgesamt wurden ca. 4000 Mutanten bzw. Enzymvarianten in Mikrotiterplatten auf Aktivität für das Substrat NADPH sowie eine erhöhte Stabilität im eher basischen pH Bereich von 9,0 untersucht. Zusammenfassend zeigte sich bei der Untersuchung auf eine NADPH-Oxidase-Aktivität, dass keine der hergestellten und untersuchten NOX-Mutanten eine Aktivität gegenüber NADPH besitzt.

Ca. 68 % der untersuchten Klone zeigten noch Aktivität in der Oxidation von NADH, ca. 32 % waren durch die eingeführten Mutationen inaktiv bzw. es war keine Aktivität im Rohextrakt nachweisbar. Die Untersuchung auf eine erhöhte Stabilität bei einem eher basischen pH-Wert von 9,0 zeigte, dass innerhalb der untersuchten Mutantenbibliothek keine Enzymvariante existiert, die eine höhere Restaktivität und damit auch eine höhere Stabilität im Vergleich zum Wildtyp-Enzym besitzt.

2.1.2 Rationales Proteindesign der NOX aus *L. brevis*

Das Prinzip des rationalen Proteindesigns bzw. der gezielten Mutagenese der NOX aus *L. brevis* ist in Abbildung 69 dargestellt.

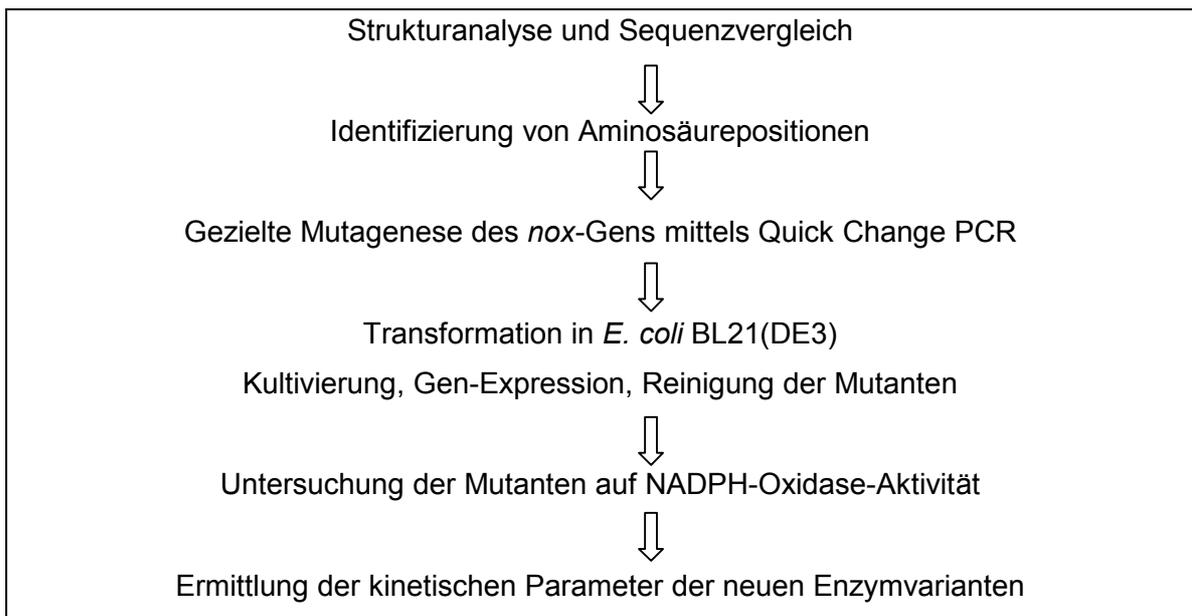


Abbildung 69: Die einzelnen Schritte des rationalen Proteindesigns der NOX aus *L. brevis*.

2.1.2.1 NAD(H)- und NADP(H)-Spezifität von Pyridin-Nucleotid-Disulfid Oxidoreduktasen

NOX gehören zu der Klasse der FAD-abhängigen Pyridin-Nucleotid-Disulfid Oxidoreduktasen (PNDOR), welche der GR1 Unterfamilie der Glutathion Reduktasen (GR) zugeordnet ist [Dym und Eisenberg, 2001], wobei die NOX zusammen mit den NADH-Peroxidasen (NPOX) sowie den Coenzyme-A-Disulfid Reduktasen (CoADR) einer gemeinsamen Untergruppe (Gruppe 3) der PNDORs angehören [Argyrou und Blanchard, 2004]. Heute sind Sequenz- und Strukturinformationen für PNDORs in größerem Umfang verfügbar und stehen für eine Analyse und einen Vergleich zur Verfügung [Mittl et al., 1993; Mallet et al., 2006; Perham et al., 1991; Mittl et al., 1994; Scrutton et al., 1990].

Für PNDORs gelang die Identifizierung von drei Sequenzmotiven, die innerhalb der Primärstruktur hoch konserviert sind [Dym und Eisenberg, 2001; Ojha et al., 2007]. Zwei dieser konservierten Sequenzmotive sind an der Bildung der FAD-Bindedomäne beteiligt, wohingegen das dritte Sequenzmotiv als wesentlicher Bestandteil der Cofaktor-Bindedomäne für die Orientierung und Stabilisierung von NAD(H) bzw. NADP(H) verantwortlich ist [Ross und Claiborne, 1991]. Die Cofaktor-Bindedomäne weist hierbei die klassische „Rossmann fold“ Struktur [Eventoff und Rossmann, 1976] einer alternierenden Abfolge von β -Faltblättern und α -Helices ($\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3$) auf.

In NAD(H)-spezifischen PNDORs befindet sich am C-terminalen Ende des ersten β -Faltblattes das hochkonservierte Glycin-reiche GXGXXG „fingerprint“ Sequenzmotiv (x stellt hier jede beliebige Aminosäure dar), welches im Protein-NADH Komplex Wechselwirkungen mit der Pyrophosphatbrücke des Cofaktors eingeht. Dem „fingerprint“ Motiv GXGXXG folgt C-terminal in der Primärsequenz im Allgemeinen eine strikt negativ geladene Aminosäure wie Asparaginsäure oder Glutaminsäure (GXGXXG₁₈ D bzw. E), welche einen wichtigen Faktor für die Bindung von NAD(H) darstellt. Die Aminosäure ist in der Lage, mit NAD(H) Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen und die Bindung des Cofaktors bzw. Substrates auf diese Weise effektiv zu stabilisieren, weiterhin wird diese negativ geladene Aminosäure aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen sowie der räumlichen Anordnung für das Verhindern der Bindung von NADP(H) verantwortlich gemacht [Wallen et al., 2008; Scrutton et al., 1990; Perham et al., 1991]. Das Vorkommen einer basischen und positiv geladenen Aminosäure wie Arginin oder Histidin an oder benachbart zu dieser Position ist typisch für NADP(H)-abhängige Enzyme. Die positive Ladung ist von höchster Wichtigkeit in Hinsicht auf die Bindung von NADP(H) bzw. die Kompensation der negativen Ladung der Phosphatgruppe.

In Vertretern der PNDORs, die NADP(H) als Cofaktor bzw. Substrat nutzen können, ist das dritte Gly des GXGXXG „fingerprint“ Sequenzmotivs typischerweise durch Ala oder in wenigen Fällen durch Ser substituiert [Wallen et al., 2008; Scrutton et al., 1990]. Dieser Austausch von Gly gegen Ala oder Ser ist innerhalb der PNDORs hoch, aber nicht absolut, konserviert. So wurden zum Beispiel für die CoADR aus *Bacillus anthracis* und *Pyrococcus horikoshii* sowie die NOX aus *Lactobacillus sanfranciscensis* beschrieben, dass sie in der Lage sind beide Cofaktoren zu nutzen, obwohl sie das typische NAD(H) Motiv GXGXXG aufweisen [Harris et al., 2005; Wallen et al., 2008; Riebel et al., 2003].

2.1.2.2 Sequenzanalyse und Alignment der NOX aus *L. brevis*

Der Vergleich der Aminosäuresequenz der NOX aus *L. brevis* mit den Uniprot-Datenbank Sequenzinformationen anderer Mitglieder der flavinhaltigen PNDORs wie NOX und NPOX, CoADR und GR, ergab eine limitierte aber für bestimmte Bereiche signifikante Sequenzhomologie. Insbesondere die für PNDORs identifizierten typischen Sequenzmotive sind konserviert und besitzen die gleiche Funktion in der NOX aus *L. brevis*. Zwei dieser Sequenzmotive sind für die Bindung des Cofaktors FAD verantwortlich (Motiv 1 und 3, Aminosäuren 7-13 und 269-280), während das dritte an der Bindung des Pyridin-Nucleotid-Cofaktors beteiligt ist (Motiv 2, Aminosäuren 150-185).

Die NOX aus *L. brevis* weist eine absolute Spezifität für NADH auf, NADPH wird nicht als Substrat akzeptiert. Diese Eigenschaft ist in Korrelation mit dem Vorhandensein des charakteristischen GXGXXG „fingerprint“ NAD(H)-Bindemotivs in der Primärstruktur (GAGYIG, Aminosäuren 154-159), welches, wie in der Abbildung 70 gezeigt, in den NAD(H)-abhängigen Vertretern der Pyridin-Nucleotid-Disulfid Oxidoreduktasen hoch konserviert ist. In den Enzymen, die NADP(H) als bevorzugten Cofaktor nutzen, befindet sich an der dritten Gly-Position des GXGXXG Motivs in den meisten Fällen die Aminosäure Ala oder in seltenen Fällen Ser (siehe auch 2.1.2.1).

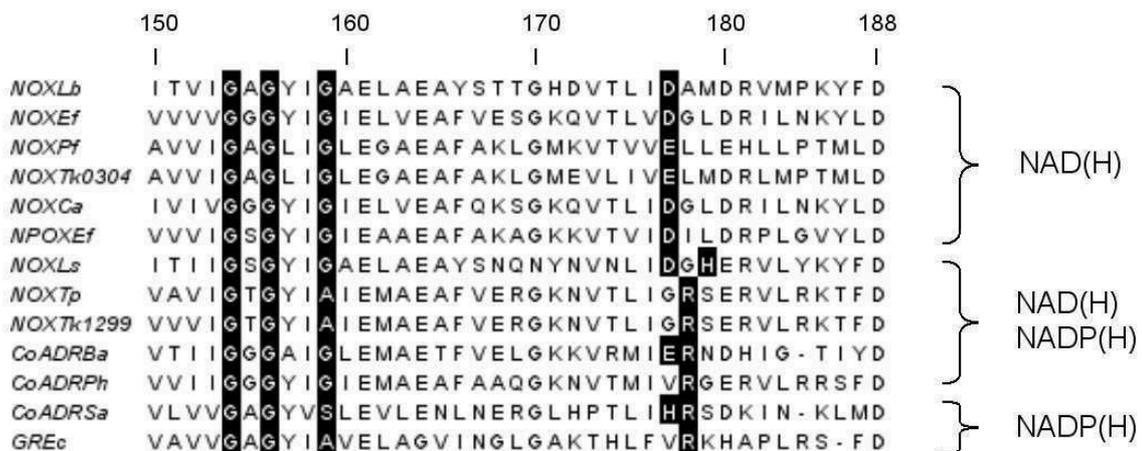


Abbildung 70: Alignment der Aminosäuresequenzen in der Umgebung des typischen Cofaktor-Bindemotivs der NOX aus *L. brevis* und anderen NAD(H)-, NADP(H)- bzw. NAD(H)/NADP(H)- spezifischen Pyridin-Nucleotid-Disulfid Oxidoreduktasen (PNDORs). NOX und NPOX Sequenzen: NOXLb (*Lactobacillus brevis* Q8KRG4), NOXef (*Enterococcus faecalis* P37061), NOXPf (*Pyrococcus furiosus* Q8U0Q3), NOXTk0304 (*Thermococcus kodakaraensis* Q5JFZ8), NOXCa (*Clostridium aminovalericum* Q2WFW5), NPOXef (*Enterococcus faecalis* P37062); NAD(P)H-Oxidase Sequenzen: NOXLs (*Lactobacillus sanfranciscensis* Q9F1X5), NOXTp (*Thermococcus profundus* B2G3S1), NOXTk1299 (*Thermococcus kodakaraensis* Q5JGP4); CoADR und GR Sequenzen: CoADRBa (*Bacillus anthracis* Q81TK5), CoADRPh (*Pyrococcus horikoshii* O58308), CoADRSa (*Staphylococcus aureus* O52582), GREc (*Escherichia coli* P06715). Schwarz hinterlegt sind die konservierten Aminosäuren, die für die Cofaktorspezifität verantwortlich sind. Die Nummerierung erfolgte anhand der Primärsequenz der NOX aus *L. brevis*.

Dem GXGXXG „fingerprint“ Motiv der NAD(H)-spezifischen PNDORs folgt in der Aminosäuresequenz im allgemeinen C-terminal eine hoch konservierte, strikt negativ geladene Aminosäure wie Asparaginsäure oder Glutaminsäure (GXGXXG₁₈ D bzw. E). In der Sequenz der NOX aus *L. brevis* befindet sich an der entsprechenden Position 177, 18 Aminosäuren downstream des GXGXXG „fingerprint“ Motivs mit Asparaginsäure ebenfalls eine negativ geladene Aminosäure (GAGYIG₁₈ D, Aminosäuren 154-177).

Die Asparaginsäure an Position 177 ist vermutlich für die strikte NADH-Spezifität und das Verhindern der NADPH-Bindung verantwortlich, sowohl aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen als auch durch sterische Behinderung der zusätzlichen Phosphatgruppe von NADPH. Ebenfalls befindet sich in der Sequenz der NOX aus *L. brevis* keine positiv geladene Aminosäure in der Nähe. Das Vorkommen von Arg oder seltener auch His an dieser Position (GXGXXG₁₈₋₂₀ H bzw. R) bzw. 1-2 Aminosäuren C-terminal davon, ist typisch für die NADP(H)-spezifischen Vertreter der PNDORs. Die positive Ladung an dieser Position ist von größter Bedeutung in Hinsicht auf die NADP(H)-Bindung, da sie Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Phosphatgruppe eingeht und so der Stabilisierung der NADP(H)-Bindung beiträgt.

Eine negativ geladene Aminosäure wie Asp oder Glu 18 Aminosäuren downstream des GXGXXG „fingerprint“ Motivs (GXGXXG₁₈ D bzw. E) ist in den NAD(H)-spezifischen PNDORs der Abbildung 70 absolut konserviert, jedoch nicht in den Enzymen mit dualer Cofaktorabhängigkeit. Hier kommen diese Aminosäuren allerdings ebenfalls zum Teil an der entsprechenden Position vor, wie in der CoADR aus *B. anthracis* sowie der NOX aus *L. sanfranciscensis*. Im Gegensatz hierzu weisen alle NADP(H)-spezifischen PNDORs und diejenigen mit dualer Cofaktorabhängigkeit eine oder mehrere positiv geladene Aminosäuren wie Arg oder seltener auch His auf. Die NAD(P)(H)-Bindemotive der CoADR aus *B. anthracis* sowie der NAD(P)H-Oxidase aus *L. sanfranciscensis* besitzen eine Art Hybridsequenz mit einer negativ geladenen Aminosäure downstream des GXGXXG „fingerprint“ Motivs gefolgt von einer positiv geladenen (E und R bzw. D und H).

Zusammenfassend konnten mittels vergleichender Sequenzanalyse der NOX aus *L. brevis* und anderen PNDORs, die konservierten Aminosäurepositionen G159, D177 und M179 identifiziert werden, welche vermutlich für das Verhindern der NADPH-Bindung sowie Oxidation und somit für die strikte NADH-Spezifität der NOX aus *L. brevis* verantwortlich sind.

2.1.2.3 Strukturanalyse der NOX aus *L. brevis*

Auch wenn in den letzten Jahren zahlreiche NOXs isoliert und charakterisiert werden konnten, sind bisher wurden nur einige wenige Strukturen von H₂O- und H₂O₂-bildenden NOXs bekannt. Die erste Struktur einer NOX wurde im Jahre 1995 durch Hecht und seine Mitarbeiter für das der H₂O₂-bildende Enzym aus *Thermus thermophilus* HB8 gelöst und publiziert [Hecht et al. 1995]. Im Jahre 1999 gelang es, die H₂O₂-bildende NOX aus *Thermus aquaticus* [Mac Sweeney et al., 1999] zu kristallisieren.

Durch Lountos und Mitarbeiter wurde die Struktur der H₂O-bildenden NOX aus *L. sanfranciscensis* [Lountos et al. 2004, 2006] gelöst und beschrieben. Weiterhin wurden die Strukturen anderer FAD-abhängiger PNDORs wie NPOX aus *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* [Stehle et al., 1991, 1993], der CoADR aus *B. anthracis* sowie der GR aus dem Menschen und *E. coli* aufgeklärt und publiziert [Wallen et al., 2008; Scrutton 1990; Pai et al., 1988; Mallett et al., 2006]. Die Struktur der NOX aus *L. brevis* konnte mit der Methode des molekularen Ersatzes gelöst und bis zu einer maximalen Auflösung von 3,5 Å verfeinert werden [Kuzu et al., 2005; Niefind, persönliche Mitteilung].

Für die Aufklärung von Struktur-Funktionsbeziehungen als Grundlage für die Durchführung der gezielten Mutagenese wurde die Struktur mit dem Programm Chimera [Pettersen et al., 2004] visualisiert und analysiert. Wie in der Abbildung 71 dargestellt, zeigt das Monomer der NOX aus *L. brevis* den für PNDORs typischen strukturellen Aufbau mit einer FAD-Bindedomäne, einer NADH-Bindedomäne, einer Dimerisierungsdomäne und der zwischen den Domänen liegenden katalytischen Spalte. Es besitzt eine konische Form und besteht aus 29 β -Faltblättern und 11 α -Helices, die Strukturelemente bilden im Zentrum der NOX einen Tunnel, welcher die katalytische Aminosäure Cys42 sowie den Cofaktor FAD enthält und in dem das Substrat NADH gebunden wird [Kuzu, 2005].

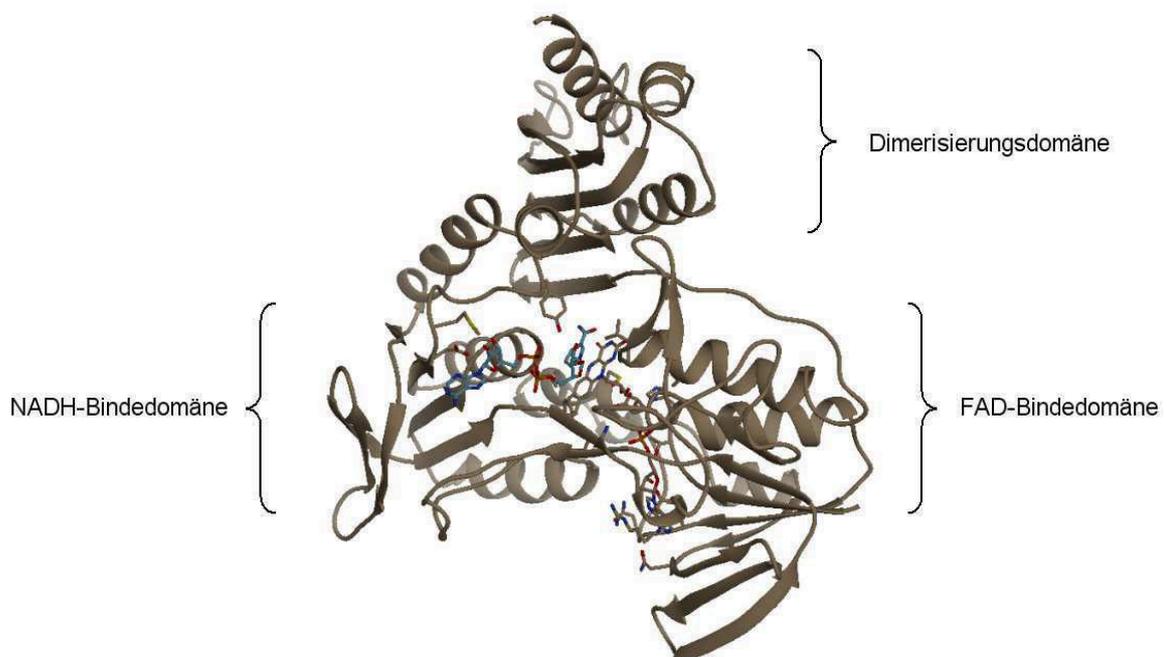


Abbildung 71: Monomer der NOX aus *L. brevis* mit FAD und NAD (Auflösung 3,5 Å, pdb. Niefind, persönliche Mitteilung).

Die Analyse der Struktur zeigte, dass die NADH-Bindedomäne eine typische „Rossmann-fold“ Struktur einer alternierenden Abfolge von β -Faltblättern und α -Helices aufweist ($\beta\alpha\beta\alpha\beta$). Wie typisch für NAD(H) spezifische PNDORs [Bellamacina, 1996], befindet sich am C-terminalen Ende des ersten β -Faltblattes das hochkonservierte Glycin-reiche GXGXXG „fingerprint“ Sequenzmotiv. Dieses Motiv ist Teil eines kurzen Loopes ist, welcher das β -Faltblatt und die darauffolgende α -Helix verbindet.

Für die Modellierung des NADH-Enzym Komplexes, wurde die Struktur der unligierten Wildtyp-NOX mit der Struktur der NADH-ligierten NPOX aus *S. faecalis* [Stehle et al., 1993] unter zu Hilfenahme des Programms Chimera (Needleman-Wunsch Algorithmus, Matrix BLOSUM-62) überlagert. Beide Enzyme besitzen eine ähnliche dreidimensionale Struktur mit einem rmsd-Wert („root-mean-square distance“) von 0,991 für 386 Atome. Die Überlagerung der beiden homologen Strukturen (Abbildung 72) zeigt deutlich auf, dass sich in der NADH-unligierten Struktur der NOX die Konformation bzw. die Orientierung des hoch konservierten Tyr an Position 157 deutlich von der Orientierung des Tyr in der Struktur der NADH-ligierten NPOX aus *S. faecalis* unterscheidet.

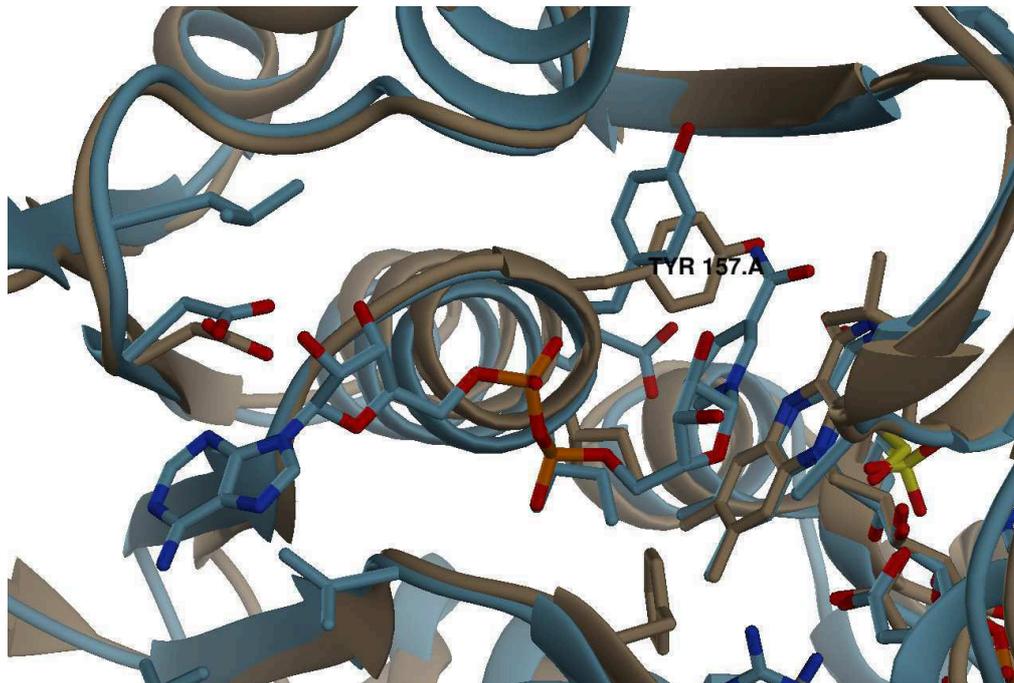


Abbildung 72: Überlagerung der Struktur der NOX aus *L. brevis* Struktur (grau) mit der NADH-ligierten Struktur der NPOX aus *S. faecalis* (blau), pdb. 2NPOX. (rmsd 0,991 für 386 Atome). Der Vergleich der Strukturen wurde mit dem Programm Chimera erstellt (Needleman-Wunsch Algorithmus, Matrix BLOSUM-62).

In der unligierten Struktur der NPOX nimmt der aromatische Ring von Tyr159 den Platz ein, der durch den Nicotinamid-Teil von NADH beansprucht werden würde und ändert während der NADH-Bindung seine Konformation bzw. Seitenkettenausrichtung („induced fit model“) [Stehle et al., 1993]. Eine solche Cofaktor-induzierte Konformationsänderung von Tyr an der korrespondierenden Aminosäurepositionen wurde ebenfalls für die humane GR [Pai et al., 1988], die GR aus *E. coli* [Mittl et al., 1994] sowie die NOX aus *L. sanfranciscensis* beschrieben [Lountos et al., 2006]. Eine Überlagerung der Struktur der NOX aus *L. brevis* mit der Struktur der NOX aus *L. sanfranciscensis* ist Abbildung 73 dargestellt.

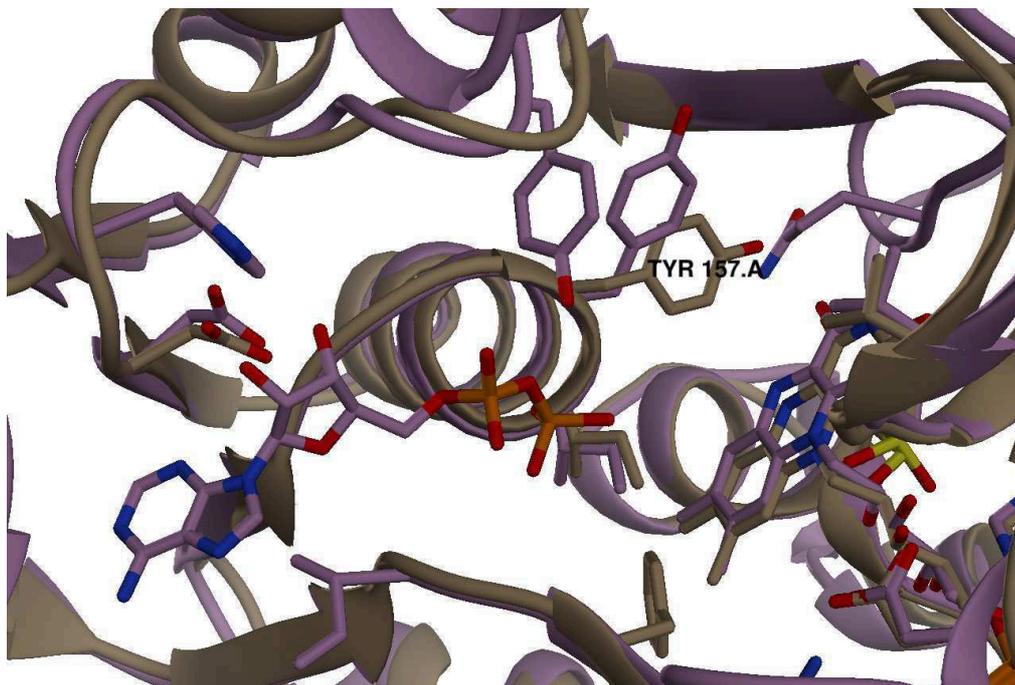


Abbildung 73: Überlagerung der Struktur der NOX aus *L. brevis* (grau) mit der Struktur der ADP-ligierten NOX aus *L. sanfranciscensis* (lila), pdb. 2CDU. (rmsd 0,849 für 427 Atome). Der Vergleich der Strukturen wurde mit dem Programm Chimera erstellt (Needleman-Wunsch Algorithmus, Matrix BLOSUM-62).

Es kann vermutet werden, dass sich Tyr157 in der NOX aus *L. brevis* analog verhält und während der NADH-Bindung seine Konformation verändert um eine sterische Kollision zwischen der Seitenkette und dem Nicotinamid-Teil von NADH zu verhindern. Unter Zuhilfenahme des Programms Chimera wurden für die Seitenkette von Tyr157 alternative Rotamere berechnet [Dunbrack, 2002] und der für die NADH-Bindung optimalste ausgewählt. Anschließend wurde mittels Swiss-Pdb-Viewer eine „energy minimisation“ (GROMOS96) zur Verfeinerung der Struktur durchgeführt [Guex und Peitsch, 1997].

Wie in Abbildung 74 dargestellt ist, wird in der Struktur der NOX aus *L. brevis* der Cofaktor bzw. das Substrat NADH in einer Spalte der NADH-Bindedomäne gebunden und ist mit dem Nicotinamid-Teil in Richtung FAD ausgerichtet. Hierbei wird das NADH mit insgesamt 10 Wasserstoffbrücken gebunden. Es können sowohl Wasserstoffbrücken mit der Proteinhauptkette als auch mit Seitenketten beobachtet werden.

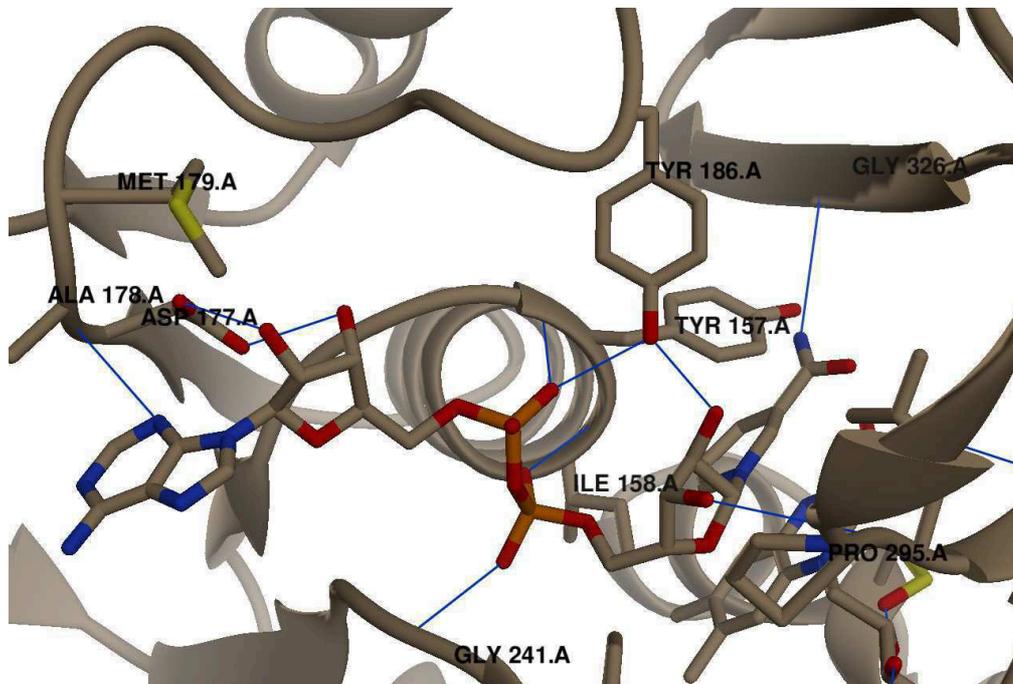


Abbildung 74: Bindungsstelle von NADH in der Struktur der NOX aus *L. brevis*, NADH modelliert aus der Struktur der NPOX aus *S. faecalis* (pdb. 2NPOX). Wasserstoffbrückenbindungen wurden mit dem Programm Chimera berechnet und sind als blaue Linien dargestellt. Für Tyr159 ist ein alternativer Rotamer dargestellt.

Drei der Wasserstoffbrückenbindungen, in denen die Proteinhauptkette involviert ist, werden zwischen Tyr157, Ile158 und Gly241 und der Pyrophosphatbrücke von NADH ausgebildet. Zusätzlich findet eine Stabilisierung der Pyrophosphatbrücke durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Seitenkette von Tyr186 statt. Die effektive Substraterkennung und Bindung von NADH erfolgt durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den 2'- und 3'-Hydroxylgruppen des Ribose Ringes vom Adenosin-Teil und den Sauerstoffatomen der Carboxylgruppe von Asp177. Weiterhin wird die Bindung des Cofaktors in der Komplexstruktur durch drei Wasserstoffbrücken zwischen der Proteinhauptkette (Ala178, Gly326 sowie Pro295) und dem Adenosin- bzw. Nicotinamid-Teil von NADH stabilisiert. Wie in Abbildung 74 dargestellt, ist die Konformation der Aminosäuren Asp177-Tyr186 und die Art der NADH-Bindung sehr ähnlich zur derjenigen in der NPOX aus *S. faecalis* (Abb. 75) [Stehle et al., 1993].

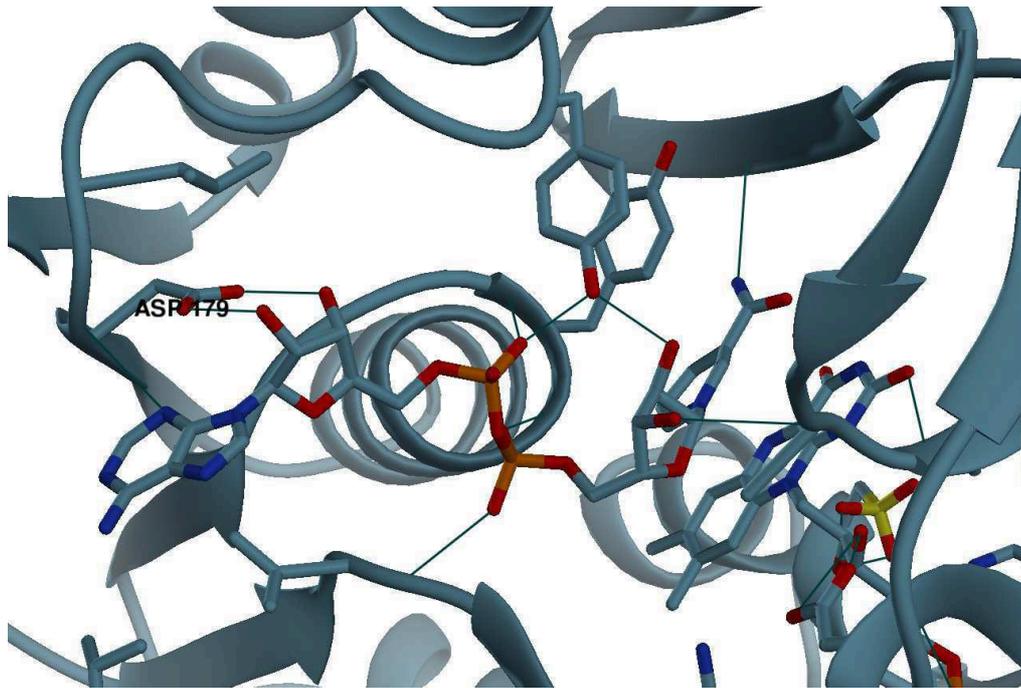


Abbildung 75: Bindungsstelle von NADH in der Struktur der NPOX aus *S. faecalis* (pdb. 2NPOX); Wasserstoffbrückenbindungen wurden mit dem Programm Chimera berechnet und sind als blaue Linien dargestellt.

Die negative geladene Asparaginsäure an Position 177, welche vermutlich für die strikte NADH-Spezifität der NOX aus *L. brevis* verantwortlich ist, befindet sich am C-terminalen Ende vom zweiten β -Faltblatt des $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ Motivs. An dieser Position der NADH-Bindungsstelle ist Asp177 in der Lage, die Bindung von NADPH zu beeinflussen, sowohl aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen als auch durch sterische Behinderung der zusätzlichen Phosphatgruppe von NADPH. In der Abbildung 74 ist weiterhin zu erkennen, dass M179 ebenfalls an der sterischen Behinderung der Phosphatgruppe von NADPH beteiligt sein könnte. Weiterhin befindet sich keine positiv geladene Aminosäure in der Nähe (D177-A178-M179) der 2'OH-Gruppe von NADH, welche in NADPH durch die zusätzliche Phosphatgruppe substituiert ist. Das Vorkommen von Arg oder seltener auch His an dieser Position bzw. 1-2 Aminosäuren C-terminal davon (GXGXXG₁₈₋₂₀ H bzw. R), ist typisch für die Vertreter der PNDORs, die in der Lage sind NADP(H) als Cofaktor zu nutzen. Arg bzw. His sind von größter Bedeutung in Hinsicht auf die NADP(H)-Bindung, da sie Wechselwirkungen mit der Phosphatgruppe eingehen und so der Stabilisierung der NADP(H)-Bindung beitragen [Pai et al., 1988; Mallett et al., 2006; Wallen et al., 2008; Scrutton, 1990].

Innerhalb der Struktur der NADP(H)-spezifischen humanen GR (Abbildung 76), kommen sowohl Arg (Arg218 und Arg224) als auch His (His219) in der entsprechenden Region der Cofaktorbindestelle vor [Pai et al., 1988]. Die Cofaktor-Bindedomäne weist eine ähnliche Struktur mit der typischen $\beta\beta\alpha\beta$ -Topologie auf und besitzt ebenfalls das Glycin-reiche Motiv, welches das erste β -Faltblatt und die darauffolgende α -Helix verbindet und Wechselwirkungen mit der Pyrophosphatbrücke des Cofaktors eingeht [Pai et al., 1988]. Wie typisch für NADP(H)-spezifische PNDORs, ist das dritte Gly des GXGXXG „fingerprint“ Motivs jedoch durch Ala substituiert. Diese Aminosäure benötigt aufgrund ihrer Seitenkette mehr Platz als Gly, so dass sie die Konformation des β -Faltblattes und der darauffolgenden α -Helix zueinander beeinflusst.

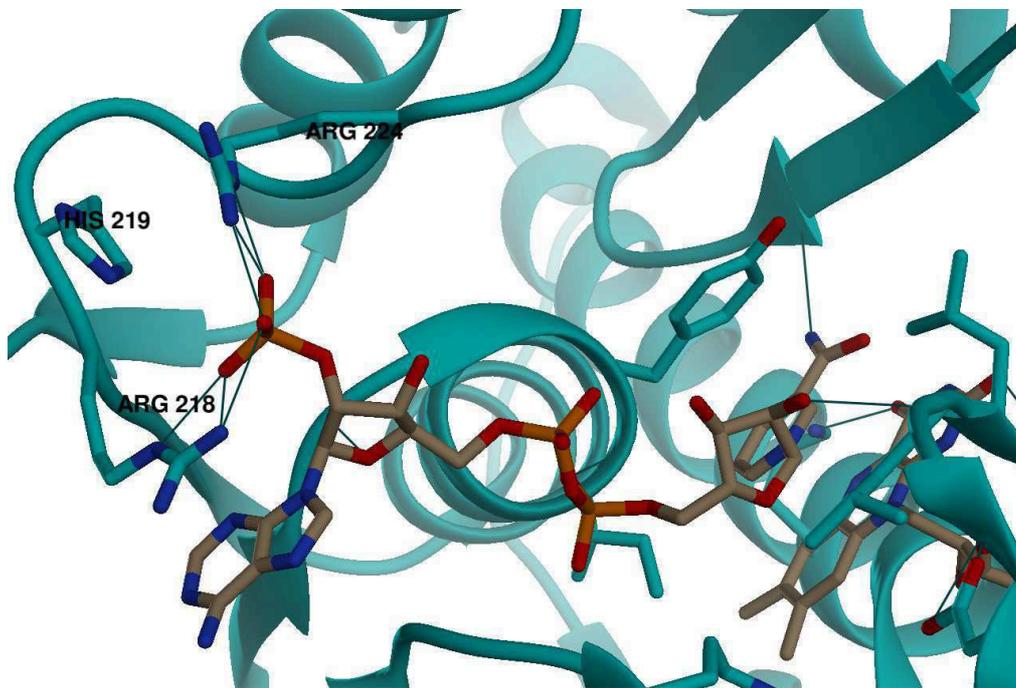


Abbildung 76: Bindungsstelle von NADPH in der Struktur der humanen GR (pdb. 1GRB). Wasserstoffbrückenbindungen wurden mit dem Programm Chimera berechnet und sind als blaue Linien dargestellt.

Die Cofaktorbindestelle der NAD(H)/NADP(H)-spezifischen CoADR aus *B. anthracis* besitzt einen hybridartigen Aufbau mit einer negativ geladenen Aminosäure (Glu180) downstream des GXGXXG „fingerprint“ Motivs gefolgt von einer positiv geladenen (Arg181) [Wallen et al., 2008]. Im NADPH-Enzym-Komplex (Abbildung 77) bilden die Aminosäuren stabilisierende Wasserstoffbrückenbindungen zur Phosphatgruppe (Arg181) bzw. 3'-Hydroxylgruppe (Glu180) aus.

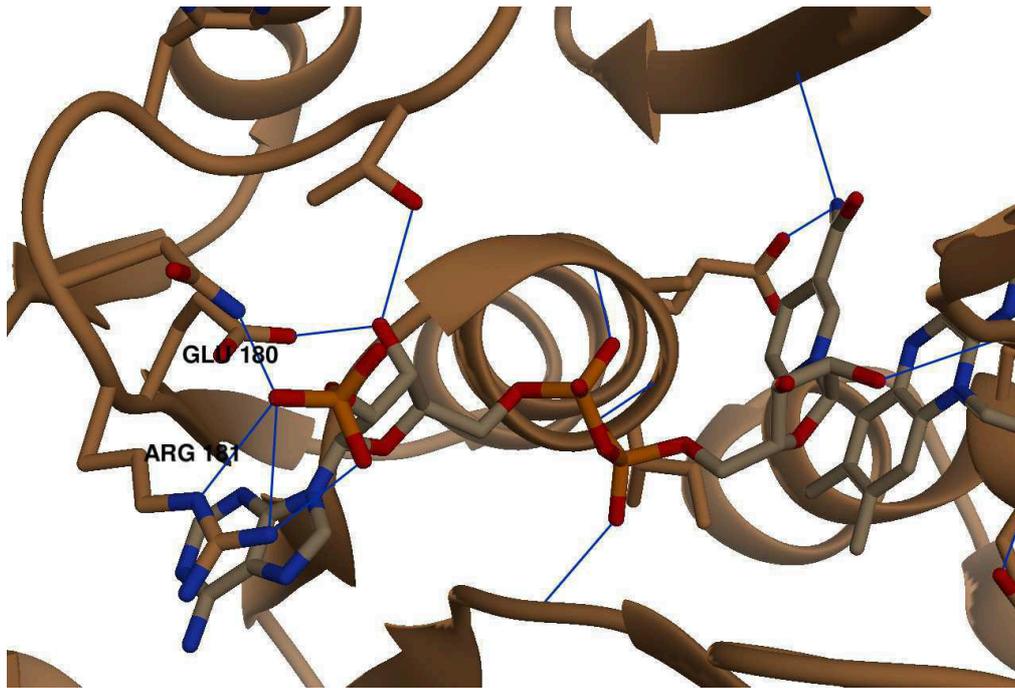


Abbildung 77: Bindungsstelle von NADPH in der Struktur der CoADR aus *B. anthracis* (pdb. 3CGE). Wasserstoffbrückenbindungen wurden mit dem Programm Chimera berechnet und sind als blaue Linien dargestellt.

2.1.2.4 Rationales Proteindesigns der NOX aus *L. brevis*

Durch die Strukturanalyse und den Sequenzvergleich mit anderen NOX und NPOX sowie NAD(H)-, NADP(H)- und NAD(P)(H)-abhängigen Enzymen der GR1-Familie, konnten die Aminosäurepositionen G159, D177, A178 und M179 identifiziert werden, die potentiell für die Bindung von NADH und die Diskriminierung der NADPH-Bindung in der NOX aus *L. brevis* verantwortlich sind bzw. einen Einfluss ausüben. Die Erweiterung des Substratspektrums sollte durch den gezielten Austausch der identifizierter Positionen durch Aminosäuren erfolgen, welche sich sowohl in Größe, Hydrophobizität als auch Ladung deutlich von den natürlich vorkommenden unterscheiden.

Die gezielte Mutagenese der identifizierten Aminosäurepositionen erfolgte nach dem Prinzip der sogenannten „Quick Change“ PCR [Kunkel, 1985]. Bei dieser Methode werden Primer verwendet, welche die gewünschte Mutation in der Sequenz tragen. Diese spezifischen Primer für die Mutagenese werden in einer PCR zur Amplifizierung des gesamten Vektors eingesetzt. Das Ala178 Codon GCG wurde gegen das Gly Codon GGC, das Meth179 Codon ATG gegen das Arg Codon CGC bzw. das His Codon CAT, das Gly159 Codon GGT gegen das Ala Codon GCC bzw. das Ser Codon AGC und das Asp177 Codon gegen das Arg Codon AGG bzw. das Ala Codon GCA oder GCG ausgetauscht.

Ein großer Vorteil hierbei ist es, dass die mutierte DNA bereits in transformationsfähiger zirkulärer Form vorliegt und nicht für die Transformation vorbereitet werden muss. In der „Quick Change“ PCR wurde eine Phusion Polymerase verwendet, nach Ablauf des Programms wurde die Template-DNA durch einen Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *DpnI* abgebaut. *DpnI* erkennt ausschließlich methylierte DNA, so dass die PCR Produkte folglich nicht verdaut werden.

Die verbliebene mutierte Vektor-DNA wurde in kompetente *E. coli* DH5 α Zellen transformiert. Nach Selektion auf LB-Platten (Kanamycin 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) und Kultivierung wurde die Vektor-DNA aus jeweils mehreren Transformanten isoliert und mittels Restriktionsanalyse überprüft. Die weitere Überprüfung geschah mittels Sequenzierung.

Die im Verlauf dieser Arbeit mittels „Quick Change“ PCR hergestellten Einfach-, Doppel- und Mehrfachmutanten sind in der Tabelle 58 aufgeführt.

Tabelle 58: Übersicht der im Verlauf des rationalen Proteindesigns hergestellten Mutanten der NOX aus *L. brevis*.

Mittels „Quick Change“ PCR hergestellte Mutanten der NOX aus <i>L. brevis</i>	
G159A	A178G
D177A	M179H
A178G/M179H	D177A/M179H
A178G/M179R	D177R/M179H
D177A/A178G/M179H	G159A/A178G/M179H
G159A/D177A/M179H	
G159A/D177A/A178G/M179H	G159S/D177A/A178G/M179H
G159S/D177R/A178G/M179H	

Nach Sequenzierung und Verifizierung der eingeführten Mutationen wurden die jeweilige Vektoren zur rekombinanten Produktion der Mutanten in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

2.1.2.5 Heterologe Expression der mutierten *nox*-Gene in *E. coli*

Eine Einzelkolonie von mit dem jeweiligen Vektor transformierten *E. coli* BL21(DE3) wurde in 20 ml LB-Medium (Kanamycin 50 µg ml⁻¹) überimpft. Die Kultivierung erfolgte für 16 bis 24 h bei 120 rpm und 37°C. Mit dieser Vorkultur wurde die Hauptkultur (Autoinduktions-Medium, Kanamycin 50 µg ml⁻¹) auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Die Kultivierung erfolgte im Schüttelkolben unter Schütteln (120 rpm) bei 30°C für 16 h. Die Zellmasse wurde durch Zentrifugation (30 min, 5000 rpm bei 4°C) von dem Medium abgetrennt. Entweder wurde die Zellen direkt für den Zellaufschluss und die anschließende Reinigung genutzt oder bis zur weiteren Verwendung als Pellet bei -18°C gelagert.

2.1.2.6 Reinigung der rekombinanten NOX-Mutanten

Zur Reinigung der NOX-Mutanten und des Wildtyp-Enzyms mittels Metallaffinitätschromatographie wurde ein Tropfsäulen-System der Firma Quiagen verwendet.

Für die Mutanten D177R/M179H und G159S/D177R/A178G/M179H konnte im Zellrohextrakt nach Ultraschall-Aufschluss keine Aktivität in der Oxidation von NADH und NADPH nachgewiesen werden. Eine Kontrolle des Zellrohextraktes mittels SDS-PAGE wurde durchgeführt und zeigte, dass die beiden Mutanten nicht als lösliches Enzym gebildet werden und in Form von „Inclusion Bodies“ in der unlöslichen Zellfraktion vorliegen. Eine Variation der Expressionsbedingungen (erniedrigte Temperatur von 25°C und 15°C) sowie die Co-Expression des Chaperonsystems groES-groEL (Takara Chaperone Kit, Vektor pGro7) führte nicht zur Bildung von löslichem Enzym. Die NOX-Mutante A178G/M179R mit Arg an der Position 179 zeigte 40 % weniger Aktivität in der Oxidation von NADPH (spez. Aktivität im Zellrohextrakt) als die entsprechende Mutante mit His (A178G/M179H) und wurde daher nicht weiter bearbeitet.

Da aus der Literatur [Kuzu, 2005] und den vorangegangenen Arbeiten mit dem Wildtyp-Enzym bekannt war, dass das zellinterne FAD Level von *E. coli* BL21(DE3) bei einer starken Überexpression der NOX nicht ausreicht um das Enzym vollständig mit Cofaktor abzusättigen, wurde den Rohextrakten der Enzympräparationen FAD in verschiedenen Konzentration von 10 µM bis 200 µM zugesetzt. Der Vergleich der spez. Aktivitäten im Rohextrakt vor und nach der Inkubation mit FAD (15 min auf Eis) zeigte für alle rekombinanten Enzyme eine deutliche Steigerung der Aktivität (Aktivitätsassay: 0,2 mM NADH bzw. NADPH, 50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C).

Die spezifische Aktivität der Wildtyp-NOX wurde durch die Zugabe von 150 μM FAD von 79,3 U mg^{-1} um das 1,6-fache auf 128 U mg^{-1} erhöht. Eine weitere Enzymaktivierung wurde auch bei erhöhten FAD Konzentrationen von 200 μM nicht beobachtet. Offensichtlich wird inaktives Apo-Enzym gebildet, welches sich *in vitro* durch Inkubation mit FAD in das Holo-Enzym überführen und damit aktivieren lässt. Analog zum Wildtyp-Enzym konnte bei keiner der Mutanten eine weitere Enzymaktivierung bei erhöhten FAD Konzentrationen von $>150 \mu\text{M}$ beobachtet werden. In der Abbildung 78 ist die Aktivierung der Mutante 179H durch externes FAD dargestellt.

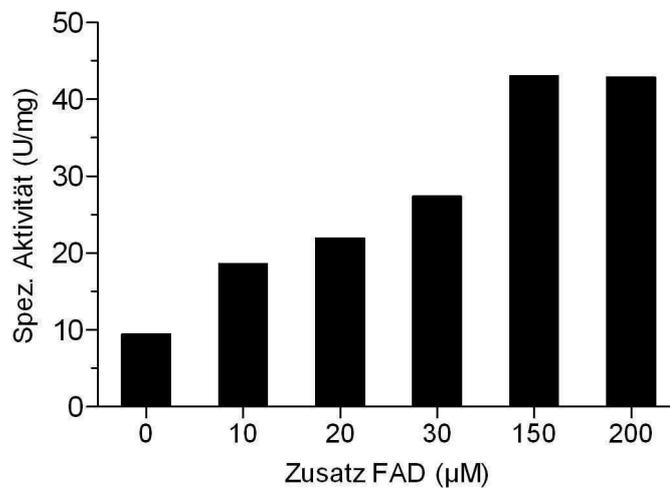


Abbildung 78: Aktivierung der Mutante 179H. Dargestellt ist die spez. Aktivität in der Oxidation von NADH in Abhängigkeit von der Konzentration an zugesetztem FAD (Aktivitätsassay: 0,2 mM NADH, 50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C).

Interessanterweise unterscheiden sich die mittels rationalem Proteindesign hergestellten Mutanten deutlich hinsichtlich dem Grade der Aktivierung. Die Ergebnisse der Untersuchung zur Aktivierung durch FAD der verschiedenen Mutanten ist in der Tabelle 59 aufgeführt. Die Aktivierung in der Oxidation von NADH und NADPH weicht für die einzelnen Enzyme nur leicht voneinander ab.

Tabelle 59: Aktivierung der Wildtyp-NOX und der hergestellten Mutanten durch extern zugefügtes FAD (150 μM) (Aktivitätsassay: 0,2 mM NADH bzw. NADPH, 50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C). FAD wurde jeweils dem Rohextrakt der Enzympräparationen zugefügt.

NOX	Aktivierung (x-fach) in der Oxidation von	
	NADH	NADPH
WT	1,6	-
G159A	3,9	-
D177A	2,0	2,2
A178G	3,2	3,3
M179H	4,5	4,5
A178G/M179H	5,4	5,4
D177A/M179H	2,7	2,9
D177A/A178G/M179H	8,2	10,1
G159A/D177A/M179H	8,7	9,2
G159A/A178G/M179H	9,7	12,0
G159A/D177A/A178G/M179H	6,2	7,4
G159S/D177A/A178G/M179H	4,3	5,1

Nachfolgend ist stellvertretend für die verschiedenen Mutanten und die Wildtyp-NOX (siehe auch 1.1.7.3) die Reinigung der Mutante D177A/M179H näher beschrieben. Die Ergebnisse der Reinigung sind in Tabelle 60 zusammengefasst und dargestellt. Aus 2,7 ml geklärtem Rohextrakt mit einer Volumenaktivität von 1068 U ml^{-1} (Oxidation von NADPH, nach der FAD Aktivierung) und einem Proteingehalt von 20,2 mg ml^{-1} konnten 2135 U NAD(P)H Oxidase mit einer spezifischen Aktivität von 90,0 U mg^{-1} (Oxidation von NADPH) gewonnen werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 74,2 %, bezogen auf die Ausgangsaktivität im Rohextrakt und unter Berücksichtigung der Enzym-Aktivierung durch die Inkubation mit FAD.

Tabelle 60: Reinigung der Mutante D177A/M179H aus *E. coli* BL21(DE3)/pHISNOXD177A/M179H (Aktivitätsassay: 0,2 mM NADH bzw. NADPH, 50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C). Die Ausbeute und der Reinigungsfaktor wurden auf die Ausgangsaktivität des Rohextraktes bezogen, unter Berücksichtigung der Aktivierung durch FAD.

Reinigungsschritt	Spez. Akt. (U mg^{-1})	Gesamt-Aktivität (U)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor (-fach)
Rohextrakt (NADH)	50,6	2762	100	1,0
Rohextrakt (NADPH)	52,9	2884	100	1,0
Ni-NTA (NADH)	88,5	2070	74,9	1,7
Ni-NTA (NADPH)	90,0	2135	74,2	1,7

Eine SDS-PAGE der Fraktionen entsprechend Tabelle 60 wurde zur Reinheitskontrolle und zur Dokumentation der Reinigung durchgeführt. Das SDS-Gel (Abb. 79) zeigt die homogene NOX-Mutante D177A/M179H mit Untereinheiten von ca. 49 kDa, sowie zum Vergleich die homogene Wildtyp-NOX.

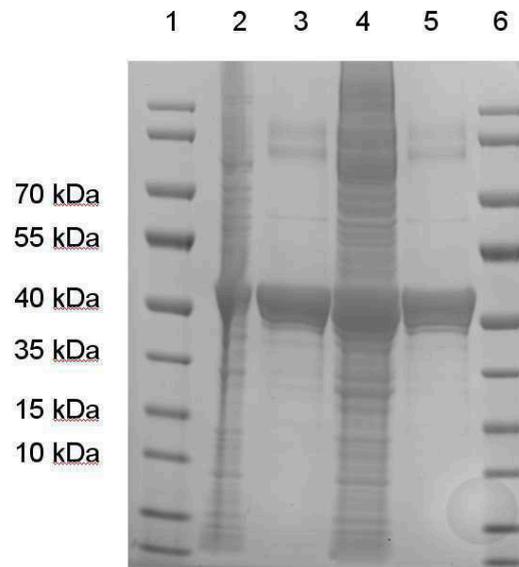


Abbildung 79: SDS-PAGE, Spur 1: Protein Standard SeeBlue2, Spur 2: Rohextrakt Wildtyp-NOX *E. coli* BL21 (DE3)/pHISNOX, Spur 3: Homogene Wildtyp-NOX nach Chromatographie (Ni-NTA) und Ultrafiltration, Spur 4: Rohextrakt NOX-Mutante D177A/M179H *E. coli* BL21 (DE3)/pHISNOXD177A/M179H, Spur 5: Homogene NOX-Mutante D177A/M179H nach Chromatographie (Ni-NTA) und Ultrafiltration.

Um weiterhin sicherzustellen, dass die Enzyme im Verlauf der Aufreinigung nicht durch ein "Auswaschen" des Cofaktors FAD inaktiviert werden, wurde den aufgereinigten Enzymen FAD in einer Konzentration von 150 μ M zugesetzt. Nach 15 min Inkubation auf Eis konnte keine Aktivierung der gereinigten Enzyme festgestellt werden.

Die rekombinanten NOX-Mutanten sowie das Wildtyp-Enzym ließen sich in nur einem Chromatographieschritt unter Verwendung von Ni-NTA nahezu bis zur vollständigen Homogenität aufreinigen, der Reinheitsgrad der Enzyme war in allen Fällen > 98%. Die spez. Aktivitäten der gereinigten Enzyme sind in der Tabelle 61 aufgeführt.

Tabelle 61: Die spezifischen Aktivitäten der Wildtyp-NOX und der Mutanten nach Isolierung und Reinigung aus *E. coli* BL21(DE3) (Aktivitätsassay: 0,2 mM NADH bzw. NADPH, 50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C); n.a. nicht aktiv.

Enzym	Substrat	Spezifische Aktivität (U mg ⁻¹)
WT	NADH	285,6
	NADPH	n.a.
G159A	NADH	17,1
	NADPH	n.a.
D177A	NADH	38,7
	NADPH	64,5
A178G	NADH	200,4
	NADPH	4,3
M179H	NADH	63,2
	NADPH	30
A178G/M179H	NADH	103,5
	NADPH	46,9
D177A/M179H	NADH	88,5
	NADPH	90
D177A/A178G/M179H	NADH	79,6
	NADPH	49,1
G159A/D177A/M179H	NADH	6,3
	NADPH	12,5
G159A/A178G/M179H	NADH	1,9
	NADPH	7,1
G159A/D177A/A178G/M179H	NADH	3,9
	NADPH	14,1
G159S/D177A/A178G/M179H	NADH	3,1
	NADPH	16,5

2.1.2.7 Bestimmung der kinetischen Konstanten

Für die Charakterisierung der Wildtyp-NOX aus *L. brevis* sowie der hergestellten Mutanten bezüglich der kinetischen Parameter gegenüber den Substraten NADH und NADPH wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der jeweiligen Substratkonzentration an NADH oder NADPH ermittelt. Die Bestimmung der kinetischen Konstanten wurde bei 30°C in 50 mM Kpi Puffer pH 6,0 durchgeführt. Die Wildtyp-NOX sowie die verschiedenen Mutanten wurden als gereinigtes Enzym unmittelbar nach der Reinigung eingesetzt, um eine Verfälschung der Werte durch eine mögliche Enzyminaktivierung während der Lagerung auszuschließen. Für NADH- und NADPH-Konzentrationen von >0,30 mM wurde die Aktivitätsmessung in gleicher Zusammensetzung, aber mit vermindertem Volumen (160 µl) in Mikrotiterplatten (Mikrotiterplattenphotometer) durchgeführt.

Dadurch war es möglich, die Schichtdicke der Reaktionslösung herabzusetzen, da für eine Messung im Küvetten Photometer die Absorptionen der Reaktionslösungen durch die hohen Konzentrationen an NADH und NADPH ungeeignet war. Im untersuchten Konzentrationsbereich konnte bei keinem der untersuchten Enzyme eine Substratüberschussinhibierung beobachtet werden. Die Auswertung und Bestimmung der Parameter v_{\max} und K_M durch nicht-lineare Regression nach Michaelis-Menten sowie die Modellierung der Diagramme erfolgte mit dem Computerprogrammen PRISM mit einem R^2 -Wert von 0.96 oder höher. Die Berechnung des k_{cat} Wertes, auch als Wechselzahl des Enzyms bezeichnet, erfolgte auf Grundlage der monomeren Form der NOX (Berechnung des Molekulargewichtes ohne FAD).

Nachfolgend sind die Kurvenverläufe der Kinetikmessungen der Wildtyp-NOX aus *L. brevis* (Abb. 80) sowie der verschiedenen Mutanten (Abb. 81 bis 91) zur Bestimmung der kinetischen Parameter v_{\max} und K_M für die Substrate NADH und NADPH dargestellt.

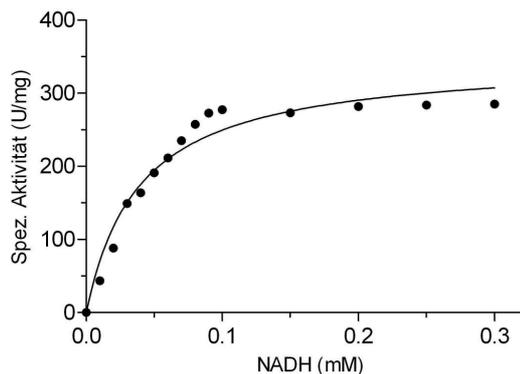


Abbildung 80: Kinetikmessung der Wildtyp-NOX aus *L. brevis* für das Substrat NADH (50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C).

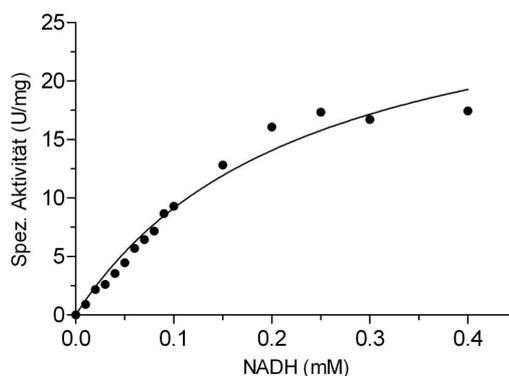


Abbildung 81: Kinetikmessung der G159A Mutante für das Substrat NADH (50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C).

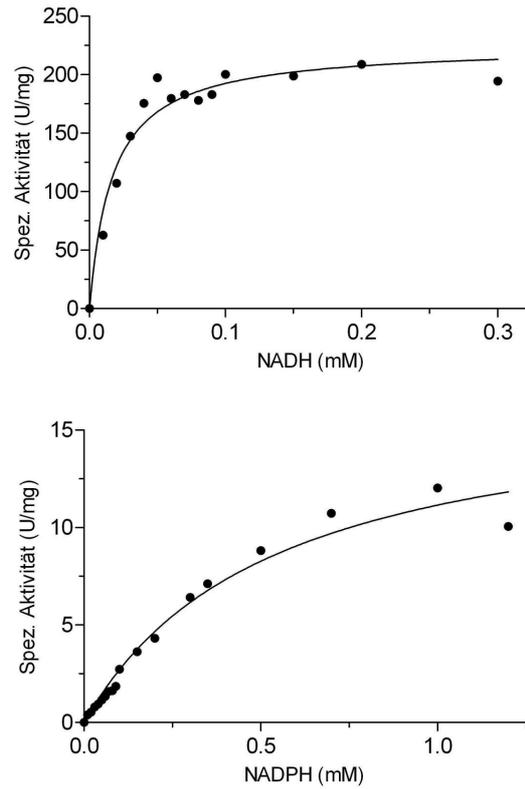


Abbildung 82: Kinetikmessung der A178G Mutante für die Substrate NADH und NADPH (50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C).

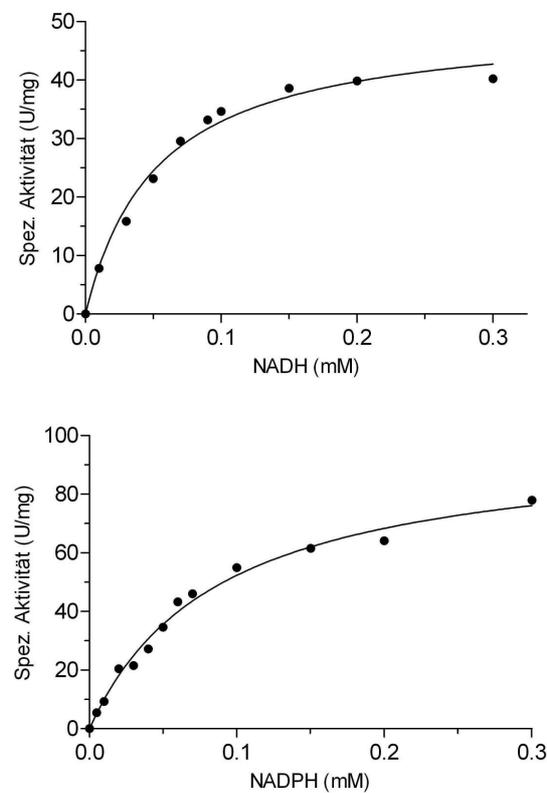


Abbildung 83: Kinetikmessung der D177A Mutante für die Substrate NADH und NADPH (50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C).

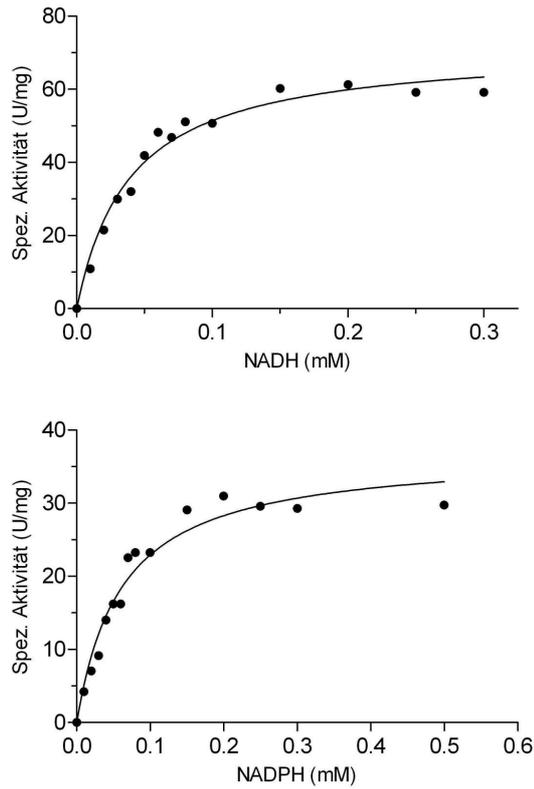


Abbildung 84: Kinetikmessung der M179H Mutante für die Substrate NADH und NADPH (50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C).

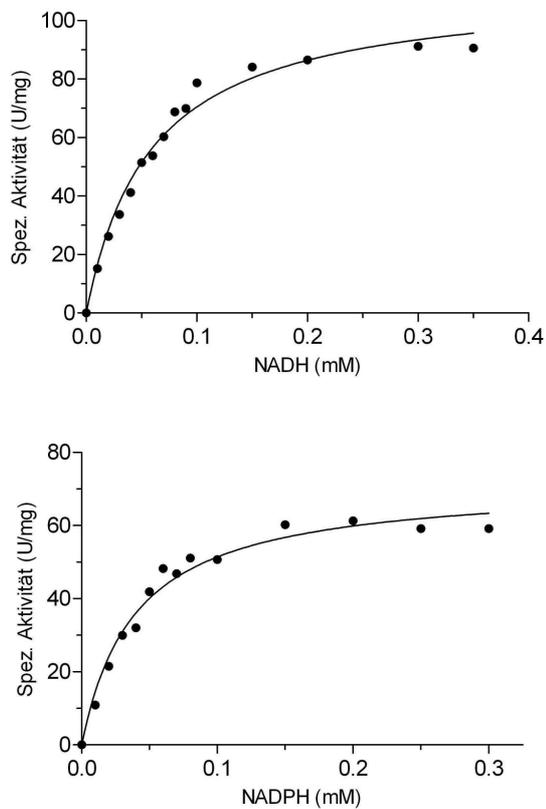


Abbildung 85: Kinetikmessung der D177A/M179H Mutante für die Substrate NADH und NADPH (50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C).

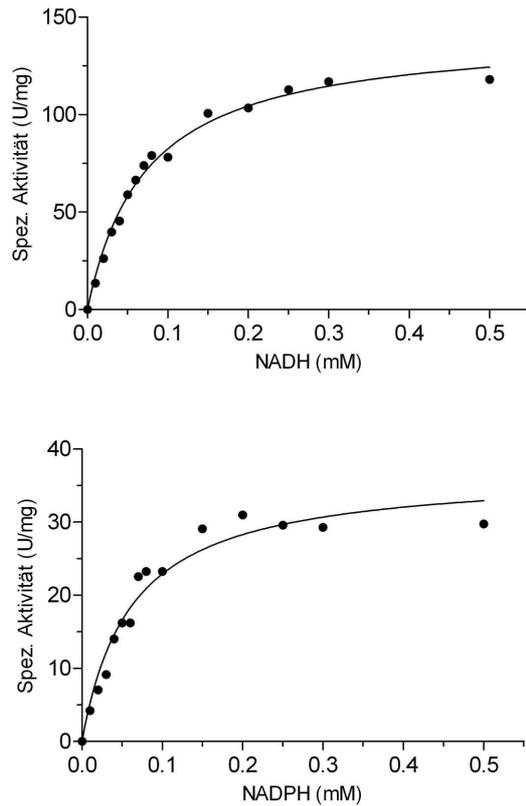


Abbildung 86: Kinetikmessung der A178G/M179H Mutante für die Substrate NADH und NADPH (50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C).

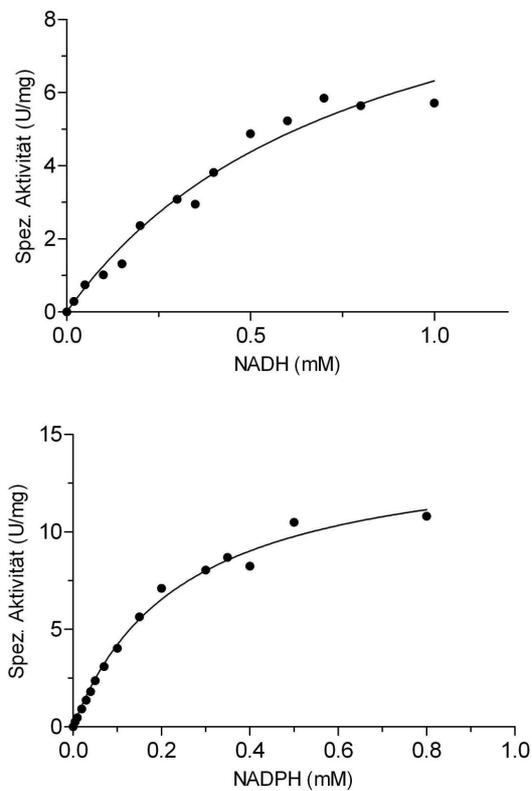


Abbildung 87: Kinetikmessung der G159A/A178G/M179H Mutante für die Substrate NADH und NADPH (50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C).

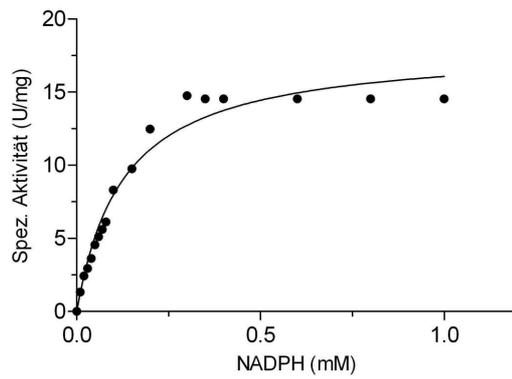
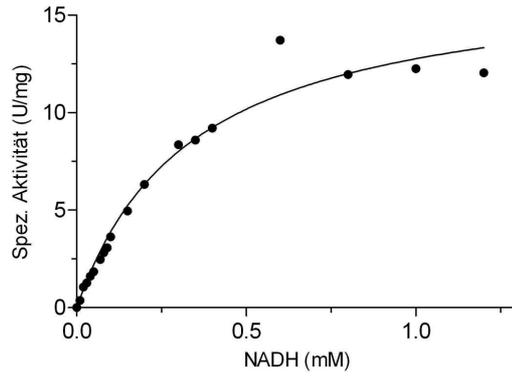


Abbildung 88: Kinetikmessung der G159A/D177A/M179H Mutante für die Substrate NADH und NADPH (50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C).

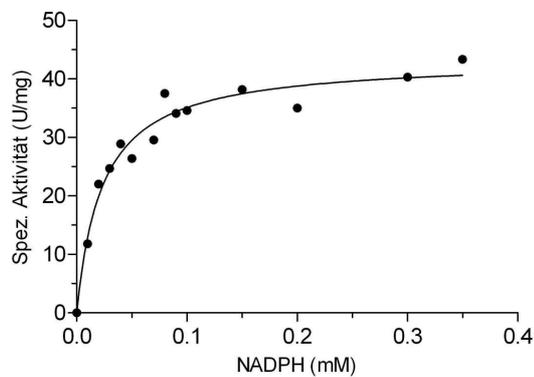
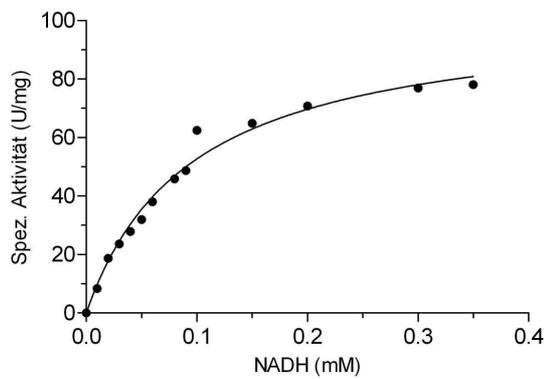


Abbildung 89: Kinetikmessung der D177A/A178G/M179H Mutante für die Substrate NADH und NADPH (50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C).

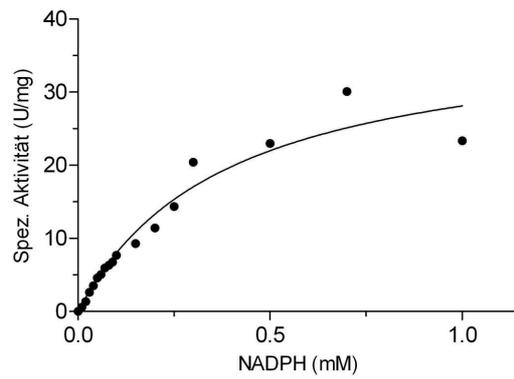
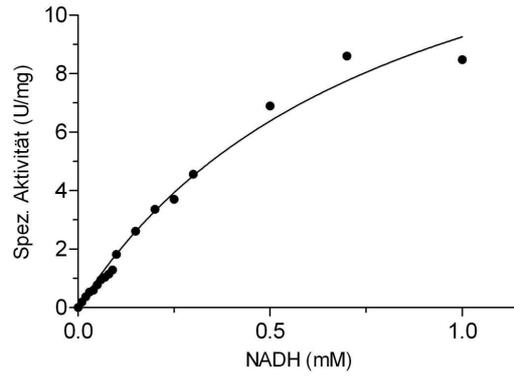


Abbildung 90: Kinetikmessung der G159A/D177A/A178G/M179H Mutante für die Substrate NADH und NADPH (50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C).

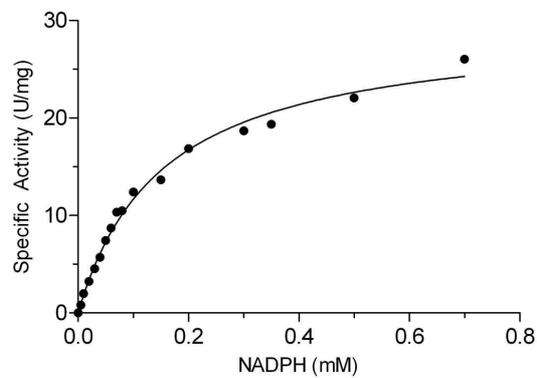
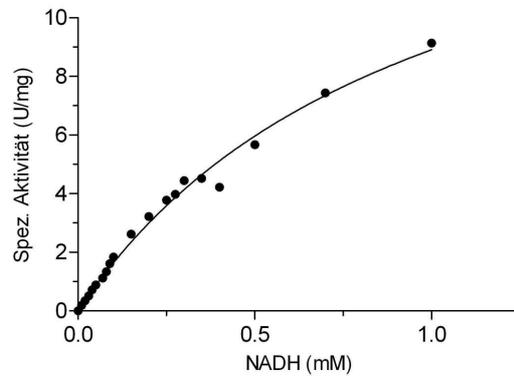


Abbildung 91: Kinetikmessung der G159S/D177A/A178G/M179H Mutante für die Substrate NADH und NADPH (50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C).

Die ermittelten v_{\max} , K_M , k_{cat} sowie k_{cat}/K_M Werte der verschiedenen mittels rationalem Proteindesign hergestellten NOX-Mutanten bezüglich der Oxidation von NADH und NADPH sind in der Tabelle 62 zusammengefasst.

Tabelle 62 A und B: Die kinetischen Parameter der Wildtyp-NOX und der Mutanten in der Oxidation von NADH (A) bzw. NADPH (B) (n.a.: nicht aktiv) (50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C).

A		NADH			
NADH Oxidase		v_{\max} (U mg ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (μM ⁻¹ s ⁻¹)
WT		347,5	0,039	288,2	7,4
G159A		30,6	0,235	25,4	0,108
D177A		50,2	0,052	41,6	0,8
A178G		225,0	0,017	186,6	11,1
M179H		71,7	0,039	59,5	1,5
A178G/M179H		142,4	0,073	118,1	1,6
D177A/M179H		111,7	0,058	92,6	1,6
D177A/A178G/M179H		102,9	0,095	85,3	0,9
G159A/D177A/M179H		17,1	0,341	14,2	0,042
G159A/A178G/M179H		11,4	0,798	9,4	0,011
G159A/D177A/A178G/M179H		16,9	0,822	14,0	0,017
G159S/D177A/A178G/M179H		17,6	0,977	14,6	0,015

B		NADPH			
NADH Oxidase		v_{\max} (U mg ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (μM ⁻¹ s ⁻¹)
WT		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
G159A		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
D177A		98,5	0,088	81,6	0,927
A178G		17,1	0,533	14,2	0,027
M179H		37,0	0,061	30,7	0,5
A178G/M179H		92,6	0,170	76,8	0,451
D177A/M179H		97,8	0,017	81,1	4,7
D177A/A178G/M179H		43,3	0,023	35,9	1,6
G159A/D177A/M179H		18,1	0,127	15,0	0,118
G159A/A178G/M179H		14,6	0,246	12,1	0,049
G159A/D177A/A178G/M179H		38,9	0,385	32,3	0,084
G159S/D177A/A178G/M179H		29,6	0,153	24,5	0,160

Die berechneten $(k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{NADPH}}/(k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{NADH}}$ Werte sind in der Tabelle 63 wiedergegeben. Aus der Serie an hergestellten Mutanten, wurden die NOX-Mutanten D177A/M179H, D177A/A178G/M179H und G159S/D177A/A178G/M179H für die weitere Charakterisierung und den Einsatz zur Cofaktorregenerierung ausgewählt.

Tabelle 63: Substratspezifität $(k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{NADPH}}/(k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{NADH}}$ der NOX-Mutanten (n.a.: nicht aktiv).

NOX	$\frac{k_{\text{cat}}/K_M \text{ NADPH}}{k_{\text{cat}}/K_M \text{ NADH}}$
WT	n.a.
G159A	n.a.
D177A	1,16
A178G	0,002
M179H	0,33
A178G/M179H	0,28
D177A/M179H	2,94
D177A/A178G/M179H	1,74
G159A/D177A/M179H	2,84
G159A/A178G/M179H	4,46
G159A/D177A/A178G/M179H	4,93
G159S/D177A/A178G/M179H	10,70

2.1.2.8 Bestimmung des pH-Optimums ausgewählter Mutanten

Die pH-Optima der unter kinetischen Gesichtspunkten interessantesten NOX-Mutanten D177A//M179H und G159S/D177A/A178G/M179H (sowie des Wildtyp-Enzyms) wurden in der Oxidation von NADH sowie NADPH bestimmt. Für die Bestimmung des pH-Optimums wurde der Standardaktivitätsassay mit 0,2 mM NADH bzw. NADPH genutzt, der pH Wert wurde von 5,0 bis 9,0 unter Verwendung der aufgeführten Puffern variiert (Abbildung 92).

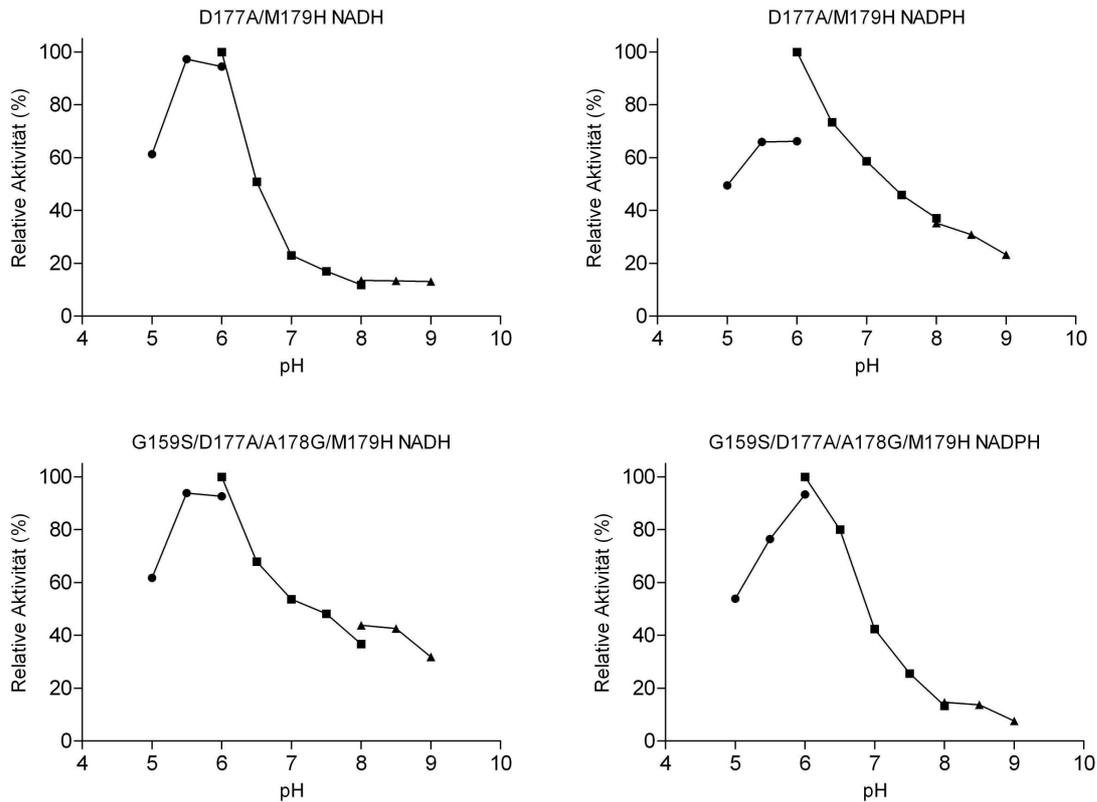


Abbildung 92: pH-Optima der NOX-Mutanten D177A/M179H und G159S/D177A/A178G/M179H in der Oxidation von NADH und NADPH. Die Enzymaktivität wurde in folgenden 50 mM Puffern bestimmt (0,2 mM NADH bzw. NADPH, 30°C): (—●—) Na-Acetat Puffer, pH 5,0-6,0; (—■—) Kpi Puffer, pH 6,0-8,0; (—▲—) Tris-HCl, pH 8,0-9,0.

Aus der Untersuchung ergab sich für die Wildtyp-NOX aus *L. brevis* ein pH-Optimum von pH 6,0 in der Oxidation von NADH, was dem in der Literatur angeführten Wert entspricht [Hummel und Riebel, 2003]. Das Wildtyp-Enzym ist aktiv über einen breiten pH-Bereich, die Aktivitäten bei pH 5,0 und pH 9,0 erreichen 74 % und 24 % des Wertes bei pH 6,0.

Ähnliche Ergebnisse wurden für die Mutanten D177A/M179H und G159S/D177A/A178G/M179H in der Oxidation von NADH erhalten. Beide Mutanten weisen einen breiten Aktivitätsbereich zwischen pH 5,0 und pH 9,0 mit einem deutlichen Optimum bei pH 6,0 auf. Abbildung 92 zeigt das pH-Aktivitätsprofil der Doppelmutante D177A/M179H in der Oxidation von NADPH, das pH-Optimum befindet sich klar erkennbar bei 6,0, die Aktivitäten bei pH 5,0 und pH 9,0 erreichen ca. 50 % und 24 % des Wertes bei pH 6,0. Die Mehrfachmutante G159S/D177A/A178G/M179H zeigt ein ähnliches Verhalten in der Oxidation von NADPH, das Optimum liegt bei pH 6,0, die Aktivitäten bei pH 5,0 und pH 9,0 erreichen 54 und 8 % des Wertes bei pH 6,0.

Zusammenfassend besitzen die untersuchten Mutanten D177A/M179H und G159S/D177A/A178G/M179H in der Oxidation von NADH mit pH 6,0 das gleiche pH-Optimum wie die Wildtyp-NOX, zusätzlich erreichen die Aktivitäten der beiden Mutanten in der Oxidation von NADPH bei pH 6,0 ebenfalls ihr Maximum.

2.2 Entwicklung eines Ganzzellbiokatalysators mit *in vivo* NADP⁺-Regenerierung

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Ganzzellbiokatalysators mit zellinterner enzymatischer NADP⁺ Cofaktorregenerierung, da ein solches System trotz eines breiten möglichen Einsatzbereiches bis heute noch nicht realisiert und beschrieben wurde. Ganzzellbiokatalysatoren sollten durch die Co-Expression der Gene der NADP⁺-abhängigen (*R*)-spezifischen Alkohol-Dehydrogenase (ADH) aus *Lactobacillus kefir* [Hummel et al., 1990; Bradshaw et al., 1992] sowie der NADP⁺-abhängigen (*R*)-spezifischen ADH aus *Lactobacillus brevis* [Riebel et al., 2003; Weckbecker, 2005] in Kombination mit der NOX-Mutante D177A/M179H aus dem rationalen Proteindesign zur *in vivo*-Cofaktorregenerierung von NADP⁺ konstruiert werden.

2.2.1 Konstruktion Ganzzellkatalysator ADH/NOX

Um einen Ganzzellbiokatalysator zu erhalten, sollten die ADHs aus *L. kefir* bzw. aus *L. brevis* und die NAD(P)H Oxidase D177A/M179H in verschiedene Expressionsvektoren kloniert und diese zur Genexpression gemeinsam in *E. coli* transformiert werden. Als Expressionsvektor für die NOX-Mutante D177A/M179H wurde der kommerzielle Vektor pACYC von Novagen ausgewählt, da dieser eine Kombination mit verschiedenen Vektoren der kommerziellen und oft verwendeten pET-Reihe von Novagen erlaubt.

Hierdurch ist es für zukünftige Arbeiten möglich, bereits existierende Vektor-Gen Konstrukte in Kombination mit der NOX-Mutante D177A/M179H zur *in vivo*-Regenerierung von NADP⁺ zu nutzen, ohne vor Aufnahme der eigentlichen Arbeiten aufwendige Klonierungen durchführen zu müssen.

Der Vektor pACYC enthält T7-Promotor und T7-Terminator für die T7-Polymerase, eine Chloramphenicol Resistenz sowie zwei „multiple cloning sites“ [Novagen, 2014]. Die Klonierung des *nox*-Genes erfolgte über die *Nde*I und *Xho*I Schnittstellen (pACNOXD177A/M179H: pACYC mit *nox* D177A/M179H).

Für die Co-Expression der *adh* und *nox* Gene wurden die Plasmide pACNOXD177A/M179H und pADHLk (Vektor pet21a von Novagen mit *adh* aus *L. kefir* DSM 20587) [Weckbecker, 2005] sowie pACNOXD177A/M179H und pADHLb (Vektor petDuet-1 von Novagen mit *adh* aus *L. brevis* DSM 20054) [Weckbecker, 2005] in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) co-transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Platten mit $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin und $34 \mu\text{g ml}^{-1}$ Chloramphenicol.

2.2.2 Produktion Ganzzellkatalysator ADH/NOX

Jeweils eine Einzelkolonie von positiven *E. coli* BL21(DE3)/pADHLk/pACNOXD177A/M179H und *E. coli* BL21(DE3)/pADHLb/pACNOXD177A/M179H Transformanten wurde in 20 ml LB-Medium ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin, $34 \mu\text{g ml}^{-1}$ Chloramphenicol) überimpft und bei 37°C für 16 h kultiviert. Mit der Vorkultur wurde die Hauptkultur auf eine OD_{600} von 0,05 angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (120 rpm) kultiviert. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,5 erfolgte die Induktion der Genexpression mit 1 mM IPTG. Die weitere Kultivierung erfolgte bei 30°C für 16 h. Die Zellmasse wurde durch Zentrifugation (30 min, 5000 rpm, 4°C) vom Medium abgetrennt und zweifach mit TEA Puffer (100 mM, pH 7,0, 1 mM MgCl_2) gewaschen. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung als Pellet bei -18°C gelagert. Nach Zellaufschluss (TEA Puffer 100 mM, pH 7,0, 1 mM MgCl_2) und Zentrifugation wurde der geklärte Rohextrakt auf die Aktivität der Biokatalysatoren hin untersucht. (ADH Aktivitätsassay: 10 mM *rac*-1-Phenylethanol, 100 mM TEA-Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl_2 , 0,1 mM NADP^+ ; NOX Aktivitätsassay: 0,1 mM NADPH, 100 mM TEA-Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl_2). Unter den gewählten Expressionsbedingungen werden sowohl beide ADHs als auch die NOX-Mutante D177A/M179H rekombinant gebildet. Da die NOX-Mutante in deutlich geringerer Menge rekombinant gebildet wurde, war eine Bestimmung der ADH-Aktivität aufgrund der zu dieser verhältnismäßig niedrigen NOX-Aktivität möglich.

Im Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)/pADHLk/pACNOXD177A/M179H zeigt die NAD(P)H-Oxidase eine Aktivität von $16,5 \text{ U ml}^{-1}$ (NADPH), während die Aktivität der ADH aus *L. kefir* 550 U ml^{-1} betrug. Es werden 2200 U ADH sowie 66 U NOX (Oxidation von NADPH) pro g Bakterienfeuchtmasse gebildet. Das Verhältnis der Aktivitäten der ADH aus *L. kefir* und der NOX-Mutante D177A/M179H ist unter den gewählten Expressionsbedingungen 33,3 zu 1.

Im Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3)/pADHLb/pACNOXD177A/M179H zeigt die NOX-Mutante D177A/M179H eine Aktivität von 16,6 U ml⁻¹ (NADPH), während die Aktivität der ADH aus *L. brevis* 587,5 U ml⁻¹ betrug. Es werden 2350 U ADH sowie 66,4 U NOX (Oxidation von NADPH) pro g Bakterienfeuchtmasse gebildet. Das Verhältnis der ADH aus *L. brevis* und der NOX-Mutante D177A/M179H ist unter den gewählten Expressionsbedingungen 35,4 zu 1.

Die Volumen- bzw. spez. Aktivitäten der Enzyme sind in der Tabelle 64 und 65 aufgeführt. Die Enzyme zeigten eine ausreichende Aktivität für die geplante Biotransformation und somit wurden die Zellen für die folgenden Arbeiten als Ganzzellbiokatalysator eingesetzt.

Tabelle 64: Aktivitäten der ADH aus *L. kefir* (LkADH) und der NOX-Mutante D177A/M179H im *E. coli* BL21(DE3)/pADHLk/pACNOXD177A/M179H Rohextrakt (Aktivitätsassay: ADH: 10 mM *rac*-1-Phenylethanol, 100 mM TEA-Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM NADP⁺; NOX: 0,1 mM NADPH, 100 mM TEA-Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂).

Enzym	Volumenaktivität (U ml ⁻¹)	Proteingehalt (mg ml ⁻¹)	Spez. Aktivität (U mg ⁻¹)
LkADH	550	18,8	29,25
NAD(P)H-Oxidase	16,5	18,8	0,87

Tabelle 65: Aktivitäten der ADH aus *L. brevis* (LbADH) und NOX-Mutante D177A/M179H im *E. coli* BL21(DE3)/pADHLb/pACNOXD177A/M179H Rohextrakt (Aktivitätsassay: ADH 10 mM *rac*-1-Phenylethanol, 100 mM TEA-Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM NADP⁺; NOX 0,1 mM NADPH, 100 mM TEA-Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂).

Enzym	Volumenaktivität (U ml ⁻¹)	Proteingehalt (mg ml ⁻¹)	Spez. Aktivität (U mg ⁻¹)
LkADH	587,5	16,2	36,26
NAD(P)H-Oxidase	16,6	16,2	1,02

Eine SDS-PAGE zeigt (Abb. 93), dass die NOX-Mutante D177A/M179H (ca. 49 kDa) in *E. coli* BL21(DE3)/pADHLk/pACNOXD177A/M179H und *E. coli* BL21(DE3)/pADHLb/pACNOXD177A/M179H deutlich schwächer expremiert wird als die jeweilige ADH (ca. 26 kDa), was auch an der niedrigen Aktivität im Rohextrakt zu erkennen ist (Anmerkung: Der verwendete Protein-Standard lief im Gel anscheinend nicht optimal, so dass die kDa Angabe des Herstellers nicht genau zutrifft).

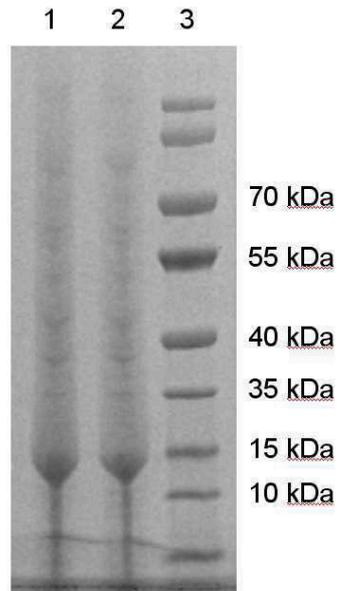


Abbildung 93: SDS-PAGE, Spur 1: *E. coli* BL21(DE3)/pADHLk/pHISNOXD177A/M179H Rohextrakt, lösliche Fraktion, Spur 2: *E. coli* BL21(DE3)/pADHLb/pHISNOXD177A/M179H Rohextrakt, lösliche Fraktion, Spur 3: Protein Standard Fermentas

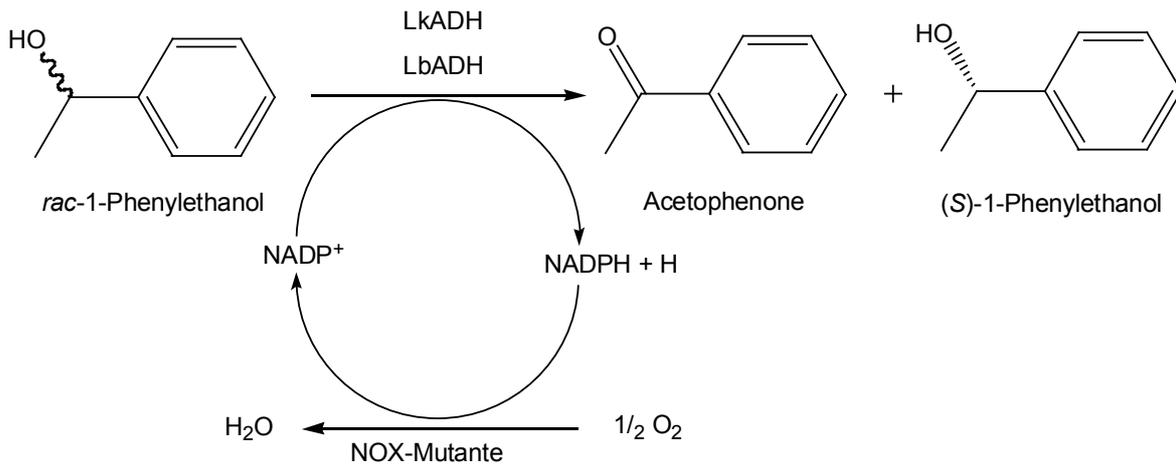
2.3 Anwendung der NOX-Mutanten zur Regenerierung von NADP⁺ - Darstellung von enantiomerenreinen Alkoholen

In der vorliegenden Arbeit erzeugte NAD(P)H-oxidierende NOX-Mutanten sollten als Anwendungsbeispiel zur *in situ*-Cofaktorregenerierung von NADP⁺ und NAD⁺ in Verbindung mit der NADP⁺ abhängigen (*R*)-spezifischen ADH aus *L. kefir* [Hummel et al., 1990; Bradshaw et al., 1992], der NADP⁺ abhängigen (*R*)-spezifischen ADH aus *L. brevis* [Riebel et al., 2003; Weckbecker, 2005] sowie der NAD⁺ abhängigen (*S*)-spezifischen ADH aus *Rhodococcus ruber* [Kosjek et al., 2004] zur Synthese von enantiomerenreinen Alkoholen eingesetzt werden.

Hierbei sollten sowohl isolierte Enzyme als auch ganze Zellen als Biokatalysator genutzt werden. Als Standardsubstrat für die ADHs wurde *rac*-1-Phenylethanol verwendet, diese Verbindung wird von den ADHs stereoselektiv zu Acetophenon oxidiert.

2.3.1 Darstellung (S)-1-Phenylethanol aus rac-1-Phenylethanol durch den Einsatz der NADP⁺-abhängigen ADHs aus *L. kefir* und *L. brevis* unter *in situ*-Cofaktorregenerierung durch eine NOX-Mutante

Die Biotransformation wurde mit Hilfe der rekombinanten NADP⁺-abhängigen (R)-spezifischen ADH aus *L. kefir* und *L. brevis* durchgeführt, zur *in situ*-Regenerierung von NADP⁺ wurden durch das rationale Proteindesign konstruierte NOX-Mutanten eingesetzt (Schema 19).



Schema 19: Konzept zur stereoselektiven Oxidation von *rac*-1-Phenylethanol durch die (R)-spezifischen ADHs aus *L. kefir* (LkADH) und *L. brevis* (LbADH) unter *in situ*-Cofaktorregenerierung von NADP⁺ mittels NAD(P)H-oxidierenden NOX-Mutanten.

Der einleitende Biotransformationsansatz enthielt 10 mM *rac*-1-Phenylethanol, 100 mM TEA-Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM NADP⁺, 1 U ml⁻¹ LkADH bzw. LbADH (zellfreier *E. coli* Rohextrakt, sterilfiltriert) und 5 U ml⁻¹ NOX D177A/M179H, Gesamtvolumen 1 ml. Bei dem Einsatz der ADHs ist eine Zugabe von Mg²⁺-Ionen notwendig, um einer Inaktivierung des Biokatalysators vorzubeugen. Die Reaktionstemperatur betrug 30°C, die Biotransformation wurde als Batch-Umsetzung in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen unter Schütteln bei 900 rpm durchgeführt (Eppendorf Thermomixer). Als Kontrolle wurde eine analoge Biotransformation zur Darstellung von Acetophenon und (S)-1-Phenylethanol aus *rac*-1-Phenylethanol ohne Cofaktorregenerierung durch die NOX D177A/M179H durchgeführt. Die Reaktionsgefäße wurden in regelmäßigen Abständen geöffnet, um für einen ausreichenden Gasaustausch zu sorgen. Proben von 100 µl wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen, mit dem doppelten Volumen an Ethylacetat gründlich gemischt (Vortexer 1 min max. Einstellung) und zur Trennung der wässrigen und organischen Phase für 3 min bei zentrifugiert (14000 rpm). Die organische Phase wurde vorsichtig abgenommen und mittels Gaschromatographie (CP-Chirasil-DEX CB) analysiert.

Durch den Einsatz der NAD(P)H-abhängigen (*R*)-spezifischen Alkohol Dehydrogenasen sowie der NAD(P)H Oxidase D177A/M179H zur *in situ*-Regenerierung von NADP verlief die stereospezifische Oxidation wie erhofft, ein effizienter Umsatz von (*R*)-1-Phenylethanol konnte beobachtet werden. Der zeitliche Verlauf der Biotransformationen ist den Abbildung 94 und 95 dargestellt. Wie aus den Abbildungen ersichtlich, wird (*R*)-1-Phenylethanol in der Biotransformation durch die (*R*)-spezifischen ADHs aus *L. kefir* (LkADH) und *L. brevis* (LbADH) mit *in situ*-Cofaktorregenerierung durch die NOX D177A/M179H innerhalb von 90 min vollständig zu Acetophenon oxidiert, es konnte ausschließlich der *S*-Alkohol mittels GC-Analyse mit einem ee (enantiomeric excess) von 100 % nachgewiesen werden (Tabelle 64). In den Kontroll-Biotransformationen ohne NOX wurde nach 90 min lediglich ein Umsatz von 1,9% (LkADH) bzw. 2,8 % (LbADH) erreicht, wohingegen die Biotransformationen mit *in situ*-Cofaktorregenerierung durch die NOX D177A/M179H bereits nach 5 min Reaktionszeit einen Umsatz von 36,3 % (LkADH) bzw. 35,8 % (LbADH) aufweisen. Der leicht über dem stöchiometrischen liegende Umsatz (hier 2 %) der Kontroll-Biotransformation der LbADH weist auf eine sehr leichte NADP⁺-Regenerierung in der Präparation der (*R*)-spezifischen ADH hin.

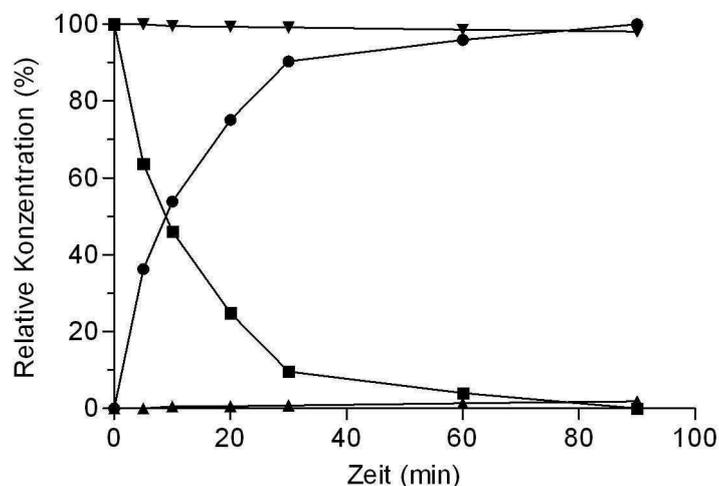


Abbildung 94: Stereospezifische Oxidation von (*R*)-Phenylethanol aus *rac*-1-Phenylethanol mit der (*R*)-spezifischen ADH aus *L. kefir* sowie der NOX-Mutante D177A/M179H zur *in situ*-Cofaktorregenerierung. Reaktionsbedingungen: 0,1 mM NADP⁺, 1 U ml⁻¹ LkADH, 5 U ml⁻¹ NOX, 10 mM *rac*-1-Phenylethanol, 100 mM TEA Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂, 30°C und 900 rpm. Die Kontroll-Biotransformationen wurden ohne den Zusatz von NOX zur Cofaktorregenerierung durchgeführt. Gezeigt sind die relativen Konzentrationen von (*R*)-1-Phenylethanol und Acetophenon über einen Reaktionszeitraum von 90 min. Symbolerklärung: LkADH und NAD(P)H-Oxidase D177A/M179H: (*R*)-1-Phenylethanol (■), Acetophenon (●); Kontroll-Biotransformation: LkADH (*R*)-1-Phenylethanol (▼), Acetophenon (▲).

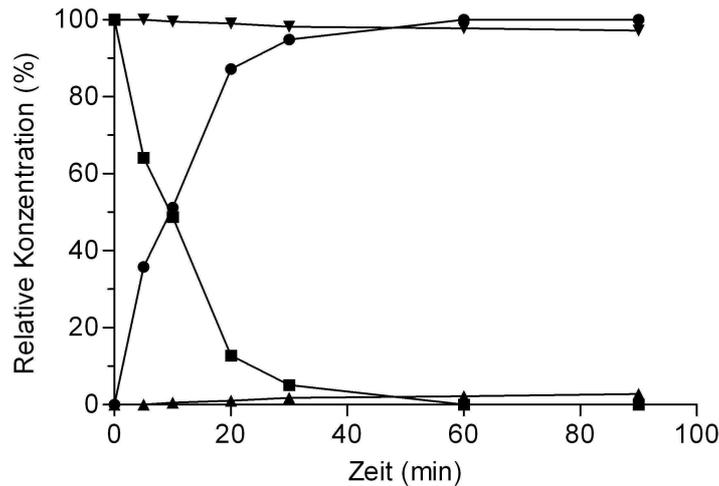


Abbildung 95: Stereospezifische Oxidation von (*R*)-Phenylethanol aus *rac*-1-Phenylethanol mit der (*R*)-spezifischen ADH aus *L. brevis* sowie der NOX-Mutante D177A/M179H zur *in situ*-Cofaktorregenerierung. Reaktionsbedingungen: 0,1 mM NADP⁺, 1 U ml⁻¹ LbADH, 5 U ml⁻¹ NOX, 10 mM *rac*-1-Phenylethanol, 100 mM TEA Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂, 30°C und 900 rpm. Die Kontroll-Biotransformationen wurden ohne den Zusatz von NOX zur Cofaktorregenerierung durchgeführt. Gezeigt sind die relativen Konzentrationen von (*R*)-1-Phenylethanol und Acetophenon über einen Reaktionszeitraum von 90 min. Symbolerklärung: LbADH und NAD(P)H-Oxidase D177A/M179H: (*R*)-1-Phenylethanol (■), Acetophenon (●); Kontroll-Biotransformation: LbADH (*R*)-1-Phenylethanol (▼), Acetophenon (▲).

Tabelle 64: Stereospezifische Oxidation von (*R*)-1-Phenylethanol aus *rac*-1-Phenylethanol mittels der (*R*)-spezifischen ADHs aus *L. kefir* und *L. brevis* sowie der NOX-Mutante D177A/M179H zur *in situ*-Cofaktorregenerierung (0,1 mM NADP⁺, 1 U ml⁻¹ LkADH, 5 U ml⁻¹ NOX, 10 mM *rac*-1-Phenylethanol, 100 mM TEA Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂, 30°C und 900 rpm), (TTN: "total turnover number"; ee: enantiomeric excess für (*S*)-1-Phenylethanol).

Eintrag	<i>rac</i> -1-Phenylethanol (mM)	ADH Herkunft	Zeit (h)	Umsatz (%)	TTN (NADP ⁺)	ee (%)
1	10	<i>L. kefir</i>	1,5	100	50	100
2	10	<i>L. brevis</i>	1,5	100	50	100

Um höhere "total turnover numbers" (TTN) zu erreichen, wurden weitere Biotransformationen mit einer niedrigeren NADP⁺ Konzentration von 0,025 mM sowie einer erhöhten Substratkonzentration von 25 mM bzw. 50 mM *rac*-1-Phenylethanol durchgeführt. Zur *in situ*-Cofaktorregenerierung wurden die NOX-Mutanten D177A/M179H, D177A/A178G/M179H und G159S/D177A/A178G/M179H eingesetzt.

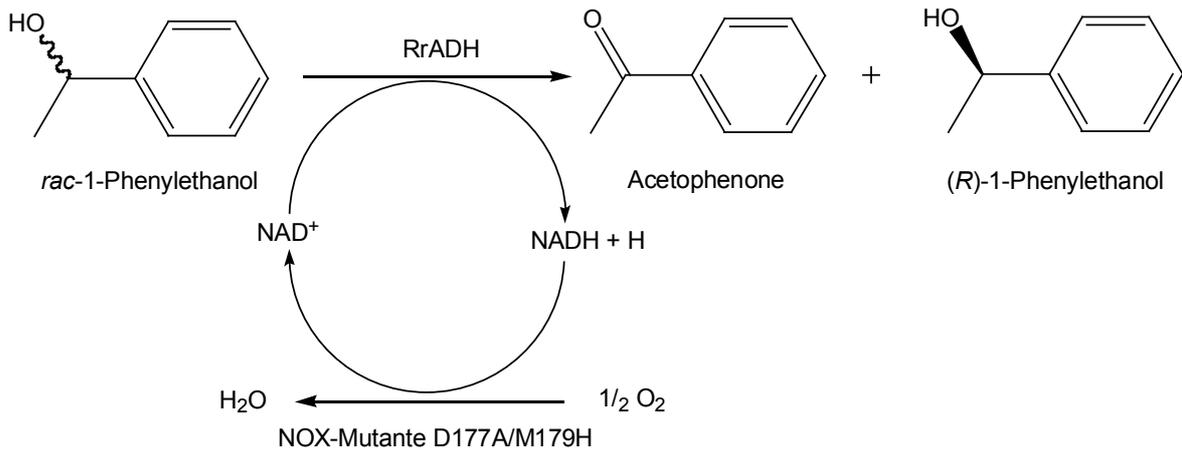
Nach einer Reaktionszeit von 9 bis 24 h konnte in allen Biotransformationen mittels NADP⁺-abhängiger (*R*)-spezifischen ADH aus *L. kefir* mit *in situ*-Cofaktorregenerierung durch die NOX-Mutanten ein nahezu vollständiger Umsatz von (*R*)-1-Phenylethanol zu Acetophenon mittels GC-Analyse nachgewiesen werden (Tabelle 65). In der Kontroll-Biotransformation von 25 mM ohne NOX wurde nach einer Reaktionszeit von 24 h lediglich ein Umsatz von 2,2 % erreicht. Der über dem stöchiometrischen (0,2 %) liegende Umsatz der Kontroll-Biotransformationen weist auf eine leichte NADP⁺ Regenerierung in den Präparationen der (*R*)-spezifischen ADH hin. Die Ergebnisse in Tabelle 65 zeigen deutlich, dass durch die *in situ*-Cofaktorregenerierung auch mit relativen niedrigen Konzentrationen an NADP⁺ eine effektive Umsetzung von hohen Substratkonzentrationen in Verbindung mit hohen TTN problemlos erreicht werden kann.

Tabelle 65: Stereospezifische Oxidation von (*R*)-1-Phenylethanol aus *rac*-1-Phenylethanol mit der (*R*)-spezifischen ADH aus *L. kefir* und verschiedenen NOX-Mutanten zur *in situ*-Cofaktorregenerierung (0,025 mM NADP⁺, 2 U ml⁻¹ LkADH, 15 U ml⁻¹ NOX, 25 bzw. 50 mM *rac*-1-Phenylethanol, 100 mM TEA Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂, 30°C und 900 rpm), (TTN: "total turnover number"; ee: enantiomeric excess für (*S*)-Phenylethanol).

Eintrag	<i>rac</i> -1-Phenylethanol (mM)	NAD(P)H-Oxidase Mutante	Zeit (h)	Umsatz (%)	TTN (NADP ⁺)	ee (%)
1	25	D177A/A178G/M179H	9	99,1	495	98
2	25	D177A/M179H	9	99,0	495	98
3	25	G159S/D177A/A178G/M179H	24	99,0	495	98
4	50	D177A/M179H	24	97,1	971	94

2.3.2 Darstellung von (*R*)-1-Phenylethanol aus *rac*-1-Phenylethanol durch den Einsatz der NAD⁺-abhängigen (*S*)-spezifischen ADH aus *R. ruber* unter *in situ*-Cofaktorregenerierung durch eine NOX-Mutante

Die Biotransformation wurde mit Hilfe der rekombinanten NAD⁺-abhängigen (*S*)-spezifischen ADH aus *R. ruber* (RrADH) [Kosjek et al., 2004] durchgeführt, zur *in situ*-Regenerierung von NAD⁺ wurde die durch das Rational Design konstruierte NOX-Mutante D177A/M179H eingesetzt (Schema 20).



Schema 20: Konzept zur stereoselektiven Oxidation von *rac*-Phenylethanol durch die (*S*)-spezifische ADH aus *R. ruber* (RrADH) unter *in situ*-Cofaktorregenerierung von NAD⁺ mittels der NOX-Mutante D177A/M179H.

Der Reaktionsansatz enthielt 10 mM *rac*-1-Phenylethanol, 100 mM TEA-Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM NAD⁺, 1 U ml⁻¹ RrADH (zellfreier Rohextrakt, sterilfiltriert) und 5 U ml⁻¹ NOX D177A/M179H, Gesamtvolumen 1 ml. Die Biotransformation wurde als Batch-Umsetzung in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen unter Schütteln bei 900 rpm durchgeführt (30°C). Als Kontrolle wurde eine analoge Biotransformation zur Synthese von (*R*)-1-Phenylethanol aus *rac*-1-Phenylethanol ohne Cofaktorregenerierung durch die NOX-Mutante D177A/M179H durchgeführt. Proben von 100 µl wurden entnommen, mit dem doppelten Volumen an Ethylacetat gründlich gemischt (Vortexer 1 min max. Einstellung) und zur Trennung der wässrigen und organischen Phase zentrifugiert (3 min bei 14000 rpm). Die obere organische Phase wurde vorsichtig abgenommen und mittels Gaschromatographie analysiert.

Wie aus der Abbildung 96 ersichtlich, wird (*S*)-Phenylethanol in der Biotransformation durch die (*S*)-spezifische ADH aus *R. ruber* mit *in situ*-Cofaktorregenerierung durch die NOX-Mutante D177A/M179H innerhalb von 60 min vollständig zu Acetophenon oxidiert, es kann ausschließlich der *R*-Alkohol mit einem ee von 100% nachgewiesen werden.

In der Kontroll-Biotransformation ohne NOX wurde nach 60 min lediglich ein Umsatz von 4,4 % erreicht, wohingegen die Biotransformationen mit *in situ*-Cofaktorregenerierung durch die NOX-Mutante D177A/M179H bereits nach 5 min Reaktionszeit einen Umsatz von 48,7 % aufweist. Der leicht über dem stöchiometrischen liegende Umsatz (hier 2 %) der Kontroll-Biotransformationen weist auf eine leichte NAD⁺-Regenerierung in der Präparation der (*S*)-spezifischen ADH hin.

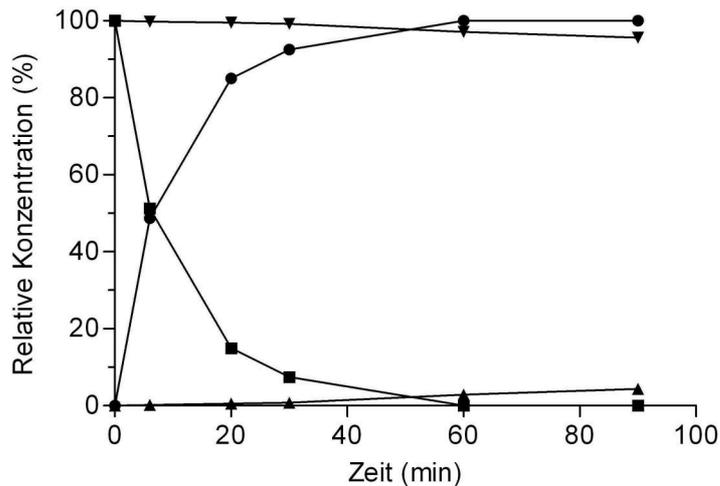


Abbildung 96: Stereospezifische Oxidation von (S)-Phenylethanol aus *rac*-1-Phenylethanol mit der (S)-spezifischen ADH aus *R. ruber* sowie der NOX-Mutante D177A/M179H zur *in situ*-Cofaktorregenerierung. Reaktionsbedingungen: 0,1 mM NAD⁺, 1 U ml⁻¹ RrADH, 5 U ml⁻¹ NOX, 10 mM *rac*-1-phenylethanol, 100 mM TEA Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂, 30°C und 900 rpm. Die Kontroll-Biotransformationen wurden ohne den Zusatz von NOX zur Cofaktorregenerierung durchgeführt. Gezeigt sind die relativen Konzentrationen von (S)-Phenylethanol und Acetophenon über einen Reaktionszeitraum von 90 min. Symbolerklärung: RrADH und NOX D177A/M179H: (S)-1-Phenylethanol (■), Acetophenon (●); Kontroll-Biotransformation RrADH: (S)-Phenylethanol (▼), Acetophenon (▲).

2.3.3 Darstellung von (S)-1-Phenylethanol aus *rac*-1-Phenylethanol durch den Einsatz von Ganzzellbiokatalysatoren mit zellinterner Cofaktorregenerierung

Für die Durchführung der Ganzzellbiotransformation mit *in vivo* Cofaktorregenerierung wurden *E. coli* BL21(DE3)/pADHLk/pACNOXD177A/M179H (LkADH) Zellen (Aktivitäten Rohextrakt 550 U ml⁻¹ ADH und 16 U ml⁻¹ NOX (NADPH), 18,8 mg Protein ml⁻¹) und *E. coli* BL21(DE3)/pADHLb/pACNOXD177A/M179H (LbADH) Zellen (Aktivitäten Rohextrakt 587 U ml⁻¹ ADH und 16 U ml⁻¹ NOX (NADPH), 16,2 mg Protein ml⁻¹) eingesetzt, die sowohl die (*R*)-spezifischen NADP(H)-abhängigen ADHs aus *L. kefir* (LkADH) bzw. *L. brevis* (LbADH) als auch die NOX-Mutante D177A/M179H zur *in vivo*-Regenerierung von NADP⁺ exprimieren.

In der Biotransformation von 10 mM *rac*-1-Phenylethanol wurde eine Zellkonzentration von 15 mg ml⁻¹ eingesetzt. Die Zellen wurden in 100 mM TEA-Puffer pH 7,0 (1 mM MgCl₂) resuspendiert und die entsprechende Menge an Zellsuspension der Reaktionslösung zugesetzt, um die Biotransformation zu starten. Es wurden Zellen verwendet, die nach der Kultivierung und Expression zur Lagerung einmalig bei -18°C als Zellpellet gefroren wurden.

Die Reaktion wurde als Batch-Umsetzung in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen unter Schütteln bei 900 rpm und einer Reaktionstemperatur von 30°C durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wurde das Reaktionsgefäß geöffnet, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Der Reaktionsansatz enthielt 10 mM *rac*-1-Phenylethanol, 100 mM TEA-Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂, und 0,1 mM NADP⁺ bei einem Gesamtvolumen von 1,0 ml. Als Kontrolle wurde eine analoge Biotransformation durchgeführt, bei der Zellen von *E. coli* BL21(DE3)/pADHLk bzw. *E. coli* BL21(DE3)/pADHLb eingesetzt wurden, die ausschließlich die jeweilige NADP(H)-abhängige ADH exprimieren und keine NOX zur Regenerierung von NADP⁺ besitzen (ADH Aktivität im Rohextrakt: ADHLk 440 U ml⁻¹, ADHLb 50 U ml⁻¹). Proben wurden nach bestimmten Zeitabständen entnommen, mit Ethylacetat extrahiert und mittels Gaschromatographie analysiert.

Nach 9 h konnte unter Einsatz von 15 mg ml⁻¹ Zellen mit beiden Ganzzellbiokatalysatoren ein nahezu vollständiger Umsatz von 10 mM (*R*)-1-Phenylethanol erreicht werden (Abbildungen 97 und 98). Durch die Biotransformationen mit ganzen Zellen wurde (*S*)-1-Phenylethanol mit hervorragender Enantiomerenreinheit (ee > 97 %) gewonnen (Abbildung 97 und 98, Tabelle 66).

In den Kontroll-Biotransformationen mit den Zellen ohne NOX wurde nach 9 h lediglich ein Umsatz von 5,2 % (LkADH) bzw. 5,6 % (LbADH) erreicht, wohingegen die Biotransformationen mit *in situ*-Cofaktorregenerierung durch die NOX-Mutante D177A/M179H bereits nach 30 min Reaktionszeit einen Umsatz von 41 % (LkADH) bzw. 43,2 % (LbADH) aufweisen. Der leicht über dem stöchiometrischen liegende Umsatz der Kontroll-Biotransformation weist hier auf eine leichte Regenerierung von NADP⁺ in den *E. coli* BL21(DE3)/pADHLb- und *E. coli* BL21(DE3)/pADHLk-Zellen hin.

Tabelle 66: Stereospezifische Oxidation von (*R*)-1-Phenylethanol aus *rac*-1-Phenylethanol mittels der konstruierten Ganzzellbiokatalysatoren *E. coli* BL21(DE3)/pADHLb/pACNOXD177A/M179H (LbADH und NOX-Mutante D177A/M179H) und *E. coli* BL21(DE3)/pADHLk/pACNOXD177A/M179H (LkADH und NOX-Mutante D177A/M179H), (TTN: "total turnover number"; ee: enantiomeric excess für (*S*)-1-Phenylethanol).

Eintrag	<i>rac</i> -1-Phenylethanol (mM)	Ganzzellbiokatalysator	Zeit (h)	Umsatz (%)	TTN (NADP ⁺)	ee (%)
1	10	LkADH/D177A/M179H	9	98,9	49,5	97,8
2	10	LbADH/D177A/M179H	9	99,2	49,6	98,4

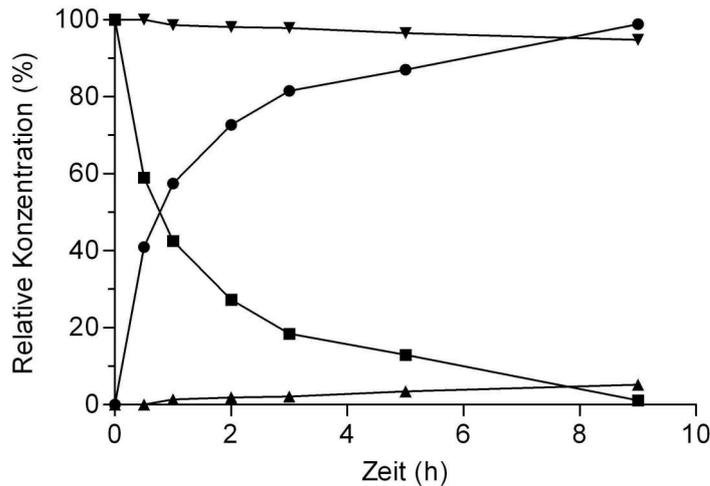


Abbildung 97: Stereospezifische Oxidation von (*R*)-1-Phenylethanol aus *rac*-1-Phenylethanol mit dem Ganzzellbiokatalysator *E. coli* BL21(DE3)/pADHLk/pACNOXD177A/M179H (LkADH und NOX-Mutante D177A/M179H). Reaktionsbedingungen: 0,1 mM NADP⁺, 15 mg ml⁻¹ Zellen, 10 mM *rac*-1-Phenylethanol, 100 mM TEA Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂, 30°C und 900 rpm. Die Kontroll-Biotransformation wurde mit *E. coli* BL21(DE3)/pADHLk Zellen ohne NOX zur Cofaktorregenerierung durchgeführt. Gezeigt sind die relativen Konzentrationen von (*R*)-1-Phenylethanol und Acetophenon über einen Reaktionszeitraum von 9 h. Symbolerklärung: ADH und NOX D177A/M179H: (*R*)-1-Phenylethanol (—■—), Acetophenon (—●—), Kontroll-Biotransformation *E. coli* BL21(DE3)/pADHLk: (*R*)-1-Phenylethanol (—▼—), Acetophenon (—▲—).

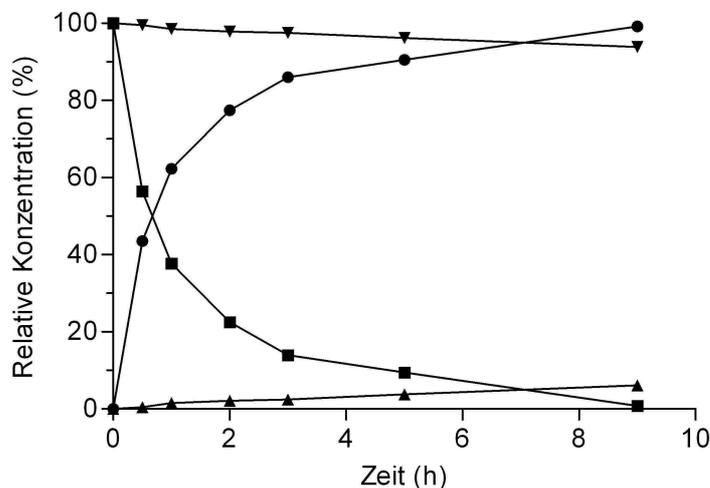


Abbildung 98: Stereospezifische Oxidation von (*R*)-1-Phenylethanol aus *rac*-1-Phenylethanol mit dem Ganzzellbiokatalysator *E. coli* BL21(DE3)/pADHLb/pACNOXD177A/M179H (LbADH und NOX-Mutante D177A/M179H). Reaktionsbedingungen: 0,1 mM NADP⁺, 15 mg ml⁻¹ Zellen, 10 mM *rac*-1-Phenylethanol, 100 mM TEA Puffer pH 7,0, 1 mM MgCl₂, 30°C und 900 rpm. Die Kontroll-Biotransformation wurde mit *E. coli* BL21(DE3)/pADHLb Zellen ohne NOX zur Cofaktorregenerierung durchgeführt. Gezeigt sind die relativen Konzentrationen von (*R*)-1-Phenylethanol und Acetophenon über einen Reaktionszeitraum von 9 h. Symbolerklärung: ADH und NOX D177A/M179H: (*R*)-1-Phenylethanol (—■—), Acetophenon (—●—), Kontroll-Biotransformation *E. coli* BL21(DE3)/pADHLb: (*R*)-1-Phenylethanol (—▼—), Acetophenon (—▲—).

IV Diskussion

Der erste Teil der Diskussion befasst sich mit den verschiedenen im Laufe dieser Arbeit entwickelten enzymatischen Verfahren zur biotechnologischen Darstellung von α -Ketoglutarat. Im zweiten Teil der Diskussion werden die Ergebnisse des „Protein Engineering“ der NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* diskutiert.

1. Entwicklung enzymatischer Verfahren zur Darstellung von α -KG

α -Ketoglutarat (2-Oxoglutarinsäure, α -KG) ist ein wichtiges Zwischenprodukt im Tricarbonsäurezyklus und im Aminosäurestoffwechsel bzw. Stickstoffmetabolismus [Verseck et al. 2009]. Aufgrund seiner vielfältigen Einsatzmöglichkeiten, stellt α -KG heute eine sehr interessante Verbindung für die chemische und pharmazeutische Industrie dar [Otto et al., 2011], insbesondere als Bulkchemikalie bzw. als Synthesebaustein für eine große Anzahl an chemischen Synthesen, wie z.B. Kondensations- und Cyclo-Kondensationsreaktionen [Stottmeister et al., 2005]. Auf Grundlage von α -KG als Ausgangsstoff organischer Synthesen ist es möglich, mehr als 70 pharmazeutisch relevante Verbindungen herzustellen [Stottmeister et al., 2005]. Weitere Einsatzgebiete sind die Verwendung bei der Herstellung von neuartigen Elastomeren für die Bio- und Pharmamedizin [Barrett und Yousaf, 2008], die Verwendung als Nahrungsergänzungsmittel bei chronischen Erkrankungen des Stoffwechsels und als Zusatz in Infusionslösungen [Mackenzie et al., 1978; Brodelius et al., 1982; Verseck et al., 2007].

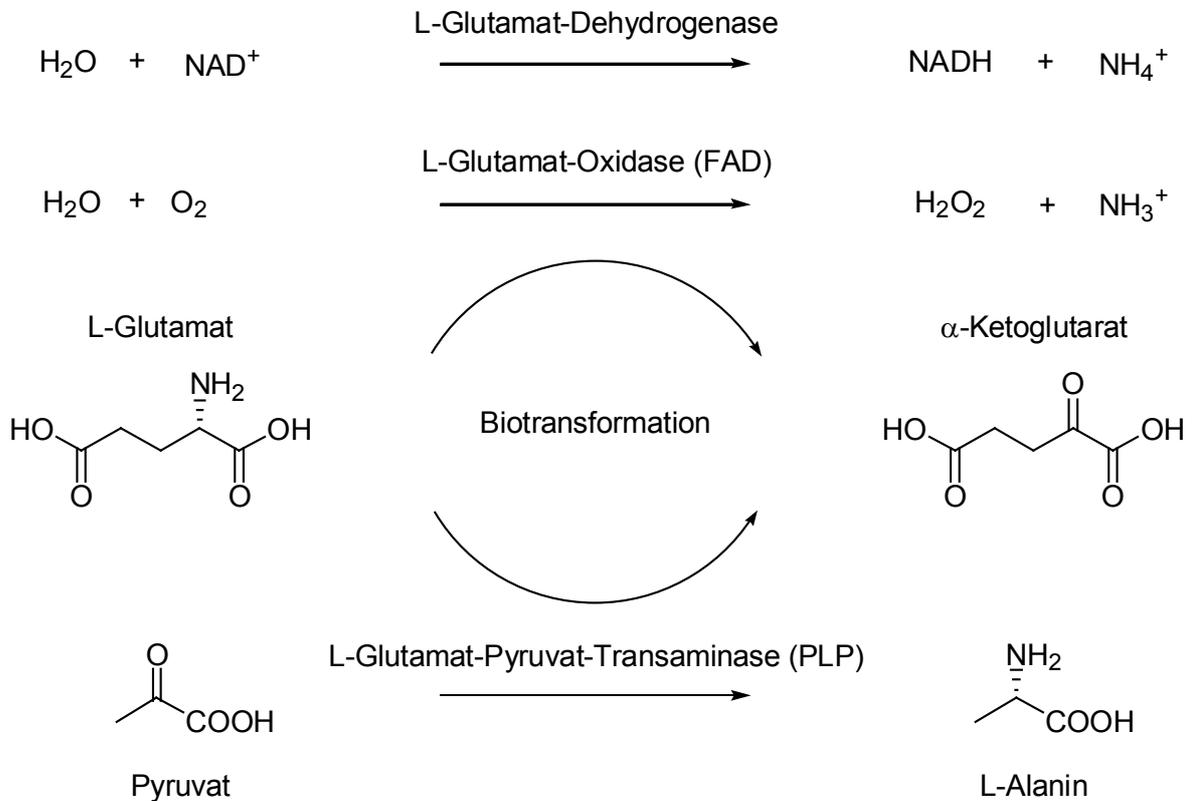
Die klassischen chemischen Syntheseverfahren für α -KG benötigen oftmals extreme Bedingungen in Hinsicht auf Druck und Temperatur, sowie den Einsatz von problematischen Katalysatoren und Reagenzien, weiterhin sind sie mit der Produktion von ungewollten Nebenprodukten sowie umweltschädlichen Abfällen verbunden [Stottmeister et al., 2005; Otto et al., 2011]. Obwohl einige fermentative Verfahren zur Produktion von α -KG beschrieben wurden [Hockenull et al., 1951; Kosheleva et al., 1967; Chernyavskaya et al., 2000; Aurich et al., 2006], schien die Verwendung von enzymatischen Prozessen eine interessante Synthesealternative zu sein, die bisher praktisch keine Beachtung fand. In den letzten Jahren haben enzymatische Biokatalysatoren insbesondere in der Synthese von Bulkchemikalien bzw. kommerziell interessanten Verbindungen an Bedeutung gewonnen und werden heute in einer Vielzahl von biotechnologischen Prozessen eingesetzt.

Die zu α -KG korrespondierende Aminosäure L-Glutamat (L-Glu) zählt zu den nicht-essentiellen α -Aminosäuren. Industrielle Bedeutung hat L-Glu in Form seines Natriumsalzes durch seine Anwendung als Geschmacksverstärker gewonnen [Dermiki et al., 2013; Halpern, 2000; Jinap et al., 2010]. Die Entwicklungen der letzten Jahre bzw. Jahrzehnte in der fermentativen Herstellung von L-Glu mittels *C. glutamicum* machen es heute möglich, diese Aminosäure in großem Maßstab und zu geringen Kosten, zunehmend auch auf Grundlage nachwachsender Rohstoffe, herzustellen [Asakura et al., 2007; Schulz et al., 2007]. Die jährliche Produktion beträgt etwa 1,5 Millionen Tonnen [Hermann et al., 2003; Kataoka et al., 2006].

Aufgrund der hohen Bedeutung von α -KG für die chemische und pharmazeutische Industrie und der kostengünstigen Verfügbarkeit der korrespondierenden Aminosäure L-Glu sollten im Verlauf dieser Arbeit enzymatische Verfahren zur Darstellung von α -KG aus L-Glu entwickelt werden. Für die Auswahl geeigneter enzymatischer Biokatalysatoren wurden mehrere Kriterien in Betracht gezogen: Wichtige Parameter für die Evaluierung von geeigneten Enzymen waren hierbei (1) eine möglichst hohe katalytische Aktivität, Stabilität und Substratspezifität, (2) die Abhängigkeit von Cofaktoren, (3) die Abhängigkeit von Co-Substraten und (4) die Produktion von Nebenprodukten. Ein weiterer wichtiger Aspekt bestand darin, dass (5) möglichst keines der beteiligten Enzyme durch die Substrate bzw. Produkte der Biotransformation inhibiert wird.

Als möglicherweise geeignet wurden die Enzyme L-Glutamat-Dehydrogenase (GluDH, EC 1.4.1.2 – 1.4.1.3), L-Glutamat-Oxidase (GluOX, EC. 1.4.3.11) und L-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT, EC 2.6.2.1) in Betracht gezogen, welche in der Lage sind, L-Glu in α -KG zu überführen. Hierbei unterscheiden sich die Enzyme jedoch deutlich hinsichtlich der katalysierten Reaktion, den benötigten Co-Substraten und Cofaktoren sowie den entstehenden sekundären Reaktionsprodukten. GluDHs katalysieren die reversible NAD(P)^+ -abhängige Desaminierung von L-Glu zu α -KG und Ammonium. In der irreversiblen und FAD-abhängigen Reaktion von GluOXs entsteht neben α -KG und Ammonium zusätzlich Wasserstoffperoxid als Nebenprodukt. GPTs katalysieren den PLP-abhängigen und reversiblen Transfer der Aminogruppe von L-Glu auf Pyruvat, wobei L-Ala sowie α -KG entstehen. Im Gegensatz zu den GluDHs sind die GluOXs und GPTs für ihre katalytische Aktivität nicht auf externe Cofaktoren angewiesen, da der Cofaktor als prosthetische Gruppe an das Enzym gebunden ist.

Der Einsatz der verschiedenen Enzyme in der Biotransformation zur Darstellung von α -KG aus L-Glu ist im Schema 21 dargestellt.



Schema 21: Die in dieser Arbeit eingesetzten Enzyme zur Darstellung von α -KG aus L-Glu mittels enzymatischer Biotransformation.

Für den Einsatz der Enzyme wurden verschiedene Parameter untersucht, um die Bedingungen der Biotransformation den Erfordernissen der unterschiedlichen biokatalytischen Teilreaktionen anzupassen und optimale Verhältnisse zu schaffen, sowie eventuelle Limitierungen zu identifizieren. Wichtige Faktoren waren hierbei vor allem die Stabilität der beteiligten Enzyme sowie der Einfluss der verschiedenen Substrate und Produkte auf die Enzyme.

Im Folgenden werden die wichtigsten Aspekte der verschiedenen Enzyme diskutiert, die im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften und des Anwendungspotentials in der Biotransformation von L-Glu zu α -KG untersucht wurden.

1.1. Darstellung von α -KG aus L-Glu mittels GluDH

Wie in der Einleitung und im Ergebnisteil erläutert, ergab sich ein Hinweis auf möglicherweise geeignete Enzyme aus der natürlichen Funktion von GluDHs im Metabolismus, wobei zu erwarten war, dass NADH-spezifische und damit katabole Enzyme eher für die Biotransformation geeignet sein sollten, da die natürliche Funktion dieser Enzyme im Abbau von L-Glu zu α -KG besteht.

Aufgrund einer durchgeführten Literaturrecherche wurden die NADH-spezifischen GluDHs aus *B. subtilis* [Belitsky und Sonenshein, 1998], *T. thermophilus* [Ruiz et al., 1998], *F. nucleatum* [Gharbia et al., 1991] und *C. difficile* [Anderson et al., 1993] als möglicherweise geeignet identifiziert.

1.1.1 Heterologe Expression der *gludh*-Gene und Reinigung der Enzyme

Nach erfolgreicher Klonierung der *gludh*-Gene konnten die GluDHs in hohem Maße rekombinant in *E. coli* produziert werden, mit Ausnahme der GluDH aus *T. thermophilus*, welche trotz umfangreicher Variation der Expressionsparameter in allen Fällen unlöslich gebildet wurde und in Form von „inclusion bodies“ vorlag. Wie im Ergebnisteil beschrieben, gelang anschließend die Reinigung der GluDHs aus *F. nucleatum* und *C. difficile* mittels Anionenaustauschchromatographie bis zu einem hohen Reinheitsgrad.

1.1.2 Biochemische Charakterisierung der GluDHs

Die Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Aktivität der verschiedenen GluDHs in der Desaminierung von L-Glu zeigten, dass die Enzyme, mit Ausnahme der *B. subtilis* GluDH, ihr pH-Optimum im eher basischen Bereich mit pH-Werten von > 9,5 besitzen.

Für die zunächst priorisierten GluDHs wurde eine ausführliche Charakterisierung in Hinsicht auf eine mögliche Inhibierung durch die Produkte der Biotransformation durchgeführt. Dabei zeigten alle Enzyme durchweg eine relativ starke Inhibierung durch α -KG, sie betrug im Standardtest (100 mM L-Glu, 50 mM α -KG, 1 mM NAD⁺, 30°C, 50 mM Tris-HCl pH 8,0) je nach Enzym 65 bis 79 %. Ebenfalls wurde ein negativer Einfluss des zweiten Reaktionsproduktes Ammonium auf die Aktivität der Enzyme festgestellt, es zeigte sich, dass die Inhibierung durch Ammonium durchschnittlich zwischen 20 und 50 % beträgt (100 mM L-Glu, 50 mM Ammonium, 1 mM NAD⁺, 30°C, 50 mM Tris-HCl pH 8,0).

In Gegenwart beider Reaktionsprodukte, α -KG sowie Ammonium, konnte keine photometrische Aktivität nachgewiesen werden, was für eine vollständige Inhibierung der Reaktion spricht. Die beiden Reaktionsprodukte zeigen hier eine deutliche Interaktion bzw. einen synergetischen Effekt auf, was zu einer vollständigen Inhibierung der Reaktion führt. Daneben wurde weiterhin eine Inhibierung durch den reduzierten Cofaktor NADH festgestellt, die Inhibierung beträgt zwischen 30 % und 60 %.

Heute existieren praktisch keine Literaturdaten zur Inhibierung von GluDHs, lediglich zwei Publikationen zu den kommerziell verfügbaren Enzymen aus *C. symbiosum* [Ödman et al., 2004] und aus der Rinderleber [Engel und Chen, 1975] weisen auf eine Inhibierung durch α -KG hin.

1.1.3 Screening nach neuen GluDHs

Da sich bei der Charakterisierung der rekombinant verfügbaren Enzyme herausstellte, dass die GluDHs durchweg einer Produktinhibierung durch α -KG unterliegen, was für eine präparative Biotransformation limitierend sein kann, sollten neue mikrobielle GluDHs zur Verfügung gestellt werden, die vorzugsweise eine niedrige bzw. keine Inhibierung durch α -KG aufweisen. Hierzu wurden in dieser Arbeit verschiedene Strategien verfolgt: zum einen wurden Sammlungsstämme und Bodenisolate aus Anreicherungskultur untersucht, zum anderen wurde die gerichtete Evolution der bereits rekombinant verfügbaren GluDH aus *C. difficile* durchgeführt, um sie hinsichtlich der Inhibierung durch α -KG zu optimieren.

Das Screening einer Stammsammlung besaß hierbei den Vorteil, dass es sich um definierte, bekannte Stämme handelte. Ein Screening von Bodenisolaten eröffnet hingegen den Zugang zu einer hohen Anzahl verschiedener Mikroorganismen, die möglicherweise Produzenten einer geeigneten und bisher unbekanntem GluDH sind.

1.1.3.1 Gerichtete Evolution der GluDH aus *C. difficile*

Nach Auswahl der am besten geeigneten GluDH aus *C. difficile* wurden zunächst die Kultivierungsparameter in Mikrotiterplatten optimiert und geeignete Protokolle für die Inhibierungsuntersuchung entwickelt. Nach Herstellung der Mutanten-Bibliothek (Fehlerrate 1-3) wurden 14000 Mutanten auf eine erniedrigte Inhibierung durch das Reaktionsprodukt α -KG hin getestet. Ca. 70 % der untersuchten Mutanten zeigten noch Aktivität in der oxidativen Desaminierung von L-Glu, ca. 30 % waren inaktiv. Die Inhibierungsuntersuchung der aktiven Mutanten zeigten allerdings, dass keine positive Enzymvariante mit verbessertem Inhibierungsverhalten identifiziert werden konnte. Interessanterweise wurde jedoch eine negative GluDH-Mutante (M16H9) mit verstärkter Produktinhibierung isoliert, der im Vergleich zu dem Wildtyp-Enzym eine um den Faktor zwei verstärkte Inhibierung aufwies. Die Sequenzierung der Mutante M16H9 zeigte nur eine Mutation auf, dabei war die Aminosäure Thr an der Position 326 gegen Ser ausgetauscht. In der Literatur ist dieser Aminosäureposition allerdings keine katalytische Funktion zugeordnet. Da jedoch die Möglichkeit bestand, dass ein anderer Aminosäureaustausch an dieser Position eine positive Veränderung nach sich ziehen könnte, stellte diese GluDH-Mutante den Ausgangspunkt für eine Sättigungsmutagenese (NNK) an der Aminosäureposition 326 dar. Das anschließende Screening der zweiten Mutanten-Bibliothek (200 Klone) erbrachte jedoch ebenfalls keine positiven Ergebnisse.

1.1.3.2 Screening einer Stammsammlung und von Bodenisolaten aus Anreicherungskultur

Insgesamt wurden 120 Bakterien und Hefen der Stammsammlung untersucht, dabei konnten 15 GluDH-Produzenten identifiziert werden, wovon 11 Stämme eine eindeutige NAD^+ -Abhängigkeit und 3 Stämme eine duale Cofaktorabhängigkeit besitzen, wobei im letzteren Fall ungeklärt ist, ob es sich um zwei verschiedenen GluDHs handelt oder nicht. Nur die GluDH aus dem Stamm *C. succiphila* wurde als eindeutig NADP^+ -abhängig identifiziert. 8 NAD^+ -abhängige GluDHs zeigten in der photometrischen Untersuchung des Rohextraktes keine Inhibierung durch α -KG (50 mM L-Glu, 50 mM α -KG, 2,5 mM NAD^+ , 30°C, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 9,0). Auffällig ist die Tatsache, dass es sich dabei durchweg um Enzyme aus Hefen handelte (3 *Pichia*-, 2 *Kluyveromyces*-, 2 *Rhodotorula*- und 1 *Candida*-Stamm).

Mit *R. glutinis* konnte ein Stamm identifiziert werden, der laut Literatur in fermentativen Verfahren zur Biomasse- und Lipidproduktion aus Abwässern der fermentativen Produktion von L-Glu eingesetzt wird [Xue et al., 2010], was für das Vorhandensein einer katabolisch aktiven NAD⁺-abhängigen GluDH spricht.

Die 4 Stämme mit dualer Cofaktorabhängigkeit bzw. NADP⁺-Abhängigkeit weisen im Vergleich zu den NAD⁺-abhängigen eine stärker ausgeprägte Inhibierung durch das Reaktionsprodukt α -KG auf. Im Screening wurden zwar ebenfalls NAD⁺-abhängige GluDHs mit einer deutlichen Inhibierung identifiziert, jedoch scheint sich die Vermutung zu bestätigen, dass im allgemeinen NAD⁺-abhängige (katabole) Enzyme eine geringere Inhibierung durch α -KG zeigen als NADP⁺-abhängige (anabole) Enzyme.

Bei der Untersuchung von 323 Bodenisolaten aus Anreicherungskultur wurde für 19 Isolate eine deutlich messbare GluDH-Aktivität nachgewiesen. Hierbei konnte ein Stamm identifiziert werden, der bei eindeutiger NAD⁺-Abhängigkeit eine vermeintlich niedrige Inhibierung durch α -KG aufweist. Das Isolat P7 wurde mittels 16SrRNA Analyse als *Bacillus pumilus* (ATCC7061) identifiziert. Um die Klonierung der im Screening identifizierten GluDHs zu ermöglichen, für die keine Literaturdaten vorlagen, wurde auf Grundlage der literaturbekannten *gludh* Sequenz aus *S. cerevisiae* (UniProt P33327) eine gezielte Suche innerhalb der Datenbank UniProt durchgeführt. Hierbei konnten putative *gludh* Gensequenzen für die im Screening identifizierten Stämme *P. pastoris* (UniProt C4R0A2), *K. lactis* (UniProt Q6CRJ9), *K. thermotolerans* (UniProt C5DD00) sowie *B. pumilus* identifiziert werden (Uniprot B4AKG2_BACPU). Aufgrund der erlangten Sequenzinformationen war es möglich, die GluDHs aus *K. lactis* und *B. pumilus* mittels Genisolierung und Klonierung rekombinant verfügbar zu machen. Bei der anschließenden Inhibierungsuntersuchung der rekombinanten Enzyme wurde jedoch ein im Vergleich zum Screening deutlich verändertes Inhibierungsverhalten festgestellt. So wiesen auch diese Enzyme eine signifikante Inhibierung durch α -KG auf, sie betrug bei pH 8,0 im Standardtest 70 % bzw. 80 % (50 mM L-Glu, 50 mM α -KG, 2,5 mM NAD⁺, 30°C, 50 mM Kpi Puffer pH 8,0). Im Gegensatz zur Inhibierungsuntersuchung der rek. Enzyme wurden die Aktivitäts- sowie Inhibierungsexperimente im Verlauf des Screenings bei einem pH-Wert von 9,0 durchgeführt, da GluDHs im Allgemeinen in diesem pH-Bereich eine höhere Aktivität in der oxidativen Desaminierung von L-Glu zeigen. Aufgrund der Ergebnisse der Inhibierungsuntersuchung wurde vermutet, dass die Inhibierung von GluDHs durch α -KG vom pH-Wert beeinflusst wird.

1.1.4 Die pH-Wert Abhängigkeit der Inhibierung von GluDHs

Weitere Untersuchungen bestätigten, dass die Inhibierung der GluDHs aus *B. subtilis*, *C. difficile*, *F. nucleatum*, *K. lactis* und *B. pumilus* durch α -KG stark vom pH-Wert abhängig ist und mit zunehmendem pH-Wert deutlich abnimmt. So wird z.B. das Enzym aus *K. lactis* bei einem pH-Wert von 8,0 zu 79,3 % inhibiert, bei einem pH-Wert 9,5 lediglich zu 10,0 %, was einer Differenz in der Inhibierung von ca. 70 % entspricht. Dieser Trend der abnehmenden Inhibierung im eher basischen pH-Bereich ist bei allen im Verlauf dieser Arbeit untersuchten GluDHs zu beobachten, wenn auch in unterschiedlicher Intensität, die Differenz beträgt aber in allen Fällen mind. 50 %. Interessanterweise wird der synergetische Effekt in der Inhibierung durch α -KG und Ammonium nicht vom pH-Wert beeinflusst. Da in der Literatur faktisch keine Informationen bezüglich des Inhibierungsverhaltens von L-Aminosäure-Dehydrogenasen durch die entsprechenden Ketosäuren verfügbar sind, erschien es ebenfalls von Interesse zu sein, diese pH-Abhängigkeit mit einem alternativen Enzym zu untersuchen. Die Untersuchung zur Produktinhibierung der L-Leucin-Dehydrogenase (LeuDH) aus *B. cereus* durch α -Ketoisocaproat zeigte, dass die Inhibierung, analog zu den untersuchten GluDHs, ebenfalls stark pH-Wert abhängig ist und im basischen pH-Bereich abnimmt. Das in dieser Arbeit identifizierte pH-abhängige Inhibierungs-Verhalten von GluDHs durch α -KG und der festgestellte synergetische Effekt durch α -KG und Ammonium sind höchst unerwartet und wurden bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.

1.1.5 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz von GluDHs unter *in situ*-Regenerierung des Cofaktors NAD⁺ mittels einer NOX

Mit der NOX aus *L. brevis* stand eine vorteilhafte Regenerierungsmöglichkeit für den Cofaktor zur Verfügung. Das Enzym wurde erfolgreich bis zur Homogenität gereinigt und in Hinsicht auf die Parameter, die für den kombinierten Einsatz mit GluDHs wichtig sind, biochemisch charakterisiert. Insbesondere pH-abhängige Aktivitäts- sowie Stabilitätsdaten wurden erfasst. So zeigt die NOX aus *L. brevis* bei pH 9,0 noch ca. 30 % ihrer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (pH 6,0), bei pH 9,5 nur noch ca. 20 %. Bedeutender für den geplanten Einsatz war die zu beobachtende pH-abhängige Enzyminaktivierung, insbesondere im eher basischen pH-Bereich von > 9,0, der von den GluDHs hinsichtlich der oxidativen Desaminierung bevorzugt wird, stellte sich die NOX aus *L. brevis* als relativ instabil heraus.

So wurde bei einem pH-Wert von 9,5 eine nahezu vollständige Inaktivierung bereits innerhalb von 4 h beobachtet, bei einem eher neutralen pH-Wert von 8,0 weist die NOX hingegen eine moderate Stabilität auf. Die NOX aus *L. brevis* wird weder durch L-Glu, noch durch α -KG und Ammonium in ihrer Aktivität gehemmt, weiterhin konnte kein negativer Einfluss auf die Stabilität nachgewiesen werden. Lediglich durch erhöhte Konzentrationen an NAD^+ wird die NOX inhibiert, so beträgt die relative Aktivität unter Zusatz von 1 mM NAD^+ 39,6 % (200 mM Kpi Puffer, pH 8,0). Dieser vermeintliche Nachteil der NOX aus *L. brevis* konnte verfahrenstechnisch durch den Einsatz einer erhöhten Menge an Biokatalysator ausgeglichen werden, was aufgrund der relativ hohen spezifischen Aktivität und der guten Verfügbarkeit der NOX kein Problem darstellte.

Da für die NOX aus *L. brevis* eine eingeschränkte Aktivität und Stabilität im basischen pH-Bereich von $> \text{pH } 9,0$ ermittelt wurde, war es nötig, bei der Wahl des pH-Wertes für die Biotransformation einen Kompromiss einzugehen und einen pH-Bereich zu wählen, bei dem die beteiligten Enzyme ausreichend aktiv sind. Für die Biotransformation wurde daher ein pH-Wert von 8,0 als optimal in Hinsicht auf die Aktivität der beteiligten Enzyme ermittelt, die NOX aus *L. brevis* und die unterschiedlichen GluDHs zeigen hier jeweils ca. 50 % ihrer maximalen Aktivität (siehe auch Ergebnissteil 1.1.8.1.2.).

Niedrige Konzentrationen an L-Glu wurden mit Hilfe der GluDHs aus *F. nucleatum*, *C. difficile*, *B. subtilis*, *B. pumilus* und *K. lactis* mit durchaus hohen Umsatzraten zwischen 72,9 % und 89,1 % (15 mM) bzw. 66,1 % und 93,2% (25 mM) innerhalb von 24 h umgesetzt. Eine verlängerte Reaktionszeit von 48 h erbrachte hier keine weitere Umsatzsteigerung, was für das Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes unter den Bedingungen der Biotransformation spricht. Interessanterweise zeigten beide *Bacillus* Enzyme die niedrigsten Umsätze, welche 20 % bis 30 % unter denen der anderen Enzyme liegen. Unter Erhöhung der Substratkonzentration an L-Glu auf 50 mM und unter Verwendung der GluDHs aus *C. difficile* und *F. nucleatum* wurden zunächst Umsätze von 60,1 % und 54,0 % erzielt, diese konnten nach Optimierung der Biotransformationsbedingungen auf 73,5 % bzw. 65,0 % erhöht werden. Wie aufgrund der Inhibierungsuntersuchungen erwartet, konnte in der Kinetik ein deutlicher Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigendem Umsatz und damit Konzentrationen an akkumuliertem α -KG und Ammonium in der Reaktionslösung beobachtet werden.

Weitere Biotransformationen unter Variation der Substratkonzentration an L-Glu bis 500 mM wurden durchgeführt. Hierbei zeigte es sich, dass eine Erhöhung der Substratkonzentration mit deutlich niedrigeren Umsätzen einhergeht. So wurden durch die GluDH aus *C. difficile* Substratkonzentrationen von 100, 200 und 500 mM L-Glu zu maximal 48,2 %, 32,4 % bzw. 31,1 % umgesetzt (nach 24 h). In der nachstehenden Abbildung 99 sind der Umsatz und die erzielte Endkonzentration an α -KG in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration an L-Glu dargestellt.

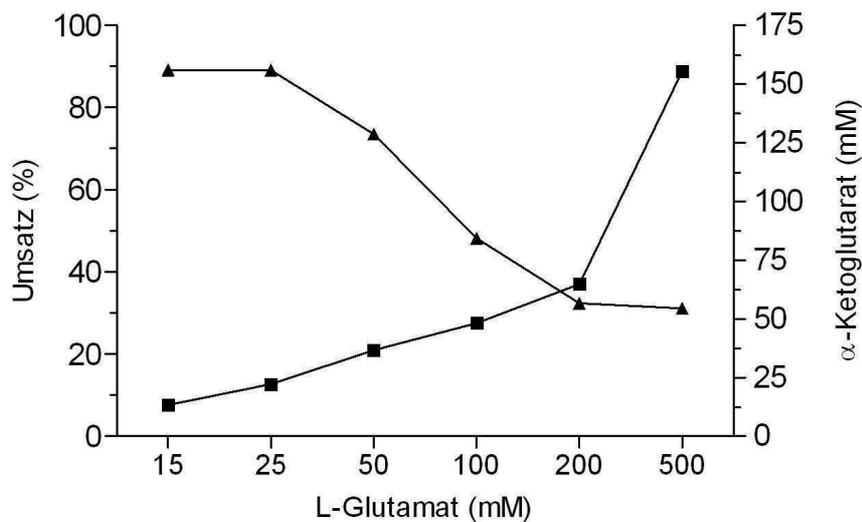


Abbildung 99: Einfluss der Substratkonzentration an L-Glu auf den Umsatz (\blacktriangle) und die erzielte Produktkonzentration (\blacksquare) an α -KG (200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 2 U ml⁻¹ GluDH *C. difficile*, 10 U ml⁻¹ NOX *L. brevis*, 2 mM NAD⁺, 120 rpm, 30°C, 24 h).

Die Biotransformation wurde ebenfalls bei einem basischen pH-Wert von 9,0 durchgeführt, da sich die Produktinhibierung durch α -KG in diesem pH-Bereich als deutlich niedriger erwiesen hat. Im Vergleich zu den Biotransformationen von 50 mM L-Glu bei einem pH von 8,0 wurden unter Verwendung der GluDHs aus *C. difficile* sowie *K. lactis* bei einem eher basischen pH-Wert von 9,0 um 10 % erhöhte Umsätze von 82,7 % bzw. 80,8 % nach 24 h erzielt. Die Umsätze von 100 mM und 200 mM L-Glu unter Einsatz der *C. difficile* GluDH betragen 47,2 bzw. 31,7 % (nach 24 h) und unterscheiden sich damit nicht von denen der Biotransformationen bei einem pH-Wert von 8,0.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass auch unter diesen Bedingungen nur ein leicht (Substratkonzentration L-Glu 50 mM) bzw. kein (Substratkonzentration L-Glu >100 mM) verbesserter Umsatz erreicht werden konnte, obwohl die Inhibierung durch α -KG bei einem basischen pH-Wert von 9,0 signifikant niedriger ist.

Die unvollständigen Umsätze sind wahrscheinlich auf das Inhibierungsverhalten der verschiedenen GluDHs in Hinsicht auf α -KG und Ammonium zurückzuführen. Beide Reaktionsprodukte sind in der Lage, die GluDHs deutlich zu inhibieren, allerdings ist die Inhibierung durch jeweils ein Produkt nicht vollständig. In Gegenwart beider Reaktionsprodukte, die im Verlauf der Biotransformation akkumulieren, kommt es jedoch ab einer gewissen Konzentration zu einer vollständigen Inhibierung der GluDHs, sowohl bei pH 8,0, als auch bei pH 9,0. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der NTB-Aktivitätsfärbung sowie der Biotransformation in Gegenwart äquimolarer Konzentrationen an α -KG und Ammonium bestätigt.

1.1.6 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GluDH unter *in situ*-Regenerierung des Cofaktors NAD⁺ mittels alternativer Systeme

Ebenfalls wurde untersucht, ob die Cofaktorregenerierung in der Biotransformation von L-Glu mittels GluDH durch alternative Systeme zu einer Erhöhung des Umsatzes führt. Zur Regenerierung von NAD⁺ wurden die L-Lactat-Dehydrogenase (LDH) aus *B. subtilis* [Richter et al., 2011], ein bekanntes und bewährtes System für die Cofaktorregenerierung, sowie die L-Leucin-Dehydrogenase aus *B. cereus* [Schütte et al., 1985; Stoyan et al., 1997] eingesetzt.

Die LeuDH schien hierbei folgende Vorteile zu bieten: Zum einen war möglich, die Biotransformation bei einem basischen pH-Wert von 9,5 durchzuführen, bei dem (1) die Produktinhibierung der GluDHs durch α -KG deutlich erniedrigt ist und (2) die LeuDH ihr pH-Optimum in Hinsicht auf die reduktive Aminierung von α -Ketoisocaproat besitzt. Zum anderen kann durch die Regenerierungsreaktion das sekundäre Reaktionsprodukt Ammonium *in situ* aus der Biotransformationslösung entfernt werden. Bei der biochemischen Charakterisierung der GluDHs zeigte es sich, dass insbesondere der vorab beobachtete synergetische Inhibierungseffekt durch α -KG und Ammonium problematisch erscheint.

Zusammenfassend konnte in der Biotransformation von 50 mM und 100 mM L-Glu unter Einsatz der GluDHs aus *C. difficile* und der LDH aus *B. subtilis* zur *in situ*-Regenerierung von NAD^+ nach 24 h ein maximaler Umsatz von 56,0 % bzw. 48,0 % nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu wurden bei Verwendung der LeuDh zur Cofaktorregenerierung in der Biotransformation von 50 mM und 100 mM deutlich niedrigere Umsätze erzielt, lediglich 20,2 % bzw. 20,1 % Umsatz nach 24 wurden erhalten.

Die Ergebnisse der Biotransformationen von L-Glu mittels GluDH unter Verwendung alternativer Systeme zur Cofaktorregenerierung unterstreichen die Hypothese, dass der nicht vollständige Umsatz von L-Glu auf das thermodynamisch ungünstige Gleichgewicht der katalysierten Reaktion sowie das Inhibierungsverhalten der Enzyme in Hinsicht auf die beiden Reaktionsprodukte α -KG und Ammonium zurückzuführen ist.

1.1.7 Vergleich der Cofaktorregenerierungssysteme in der Biotransformation von L-Glu mittels GluDH

Um die verschiedenen Cofaktorregenerierungssysteme in der Biotransformation von L-Glu mittels GluDH miteinander zu vergleichen, wurden die erzielten Umsätze, die erzielten Endkonzentrationen an α -KG und die Raum-Zeit-Ausbeuten der Biotransformationen tabellarisch gegenübergestellt. Die Tabelle 67 verdeutlicht, dass die GluDH aus *C. difficile* in Verbindung mit der NOX als Cofaktor regenerierendes Enzym die besten Ergebnisse liefert, gefolgt von der LDH und der LeuDh zur Regenerierung von NAD^+ . Die LDH sowie die LeuDh besitzen hierbei den Nachteil, dass die Produktaufarbeitung von α -KG aufgrund der Co-Substrate Pyruvat und α -Ketoisocaproat bzw. aufgrund der Nebenprodukte L-Lactat und L-Leu nur unter erschwerten Bedingungen möglich ist. Ebenfalls werden durch den zwingenden Einsatz der Co-Substrate die Kosten der Biotransformation erhöht. Im Vergleich dazu bietet der Einsatz der NOX mehrere entscheidende Vorteile: Bei der Oxidation des Cofaktors wird molekularer Sauerstoff als leicht und günstig verfügbares Reaktionsäquivalent genutzt, der Zusatz eines weiteren möglicherweise kostenintensiven Substrates ist nicht nötig und als Nebenprodukt der Reaktion entsteht lediglich Wasser. Weiterhin scheint sich die Irreversibilität der Oxidation des Cofaktors durch die NOX positiv auf das Gleichgewicht der Reaktion bzw. den maximal erreichbaren Umsatz auszuwirken.

Tabelle 67: Vergleich der verwendeten *in situ*-Cofaktorregenerierungssysteme in der Biotransformation von 50 mM L-Glu zu α -KG mittels der GluDH aus *C. difficile* (die Raum-Zeit-Ausbeute ist auf 24 h bezogen).

Regenerierungssystem für NAD ⁺	Co-Substrat	Umsatz (%)	α -KG (g l ⁻¹)	Raum-Zeit-Ausbeute (g l ⁻¹ h ⁻¹)
NOX	O ₂	82,7	6,0	0,25
LDH	Pyruvat	56,0	4,1	0,17
LeuDH	α -Ketoisocaproat	20,2	1,5	0,06

1.1.8 *In situ*-Bereitstellung von C¹³-markiertem α -KG zur MenD-abhängigen Synthese von 4-hydroxy-5-oxo-Hexansäure

Um eine weitere biotechnologische Einsatzmöglichkeit des entwickelten Systems zu überprüfen, wurden die GluDH aus *C. difficile* und die NOX aus *L. brevis* für die *in situ*-Bereitstellung von C¹³-markiertem α -KG in der Synthese von 4-hydroxy-5-oxo-Hexansäure durch die MenD aus *Escherichia coli* K12 genutzt [Beigi et al., 2013].

Interessanterweise konnte in der gekoppelten Reaktion mit der MenD ein vollständiger Umsatz von 30 mM L-Glu durch die GluDH erzielt werden, wohingegen in den durchgeführten Biotransformationen ohne nachgeschaltete bzw. angekoppelte zweite Synthesereaktion auch niedrige Konzentrationen an L-Glu von 15 bzw. 25 mM zwar zu ca. 90 %, aber dennoch nur unvollständig umgesetzt wurden. Durch die gekoppelte Reaktion mit dem Enzym MenD konnte eine Art der kontinuierlichen Produktabtrennung erreicht werden, da das entstehende α -KG *in situ* durch MenD in das sekundäre bzw. hier eigentliche Produkt 4-hydroxy-5-oxo-Hexansäure umgewandelt wird und so die Reaktion der GluDH nicht mehr oder zumindest vermindert beeinflussen kann.

Durch die Bereitstellung von C¹³-markiertem α -KG konnte gezeigt werden, dass ein Einsatz des GluDH-NOX-Systems für die Synthese von α -KG in der Forschung durchaus praktikabel und erfolgreich durchführbar ist. Insbesondere in gekoppelten Anwendungen, in denen eingesetzte Katalysatoren oder entstehende Produkte sehr empfindlich auf die Anwesenheit von geringsten Konzentrationen an Wasserstoffperoxid (GluOX-System) reagieren können, bietet sich der Einsatz der GluDH an.

1.2 Darstellung von α -KG aus L-Glu mittels GluOX

In der Literatur sind verschiedene L-AAO mit breitem Substratspektrum beschrieben und charakterisiert worden, wobei L-Glu durch die meisten dieser Enzyme nicht oder nur in geringem Maße als Substrat akzeptiert wird [Geueke et al., 2002; Ponnudurai et al., 1994; Kusakabe et al., 1983]. Neben der geringen Aktivität für L-Glu sowie dem hohen Preis für die kommerziell verfügbaren L-AAO ist ebenfalls deren Herkunft aus Schlangengiften als problematisch einzustufen, was eine Verwendung in einem biotechnologischen Prozess in Hinblick auf die mögliche Verwendung des Produktes als Nahrungsergänzungsmittel oder in Pharmazeutika als problematisch erscheinen lässt. Eine hochinteressante Alternative zu unspezifischen L-AAO stellt der Einsatz einer L-Glu-spezifischen Oxidase dar.

GluOX fanden bisher keine Anwendung in der Darstellung von α -KG, sondern sind biotechnologisch vorrangig in der Biosensorik genutzt worden [Ryan et al., 1997; Basu et al., 2006; Upadhyay et al., 2006; Tian et al., 2009; Li et al., 1996]. Nach einer intensiven Literaturrecherche wurde die GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 aufgrund ihrer vorteilhaften Eigenschaften als geeignetes Enzym für die geplante Anwendung in der oxidativen Desaminierung von L-Glu ausgewählt. Das Enzym ist hoch spezifisch für L-Glu (lediglich L-Asp wird mit 0,6 % relativer Aktivität als Substrat akzeptiert), besitzt sowohl eine hohe Aktivität als auch Affinität über einen breiten pH-Bereich und konnte bereits rekombinant in *E. coli* hergestellt werden [Kusakabe et al., 1983; Arima et al., 2003, 2009; Utsumi et al., 2012].

1.2.1 Heterologe Expression des *gluox*-Gens, Reinigung und Prozessierung GluOX *Streptomyces* sp. X-119-6

Die rekombinante Produktion der ausgewählten GluOX in *E. coli* war von Interesse, um den Biokatalysator in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen. Die Sequenz des Wildtyp-Gens aus *Streptomyces* sp. X-119-6 weist einen deutlich erhöhten GC-Gehalt auf, was in *E. coli* zu Expressionsproblemen führen kann. Um eine optimale Expression zu gewährleisten, wurde eine computergestützte „codon usage“ Optimierung des *gluox*-Genes bezüglich der heterologen Expression in *E. coli* durchgeführt, wodurch der GC-Gehalt erfolgreich um 13,2 % gesenkt werden konnte. Aus der Literatur war ersichtlich, dass die GluOX eine N-terminale Signalsequenz besitzt [Arima et al., 2003, 2009]. Die meisten der bisher beschriebenen GluOXs sind extrazelluläre Enzyme, und das Vorkommen solcher Signalsequenzen ist bei diesen weit verbreitet. Anscheinend

schützen sich die Zellen so vor einer zu hohen intrazellulären GluOX-Aktivität, was zu einer ungewollten Desaminierung von L-Glu und somit zur Produktion von H₂O₂ führen könnte.

Das *gluox*-Gen wurde ohne N-terminale Signalsequenz mittels PCR erfolgreich amplifiziert und in den Expressionsvektor pet28a kloniert, hierbei wurde die GluOX N-terminal mit einem Hexahistidin-Tag fusioniert. Nach erfolgreicher Klonierung des Gens und Etablierung einer Hochzelldichtefermentation konnte das Enzym in hohem Maße rekombinant in *E. coli* hergestellt werden, wobei die GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 wie erwartet [Arima et al., 2003] als eine „one chain polypeptide“ Vorstufe gebildet wurde. Experimente zur *in vitro* Aktivierung der rekombinanten GluOX durch FAD zeigen, dass anscheinend ausschließlich aktives Holo-Enzym gebildet wird, da es sich *in vitro* durch Inkubation mit FAD nicht weiter aktivieren lässt. Die rekombinante „one chain polypeptide“ Vorstufe der GluOX konnte mittels Metallaffinitätschromatographie und Anionenaustauschchromatographie bis zur Homogenität gereinigt werden. Als rekombinante Vorstufe liegt das Enzym aus *Streptomyces* sp. X-119-6 als Dimer mit einem Molekulargewicht von 77 kDa (mit Hexahistidin-Tag) je Untereinheit vor. Für die Prozessierung der GluOX Vorstufe nach der Reinigung wurde das Proteasepräparat Pronase aus *S. griseus* eingesetzt, wodurch das Enzym die korrekte heteropolymere Struktur ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$; 42 kDa, 17 kDa und 10 kDa) ausbilden konnte und somit in seine natürliche Form überführt wurde. Nach Reinigung der prozessierten GluOX mittels Anionenaustauschchromatographie standen sowohl die unprozessierte als auch die prozessierte Form für die weiteren Versuche zur Verfügung.

1.2.2 Biochemische Charakterisierung der GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6

In den Untersuchungen zur Charakterisierung der unprozessierten sowie prozessierten Form der rekombinanten GluOX *Streptomyces* sp. X-119-6 wurde das pH-Optimum, die Stabilität, die kinetischen Parameter sowie der Einfluss der verschiedenen Reaktionsprodukte auf die GluOX überprüft. Sowohl die prozessierte als auch die unprozessierte GluOX weisen einen ähnlich breiten pH-Aktivitätsbereich (pH 5,0 bis pH 9,0) mit einem Optimum bei pH 7,5 auf. Beide Enzyme wurden hinsichtlich ihrer Stabilität unter Biotransformationsbedingungen untersucht und können als sehr stabil beschrieben werden.

Bezüglich der kinetischen Parameter gegenüber L-Glu wurden für die prozessierte als auch die unprozessierte GluOX signifikante Unterschiede festgestellt. Die prozessierte GluOX weist im Vergleich zur unprozessierten Form einen um das 3,7-fache erhöhten v_{\max} -Wert auf, kombiniert mit einem drastischen Abfall des K_M -Wertes auf 1,5 % des Wertes der unprozessierten Form. In Form der unprozessierten „one chain polypeptide“ Vorstufe besitzt die GluOX folglich eine niedrigere katalytische Aktivität (k_{cat} 10,9 s⁻¹ vs. 37,1 s⁻¹) sowie eine deutlich niedrigere Substrataffinität (K_M 12,97 mM vs. 0,20 mM). Durch die höhere katalytische Aktivität und Substrataffinität weist die prozessierte GluOX eine um den Faktor 220 höhere katalytische Effizienz k_{cat}/K_M auf ($185 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ vs. $0,83 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$).

Im untersuchten Konzentrationsbereich konnte weder bei der unprozessierten noch bei der prozessierten Form der rekombinanten GluOX eine Inhibierung durch L-Glu beobachtet werden. Über eine Substratüberschussinhibierung wurde für verschiedene L-AAOs in der Literatur berichtet, so z.B. die für die Enzyme aus Schlangengift und *Corynebacterium* [Findrik and Vasić-Rački, 2008; Coudert et al., 1975]. Auch Ketosäuren als Reaktionsprodukt sind in der Literatur als Inhibitoren von L-AAOs bzw. D-AAOs beschrieben [Findrik et al., 2006; Findrik und Vasić-Rački, 2008; Moreno et al., 1996].

Ein enzymatischer Biokatalysator, der durch erhöhte Konzentrationen an Substrat bzw. Produkt der katalysierten Reaktion in seiner Aktivität gehemmt wird, erscheint für die Anwendung in der Biotransformation weniger geeignet, da ausgehend von hohen Substratkonzentrationen hohe Produktkonzentrationen angestrebt werden. In der Literatur sind keine Informationen hinsichtlich einer möglichen Inhibierung von L-Glu-spezifischen Oxidasen durch α -KG verfügbar, weder für das Enzym aus *Streptomyces* sp. X-119-6 noch für eine andere bisher beschriebene GluOX. Daher war es in Hinsicht auf die angestrebten hohen Produktkonzentrationen an α -KG von besonderem Interesse, eine mögliche Inhibierung der GluOX näher zu untersuchen und zu charakterisieren.

Sowohl in den Experimenten zur möglichen Inhibierung der unprozessierten als auch der prozessierten Form der GluOX durch das Reaktionsprodukt α -KG wurde kein Einfluss von α -KG auf die Aktivität der beiden Enzymvarianten beobachtet, d.h. beide Formen der GluOX werden nicht inhibiert. Da während der Biotransformation von L-Glu mittels GluOX auch das sekundäre Reaktionsprodukt Ammonium in der Reaktionslösung akkumuliert, war es ebenfalls von Interesse, eine Inhibierung durch Ammonium zu untersuchen.

In den entsprechenden Experimente wurde ein signifikanter Unterschied der beiden Formen der GluOX bezüglich der Inhibierung durch Ammonium festgestellt, so wird die prozessierte Form durch eine Konzentration an Ammonium von bis zu 200 mM in keiner Weise in ihrer Aktivität beeinflusst, die unprozessierte Form hingegen wird durch ansteigende Konzentrationen an Ammonium deutlich in ihrer Aktivität gehemmt. So beträgt die Inhibierung bei 50 mM 17,9 %, bei 100 mM 45,0 % und bei 200 mM 77,9 %.

Für den Einsatz von Enzymen als Katalysator in biotechnologischen Prozessen ist die Stabilität von größter Wichtigkeit. In der durch die GluOX katalysierten Oxidation von L-Glu zu α -KG wird nach der Reaktionsgleichung Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in äquimolaren Mengen gebildet. Es ist hinlänglich bekannt, dass enzymatische Biokatalysatoren durch H_2O_2 in ihrer Aktivität sowie Stabilität negativ beeinflusst werden können [Findrik und Vasić-Rački, 2008; Sz wajcer et al., 1982], daher war es von Interesse, die Empfindlichkeit der GluOX gegenüber dieser stark oxidierenden Verbindung zu untersuchen.

Durch die Inkubation in Anwesenheit von 5 mM H_2O_2 wurden beide Formen der GluOX inaktiviert, wobei der Effekt bei der unprozessierten Form mit einer Inaktivierung von 35,4 % deutlich ausgeprägter war, als mit einer Inaktivierung von 12,0 % bei der prozessierten Form. Sowohl unprozessierte als auch prozessierte Form der GluOX reagieren empfindlich auf H_2O_2 als Nebenprodukt der Reaktion und werden in dessen Gegenwart inaktiviert. Eine vergleichende Zusammenfassung der biochemischen Eigenschaften der unprozessierten und prozessierten rekombinanten GluOX ist in Tabelle 68 wiedergegeben.

Tabelle 68: Vergleich der biochemischen Eigenschaften der unprozessierten und prozessierten Form der rekombinanten GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 (¹: 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 15°C; ²: keine Inaktivierung innerhalb von 260 d).

Biochemische Eigenschaft	GluOX	
	unprozessiert	prozessiert
Struktur	Homodimer	$\alpha_2 \beta_2 \gamma_2$
pH-Optimum	7,5	7,5
pH-Aktivitätsbereich	5,0-9,0	5,0-9,0
Inaktivierung Lagerung	50 % in 260 d	- ²
Inaktivierung Biotransformation ¹	-	-
Einfluss α -KG ¹	Kein Einfluss	Kein Einfluss
Einfluss Ammonium ¹	Inhibierung	Kein Einfluss
Einfluss H ₂ O ₂ ¹	Inaktivierung	Inaktivierung
Kinetische Parameter ¹		
v_{\max} (U mg ⁻¹)	8,37	31,06
K_M (mM)	12,97	0,20
k_{cat} (s ⁻¹)	10,9	37,1
k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$0,83 \times 10^{-3}$	185×10^{-3}

1.2.3 Screening nach neuen Produzenten einer GluOX

Über das Screening von Sammlungsstämmen gelang die Identifizierung von insgesamt 19 verschiedene neuen potenziellen GluOX-Produzenten (bzw. L-AAO-Produzenten), wobei die identifizierten Stämme auffälligerweise vermehrt den Gattungen *Streptomyces*, *Rhodococcus* sowie *Lactobacillus* zugehörig waren. Jedoch war es bei keinem der über das Screening identifizierten Stämme möglich, die Aktivität zu quantifizieren. Eine Untersuchung der Rohextrakte auf Katalase-Aktivität wurde ebenfalls durchgeführt, wobei für 11 der identifizierten Stämme eine zum Teil recht hohe Katalase-Aktivität im Rohextrakt nachgewiesen wurde. Anscheinend schützen sich GluOX- bzw. L-AAO-Produzenten auf diese Weise vor einer hohen intrazellulären Konzentration an H₂O₂ und dem damit verbundenen hohen Oxidationspotenzial. Das Vorhandensein von Katalase im untersuchten Zellrohextrakt kann bei der verwendeten Aktivitätsbestimmung durch den Abbau von H₂O₂ jedoch leicht zu einer Störreaktion führen.

Aufgrund der guten Eignung der rekombinant hergestellten GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 und den durchweg nicht quantifizierbaren Aktivitäten wurden die potenziellen GluOX-Produzenten im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter bearbeitet, stehen jedoch als vielversprechender Ausgangspunkt für mögliche weitere Arbeiten zur Isolierung neuer GluOXs bzw. L-AAO zur Verfügung.

1.2.4 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz der isolierten GluOX

Die anfänglichen Biotransformationen der Oxidation von L-Glu (100 mM) wurden mit der unprozessierten GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 als isoliertem Enzym durchgeführt. Für diese Umsetzungen konnte ein vollständiger Umsatz (100 %) mittels $^1\text{H-NMR}$ Untersuchung nachgewiesen werden, allerdings lag die Produktausbeute an α -KG bezogen auf die eingesetzte Menge an L-Glu (Mol Produkt α -KG pro Mol eingesetztem Substrat L-Glu) nur bei 69,0 % des theoretischen Wertes.

Der Verlust von 31,0 % Ketosäure weist hier deutlich auf eine eventuell stattfindende Nebenreaktion hin, höchst wahrscheinlich handelt es sich um eine Reaktion mit dem sekundären Reaktionsprodukt H_2O_2 . Überraschenderweise konnten im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum weder Signale für ein sekundäres Reaktionsprodukt noch ein mögliches Degradationsprodukt nachgewiesen werden.

In der Literatur ist beschrieben, dass Ketosäuren in Gegenwart von H_2O_2 wenig stabil sind und zu Decarboxylierungsreaktionen neigen [Findrik et al., 2005; Trost und Fischer, 2002; Fernandez-Lafuente et al., 1998; Upadhyya et al., 1999; Upadhyya und Bath, 1999]. So wurden durch Fischer Biotransformationen von D-Met sowie D-Phe mit der D-AAO aus *Trigonopsis variabilis* durchgeführt, bei denen keine Katalase, die H_2O_2 abbauen würde, eingesetzt wurde. Aufgrund der dann stattfindenden Nebenreaktion der Ketosäuren mit H_2O_2 wurden nur niedrige Produktausbeuten von 20 % (Umsatz von D-Met) bzw. 5 % (Umsatz von D-Phe) nach vollständigem Substratumsatz erreicht [Trost und Fischer, 2002]. Teilweise ist die Reaktion von Ketosäuren mit H_2O_2 aber auch gewünscht und wird absichtlich nicht unterdrückt. So wird in der oxidativen Desaminierung von Cephalosporin C mittels D-AAO keine Katalase zugesetzt, da das entstehende H_2O_2 nützlich für die Decarboxylierung der Ketoamidyl-7-aminocephalosporansäure ist [Pollegioni et al., 2004]; hier wird sogar noch H_2O_2 zugesetzt, um eine vollständige Umsetzung zu erreichen.

Um die Reaktion mit dem sekundären Reaktionsprodukt näher zu untersuchen, wurde ein Experiment zur gezielten Nebenproduktbildung bzw. Decarboxylierung von α -KG durch die Reaktion mit H_2O_2 durchgeführt. Dazu wurde α -KG in einer simulierten Biotransformation gezielt H_2O_2 ausgesetzt. Nach vollständigem Abreagieren des eingesetzten H_2O_2 wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ eine nahezu äquimolare Abnahme der Konzentration an α -KG nachgewiesen, wobei allerdings ebenfalls kein Signal für ein mögliches Abbau- bzw. Nebenprodukt, wie z.B. Bernsteinsäure für die Decarboxylierung von α -KG im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum nachzuweisen war. Ein weiteres Reagieren eines möglichen α -KG-Nebenproduktes mit H_2O_2 kann weitgehend ausgeschlossen werden, da die Reaktion mit α -KG im äquimolaren Verhältnis stattfand und somit in der Reaktionslösung kein weiteres H_2O_2 zur Verfügung stand. Die Ergebnisse der Untersuchung zur gezielten Nebenreaktionsführung mit H_2O_2 sowie der durchgeführten Biotransformation führten zur Hypothese, dass (1) α -KG in einer Decarboxylierungsreaktion mit H_2O_2 reagiert, und (2) dass das entstehende Nebenprodukt unter den Bedingungen der Biotransformation nicht stabil ist.

Um die unerwünschte Nebenreaktion von α -KG mit H_2O_2 sowie die Inaktivierung der beteiligten Biokatalysatoren auszuschließen, war folglich ein System zur *in situ*-Eliminierung von H_2O_2 in der Biotransformation von größter Wichtigkeit. Nach dem heutigen Stand der Technik kann dies durch z.B. chemische Methoden sowie durch den Einsatz des Enzyms Katalase erfolgen, wobei die enzymatische Eliminierung mittels Katalase unter den gegebenen Bedingungen am elegantesten erschien.

Eine der heute am besten untersuchten und charakterisierten Katalase stammt aus *Micrococcus luteus*. Das Enzym ist kommerziell verfügbar und besitzt im Vergleich zu anderen literaturbekannten Katalasen verschiedene Vorteile wie hohe Stabilität, Aktivität und Affinität gegenüber H_2O_2 [Few et al., 1957; Switala und Loewen, 2002; Trost und Fischer, 2002]. Aufgrund der vorteilhaften Eigenschaften und der kostengünstigen Verfügbarkeit wurde die Katalase aus *M. luteus* als geeignetes Enzym für die *in situ*-Eliminierung von H_2O_2 in der Biotransformation von L-Glu mittels GluOX ausgewählt. Um das optimale Enzymverhältnis für die Protektion der Ketosäure und der GluOX vor einer unerwünschten Nebenreaktion mit H_2O_2 zu ermitteln, wurden Biotransformationen von L-Glu (100 mM) mit verschiedenen Verhältnissen an Katalase zu GluOX durchgeführt.

Hierbei zeigte sich, dass das Verhältnis der beiden Enzyme in der Biotransformation von L-Glu eine entscheidende Rolle spielt in Hinsicht auf die erreichbare Substrat-bezogene Produktausbeute. Durch den Einsatz eines 100-fachen Überschusses an Katalase-Aktivität in der gekoppelten Biotransformation von L-Glu durch die prozessierte und unprozessierte Form der GluOX *Streptomyces* sp. X-119-6 konnte das Produkt α -KG nahezu vollständig vor der ungewollten Reaktion mit dem Nebenprodukt H_2O_2 protektiert werden.

Weitere Biotransformationen unter Variation der Substratkonzentration an L-Glu bis zu 500 mM wurden durchgeführt, es wurden sowohl die prozessierte als auch die unprozessierte GluOX eingesetzt. Alle Konzentrationen an L-Glu konnten vollständig mit hervorragenden Substrat-bezogenen Produktausbeuten und Raum-Zeit-Ausbeuten umgesetzt werden. Bezogen auf die eingesetzte Menge an L-Glu wurden jedoch in keiner der Biotransformationen 100 % Produktausbeute erhalten, auch bei Einsatz von sehr hohen Mengen an Katalase kommt es im Verlauf der Biotransformation in geringem Maße zu einer unerwünschten Nebenreaktion mit dem sekundären Reaktionsprodukt H_2O_2 , allerdings ist der Verlust an α -KG mit 0,6 bis 5,5 % relativ niedrig.

Der Einfluss der eingesetzten Substratkonzentration auf die Produktausbeute und die erzielte Endkonzentration an α -KG in der Biotransformation von L-Glu mittels GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 ist in der Abbildung 100 dargestellt. Analog zu den Experimenten zur gezielten Nebenproduktbildung bzw. Decarboxylierung von α -KG konnte in den Biotransformationen kein Nebenprodukt der Reaktion mit H_2O_2 nachgewiesen werden, die angestrebte hohe Produktreinheit von α -KG war somit in allen Fällen gegeben.

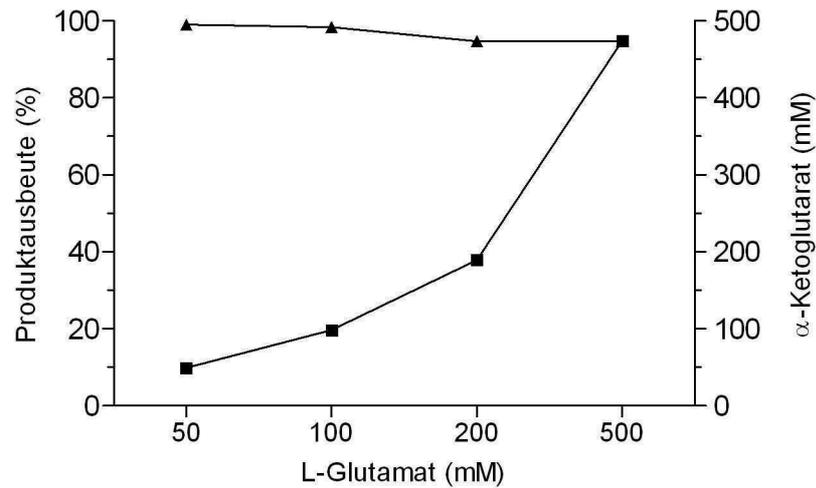


Abbildung 100: Einfluss der Substratkonzentration auf die Produktausbeute (\blacktriangle) und die erzielte Produktendkonzentration (α -KG, \blacksquare) in der Biotransformation von L-Glu zu α -KG mittels der GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 unter Zusatz von Katalase zur *in situ*-Eliminierung von H_2O_2 (prozessierte GluOX 2 U ml^{-1} , Katalase aus *M. luteus* 200 U ml^{-1} , 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 120 rpm, 15°C).

Aufgrund der im Verlauf der biochemischen Charakterisierung festgestellten Inhibierung der unprozessierten GluOX durch das sekundäre Reaktionsprodukt Ammonium wäre zu erwarten gewesen, dass die Biotransformationen erhöhter L-Glu Konzentration von 200 mM bzw. 500 mM bei Einsatz der gleichen Katalysatormenge (U) langsamer verlaufen, da mit zunehmendem Umsatz die Reaktionsgeschwindigkeit aufgrund der Inhibierung durch das sich akkumulierende Ammonium sinken müsste. In den entsprechenden Umsatzkinetiken (Abbildung 101 A und B) kann jedoch kein Unterschied hinsichtlich des zeitlichen Verlaufes der Biotransformation von 200 mM L-Glu mittels unprozessierter und prozessierter GluOX festgestellt werden, so dass eine Limitierung aufgrund der Inhibierung durch Ammonium ausgeschlossen werden konnte.

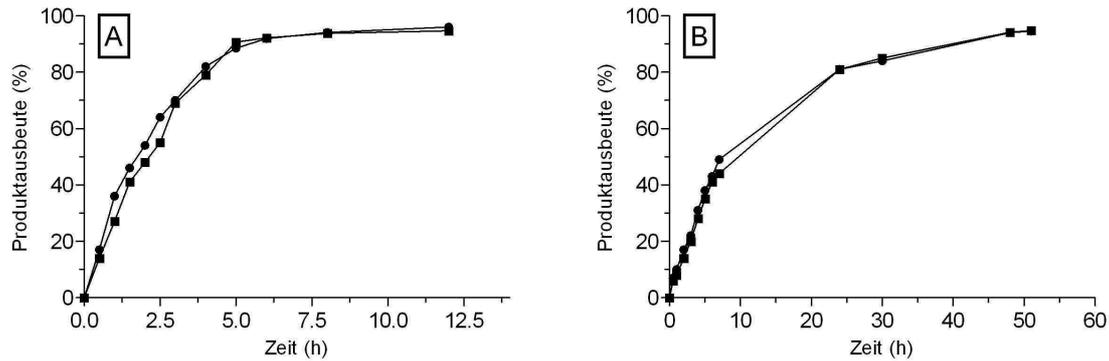


Abbildung 101: Biotransformation von L-Glu mit der unprozessierten (—●—) und der prozessierten (—■—) GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 unter Zusatz von Katalase zur *in situ*-H₂O₂ Eliminierung (L-Glu 200 mM (A) bzw. 500 mM (B), GluOX 2 U ml⁻¹, Katalase aus *M. luteus* 200 U ml⁻¹, 200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 120 rpm, 15°C).

1.2.5 Co-Immobilisierung von GluOX und Katalase

Durch eine Immobilisierung kann die Abtrennung des Katalysators vom Reaktionsgemisch nach erfolgter Biotransformation deutlich erleichtert werden, womit eine einfache Wiederverwendbarkeit des Biokatalysators gegeben ist und die Kosten für einen biotechnologischen Prozess deutlich gesenkt werden können. Ebenfalls bieten immobilisierte Biokatalysatoren die Möglichkeit einer kontinuierlichen Prozessführung sowie einer einfachen Produktaufreinigung. In der Literatur werden verschiedene Beispiele für den erfolgreichen Einsatz von enzymatischen Katalysatoren wie z.B. Oxidoreduktasen oder auch Hydrolasen in Verbindung mit kommerziellen Immobilisierungs-Trägern beschrieben [Boller et al., 2002]. Die Immobilisierung von Enzymen auf kommerziell verfügbare Träger bietet verschiedene Vorteile, sie ist, sowohl im Labor- als auch im industriellen Maßstab, schnell und einfach durchführbar und während der Immobilisierung müssen zumeist keine zusätzlichen Stoffe bzw. Reagenzien eingesetzt werden. Zudem ist durch die Verwendung von kommerziell verfügbaren Materialien ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit gegeben. Häufig werden die Träger lediglich mit den Enzymen in wässrigen Puffern vermischt und nach einer gewissen Wartezeit ist die Immobilisierung abgeschlossen. Als Alternative zum Einsatz isolierter Enzyme wurden die gereinigte homogene prozessierte GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 und die Katalase aus *M. luteus* auf dem kommerziellen Immobilisierungsträger EP113/S der Firma Resindion immobilisiert. Die Immobilisierung erfolgt bei diesem Träger über die Epoxid-Gruppen ohne weitere Zusätze wie z.B. Quervernetzungsreagenzien.

Unter den gewählten Bedingungen konnten GluOX und Katalase erfolgreich auf dem Träger EP113/S co-immobilisiert werden. Jedoch erscheint die erreichte Immobilisierungsausbeute in Hinsicht auf die GluOX (23.3 %) sowie die Katalase (10,6 %) nicht voll zufriedenstellend, so dass hier eine weitere Optimierung in Hinsicht auf das Trägermaterial sowie die Immobilisierungsparameter vorteilhaft wäre, jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht geplant war und aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt werden konnte. Es wurden 23 U GluOX sowie 529 U Katalase pro g EP113/S-Trägermaterial (Feuchtmasse) immobilisiert. Um die Einsatzfähigkeit sowie die Wiederverwendbarkeit zu untersuchen, wurde das Immobilisat in mehreren Zyklen unter Standardbedingungen zur Biotransformation von L-Glu eingesetzt. In jedem der drei Zyklen wurden hohe Substrat-bezogene Produktausbeuten erreicht, jedoch war eine leichte Abnahme von 98,1 % im ersten Zyklus auf 95,5 % im zweiten und 87,3 % im dritten Zyklus zu beobachten, wobei sich die Reaktionszeit für einen vollständigen Umsatz ebenfalls um 33 % bzw. 66 % verlängerte.

Bisher wurden verschiedene GluOX erfolgreich immobilisiert, die Anwendung beschränkte sich allerdings ausschließlich auf den Einsatz als Biosensor [Basu et al., 2005; Ye et al., 1995; Li et al., 1995; McMahon et al., 2006], eine Immobilisierung für präparative Zwecke wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass GluOX und Katalase erfolgreich auf dem Träger EP113/S der Firma Resindion immobilisiert werden können und dass das Immobilisat für eine Vielzahl von Zyklen in der präparativen Biotransformation einsetzbar ist. Durch die Co-Immobilisierung der GluOX und der Katalase konnte eine einfache Abtrennung der Katalysatoren vom Reaktionsgemisch und damit eine einfache Wiederverwendbarkeit nach erfolgter Reaktionsführung ermöglicht werden.

1.2.6 Ganzzellkatalysator GluOX und Katalase

Ganzzellkatalysatoren wurden bisher bereits vielfach sehr erfolgreich in der Synthese von unterschiedlichen Zielverbindungen genutzt. Vorteile von Ganzzellkatalysatoren im Vergleich zum Einsatz isolierter Enzyme sind im Allgemeinen der geringe Arbeits- und Kostenaufwand, da eine Präparation und Reinigung der enzymatischen Biokatalysatoren entfällt. Weiterhin besteht die Möglichkeit, den Ganzzellkatalysator nach erfolgter Biotransformation einfach von der Produktlösung abzutrennen und erneut einzusetzen.

Jedoch kann die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Biotransformation mittels Ganzzellkatalysatoren aufgrund von Transportprozessen limitiert sein.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein Ganzzellkatalysator mit GluOX und Katalase konstruiert und in der Biotransformation von L-Glu eingesetzt. Um hierbei einen möglicherweise limitierten Transport von Substrat und Produkt in und aus der Zelle zu untersuchen, wurde ein Teil der Zellen vor den Biotransformation zum Zwecke der Permeabilisierung mit Toluol behandelt. Die Ganzzell-Biotransformationen von L-Glu mit *E. coli* BL21(DE3)/pACHPIIa/pHISGLOX, also Zellen, die GluOX und Katalase rekombinant enthalten, mit und ohne Permeabilisierung lieferten vollständige Umsätze und hervorragende Produktausbeuten, wobei festgestellt wurde, dass die Ganzzell-Biotransformation durch die Permeabilisierung mittels Toluolbehandlung nicht positiv beeinflusst wird. Um die Wiederverwendbarkeit des Ganzzellkatalysators zu testen, wurden die Zellen in einem zweiten Zyklus zur Biotransformation von L-Glu eingesetzt. Auch beim wiederholten Einsatz des Ganzzellkatalysators wurden unabhängig von der Zellpermeabilisierung hohe Produktausbeuten erreicht, jedoch war eine leichte Abnahme von 98,5 % bzw. 95,6 % (permeabilisiert) im ersten Zyklus auf 96,1 % und 94,2 % (permeabilisiert) im zweiten Zyklus zu beobachten. Der Zeitraum der Biotransformation für einen vollständigen Substratumsatz verlängerte sich nicht.

Bei der Verwendung von Ganzzellkatalysatoren war im Vergleich zur Verwendung isolierter Enzyme zusätzlich auf die mögliche Metabolisierung von Substrat bzw. Produkt zu achten. Da zu erwarten war, dass *E. coli* in der Lage ist, sowohl L-Glu als auch α -KG im Stoffwechsel zu nutzen, wurde den Ganzzell-Biotransformationen das Antibiotikum Gentamycin (Wirkung auf die Proteinbiosynthese) zugesetzt, um ein mögliches Zellwachstum und eine Induktion von L-Glu- und KG-abbauenden Enzymen zu verhindern.

In den Kontroll-Biotransformationen mit *E. coli* Zellen, die nicht Träger der rekombinanten GluOX sind, konnte unter den untersuchten Bedingungen der Biotransformation und innerhalb des untersuchten Zeitraumes weder eine Umsetzung von L-Glu zu α -KG noch eine Metabolisierung des Substrates nachgewiesen werden. Die Metabolisierung des Produktes α -KG durch *E. coli* unter den gewählten Bedingungen der Ganzzell-Biotransformation kann aufgrund des hohen erzielten Umsatzes in Verbindung mit einer hohen Substratbezogenen Produktausbeute ebenfalls ausgeschlossen werden.

1.2.7 Zusammenfassender Vergleich der verschiedenen Enzympräparationen

In der Biotransformation wurden verschiedene Präparationen wie isolierte Enzyme, immobilisierte Enzyme und ein Ganzzellkatalysator erfolgreich für die Biotransformation von L-Glu zu α -KG eingesetzt. Mit allen Präparationen konnten vollständige Umsetzungen von L-Glu erreicht werden, verbunden mit hohen Produktausbeuten an α -KG. Der Einsatz von Katalase zum *in situ*- bzw. *in vivo*-Abbau von H_2O_2 konnte neben der Protektion des Zielproduktes α -KG eine hohe Stabilität der eingesetzten Biokatalysatoren garantieren. Eine vergleichende Zusammenfassung der untersuchten Enzympräparationen ist in Tabelle 69 wiedergegeben.

Tabelle 69: Vergleich der unterschiedliche Präparationen in der Biotransformation von 50 mM L-Glu zu α -KG mittels GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 unter *in situ*- bzw. *in vivo*-Eliminierung von H_2O_2 mittels Katalase (200 mM Kpi Puffer pH 7,0, 120 rpm, 15°C).

Präparation	Ansatz	Ausbeute α -KG (%)	Vorteile	Nachteile
Isolierte Enzyme	batch	> 99	Einfache	Kosten für
			- Handhabung	- Isolierung
<i>E. coli</i> Zellen	batch	> 98	- Dosierung	- Reinigung
			Einfache	Leicht sinkende Produktausbeute
	rep.-batch	> 94	- Abtrennung	- Wiederverwendbarkeit
Immobilisat	batch	> 98	Einfache	Kosten Trägermaterial
			- Handhabung	Ausbeute der Immobilisierung
	rep.-batch	> 96	- Abtrennung	Leicht sinkende Produktausbeute
			- Wiederverwendbarkeit	Verlängerte Reaktionszeit

1.3 Darstellung von α -KG aus L-Glu mittels GPT

Bei der Evaluierung einer geeigneten Transaminase war insbesondere auf das Substratspektrum in Hinblick auf den Aminogruppen-Akzeptor zu achten. Wird durch die Transaminase z.B. ein Akzeptor verlangt, der kommerziell nicht oder nur mit hohen Kosten verfügbar ist, erscheint der Einsatz eines solchen Enzyms nicht vorteilhaft. Als drittes enzymatisches System für die Darstellung von α -KG sollte daher eine L-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) eingesetzt werden. Aufgrund der durchgeführten Literaturrecherche wurde die GPT aus dem Schweineherz [De Rosa et al., 1987] als möglicherweise geeignetes Enzym für die geplante Anwendung ausgewählt. Dieses Enzym ist kommerziell verfügbar und nutzt preisgünstiges Pyruvat als Aminogruppen-Akzeptor, welches zu L-Ala umgewandelt wird.

Beim Einsatz der GPT war weiterhin zu beachten, dass Transaminasen im Allgemeinen eine Gleichgewichtskonstante von annähernd 1 besitzen, was einen vollständigen Substratumsatz schwierig macht [Taylor et al., 1998; Engel und Paradisi, 2010]. Die Reversibilität der Reaktion und das Vorhandensein eines Nebenproduktes in Form einer Aminosäure schränken die Produktivität von Transaminase-katalysierten Prozessen stark ein, so dass typische Ausbeuten nicht über 50 % liegen [Taylor et al., 1998; Engel und Paradisi, 2010].

Verschiedene Ansätze standen zur Verfügung, um das Gleichgewicht der Transaminierungsreaktion in die Richtung der Produktbildung hin zu verschieben. Zum einen sollte der Aminogruppen-Akzeptor in einem hohen molaren Überschuss eingesetzt werden, zum anderen sollte die Kopplung mit einem zweiten enzymatischen System ermöglicht werden, das mit der Transaminasereaktion über den Aminogruppen-Akzeptor Pyruvat gekoppelt ist und diesen *in situ* regeneriert. Vorteilhaft wird hierfür ein enzymatisches System eingesetzt, dessen katalysierte Reaktion irreversibel verläuft, wodurch es möglich sein sollte, eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes herbeizuführen und die Gesamtreaktion in Richtung der α -KG-Bildung hin anzutreiben.

Als Enzyme zur *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat wurden die L-Alanin-Dehydrogenase (AlaDH) aus *Bacillus subtilis* sowie die kommerziell verfügbare L-Aminosäure-Oxidase (L-AAO) aus *Crotalus atrox* eingesetzt. Beide enzymatischen Systeme zur Regenerierung von Pyruvat sind jedoch zusätzlich auf ein weiteres Hilfsenzym angewiesen.

Die AlaDH macht den Einsatz eines effizientes NAD⁺-Regenerierungssystem nötig, was in Form der NOX aus *L. brevis* verfügbar war. Da die Oxidation von NADH durch die NOX irreversibel verläuft, kann die reduktive Rückreaktion von Pyruvat zu L-Ala weitgehend ausgeschlossen werden, so dass die Gesamtreaktion ebenfalls annähernd irreversibel wird. Die L-AAO katalysiert die oxidative Desaminierung von L-Ala zu Pyruvat, Ammonium und H₂O₂, wobei die Reaktion als vollständig irreversibel anzusehen ist, was die Gleichgewichtslage der Transaminierungsreaktion zugunsten der α -KG-Bildung verschieben sollte. Um die oxidationsempfindliche Ketosäure sowie die Biokatalysatoren zu schützen, wurde beim Einsatz der L-AAO die *in situ*-Eliminierung von H₂O₂ mittels der Katalase aus *M. luteus* durchgeführt.

1.3.1 Untersuchung des Einflusses von Substraten und Produkten der Biotransformation auf die AlaDH aus *B. subtilis*

Die Untersuchung der AlaDH schien von Bedeutung zu sein, da eine Inhibierung des Enzyms durch den Aminogruppen-Akzeptor Pyruvat analog zu der Produktinhibierung der GluDH vorstellbar war, ebenso eine Inhibierung durch das Substrat und Produkt der Biotransformation sowie das sekundäre Reaktionsprodukt Ammonium, welches im Verlauf der Biotransformation in der Reaktionslösung akkumuliert bzw. durch das Zusammenspiel von Pyruvat und Ammonium.

Die durchgeführten Aktivitätsmessungen zeigten einen deutlichen negativen Einfluss des Aminogruppen-Akzeptors auf die Aktivität der AlaDH aus *B. subtilis*, so beträgt die Inhibierung bei einer Konzentration von 2,5 mM Pyruvat 30,1 %, bei einer Konzentration von 10 mM 48,9 %. Ebenfalls wurde ein negativer Einfluss des zweiten Reaktionsproduktes Ammonium auf die Aktivität des Enzyms festgestellt, die Inhibierung durch Ammonium beträgt bei einer Konzentration von 2,5 mM 4,7 %, bei 10 mM 12,2 % und bei 50 mM 32,6 %. In Gegenwart von Pyruvat sowie Ammonium konnte ein deutlicher synergetischer Inhibierungseffekt beobachtet werden, so wird die AlaDH durch eine Konzentration von jeweils 2,5 mM mit 92,8 % bereits fast vollständig in der oxidativen Desaminierung von L-Ala gehemmt, bei einer Konzentration von 5 mM konnte in den entsprechenden Experimenten keine Aktivität nachgewiesen werden, was für eine vollständige Inhibierung des Enzyms spricht. Durch L-Glu und α -KG konnte bis zu einer Konzentration von 50 mM keine Inhibierung der AlaDH festgestellt werden.

1.3.2 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GPT ohne *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors

Für die Biotransformation von 50 mM L-Glu unter Einsatz der GPT ohne *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors konnte nach Optimierung der Biotransformationsbedingungen und unter Einsatz eines 3-fachen molaren Überschusses an Pyruvat ein maximaler Umsatz von 82,4 % nachgewiesen werden, die Endkonzentration der Reaktion an α -KG beträgt $6,0 \text{ g l}^{-1}$, die Raum-Zeit-Ausbeute beträgt $0,25 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Interessanterweise scheint sich der Einsatz eines sehr hohen molaren Überschusses des Amino-Akzeptors eher negativ auf die Biotransformation auszuwirken, so wurde bei einem 10-fachem Überschuss lediglich ein Umsatz von 27,4 % erzielt.

1.3.3 Darstellung von α -KG aus L-Glu durch den Einsatz einer GPT unter *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors

In der Biotransformation von 100 mM L-Glu unter Einsatz der GPT sowie der AlaDH aus *B. subtilis* zur *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat wurde nach Optimierung der Biotransformationsbedingungen ein maximaler Umsatz von 33,6 % nachgewiesen, die Endkonzentration der Reaktion an α -KG beträgt $4,9 \text{ g l}^{-1}$, die Raum-Zeit-Ausbeute beträgt $0,20 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Sowohl die GPT als auch die AlaDH konnten als sehr stabil bzw. stabil unter den Bedingungen der Biotransformation charakterisiert werden, die Stabilität der eingesetzten NOX unter den gewählten Reaktionsbedingungen ist ebenfalls ausreichend. Eine Inaktivierung eines oder mehrerer beteiligter Enzyme im Verlauf der Biotransformation konnte daher als Grund für den niedrigen erreichten Umsatz ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der Charakterisierung der AlaDH hinsichtlich der Inhibierung durch Produkte der von ihr katalysierten Reaktion unterstreichen die Hypothese, dass der niedrige Umsatz von L-Glu auf eine Limitierung der AlaDH zurückzuführen ist. Die im Biotransformationsverlauf steigende Konzentration an Ammonium scheint sich hier in Gegenwart auch geringer Konzentrationen an Pyruvat nachteilig auf die AlaDH-katalysierte Reaktion auszuwirken, so dass der Aminogruppen-Akzeptor nur unzureichend regeneriert wird und die Transaminasereaktion daher schließlich zum Stillstand kommt.

In der Biotransformation von 100 mM L-Glu unter Einsatz der GPT sowie der L-AAO aus *Crotalus atrox* zur *in situ*-Regenerierung des Amino-Akzeptors Pyruvat, wurde ein maximaler Umsatz von 29,7 % nachgewiesen, die Endkonzentration der Reaktion an α -KG beträgt 4,3 g l⁻¹, die Raum-Zeit-Ausbeute beträgt 0,18 g l⁻¹ h⁻¹. In der Biotransformation sowie entsprechenden Kontrollmessungen wurde eine aufgrund der Literaturlage nicht erwartete leichte Nebenaktivität der L-AAO aus *C. atrox* für L-Glu festgestellt.

Aufgrund dieser zusätzlichen Desaminierung von L-Glu wäre ein durchaus höherer Umsatz zu erwarten gewesen, allerdings scheinen sich hier die in der Biotransformation vorhandenen Substrat- bzw. Produktkonzentrationen nachteilig auf die Aktivität der L-AAO auszuwirken, so dass das durch die Transaminierungsreaktion entstandene L-Ala anscheinend nur unzureichend durch das Enzym zu Pyruvat umgesetzt und wieder für die Transaminierungsreaktion bereitgestellt wird.

1.3.4 Vergleich der Biotransformationen von L-Glu mittels GPT

Um die verschiedenen GPT-Systeme hinsichtlich der Biotransformation von L-Glu miteinander zu vergleichen, wurden die erzielten Umsätze, die Endkonzentrationen an α -KG und die Raum-Zeit-Ausbeuten der Biotransformationen tabellarisch gegenübergestellt. Die Tabelle 70 verdeutlicht, dass die GPT ohne System zur Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors die besten Ergebnisse liefert, gefolgt von der Biotransformation unter *in situ*-Regenerierung von Pyruvat durch die AlaDH aus *B. subtilis* und der L-AAO aus *C. atrox*.

Nachteilig bei der Biotransformation ohne Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors wirkt sich vor allem aus, dass Pyruvat in einem hohen molaren Überschuss eingesetzt werden muss, was kostenintensiv ist und die Produktisolierung erschwert. Die AlaDH und die L-AAO können den Aminogruppen-Akzeptor anscheinend nur unzureichend regenerieren und besitzen hierbei den Nachteil, dass beide enzymatischen Systeme zusätzlich auf ein weiteres Hilfsenzym angewiesen sind, was die Komplexität und damit auch die Kosten des Gesamtprozesses deutlich erhöht. Weiterhin können die erzielten Umsätze keine hohe Produktreinheit gewährleisten, so dass die Produktaufarbeitung von α -KG aufgrund der hohen verbliebenen Konzentrationen an L-Glu wohl nur unter erschwerten Bedingungen möglich ist.

Tabelle 70: Vergleich der unterschiedliche Systeme in der Biotransformation von L-Glu zu α -KG mittels der GPT aus Schweineherz mit oder ohne *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors (200 mM Kpi Puffer pH 8,0, 120 rpm, 30°C, ¹ 50 mM L-Glu/150 mM Pyruvat, ² 100 mM L-Glu/5 mM Pyruvat, ³ 100 mM L-Glu/2,5 mM Pyruvat).

Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors	Umsatz (%)	α -KG (g l ⁻¹)	Raum-Zeit-Ausbeute (g l ⁻¹ h ⁻¹)	Nachteile
-	82,4 ¹	6,0	0,25	Hohe Konzentration an Pyruvat Kosten Pyruvat Erschwerte Produktisolierung
AlaDH <i>B. subtilis</i>	33,6 ²	4,9	0,20	Kosten Enzym Inhibierung durch Pyruvat und Ammonium Niedriger Umsatz
L-AAO <i>C. atrox</i>	29,7 ³	4,3	0,18	Kosten Enzym L-Glu-Nebenaktivität Niedriger Umsatz

1.4 Vergleich der enzymatischen Verfahren zur Darstellung von α -KG

Für die biotechnologische Herstellung der Ketosäure α -KG mittels enzymatischer Biotransformation von L-Glu wurden im Laufe dieser Arbeit die Enzyme GluDH, GluOX sowie GPT als Katalysatoren eingesetzt. Hierbei unterscheiden sich die verwendeten Enzyme deutlich hinsichtlich der Art der katalysierten Reaktion, der benötigten Cofaktoren bzw. Co-Substrate sowie der entstehenden sekundären Produkte, so dass jedes Enzym individuelle Anforderungen an die Bedingungen der Biotransformation stellt.

Aufgrund der NAD^+ -Abhängigkeit der GluDH ist das Enzym auf ein effizientes *in situ* NAD^+ -Regenerierungssystem angewiesen. In der Biotransformation mittels GluDH wurden drei verschiedene Systeme zur *in situ* NAD^+ -Regenerierung eingesetzt: eine NOX, eine LDH sowie eine LeuDH. In der durch die GluOX-katalysierten Desaminierung von L-Glu zu α -KG wird nach der Reaktionsgleichung H_2O_2 in äquimolaren Mengen gebildet. Um eine unerwünschte Nebenreaktion von α -KG und H_2O_2 sowie eine Inaktivierung der beteiligten Biokatalysatoren auszuschließen, war ein System zum *in situ*-Abbau von H_2O_2 in der Biotransformation von größter Wichtigkeit. Der enzymatische *in situ*-Abbau mittels Katalase erschien unter den gegebenen Bedingungen am geeignetsten. Die GPT katalysiert den Transfer der Aminogruppe von L-Glu (Aminogruppen-Donor) zu Pyruvat (Aminogruppen-Akzeptor), wobei α -KG und L-Ala gebildet werden. Um die *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors Pyruvat zu erreichen, wurden eine AlaDH sowie eine L-AAO eingesetzt. Beide enzymatischen Systeme zur Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors sind jedoch zusätzlich auf noch ein weiteres Hilfsenzym angewiesen. Die AlaDH verlangt den Einsatz eines NAD^+ -Regenerierungssystems (NOX), die L-AAO macht den *in situ*-Abbau von H_2O_2 mittels Katalase nötig.

Ein zusammenfassender Vergleich der verschiedenen in dieser Arbeit entwickelten und eingesetzten enzymatischen Verfahren zur Darstellung von α -KG aus L-Glu mittels Biotransformation ist in der Tabelle 71 dargestellt.

Tabelle 71: Zusammenfassender Vergleich der in dieser Arbeit entwickelten und eingesetzten enzymatischen Verfahren zur Darstellung von α -KG aus L-Glu.

Enzym	Co-Enzym(e)	Cofaktor	Co-Substrat	Co-Produkt
	NOX	NAD ⁺	O ₂	H ₂ O
GluDH	LDH	NAD ⁺	Pyruvat	L-Lactat
	LeuDH	NAD ⁺	α -Ketoisocaproat	L-Leu
GluOX	-	FAD	H ₂ O, O ₂	H ₂ O ₂
	Katalase	FAD	H ₂ O, O ₂	O ₂
GPT	-	PLP	Pyruvat	L-Ala
	AlaDH, NOX	PLP NAD ⁺	Pyruvat	L-Ala
	L-AAO, Katalase	PLP	Pyruvat	L-Ala

Um zu vergleichen, inwiefern die verschiedenen enzymatischen Verfahren bzw. Systeme in der Lage sind L-Glu in α -KG zu transformieren, wurden die höchsten erzielten Umsätze, Produktendkonzentration und Raum-Zeit-Ausbeuten in der optimierten Biotransformation unterschiedlicher Konzentrationen von L-Glu mittels isolierter GluDH, GluOX und GPT sowie den entsprechenden Co-Enzymen tabellarisch gegenübergestellt (Tabelle 72). Die Tabelle verdeutlicht, dass die GluOX in der Biotransformation von L-Glu mit Abstand die besten Ergebnisse liefert, gefolgt von der GluDH und der GPT.

Tabelle 72: Zusammenfassender Vergleich der durchgeführten Biotransformationen zur Darstellung von α -KG aus L-Glu mit GluDH (*C. difficile*), GluOX (prozessierte GluOX *Streptomyces* sp. X-119-6) und GOT (Schweineherz), (¹ Substrat-bezogene Produktausbeute, Verlust von α -KG durch die Reaktion mit H₂O₂), RZA: Raum-Zeit-Ausbeute.

Enzym	Co-Enzym(e)	L-Glu (mM)	Umsatz (%)	α -KG (g L ⁻¹)	RZA (g L ⁻¹ h ⁻¹)
GluDH	NOX	50	82,7	6,0	0,25
		100	48,2	7,0	0,29
		200	32,4	9,5	0,40
	LDH	50	56,0	4,1	0,17
		100	48,0	7,0	0,29
		LeuDh	50	20,2	1,5
	100		20,1	2,9	0,12
	GluOX	-	100	100 / 69,0 ¹	10,1
KAT		50	100 / 99,0 ¹	7,2	2,42
		100	100 / 98,4 ¹	14,3	3,58
		200	100 / 94,7 ¹	27,7	2,31
		500	100 / 94,8 ¹	69,3	1,36
GPT	-	50	82,4	6,0	0,25
	AlaDH, NOX	100	33,6	4,9	0,25
	L-AAO, KAT	100	29,7	4,3	0,18

Der größte Vorteil der GluOX liegt vor allem in der Vollständigkeit der Biotransformation des Ausgangssubstrats L-Glu zum Zielprodukt α -KG. Die Irreversibilität der GluOX-katalysierten Reaktion scheint sich hier im Vergleich zum Einsatz der GluDH und der GPT positiv auf die Biotransformation auszuwirken. Bezogen auf die eingesetzte Menge an L-Glu wurde jedoch in keiner der durchgeführten Biotransformationen eine Produktausbeute von 100 % erhalten, trotz des Einsatzes von Katalase zum *in situ*-Abbau des reaktiven sekundären Reaktionsproduktes H_2O_2 kommt es im Verlauf der Biotransformation in geringem Maße zu einer unerwünschten Decarboxylierungsreaktion. Der Verlust an α -KG ist mit 1,0 bis 5,4 % jedoch relativ niedrig und das entstehende Nebenprodukt scheint unter den Bedingungen der Biotransformation ebenfalls nicht stabil zu sein, da mittels 1H -NMR kein Nebenprodukt einer Decarboxylierungsreaktion bzw. ein Abbauprodukt von diesem nachgewiesen werden konnte. Da das Zielprodukt α -KG somit nahezu in Reinform vorliegt, was wiederum die Produktaufreinigung deutlich erleichtert, kann der geringe Produktverlust jedoch vernachlässigt werden.

Im Gegensatz zu den anderen Systemen bietet die FAD-abhängige GluOX verschiedene weitere Vorteile. So ist bei den Flavoenzymen der Cofaktor FAD als prosthetische Gruppe an das Enzym gebunden und wird durch die Reaktion mit molekularem Sauerstoff regeneriert. Somit kann im Gegensatz zu den NAD^+ -abhängigen Systemen auf eine externe Cofaktorregenerierung verzichtet werden. Enzyme, die nicht auf zusätzliche Cofaktoren angewiesen sind, besitzen natürlicherweise in der enzymatischen Synthese das größere Potential, da sie keine zusätzlichen Kosten für den Cofaktor verursachen. Allerdings muss bei der Verwendung der GluOX zum *in situ*-Abbau von H_2O_2 das Enzym Katalase zugesetzt werden. Ein positiver Nebenaspekt bei der Verwendung von Katalase ist jedoch, dass bei der katalysierten Reaktion Sauerstoff entsteht und somit für die GluOX bzw. die Regenerierung des gebundenen Cofaktors FAD zur Verfügung gestellt wird.

Die Biotransformationen von L-Glu unter Verwendung von GluDH lieferten im Vergleich zur GluOX deutlich niedrigere Umsätze, Produktendkonzentration und Raum-Zeit-Ausbeuten. Bei der biochemischen Charakterisierung der verwendeten GluDHs wurde durchweg eine relativ starke Inhibierung durch die Reaktionsprodukte α -KG und Ammonium festgestellt, allerdings ist die Inhibierung durch jeweils ein Produkt nicht vollständig. In Gegenwart beider Reaktionsprodukte kommt es jedoch zu einem starken synergetischen Inhibierungseffekt, so dass die von der GluDH katalysierte Desaminierung

von L-Glu aufgrund der im Verlauf der Biotransformation akkumulierenden Reaktionsprodukte zum Erliegen kommt. Wie die Biotransformationen mit Substratkonzentrationen von 100 bzw. 500 mM L-Glu zeigen, kann jedoch trotz der starken Inhibierung ein Umsatz von 48,2 % bzw. 31,1 % erreicht werden.

Bei der GPT ist der Cofaktor PLP ähnlich wie bei der GluOX fest am Enzym gebunden und muss nicht extern regeneriert werden, trotzdem muss ein Regenerierungssystem für den Aminogruppen-Akzeptor berücksichtigt werden. Auch in der Biotransformation von L-Glu mittels GPT wurden trotz umfangreicher Variation der Parameter nur unzufriedenstellende Umsätze erzielt, damit verbunden auch niedrige Produktkonzentrationen und Raum-Zeit-Ausbeuten. Nachteilig bei der Biotransformation ohne Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors wirkt sich vor allem aus, dass Pyruvat in einem hohen molaren Überschuss eingesetzt werden muss, was kostenintensiv ist und die Produktisolierung erschwert. Die niedrigen Umsätze der Biotransformationen mittels GPT unter *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors sind nicht auf eine Limitierung des eigentlichen Synthesenzyms zurückzuführen, sondern vielmehr auf eine Limitierung der gekoppelten Co-Enzyme AlaDH und L-AAO. Die Ergebnisse der Untersuchung zur Beeinflussung durch die Produkte der Biotransformation zeigten, dass die AlaDH ein den GluDHs ähnliches Inhibierungsverhalten aufweist, insbesondere in Hinsicht auf den synergetischen Effekt der Reaktionsprodukte der oxidativen Desaminierung. Allerdings ist bei den GluDHs das inhibierende α -KG Produkt der eigentlichen Hauptreaktion, das stöchiometrisch zum Abbau von L-Glu entsteht und damit in der Konzentration kontinuierlich ansteigt. Im Gegensatz dazu wird das die AlaDH inhibierende Pyruvat der Biotransformation prinzipiell nur in katalytischen Mengen zugesetzt (2,5 mM) und weiterhin durch die Transaminase-Reaktion wieder zu L-Ala umgesetzt. Jedoch wird die AlaDH aus *B. subtilis* bereits durch eine Konzentration an Pyruvat und Ammonium von jeweils 2,5 mM mit 92,8 % fast vollständig in ihrer Aktivität in der oxidativen Desaminierung von L-Ala gehemmt.

Für die eingesetzte L-AAO wurde eine nicht erwartete Nebenaktivität für L-Glu festgestellt, jedoch scheinen sich die in der Biotransformation vorhandenen Substrat- bzw. Produktkonzentrationen ebenfalls nachteilig auf die Aktivität der L-AAO auszuwirken. Durch beide Enzyme wird der Aminogruppen-Akzeptor Pyruvat nur unzureichend regeneriert und wieder für die Transaminierungsreaktion bereitgestellt, so dass die Biotransformation schließlich zum Stillstand kommt.

Die Verfahren unter Nutzung der GluDH sowie der GPT besitzen beide den Nachteil, dass nur unvollständige Umsätze erreicht werden. Ebenfalls entstehen durch die eingesetzten Systeme zur Cofaktor- bzw. Co-Substratregenerierung teilweise Co-Produkte, die zusammen mit verbliebenem Substrat wahrscheinlich die Produktaufarbeitung stören werden. Zusätzlich werden durch den zwingenden Einsatz der Co-Substrate bzw. der Co-Enzyme die Kosten der Biotransformation deutlich erhöht. Eine Zusammenfassung der verschiedenen Vor- und Nachteile der in dieser Arbeit entwickelten und eingesetzten enzymatischen Verfahren zur Darstellung von α -KG aus L-Glu mittels GluDH, GluOX und GPT ist in der Tabelle 73 dargestellt.

Tabelle 73: Vor- und Nachteile der in dieser Arbeit entwickelten und eingesetzten Verfahren zur Darstellung von α -KG aus L-Glu mittels enzymatischer Biotransformation.

Enzym	Vorteile	Nachteile
GluDH		Reversibel
		Limitierung Produktinhibierung
		Benötigt Co-Substrat
		Nebenproduktbildung
		Unvollständiger Umsatz
	Erschwerte Produktisolierung	
GluOX	Irreversibel	
	Kein Co-Substrat	Ohne Katalase Produktverlust
	Kein Nebenprodukt	
	Vollständiger Umsatz	
GPT		Reversibel
		Limitierung Co-Enzyme
		Benötigt Co-Substrat
		Nebenproduktbildung
		Unvollständiger Umsatz
	Erschwerte Produktisolierung	

1.5 Vergleich der entwickelten Verfahren mit anderen Produktionsverfahren für α -KG

Die klassischen chemischen Syntheseverfahren für α -KG aus α,α -Dichlorglutarsäure oder Succinat- und Oxalat-diethylester benötigen extreme Bedingungen in Hinsicht auf Druck und Temperatur, sowie den Einsatz von problematischen Katalysatoren und Reagenzien, weiterhin sind sie mit der Produktion von ungewollten Nebenprodukten sowie umweltschädlichen Abfällen verbunden [Timmler und Wegler, 1971; Stottmeister et al., 2005, Otto et al., 2011].

Bis heute wurden verschiedene biotechnologische Verfahren zur Produktion von α -KG beschrieben, wobei in der Hauptsache fermentative Verfahren genutzt werden, bei denen sowohl Bakterien als auch Hefen zum Einsatz kommen [Hockenull et al. 1951, Kosheleva et al. 1967, Chernyavskaya et al. 2000, Aurich und Stottmeister, 2006; Verseck et al., 2007].

Die fermentative Gewinnung von α -KG erfolgt heute bevorzugt mit Hilfe von Hefen der Gattungen *Candida* und *Yarrowia* [Zhang et al., 2009; Aurich und Stottmeister, 2006; Weissbrodt et al., 1989]. Insbesondere *Y. lipolytica* zeichnet sich durch eine hohe Vielfalt an einsetzbaren Substraten zur α -KG-Produktion aus. Neben Kohlenwasserstoffen fossiler Herkunft können auch Glucose und andere nachwachsender Rohstoffe wie z.B. Ethanol, Rapsöl, Sonnenblumenöl und Glycerol durch die Hefe zur fermentativen Produktion von α -KG genutzt werden. Die Fermentationen auf Grundlage von Substraten fossiler Herkunft liefert jedoch deutlich höhere Produktkonzentrationen. So wurde auf Grundlage von n-Alkanen eine α -KG Konzentration von 195 g l⁻¹ erzielt [Weissbrodt et al., 1989], während unter Nutzung von Ethanol, Glucose und Pflanzenöl Konzentrationen zwischen 37,7 g l⁻¹ und 125 g l⁻¹ erreicht wurden [Aurich und Stottmeister, 2006]. Allerdings weisen die Fermentationsverfahren grundsätzlich den Nachteil auf, dass die entsprechenden Ausgangssubstrate weit unter dem theoretisch möglichen Maximum in α -KG transformiert werden, typische Substrat-bezogene Ausbeuten liegen zwischen 40 % und 50 % [Koepsell et al., 1952; Tanaka et al., 1964; Chernyavskaya et al., 2000; Il'chenko et al., 2002]. Der Grund für die zum Teil geringen Ausbeuten ist, dass ein beträchtlicher Anteil des Ausgangssubstrats zu Biomasse und unerwünschten Nebenprodukten wie Pyruvat, Fumarat und Malat verstoffwechselt sowie zur Energiegewinnung verwendet wird [Liu et al., 2007].

Die vollständige Transformation des Ausgangssubstrats in α -KG ist mittels Fermentation bisher kaum möglich. Ein weiterer Nachteil der fermentativen Verfahren stellt der obligatorische Bedarf an weiteren Co-Substraten bzw. Nährstoffen dar, welche für Wachstum und Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen benötigt werden, jedoch nicht in das eigentliche Zielprodukt α -KG umgewandelt werden.

Die enzymatische Synthesemöglichkeit von α -KG mittels der GluDH aus *C. symbiosum* wurde durch Ödman und Mitarbeiter beschrieben [Ödman et al., 2004], ist unter ökonomischen Gesichtspunkten jedoch wenig attraktiv, da nur sehr niedrige Produktkonzentrationen von $0,7 \text{ g l}^{-1}$ erreicht werden können. Im Verlauf dieser Arbeit wurde in der Literatur über den Einsatz der isolierten L-Aminosäure Deaminase (L-AAD) aus *Proteus mirabilis* zur Produktion von α -KG aus L-Glu berichtet [Liu et al., 2013]. Die Verwendung einer L-AAD besitzt im Vergleich zur GluOX den Vorteil, dass während der Biotransformation kein Wasserstoffperoxid entsteht und es somit auch nicht zu einer Katalysatorinaktivierung oder einem Produktverlust führen kann, ebenfalls ist der Einsatz von Katalase als Hilfsenzym nicht nötig. Jedoch ist dieses System aufgrund einer deutlichen Produktinhibierung der Deaminase durch α -KG stark limitiert, es können lediglich niedrige Konzentrationen an L-Glu unvollständig mit schlechter Effizienz umgesetzt werden, was sich in der niedrigen Produktkonzentration von max. $1,5 \text{ g l}^{-1}$ zeigt [Liu et al., 2013].

Ein Vergleich der in dieser Arbeit entwickelten enzymatischen Verfahren zur Darstellung von α -KG aus L-Glu mit anderen publizierten biotechnologischen Produktionsverfahren von α -KG ist in Tabelle 74 wiedergegeben

Tabelle 74: Vergleich der in dieser Arbeit entwickelten enzymatischen Verfahren zur Darstellung von α -KG aus L-Glu mittels GluDH, GluOX und GPT mit publizierten biotechnologischen α -KG-Produktionsverfahren (¹ 50 mM, ² 100 mM).

Verfahren	Substrat	α -Ketoglutarat (g L ⁻¹)	RZA (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Referenz
Fermentation				
<i>Y. lipolytica</i> H222-27-11	n-Alkane	195	1,40	Weissbrodt et al., 1988
<i>T. glabrata</i> M202019	Glucose	37,7	0,52	Zhang et al., 2009
<i>Y. lipolytica</i> Mutant N1	Ethanol	49	0,34	Chernyavskaya et al., 2000
<i>Y. lipolytica</i> H222-27-11	Sonnenblumenöl	35	-	Aurich et al., 2000
<i>Y. lipolytica</i> H355	Rapsöl	120	0,44	Aurich und Stottmeister, 2006
<i>Y. lipolytica</i> H355	Glycerol	38	0,10	Aurich und Stottmeister, 2006
Biotransformation				
GluDH	L-Glu	0,7	0,04	Ödman et al., 2004
L-AAD	L-Glu	1,5	0,25	Liu et al., 2013
Verfahren dieser Arbeit				
GluDH	L-Glu ¹	22,7	0,95	Diese Arbeit
GPT	L-Glu ²	6,0	0,25	Diese Arbeit
GluOX	L-Glu ¹	69,3	1,36	Diese Arbeit

In dieser Arbeit konnte durch den Einsatz einer GluOX in der Biotransformation von L-Glu (500 mM) eine hohe Produktkonzentration von $69,3 \text{ g l}^{-1}$ sowie eine hervorragende Raum-Zeit-Ausbeute von $1,4 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erzielt werden. Im Vergleich zu den fermentativen Verfahren auf Grundlage von nachwachsenden Rohstoffen wie Ethanol oder Rapsöl liefert das GluOX-basierte Verfahren eine vergleichbar hohe Produktkonzentration verbunden mit der vollständigen Transformation des Ausgangssubstrats und einer hohen Substrat-bezogenen Ausbeute von annähernd 95 %. Die Biotransformation mittels GluOX benötigt weiterhin eine kürzere Reaktionszeit, so dass die Raum-Zeit-Ausbeute des Systems im Vergleich zu den fermentativen Verfahren durchschnittlich um den Faktor 3 höher ist. In der enzymatischen Biotransformation wird im Gegensatz zur Fermentation kein Ausgangssubstrat für Wachstum und Stoffwechselaktivität verbraucht und es entstehen als Nebenprodukte lediglich Wasser und Ammonium, wohingegen in der fermentativen Herstellung mittels *Y. lipolytica* durchaus hohe Konzentrationen verschiedener Nebenprodukte wie Pyruvat, Fumarat und Malat gebildet werden [Liu et al., 2007], was die Produktisolierung von α -KG deutlich erschwert. Im Vergleich zu den bisher in der Literatur beschriebenen enzymatischen Verfahren mittels GluDH und L-AAD ist die Raum-Zeit-Ausbeute mit dem GluOX System 34-fach (GluDH) und 5,4-fach (L-AAD) erhöht. Weiterhin ist die erreichte Endkonzentrationen an α -KG mit $69,3 \text{ g l}^{-1}$ um mehr als das 99- bzw. 46-fache höher [Ödman et al., 2004; Liu et al., 2013]. Ebenfalls ist auf Grundlage der erreichten Ergebnisse davon auszugehen, dass auch höhere Substratkonzentrationen, durchaus im molaren Bereich, eingesetzt und ebenfalls vollständig durch die GluOX umgesetzt werden können.

Auch wenn die Biotransformation von L-Glu (500 mM) unter Verwendung einer GluDH im Vergleich dazu deutlich schlechtere Ergebnisse liefert, ist die erzielte Raum-Zeit-Ausbeute im Vergleich zu dem publizierten Verfahren mit der GluDH aus *C. symbiosum* um das 23,7-fache, die erreichte Endkonzentrationen an α -KG sogar um das 32,4-fache höher [Ödman et al., 2004]. Aus der Reihe der in dieser Arbeit eingesetzten Enzyme liefert die GPT mit Abstand die schlechtesten Ergebnisse in der Biotransformation, jedoch ist die erzielte Raum-Zeit-Ausbeute im Vergleich zum Verfahren mit der GluDH aus *C. symbiosum* 6,2-fach erhöht, die erreichte Endkonzentrationen an α -KG von $6,0 \text{ g l}^{-1}$ ist 8,5-fach und im Vergleich zur L-Aminosäure Deaminase [Liu et al., 2013] 4-fach erhöht.

Somit erzielt selbst das im direkten Vergleich am wenigsten geeignete entwickelte Verfahren sowohl eine gleichwertige oder höhere Raum-Zeit-Ausbeute als auch eine höhere Produktendkonzentration als die bisher publizierten enzymatischen Verfahren.

Das neuentwickelte biotechnologische Verfahren unter Nutzung der GluOX ist aufgrund der hohen erreichten Produktausbeuten, den hohen Endkonzentrationen und den hervorragenden Raum-Zeit-Ausbeuten für einen industriellen Einsatz höchst interessant. Als nicht zu vernachlässigender Faktor muss hier der zugrunde liegende Aufwand für die Enzymproduktion und Bereitstellung genannt werden. Für die technische Anwendung wurden eine Hochzelldichtefermentation sowie ein Reinigungsprotokoll für das Enzym etabliert, so dass die kostengünstige Produktion sowie Bereitstellung von hochreinem Biokatalysator in größeren Chargen ohne großen Aufwand möglich ist. Auch wenn die GluOX in ihrer prozessierten Form eine deutlich höhere katalytische Aktivität, Substrataffinität und katalytische Effizienz aufweist, spricht unter den untersuchten Bedingungen der Biotransformation nichts zwingend für den bevorzugten Einsatz der prozessierten Form der GluOX, da hiermit zusätzliche Kosten für die Bereitstellung des Biokatalysators entstehen. Zum einen muss die Protease SGMP bzw. das Protease-Gemisch Pronase eingesetzt werden, zum anderen ist nach der Prozessierung eine weitere chromatographische Reinigung nötig, um die Protease abzutrennen und somit unerwünschte Nebenreaktionen z.B. mit der eingesetzten Katalase zu verhindern. In der Biotransformation können verschiedene Präparationen wie isolierte Enzyme, immobilisierte Enzyme sowie ganze Zellen erfolgreich als Katalysator eingesetzt werden. Die Verwendung von ganzen Zellen bietet hierbei den Vorteil, dass eine Isolierung des enzymatischen Biokatalysators entfällt.

Zusammenfassend scheint die Biotransformation von L-Glu unter Verwendung einer GluOX eine unter ökologischen und ökonomischen Gesichtspunkten höchst interessante neue Synthesealternative für α -KG darzustellen. Die Konkurrenzfähigkeit des entwickelten innovativen Verfahrens gegenüber den heute durchgeführten chemischen und biotechnologischen Prozessen ist langfristig absehbar.

2. Entwicklung eines enzymatischen NADP⁺-Regenerierungssystems

Für die pharmazeutische oder auch chemische Industrie stellen enantiomerenreine Stoffe, wie z.B. Aminosäuren oder Alkohole höchst interessante Synthesebausteine bzw. Ausgangsstoffe dar [Breuer et al., 2004; Stottmeister et al., 2005; Verseck et al., 2009]. Die hohe Selektivität, mit der Enzyme in der Lage sind, solche Stoffe zu produzieren, führte in den letzten Jahren zu einer verstärkten Forschung mit dem Ziel, etablierte chemische Prozesse durch den Einsatz von enzymatischen Biokatalysatoren zu ersetzen [Hollmann et al., 2011]. Enzyme, die nicht auf Cofaktoren angewiesen sind, besitzen natürlicherweise in der enzymatischen Synthese von Zielsubstanzen das größere Potential, da sie keine zusätzlichen Kosten für den Cofaktor bzw. ein Regenerierungssystem verursachen. Jedoch hat in den letzten Jahrzehnten die Bedeutung von Cofaktor-abhängigen Enzymen stark zugenommen, insbesondere NAD(H)- bzw. NADP(H)-abhängige Oxidoreduktasen, welche für ihre katalytische Aktivität entweder auf die reduzierten bzw. oxidierten Cofaktoren angewiesen sind, werden in einer wachsenden Anzahl an biotechnologischen Verfahren eingesetzt [Hummel und Kula, 1989; Devaux-Basseguy et al., 1997; Hummel, 1999; Stottmeister et al., 2005; Arterburn, 2001; Kroutil et al., 2004; Romano et al., 2012; Schrittwieser et al., 2011, 2014]. Da der Zusatz von stöchiometrischen Konzentrationen an Cofaktor in enzymatischen Syntheseverfahren mit sehr hohen Kosten verbunden ist, erscheint die *in situ*-Regenerierung von größter Wichtigkeit in Hinsicht auf eine ökonomische Reaktionsführung [Kragl et al., 1996; van der Donk, 2003; Riebel et al., 2003; Romano et al., 2012]. Durch die *in situ*-Regenerierung wird der Cofaktor durch eine gezielte Reaktion in seinen jeweiligen Ausgangszustand zurückgewandelt und steht somit dem eigentlichen Synthesenzym wieder zur Verfügung. Es findet neben der Synthesereaktion also eine weitere NAD(H)/NADP(H)-abhängige Reaktion in umgekehrter Richtung statt, welche die Redoxäquivalente erneut bereitstellt und somit den Einsatz von katalytischen Mengen an Cofaktor ermöglicht. Verschiedene Autoren haben sich mit den Möglichkeiten zur Regenerierung der Nicotinamid-Cofaktoren beschäftigt und es sind zahlreiche Review-Artikel zu diesem Thema erschienen [Weckbecker et al., 2010; Zhao und van der Donk, 2003; van der Donk und Zhao, 2003; Woodyer et al., 2003; Liu und Wang, 2007; Wichmann und Vasic-Racki, 2005; Uppada et al., 2014]. Nach dem heutigen Stand der Technik stehen photochemische, elektrochemische, chemische, elektroenzymatische und enzymatische Methoden der Cofaktorregenerierung zur Verfügung, wobei die enzymatische Cofaktorregenerierung eindeutig die am häufigsten eingesetzte Methode ist.

Für die enzymatische Regenerierung der reduzierten Cofaktoren NADH und NADPH ist eine Vielzahl an etablierten und gut untersuchten Systemen in der Fachliteratur beschrieben [Hollmann et al., 2006; Weckbecker et al., 2010; Zhao und van der Donk, 2003; Uppada et al., 2014], wobei einige dieser Systeme heute auch erfolgreich im industriellen Maßstab durchgeführt werden. Im Gegensatz hierzu existieren jedoch kaum funktionelle enzymatische Regenerierungssysteme für die oxidierten Cofaktoren [Woodyer et al., 2003], wobei nach dem heutigen Stand der Technik insbesondere die effiziente und ökonomische Regenerierung von NADP^+ eine große Herausforderung darstellt.

Die Regenerierung von Nicotinamid-Cofaktoren kann ebenfalls *in vivo* mittels ganzer Zellen erfolgen, zahlreiche Beispiele für Ganzzellbiokatalysatoren mit zellinterner Regenerierung von NADH, NADPH sowie NAD^+ sind in der Literatur aufgeführt [Weckbecker et al., 2010; Wichmann und Vasic-Racki, 2005; Xiao et al., 2010]. Bis heute ist jedoch kein Ganzzellbiokatalysator mit zellinterner Regeneration von NADP^+ konstruiert und beschrieben worden, obwohl für ein solches System eine breite Anwendung in Kombination mit NADP^+ -abhängigen Oxidoreduktasen vorstellbar ist.

In den letzten Jahren wurden verstärkt NADP^+ -abhängige Enzyme, die ein biotechnologisches Potential besitzen, Methoden der gerichteten Evolution und des rationalen Proteindesigns unterzogen, um die Cofaktorabhängigkeit der Enzyme von NADP^+ zu NAD^+ hin zu verändern [Lerchner et al., 2013; Schulz, 2008; Pick et al., 2014]. Eine elegantere Lösung stellt die gezielte Veränderung eines enzymatischen Systems zur Regenerierung von NAD^+ dar, um ebenfalls eine Akzeptanz von NADPH in der Regenerierungsreaktion zu ermöglichen. Ein System zur Cofaktorregenerierung beider oxidierten Cofaktoren ist mit NAD^+ - und NADP^+ -abhängigen Enzymen frei kombinierbar.

Ein gut geeignetes Enzym zur Regenerierung von NAD^+ stellt die NADH-Oxidase (NOX) dar. NOXs katalysieren die irreversible Oxidation von NADH zu NAD^+ unter gleichzeitiger Reduktion von molekularem Sauerstoff und wurden bisher vielfach erfolgreich als isolierte Enzyme für die Cofaktorregenerierung in Kombination mit NAD^+ -abhängigen Dehydrogenasen eingesetzt [Hugenholtz et al., 2000; Geueke et al., 2003; Riebel et al., 2003; Findrik et al., 2007], weiterhin sind sie erfolgreich für die Konstruktion von Ganzzellbiokatalysatoren mit zellinterner NAD^+ -Regenerierung genutzt worden [Felipe et al., 1998; Hugenholtz et al., 2000; Xiao et al., 2010]

2.1 „Protein Engineering“ der NOX aus *L. brevis*

Die FAD-abhängige NOX aus *L. brevis* (DSM 20587) wurde erstmals durch Hummel und Riebel im Jahre 2003 beschrieben und biochemisch näher charakterisiert. Das Enzym ist hoch spezifisch für NADH und weist keine NADPH-Oxidase Nebenaktivität auf [Hummel und Riebel, 2003; Geueke et al., 2003]. Das Enzym besitzt eine der höchsten bisher beschriebenen NOX Aktivitäten sowie eine hohe Affinität gegenüber NADH. Des Weiteren konnte die Struktur aufgeklärt werden [Kuzu, 2005; Kuzu et al., 2005]. Die *L. brevis* NOX wurde bereits erfolgreich für die Regenerierung von NAD^+ genutzt [Geueke et al., 2003; Riebel et al., 2003; Findrik et al. 2007; Xiao et al., 2010]. Aufgrund der absoluten Spezifität für NADH [Hummel und Riebel, 2003, Geueke et al., 2003] konnte das Enzym bisher jedoch nicht für die Regenerierung von NADP^+ eingesetzt werden.

Um ein geeignetes enzymatisches Regenerierungssystem für NADP^+ zu entwickeln und um Zusammenhänge von Struktur und Funktion der NOX aus *L. brevis* aufzuklären, war es ein wesentliches Ziel dieser Arbeit, mittels Methoden des rationalen Proteindesigns sowie der gerichteten Evolution die Substratspezifität der NOX zu verändern, um die Oxidation von NADPH zu ermöglichen. Ein Nebenaspekt bei der gerichteten Evolution war die Erhöhung der pH-Stabilität im eher basischen pH-Bereich. Die in der vorliegenden Arbeit erzeugten NAD(P)H-Oxidasen sollten als Anwendungsbeispiel zur *in situ*-Cofaktorregenerierung von NADP^+ (und NAD^+) als isolierte Enzyme in Verbindung mit verschiedenen Alkohol-Dehydrogenasen, die ein hohes biotechnologisches Potential besitzen, in der Synthese von enantiomerenreinen Alkoholen eingesetzt werden. Ebenfalls war die Entwicklung eines Ganzzellbiokatalysators mit zellinterner enzymatischer NADP^+ -Regenerierung von größerer Bedeutung, da ein solches System bis heute noch nicht realisiert und beschrieben wurde, obwohl eine breite Anwendung in Kombination mit NADP^+ abhängigen Enzymen vorstellbar ist.

2.1.1 Gerichtete Evolution der NOX aus *L. brevis*

Durch die Methode der gerichteten Evolution [Cadwell und Joyce, 1992] sollte die Oxidation von NADPH durch die NOX aus *L. brevis* ermöglicht werden. Ein Nebenaspekt war die Erhöhung der pH-Stabilität im eher basischen pH Bereich, da das Wildtyp-Enzym bei einem basischen pH-Wert von 9,0 bereits in einem Zeitraum von 4 h zu über 90 % inaktiviert wird.

Zunächst wurden die Kultivierungsparameter in Mikrotiterplatten optimiert und geeignete Protokolle für die Untersuchung im 96-Well-Platten-Maßstab entwickelt. Als Methode zur gerichteten Evolution wurde die „random mutagenese“ mittels epPCR angewandt.

Insgesamt wurden ca. 4000 Mutanten bzw. Enzymvarianten in Mikrotiterplatten auf Aktivität für das Substrat NADPH sowie eine erhöhte Stabilität im eher basischen pH Bereich von 9,0 untersucht. Zusammenfassend zeigte sich, dass keine der hergestellten NOX-Mutanten eine Aktivität gegenüber NADPH besitzt. Ca. 68 % der untersuchten Klone zeigten noch Aktivität in der Oxidation von NADH, ca. 32 % waren durch die eingeführten Mutationen inaktiv bzw. es war keine Aktivität im Rohextrakt nachweisbar. Innerhalb der angelegten Mutantenbibliothek konnte keine NOX-Variante identifiziert werden, die im Vergleich zum Wildtyp-Enzym eine höhere Restaktivität und damit auch eine höhere Stabilität bei einem eher basischen pH-Wert von 9,0 besitzt.

2.1.2 Rationales Proteindesign der NOX aus *L. brevis*

2.1.2.1 Die NADH-Spezifität der NOX aus *L. brevis*

NADH-Oxidasen gehören zu der Klasse der FAD-abhängigen Pyridin-Nucleotid-Disulfid Oxidoreduktasen (PNDOR) [Dym und Eisenberg, 2001; Argyrou und Blanchard, 2004]. Die Unterscheidung von NAD(H)- und NADP(H)-abhängigen PNDORs zwischen den beiden Pyridin-Nucleotid-Cofaktoren ist ein interessantes Phänomen, die meisten der heute bekannten PNDORs weisen eine hohe Spezifität für einen der beiden Cofaktoren auf. NADP(H) unterscheidet sich strukturell von NAD(H) lediglich durch das Vorhandensein einer zusätzlichen Phosphat-Gruppe in der 2'-Position des Ribose-Rings vom Adenosinteil des Cofaktors. Auch wenn die strukturelle Ähnlichkeit von NAD(H) und NADP(H) sehr hoch ist, sind die Interaktionen, die sie mit PNDORs eingehen, als sehr unterschiedlich beschrieben, hierbei sind die Enzym-NADP(H) Wechselwirkungen komplexer und differenzierter als die mit NAD(H) [Scrutton et al., 1990].

In den letzten Jahrzehnten wurde zahlreiche Mutagenesestudien mit PNDORs durchgeführt, um die Cofaktorabhängigkeit der jeweiligen Enzyme gezielt zu verändern und um Informationen über die strukturelle Basis der Cofaktorspezifität bzw. die Unterscheidung und Bindung von NAD(H) und NADP(H) zu erlangen. Diese Studien lieferten teilweise vielversprechende Ergebnisse und die Cofaktorspezifität einiger Enzyme konnte von einer Coenzym-Spezies hin zur anderen geändert werden. Dieser

Cofaktor-„Switch“ war mit signifikanten Veränderungen in Hinsicht auf die Aktivität und Affinität gegenüber NAD(H) bzw. NADP(H) [Mittl et al., 1993; Perham et al., 1991; Mittl et al., 1994; Scrutton et al., 1990] verbunden. Heute sind Sequenz- und Strukturinformationen für PNDORs in größerem Umfang verfügbar und standen somit für eine Analyse und einen Vergleich zur Verfügung.

Durch den Vergleich der Aminosäuresequenz der NOX aus *L. brevis* mit anderen NAD(H), NADP(H)- und NAD(P)(H)-abhängigen PNDORs gelang die Identifizierung von drei Sequenzmotiven, die innerhalb der Primärstruktur von PNDORs hoch konserviert sind [Dym und Eisenberg, 2001; Ojha et al., 2007]. Zwei dieser Sequenzmotive sind für die Bindung des Cofaktors FAD verantwortlich (Motiv 1 und 3, Aminosäuren 7-13 und 269-280), während das dritte an der Bindung des Pyridin-Nucleotid-Cofaktors beteiligt ist (Motiv 2, Aminosäuren 150-185) und welches in NAD(H)-spezifischen Vertretern der PNDORs das hoch-konservierte GXGXXG „fingerprint“ NAD(H)-Bindemotiv aufweist (GAGYIG, Aminosäuren 154-159). In den NADP(H)-spezifischen PNDORs ist das dritte Gly des GXGXXG Motivs typischerweise durch Ala oder in weniger Fällen durch Ser substituiert [Wallen et al., 2008; Scrutton et al., 1990], dieser Austausch ist innerhalb der PNDORs hoch, aber nicht absolut konserviert. Dem Gly-reichen „fingerprint“ Motiv folgt in der Primärstruktur der *L. brevis* NOX C-terminal die hoch konservierte, negativ geladene Aminosäure Asp177 (GAGYIG₁₈D, Aminosäuren 154-177), welche einen wichtigen Faktor für die Bindung und Stabilisierung von NAD(H) darstellt. In NADH-spezifischen PNDORs wird diese negativ geladene Aminosäureposition aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen sowie der räumlichen Anordnung weiterhin maßgeblich für das Verhindern der NADP(H)-Bindung verantwortlich gemacht [Wallen et al., 2008; Scrutton et al., 1990; Perham et al., 1991]. Das Vorkommen einer basischen und positiv geladenen Aminosäure wie Arg oder His an oder benachbart zu dieser Position ist typisch für NADP(H)-abhängige Enzyme [Wallen et al., 2008; Scrutton et al., 1990]. Die positive Ladung an dieser Position ist von größter Bedeutung in Hinsicht auf die Bindung von NADP(H), da sie Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Phosphat-Gruppe eingeht und so der Stabilisierung der NADP(H)-Bindung beiträgt.

Für die Aufklärung von Struktur-Funktionsbeziehungen als Grundlage für die Durchführung der gezielten Mutagenese wurde die Struktur der NOX aus *L. brevis* [Kuzu et al., 2005; Niefind, persönliche Mitteilung] visualisiert und analysiert, die Position des Substrates NADH modelliert sowie die Interaktionen mit dem Enzym bestimmt.

Durch die Analyse der Struktur konnten detaillierte Informationen bezüglich der Substratbindung und der NADH-Spezifität erlangt werden. Das Monomer der NOX (Abb. 102) zeigt den für PNDORs typischen strukturellen Aufbau mit einer FAD-Bindedomäne, einer NADH-Bindedomäne, einer Dimerisierungsdomäne und der zwischen den Domänen liegenden katalytischen Spalte. Es besitzt eine konische Form und besteht aus 29 β -Faltblättern und 11 α -Helices. Die Strukturelemente bilden im Zentrum der NOX einen Tunnel, welcher die katalytische Aminosäure Cys42 sowie den Cofaktor FAD enthält und in dem das Substrat NADH gebunden wird [Kuzu, 2005].



Abbildung 102: Monomer der NOX aus *L. brevis* mit FAD und NAD (Auflösung 3,5 Å).

Die Strukturanalyse zeigt, dass die NADH-Bindedomäne die klassische „Rossmann fold“-Struktur [Eventoff und Rossmann, 1976] einer alternierenden Abfolge von β -Faltblättern und α -Helices ($\beta\alpha\beta\alpha\beta$) aufweist. Wie typisch für NAD(H)-spezifische PNDORs [Bellamacina, 1996], befindet sich am C-terminalen Ende des ersten β -Faltblattes das hochkonservierte Gly-reiche GXGXXG „fingerprint“ Sequenzmotiv (GAGYIG, Aminosäuren 154-177). Der Cofaktor bzw. das Substrat NADH wird in einer Spalte der NADH-Bindedomäne gebunden und ist mit dem Nicotinamid-Teil in Richtung FAD ausgerichtet. Wie in Abbildung 103 dargestellt, wird das NADH mit insgesamt 10 Wasserstoffbrücken, sowohl mit der Proteinhauptkette als auch mit Seitenketten, an die Bindedomäne gebunden. Drei Wasserstoffbrückenbindungen, in denen die

Proteinhauptkette involviert ist, werden zwischen Tyr157-N, Ile158-N und Gly241-N und der Pyrophosphatbrücke von NADH ausgebildet, zusätzlich findet eine Stabilisierung durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Seitenkette von Tyr186 statt. Die effektive Bindung der 2'- und 3'-Hydroxyl-Gruppen des Adenin-Ribose-Rings von NADH erfolgt durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den Sauerstoffatomen der Carboxyl-Gruppe von Asp177. Weiterhin wird die Bindung des Cofaktors in der Komplexstruktur durch drei Wasserstoffbrücken zwischen der Proteinhauptkette (Ala178, Gly326 sowie Pro295) und dem Adenosin- bzw. Nicotinamid-Teil von NADH stabilisiert.

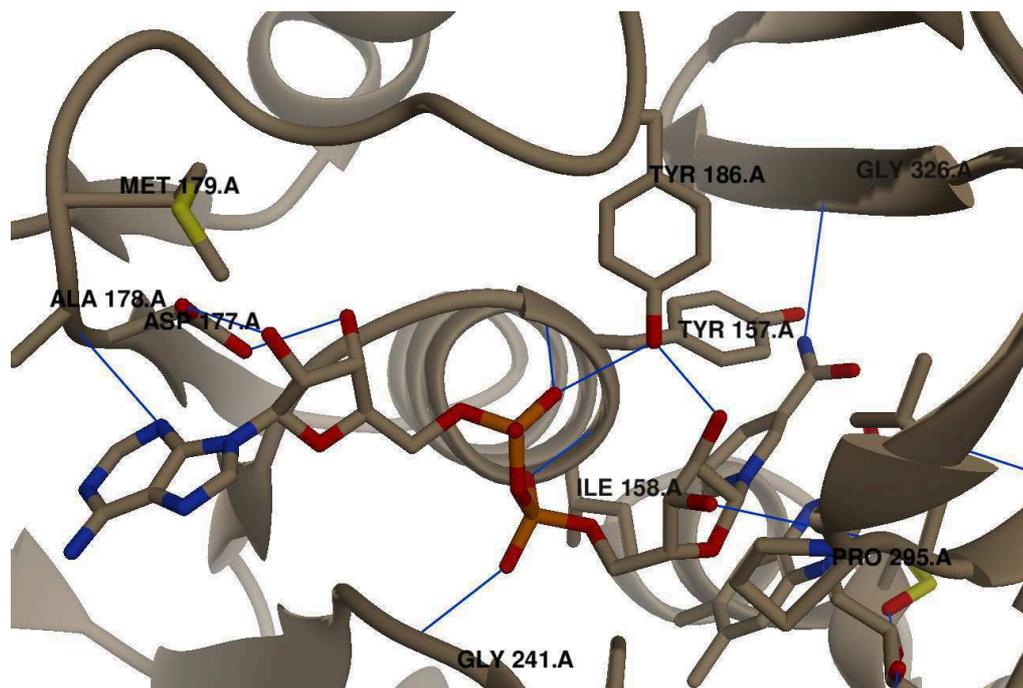


Abbildung 103: A: Bindungsstelle von NADH in der Struktur der NOX aus *L. brevis*, NADH modelliert aus der Struktur der NPOX aus *S. faecalis* (pdb. 2NPOX). Wasserstoffbrückenbindungen wurden mit dem Programm Chimera berechnet und sind als blaue Linien dargestellt. Für Tyr159 ist ein alternativer Rotamer dargestellt.

Das negativ geladene Asp an Position 177, welches für die strikte NADH-Spezifität sowie die Diskriminierung der NADPH-Bindung verantwortlich ist, befindet sich am C-terminalen Ende vom zweiten β -Faltblatt des $\beta\alpha\beta\alpha$ Motivs. An dieser Position der NADH-Bindungsregion ist Asp177 in der Lage, die Bindung von NADPH zu beeinflussen, sowohl aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen als auch durch sterische Behinderung der zusätzlichen Phosphat-Gruppe. Weiterhin ist zu vermuten, dass M179 ebenfalls an der sterischen Behinderung der NADPH-Bindung beteiligt ist.

In der Cofaktorbindestelle befindet sich keine positiv geladene Aminosäure in der Nähe von Asp177 bzw. der 2'-Position des Ribose-Rings vom Adenosinteil des Cofaktors, welche in NADPH durch die zusätzliche Phosphat-Gruppe substituiert ist. Das Vorkommen von Arg oder seltener auch His ist typisch für die Vertreter der PNDORs, die in der Lage sind NADP(H) als Cofaktor zu nutzen. Die positive Ladung an dieser Position ist von größter Bedeutung in Hinsicht auf die NADP(H)-Bindung, da sie Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Phosphat-Gruppe eingeht und so zur NADP(H)-Stabilisierung beiträgt [Pai et al., 1988; Mallett et al., 2006; Scrutton 1990].

Durch die Strukturanalyse der Wildtyp-NOX sowie den Struktur- und Sequenzvergleich mit anderen NADH- bzw. NAD(P)H-Oxidasen sowie NAD(H)-, NADP(H)- und NAD(P)(H)-abhängigen Pyridin-Nucleotid-Disulfid Oxidoreduktasen (PNDOR), konnten die Aminosäurepositionen G159, D177 und M179 identifiziert werden, die potentiell für die strikte NADH-Spezifität und die Diskriminierung der NADPH-Bindung in der NOX aus *L. brevis* verantwortlich sind.

Die Erweiterung des Substratspektrums erfolgte durch den gezielten Austausch der identifizierten Positionen durch Aminosäuren, welche sich sowohl in Größe, Hydrophobizität als auch Ladung deutlich von den natürlich vorkommenden unterscheiden. Gly159Ala und Gly159Ser Mutationen wurden eingeführt, da in den NADP(H)-spezifischen PNDORs das dritte Gly des GXGXXG Motivs typischerweise durch Ala oder in wenigen Fällen durch Ser substituiert ist [Wallen et al., 2008; Scrutton et al., 1990]. Um sowohl elektrostatische Wechselwirkungen als auch eine sterische Behinderung der zusätzlichen Phosphat-Gruppe von NADPH auszuschließen, wurde die negativ geladene und sperrige Aminosäure Asp177 gegen das kleine und neutrale Ala ausgetauscht. Die Aminosäure Gly an Position 178 wurde eingeführt, da zu erwarten war, dass sie aufgrund der kleinen und flexiblen Struktur die Flexibilität der NADH-Bindestelle erweitern würde. Da auch Met179 an einer sterischen Behinderung der NADPH-Bindung beteiligt sein könnte und sich in der Cofaktorbindestelle keine positiv geladene Aminosäure in der Nähe von Asp177 befindet, was typisch ist für NADP(H)-abhängige Enzyme [Wallen et al., 2008; Scrutton et al., 1990], wurde das Met an Position 179 gegen Arg und His ausgetauscht.

2.1.2.2 Herstellung, heterologe Expression und Reinigung der NOX-Mutanten

Um die Aminosäurepositionen gezielt gegen andere Aminosäuren auszutauschen wurde die Methode der Quick Change PCR angewandt [Kunkel, 1985]. Folgende Einfach-, Doppel- und Mehrfachmutanten wurden im Verlauf der Arbeiten hergestellt: G159A, D177A, A178G, M179H, A178G/M179H, D177A/M179H, D177R/M179H, G159A/D177A/M179H, G159A/A178G/M179H, D177A/A178G/M179H, G159A/D177A/A178G/M179H, G159S/D177R/A178G/M179H und G159S/D177A/A178G/M179H.

Nach Transformation und heterologen Expression der *nox*-Gene in *E. coli* BL21(DE3) zeigte es sich, dass die hergestellten Mutanten, mit Ausnahme von D177R/M179H und G159S/D177R/A178G/M179H, erfolgreich und in hohem Maße rekombinant in *E. coli* BL21(DE3) produziert werden konnten. Für die Mutanten D177R/M179H und G159S/D177R/A178G/M179H konnte im Zellrohextrakt nach Ultraschall-Aufschluss keine Aktivität nachgewiesen werden. Eine Kontrolle mittels SDS-PAGE zeigte, dass diese beiden Mutanten als nicht lösliches Enzym gebildet werden und in Form von „Inclusion Bodies“ vorlagen. Eine Variation der Expressionsbedingungen sowie die Co-Expression des Chaperonsystems groES-groEL (Takara Chaperone Kit, Vektor pGro7) führte nicht zur Bildung von löslichem Enzym. Anscheinend besitzt die D177R Mutation einen negativen Einfluss auf die Faltung bzw. den Faltungsprozess der NOX. Da sich in den hergestellten Mutanten D177R/M179H und G159S/D177R/A178G/M179H mit Arg177 und His179 zwei stark positiv geladene Aminosäureseitenketten in direkter Nachbarschaft befinden, ist ein elektrostatischer Abstoßungseffekt durchaus vorstellbar, welcher die funktionelle und korrekte Faltung der NOX verhindert.

Da aus der Literatur und den vorangegangenen Arbeiten mit dem Wildtyp-Enzym bekannt war, dass die zellinterne FAD-Konzentration von *E. coli* BL21(DE3) bei einer starken Überexpression der NOX nicht ausreicht um das Enzym vollständig mit Cofaktor abzusättigen, wurden Experimente zur *in vitro* Aktivierung durch externes FAD durchgeführt. Der Vergleich der spezifischen Aktivitäten vor und nach der Inkubation mit FAD zeigte für alle rekombinanten Enzyme eine deutliche Steigerung durch die Inkubation mit FAD auf. Offensichtlich wird inaktives Apo-Enzym gebildet, welches sich jedoch *in vitro* durch Inkubation mit FAD in das Holo-Enzym überführen und damit aktivieren lässt. Die spezifische Aktivität der Wildtyp-NOX im *E. coli* Rohextrakt wurde durch die Zugabe von 150 μM FAD von 79,3 U mg^{-1} um das 1,6-fache auf 128 U mg^{-1} erhöht.

Eine weitere Steigerung der Aktivität wurde auch bei einer erhöhten FAD Konzentrationen nicht beobachtet, das Enzym konnte demzufolge mit 150 μ M FAD vollständig abgesättigt werden. Analog zum Wildtyp-Enzym konnte bei keiner der Mutanten eine weitere Enzymaktivierung bei erhöhten FAD Konzentrationen von > 150 μ M beobachtet werden. In der nachfolgenden Abbildung 104 ist die *in vitro* Aktivierung der Wildtyp-NOX und der verschiedenen Mutanten durch externes FAD dargestellt.

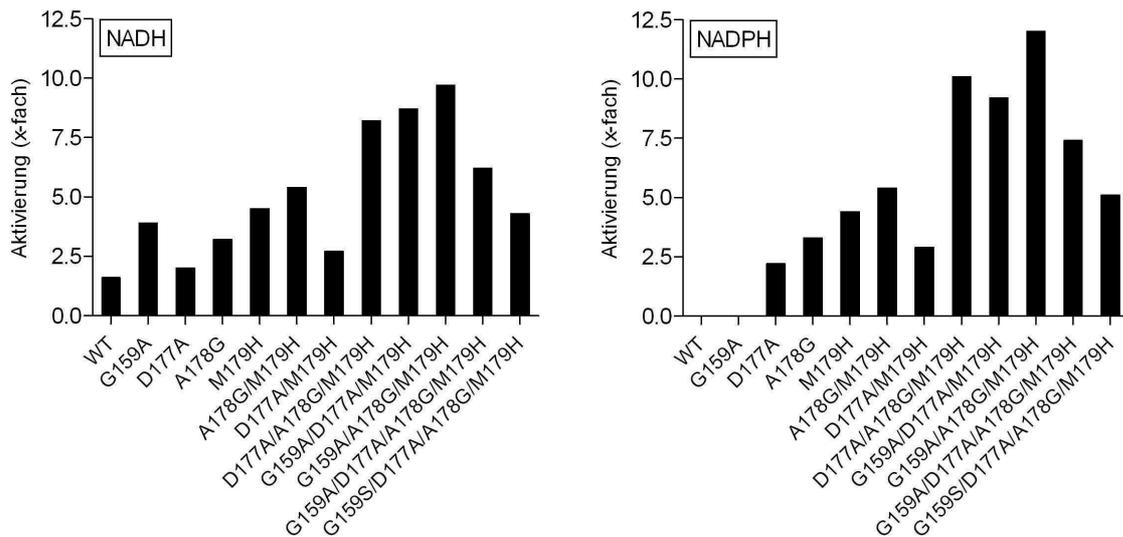


Abbildung 104: *In vitro* Aktivierung der Wildtyp-NOX und der hergestellten Mutanten durch extern zugefügtes FAD (150 μ M), (Aktivitätsassay: 0,2 mM NADH bzw. NADPH, 50 mM Kpi Puffer pH 6,0, 30°C).

Interessanterweise unterscheiden sich die mittels rationalem Proteindesign hergestellten Mutanten deutlich hinsichtlich der Aktivierung, sowohl im Vergleich zum Wildtyp wie auch untereinander. So konnte die Aktivität der Mutante M179H durch die Inkubation mit 150 μ M FAD um den Faktor 4,5 *in vitro* erhöht werden. Die Aktivierung der Mutante G159A/A178G/M179H hingegen war deutlich ausgeprägter, so wurde die spezifische Aktivität nahezu um den Faktor 10 erhöht, was einer im Vergleich zum Wildtyp-Enzym um den Faktor 6 höheren *in vitro* Enzymaktivierung entspricht. Offensichtlich werden die Mutanten in *E. coli* BL21(DE3) in unterschiedlichem Maße als inaktives Apo-Enzym gebildet. Dieses Phänomen lässt vermuten, dass die im Verlauf des rationalen Proteindesigns mutierten Aminosäurepositionen neben ihrer Aufgabe in der NADH- bzw. NADPH-Bindung ebenfalls einen Einfluss auf die Fähigkeit der NOX besitzen, in *E. coli* BL21(DE3) FAD zu binden. Da FAD nicht-kovalent gebunden vorliegt, könnte die Affinität

der Bindetasche durch die Mutationen beeinflusst worden sein, so dass die Mutanten das in der Zelle vorhandene FAD unterschiedlich gut binden können. Bekannt ist, dass in verschiedenen Oxidasen das FAD unterschiedlich stark gebunden wird. So muss man bei der chromatographischen Reinigung der NADH-Oxidase aus *Thermus thermophilus* der mobilen Phase FAD zusetzen, um ein „Ausbluten“ des Enzyms bezüglich des Cofaktors zu verhindern. Bei der Untersuchung der Einzelmутanten zeigten die Aminosäureaustausche G159A und M179H den größten Einfluss auf die *in vitro* Aktivierung und somit die Apo-Enzym Bildung. Während bei den erstellten Doppelmутanten keine deutliche Steigerung der Aktivierung festzustellen war, zeigten die Dreifachmutanten einen signifikanten Anstieg. Interessanterweise führt die Kombination aller Mutationen in den Vierfachmutanten wiederum zu einem Abfall der *in vitro* Aktivierung, so liegt die Aktivierung der Mutante G159S/D177R/A178G/M179H durchaus auf dem Level der Einzelmутanten. Um diesen Aspekt näher zu untersuchen, müssten die Mutanten in weiter führenden Arbeiten jeweils auf ihren FAD-Gehalt hin untersucht werden.

Durch die Fusionierung mit einem N-terminalen His-Tag ließen sich die rekombinanten Mutanten sowie das Wildtyp-Enzym nach der *in vitro* Aktivierung durch extern zugesetztes FAD in nur einem Chromatographieschritt unter Verwendung von Ni-NTA nahezu bis zur vollständigen Homogenität aufreinigen, der Reinheitsgrad der Enzyme war in allen Fällen > 98 %. Im Vergleich zu den etablierten Methoden zur Reinigung der NOX aus *L. brevis* stellt das in dieser Arbeit entwickelte einstufige Reinigungsprotokoll mittels Metallaffinitätschromatographie eine signifikante Verbesserung dar. Bisher wurde die NOX entweder durch ein dreistufiges oder ein vierstufiges Reinigungsprotokoll präpariert, welche unter anderem Chromatographieschritte an Q-Sepharose, Phenyl-Sepharose, Hydroxyapatit sowie Superdex 200 PG beinhalteten [Hummel und Riebel, 2003; Kuzu et al., 2005]. Unter Verwendung des dreistufigen Reinigungsprotokolls konnte die NOX mit einer Ausbeute von 41 % bis zur Homogenität aufgereinigt werden (spezifische Aktivität 350 U mg^{-1} , v_{\max} 194 U mg^{-1}) [Kuzu, 2005]. Unter Verwendung des vierstufigen Reinigungsprotokolls wurden im Vergleich hierzu deutlich schlechtere Ergebnisse erzielt, so betrug die Ausbeute lediglich 14 % bei einer spezifischen Aktivität des nicht vollständig homogenen Enzyms von 116 U mg^{-1} [Hummel und Riebel, 2003]. Das im Verlauf dieser Arbeit entwickelte Reinigungsprotokoll erlaubt die einstufige Reinigung der Wildtyp-NOX mit einer deutlichen höheren Ausbeute von 85 %, das homogene Enzym weist eine spezifische Aktivität von 285 U mg^{-1} auf. Ebenfalls wurde, im Vergleich zu dem in dieser

Arbeit entwickelten Reinigungsprotokoll, bei einem der bisher eingesetzten Verfahren ein wiederholtes Auswaschen des Cofaktors FAD im Verlauf der unterschiedlichen Reinigungsschritte beobachtet und beschrieben [Kuzu, 2005].

Im Folgenden werden die wichtigsten Aspekte der neuen NAD(P)H-Oxidasen diskutiert, die im Rahmen dieser Arbeit teilweise hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften und ihres Anwendungspotentials untersucht wurden.

2.1.2.3 Biochemische Charakterisierung der NOX-Mutanten aus dem rationalen Proteindesign

Für die Charakterisierung der Wildtyp-NOX aus *L. brevis* sowie der hergestellten Mutanten wurden zunächst die kinetischen Parameter gegenüber den Substraten NADH und NADPH bestimmt. Im untersuchten Konzentrationsbereich konnte bei keinem der untersuchten Enzyme eine Substratüberschussinhibierung beobachtet werden. Die nicht-lineare Regression der Messwerte der **Wildtyp-NOX** ergab für NADH einen v_{\max} von $347,5 \text{ U mg}^{-1}$ und einen K_M -Wert von $0,039 \text{ mM}$. Der k_{cat} -Wert, auch als Wechselzahl des Enzyms bezeichnet, beträgt $288,2 \text{ s}^{-1}$, was einer katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M von $7,4 \text{ }\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ entspricht. Wie erwartet und in der Literatur aufgeführt [Hummel, 2003; Geueke, 2002], zeigt die Wildtyp-NOX aus *L. brevis* eine eindeutige Spezifität für NADH, NADPH wird nicht als Substrat akzeptiert (bis $0,5 \text{ mM}$ untersucht).

Einzelmutationen

Im Vergleich zum Wildtyp-Enzym zeigen die meisten der hergestellten Mutanten gegenüber NADH erhöhte K_M -Werte und somit eine herabgesetzte Affinität, wobei die Werte für die verschiedenen Mutanten deutlich variieren. Überraschenderweise weist jedoch die Einzelmutante **A178G** mit einem K_M -Wert von $0,017 \text{ mM}$ eine im Vergleich zum Wildtyp-Enzym deutlich höhere Affinität gegenüber NADH auf. Der k_{cat} -Wert der Mutante A178G für NADH beträgt $186,6 \text{ s}^{-1}$, was einem k_{cat}/K_M -Wert von $11,1 \text{ }\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ entspricht. Auch wenn die A178G Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Enzym einen niedrigeren k_{cat} -Wert für NADH aufweist, wird durch den niedrigeren K_M -Wert die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M um den Faktor 1,5 erhöht. Weiterhin zeigt die A178G Mutante Aktivität in der Oxidation von NADPH, allerdings beträgt der v_{\max} nur $7,5 \%$ des v_{\max} -Wertes mit NADH. Ebenfalls ist die Affinität gegenüber NADPH mit einem K_M -Wert von $0,533 \text{ mM}$ relativ niedrig. Der k_{cat} für NADPH beträgt $14,2 \text{ s}^{-1}$ mit einem k_{cat}/K_M -Wert von $0,027 \text{ }\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Im Gegensatz zur A178G Mutation führt der Austausch **G159A** zu einer signifikant verschlechterten Affinität gegenüber NADH, so wird der K_M -Wert im Vergleich zum Wildtyp Enzym um das 6-fache auf 0,235 mM erhöht. Weiterhin zeigt die G159A Mutante eine deutlich verringerte katalytische Aktivität gegenüber NADH, so beträgt der k_{cat} mit $25,4 \text{ s}^{-1}$ lediglich 8,8 % des k_{cat} -Wertes der Wildtyp-NOX mit NADH. Zusammen führt dies zu einer katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M von $0,108 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, was lediglich 1,5 % der Ausgangseffizienz des Wildtyp-Enzyms darstellt. Eine NADPH-Oxidase Aktivität konnte für die G159A Mutante nicht nachgewiesen werden.

Die Einzelmutante **D177A** zeigt Aktivität sowohl in der Oxidation von NADH als auch NADPH. Im Falle von NADH beträgt der K_M -Wert 0,054 mM, was im Vergleich zum Wildtyp-Enzym eine leichte Erhöhung darstellt. Weiterhin sind sowohl der k_{cat} -Wert für NADH ($41,6 \text{ s}^{-1}$) als auch k_{cat}/K_M ($0,8 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) deutlich erniedrigt. Im Vergleich zum Wildtyp ist die Einzelmutante D177A jedoch in der Lage, NADPH als Substrat in der Oxidation zu akzeptieren. K_M und k_{cat} für NADPH betragen 0,088 mM und $81,6 \text{ s}^{-1}$, mit einem k_{cat}/K_M -Wert von $0,927 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Der Effekt, der durch den Austausch von **M179H** hervorgerufen wurde, war ein drastischer Abfall des k_{cat} -Wertes für NADH auf $59,5 \text{ s}^{-1}$, einen Wert, der nahezu 5-fach niedriger ist als der k_{cat} des Wildtyp-Enzyms. Die eingeführte Mutation verändert den K_M -Wert für NADH (0,039 mM) nicht, somit ergibt sich ein k_{cat}/K_M von $1,5 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, im Vergleich zur Wildtyp-NOX ebenfalls nahezu 5-fach erniedrigt. Der Austausch M179H ermöglicht die Oxidation von NADPH, der K_M für NADPH beträgt 0,061 mM, der k_{cat} $30,7 \text{ s}^{-1}$. Daraus resultiert eine katalytische Effizienz k_{cat}/K_M von $0,5 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Mehrfach-Mutationen

Die Kombination der beiden Mutationen an den Positionen 177 und 179 führte zur hoch aktiven Doppelmutante **D177A/M179H**. Im Vergleich zur Ausgangsmutante M179H, zeigt die Oxidase D177A/M179H für NADPH einen drastischen Abfall des K_M -Wertes um das nahezu 3,5-fache, kombiniert mit einem nahezu 2,6-fachen Anstieg des k_{cat} -Wertes. Für die D177A/M179H Mutante beträgt der K_M für NADPH 0,017 mM, was den niedrigsten K_M -Wert der verschiedenen Enzymvarianten darstellt. Die Affinität der Mutante gegenüber dem unnatürlichen Substrat NADPH ist interessanterweise deutlich höher als die der Wildtyp-NOX gegenüber dem natürlichen Substrat NADH. Weiterhin sind sowohl der k_{cat} -Wert für NADPH ($81,8 \text{ s}^{-1}$) als auch k_{cat}/K_M ($4,7 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) im Vergleich zu den anderen Mutanten deutlich erhöht.

Die D177A/M179H Mutante weist einen, im Vergleich zum Wildtyp-Enzym, erhöhten K_M -Wert von 0,058 mM für NADH auf, der k_{cat} beträgt $92,6 \text{ s}^{-1}$ mit einer katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M von $1,6 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Auch wenn die D177A/M179H Mutante aufgrund des nahezu 3-fach niedrigeren K_M -Wertes eine erhöhte Affinität gegenüber NADPH aufweist, ist diese Mutante in der Lage, beide Cofaktoren bzw. Substrate effizient zu oxidieren. Die katalytische Effizienz mit NADH beträgt 22,1 % der Ausgangeffizienz der Wildtyp-NOX, mit NADPH beträgt die katalytische Effizienz sogar 63,4 %.

Interessanterweise zeigte die Einzelmutante A178G im Vergleich zum Wildtyp-Enzym eine deutliche Affinitätssteigerung gegenüber NADH, verbunden mit der Erhöhung der katalytischen Effizienz. Wird der Austausch A178G in die Einzelmutante M179H eingeführt, führt dies zu einer Erhöhung der katalytischen Aktivität, in diesem Falle sogar mit beiden Substraten, NADH und NADPH. Allerdings führt die zusätzliche A178G Mutation zu einer Erniedrigung der Affinität gegenüber beiden Substraten. So wird der K_M -Wert der **A178G/M179H** Enzymvariante für NADH um das 1,7-fache auf 0,073 mM erhöht, kombiniert mit einem 2-fachen Anstieg des k_{cat} -Wertes auf $118,1 \text{ s}^{-1}$ führt dies zu einer nahezu gleichbleibenden katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M von $1,6 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Der K_M der A178G/M179H Mutante gegenüber NADPH wird im Vergleich zur Einzelmutante M179H um das 2,5-fache auf 0,17 mM erhöht, bei ebenfalls 2,8-fach erhöhtem k_{cat} führt dies zu einer nahezu gleichbleibenden katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M von $0,45 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Die kinetische Untersuchung der Einzelmutante G159A zeigte im Vergleich zum Wildtyp-Enzym einen deutlichen Aktivität- und Affinitätsverlust gegenüber NADH. Auf die Bindung und Oxidation von NADPH zeigte die Einzelmutation G159A keinen Einfluss, eine NADPH-Oxidase Aktivität konnte für die G159A Mutante nicht nachgewiesen werden. In Kombination mit bereits eingeführten Mutationen führt der Austausch von Gly gegen Ala an der Position 159 jedoch zu einer deutlichen Verschiebung der Cofaktorspezifität hin zu NADPH. Wird der Austausch G159A in die Doppelmutanten A178G/M179H sowie D177A/M179H eingeführt, führt dies in den entsprechenden Dreifachmutanten zu einem deutlichen Aktivität- und Affinitätsverlust gegenüber NADH, verbunden mit einem drastischen Abfall der katalytischen Effizienz. So ist der K_M -Wert der Dreifachmutante **G159A/A178G/M179H** für NADH im Vergleich zur Doppelmutante A178G/M179H mit 0,798 mM deutlich um das 11-fache erhöht, wobei der k_{cat} ($9,4 \text{ s}^{-1}$) lediglich 3,3 % des Ausgangswertes beträgt. Zusammen führt dies zu einer deutlich niedrigeren katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M von $0,011 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, dies sind lediglich 0,67 % der katalytischen Effizienz

der Doppelmutante A178G/M179H mit NADH. Der K_M der G159A/A178G/M179H Enzymvariante gegenüber NADPH hingegen wurde lediglich um das 1,44-fache auf 0,246 mM erhöht, bei einem ebenfalls auf 15,7 % erniedrigten k_{cat} führt dies zu einer um den Faktor 10 erniedrigten katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M von $0,049 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$.

Für die Dreifachmutante **G159A/D177A/M179H** wurde ein im Vergleich zur Doppelmutante ein 5,8-fach erhöhter K_M von 0,341 mM für NADH bestimmt. Ein k_{cat} von $14,2 \text{s}^{-1}$ bedeutet eine Erniedrigung auf 15,3 % des Ausgangswertes. Der K_M für NADPH ist mit 0,127 mM um das 7,3-fache erhöht. Analog zur Dreifachmutante G159A/A178G/M179H zeigt die G159A/D177A/M179H Mutante eine deutlich verringerte Aktivität gegenüber NADPH, so beträgt der k_{cat} -Wert mit $15,0 \text{s}^{-1}$ nur 18,5 % des Ausgangswertes der Doppelmutante.

Zusammenfassend besitzt die Mutation G159A einen negativen Einfluss auf die Aktivität und Affinität gegenüber den beiden Substraten NADH und NADPH, wobei der Effekt bezüglich NADH deutlich ausgeprägter ist und somit zur Verschiebung der Substratspezifität führt. Auffällig beim direkten Vergleich der beiden Dreifachmutanten G159A/D177A/M179H und G159A/A178G/M179H ist die niedrigere Affinität und Aktivität der G159A/A178G/M179H Mutante gegenüber NADH. Obwohl die negativ geladene Aminosäure D177 noch vorhanden ist und potentiell für zum Wildtyp analoge Wechselwirkungen mit der 2'- und 3'-Hydroxyl-Gruppe von NADH zur Verfügung steht, ist die Affinität gegenüber NADH um den Faktor 2 niedriger als in der G159A/D177A/M179H Mutante.

Auch wenn das Einführen der Mutation A178G in den Wildtyp sowie die Einzelmutante M179H in einer Erhöhung der Affinität und der katalytischen Effizienz gegenüber NADH und NADPH resultierte, zeigen sich keine positiven Effekte in Hinsicht auf die Aktivität und Affinität, wenn diese Mutation zusätzlich in Doppel- oder Dreifachmutanten eingeführt wird, weder gegenüber NADH noch NADPH. So wird im Falle der hergestellten Dreifachmutante **D177A/A178G/M179H** die Affinität gegenüber NADH im Vergleich zur Doppelmutante D177A/M179H erniedrigt, bei nahezu gleichbleibendem k_{cat} führt dies zu einer fast halbierten katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M von $0,9 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. In Hinsicht auf NADPH findet sowohl eine Erniedrigung der Affinität als auch der Aktivität statt, der K_M -Wert erhöht sich leicht auf 0,023 mM, k_{cat} ($35,9 \text{s}^{-1}$) sowie k_{cat}/K_M ($1,6 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) werden mehr als halbiert.

Für die Vierfachmutante **G159A/D177A/A178G/M179H** konnte im Vergleich zur Dreifachmutante G159A/D177A/M179H eine deutlich niedrigere Affinität gegenüber NADH festgestellt werden, so wird der K_M von 0,341 mM auf 0,822 mM um das 2,4-fache erhöht. Bei einem nahezu gleichem k_{cat} von $14,0 \text{ s}^{-1}$ führt dies zu einer mehr als halbierten katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M von $0,017 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Im Vergleich zum Wildtyp (K_M 0,039 mM) wird der K_M um mehr als das 21-fache erhöht und die katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M auf lediglich 4,9 % der Ausgangseffizienz erniedrigt. In Hinsicht auf NADPH konnte eine Erniedrigung der Affinität beobachtet werden, der K_M -Wert erhöht sich im Vergleich zur Dreifachmutante 3-fach von 0,127 auf 0,385 mM. Interessanterweise erhöht sich der k_{cat} 2-fach, wodurch die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M mit NADPH vergleichbar bleibt. Da aus den ermittelten Sequenz- und Struktur-Daten bekannt war, dass in einigen der NADP(H) spezifischen Enzyme an der 159G entsprechenden Position neben Ala auch seltener Ser vorkommt, wurde in der Mehrfachmutante G159A/D177A/A178G/M179H der Austausch A159S eingeführt. Interessanterweise macht es hinsichtlich der K_M , k_{cat} - und k_{cat}/K_M -Werte für NADH nur einen sehr geringen Unterschied aus, ob sich an der Position 159 die Aminosäure Ala oder Ser befindet. Für das Substrat NADPH hingegen weist die Mutante **G159S/D177A/A178G/M179H** eine deutlich höhere Bindungsaffinität und katalytische Effizienz auf als die Mutante G159A/D177A/A178G/M179H. Im Vergleich ist der K_M mit 0,153 mM um mehr als 50 % erniedrigt, wodurch sich der k_{cat}/K_M -Wert auf $0,16 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mehr als verdoppelt. Die Mutante G159S/D177A/A178G/M179H weist eine moderate katalytische Aktivität mit NADPH sowie eine signifikante Verschiebung der Substratspezifität auf. Der K_M für NADH ist mit 0,933 mM um mehr das 6-fache höher als der K_M für NADPH mit 0,153 mM. Weiterhin ist die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M mit NADPH ($0,160 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) um den Faktor 10 höher als mit NADH ($0,015 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), mit einem $(k_{cat}/K_M)_{\text{NADPH}}/(k_{cat}/K_M)_{\text{NADH}}$ -Wert von 10,7.

Zeitgleich zu dieser Arbeit wurde über die Mutation der NOX aus *L. plantarum* an den Positionen G178 und L179 (äquivalent zu A178 und M179 in NOX *L. brevis*) berichtet, jedoch zeigen die publizierten Daten von Park deutlich abweichende und eher gegensätzliche Ergebnisse [Park et al., 2011]. Die Wildtyp-NOX aus *L. plantarum*, die ausschließlich NADH oxidiert, zeigt in der Primärstruktur die Aminosäure Gly an Position 178. Durch den Austausch von Gly gegen Arg (G178R) ist das Enzym in der Lage, NADPH als Substrat zu akzeptieren und die Affinität gegenüber dem natürlichen Substrat NADH erhöhte sich ebenfalls deutlich, dies zeigt der 8-fach erniedrigte K_M [Park et al., 2011].

Im Gegensatz hierzu führt in der NOX aus *L. brevis* nicht der Austausch sondern das Einführen der Aminosäure Gly an Position 178 zu einer NADPH-Akzeptanz und ebenso zu erhöhter Affinität gegenüber dem natürlichen Substrat NADH, im Vergleich zum Wildtyp-Enzym ist der K_M der NOX-Mutante M178G für NADH 2,2-fach erniedrigt. Ebenfalls hat sich für die NOX aus *L. plantarum* gezeigt, dass das Einführen von Arg an Position 179 zu einer mit NADPH deutlich aktiveren Enzymvariante führt als das Einführen von His (2,75-fache spez. Aktivität, Zellrohextrakt) [Park et al., 2011], wohingegen eine *L. brevis* NOX-Mutante mit Arg an der korrespondierenden Position (A178G/M179R) 40 % weniger Aktivität in der Oxidation von NADPH zeigt als die entsprechende Mutante mit His (A178G/M179H) (siehe auch Ergebnisse 2.1.2.6).

Alle im Verlauf der gezielten Mutagenese hergestellten Einfach-, Doppel- und Mehrfach-Mutanten, mit Ausnahme der Mutante G159A, zeigen Oxidase-Aktivität gegenüber NADH und NADPH. Der Einfluss der Aminosäurenaustausche, allein oder in Kombination mit anderen Mutationen, auf die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M mit NADH und NADPH ist in der Abbildung 105 graphisch dargestellt.

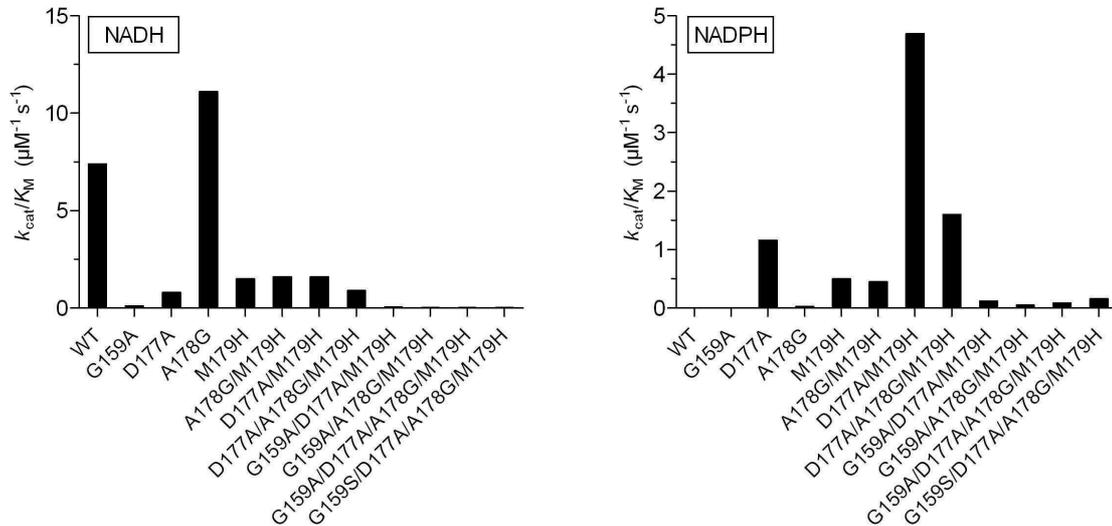


Abbildung 105: Einfluss der Mutationen G159A, G159S, D177A, A178G und M179H, allein oder in Kombination, auf die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M der NOX aus *L. brevis* mit NADH und NADPH.

Durch die Kombination von Mutationen, die sich positiv auf die Affinität und Aktivität der Oxidase gegenüber dem nicht-natürlichen Substrat NADPH auswirken, gelang es, Mehrfachmutanten zu generieren, die eine hohe katalytische Effizienz und Substrataffinität gegenüber NADPH aufweisen. Aufgrund der deutlich voneinander abweichenden Aktivität und Affinität gegenüber NADH und NADPH zeigen die verschiedenen Mutanten eine unterschiedliche Spezifität für NADH bzw. NADPH.

Während die Mutante D177A als einzige keinen Cofaktor eindeutig als Substrat bevorzugt, sind die Mutanten G159A, A178G, M179H und A178G/M179H eher NADH-spezifisch, die Mutanten D177A/M179H, G159A/D177A/M179H, G159A/A178G/M179H, D177A/A178G/M179H, G159A/D177A/A178G/M179H, G159S/D177R/A178G/M179H und G159S/D177A/A178G/M179H eher NADPH-spezifisch. In der Abbildung 106 ist der Einfluss der Austausch G159A, G159S, D177A, A178G und M179H allein oder in Kombination, auf die Substratspezifität $(k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{NADPH}}/(k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{NADH}}$ der hergestellten NOX-Mutanten dargestellt.

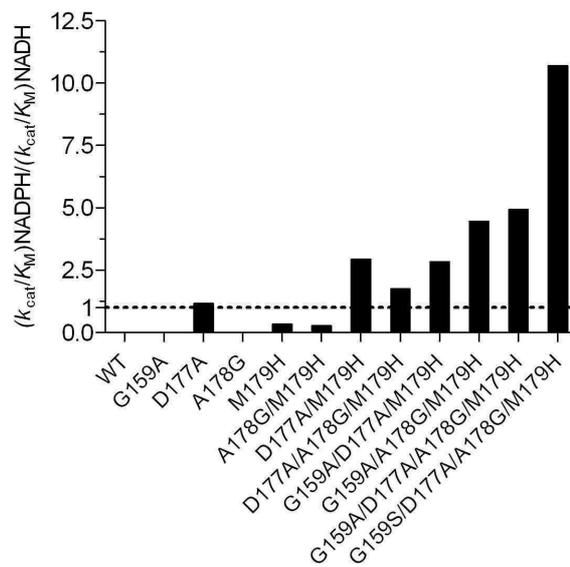


Abbildung 106: Einfluss der Mutationen G159A, G159S, D177A, A178G und M179H, allein oder in Kombination, auf die Substratspezifität $(k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{NADPH}}/(k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{NADH}}$ der NOX aus *L. brevis*.

Insgesamt stellen die ermittelten kinetischen Daten einen Beleg für die Vermutungen hinsichtlich der Struktur-Funktions-Beziehungen der identifizierten Aminosäurepositionen dar. Aus der Serie an hergestellten Mutanten erscheinen die Oxidasen D177A/M179H und G159S/D177A/A178G/M179H besonders interessant in Hinsicht auf die ermittelten kinetischen Parameter.

Für den Einsatz eines enzymatischen Systems zur Cofaktorregenerierung ist der nutzbare pH-Bereich ein wichtiger und entscheidender Parameter. Daher wurden die pH-Optima der Mutanten D177A/M179H und G159S/D177A/A178G/M179H in der Oxidation von NADH sowie NADPH bestimmt. Zusammenfassend besitzen die untersuchten Mutanten in der Oxidation von NADH mit pH 6,0 das gleiche pH-Optimum wie die Wildtyp-NOX [Hummel und Riebel, 2003]. Die Aktivitäten der beiden Mutanten D177A/M179H und G159S/D177A/A178G/M179H in der Oxidation von NADPH erreichen bei pH 6,0 ebenfalls ihr Maximum und bleiben moderat über einen breiten pH-Bereich von pH 5,0 bis pH 9,0, was in Hinsicht auf den Einsatz als System zur Cofaktorregenerierung von besonderer Bedeutung ist.

2.1.2.4 Strukturmodellierung ausgewählter NOX-Mutanten

Um die ermittelten kinetischen Daten und die aufgestellten Vermutungen hinsichtlich der vorab dargelegten Struktur-Funktions-Beziehungen der identifizierten Aminosäurepositionen miteinander zu verbinden, wurden Strukturmodelle der Mutanten D177A, M179H, D177A/M179H und G159S/D177A/A178G/M179H erstellt. Zur Modellierung der Strukturen wurden die Aminosäuren in der Struktur der Wildtyp-NOX mit dem Programm Swiss-Pdb Viewer [Guex und Peitsch, 1997] ausgetauscht, anschließend wurde eine „energy minimisation“ (GROMOS96) zur Verfeinerung der Struktur durchgeführt. Die Modellierung von NADH-Enzym-Komplexen erfolgte analog zum Wildtyp-Enzym durch die Überlagerung mit der Struktur der NADH-ligierten NPOX aus *S. faecalis* [Stehle et al., 1993]. Für die Modellierung von NADPH-Enzym-Komplexen wurden die Strukturen mit dem NADPH-Komplex der *B. anthracis* Coenzym-A-Disulfid Reduktase [Wallen et al., 2008] überlagert (Programm Chimera, Needleman-Wunsch Algorithmus, Matrix BLOSUM-62). Alternative Seitenketten-Rotamere [Dunbrack, 2002] und Wasserstoffbrückenbindungen wurden mit dem Programm Chimera [Pettersen et al., 2004] berechnet.

NADH und NADPH unterscheiden sich strukturell durch das Vorhandensein einer zusätzlichen Phosphat-Gruppe in der 2'-Position des Ribose-Rings vom Adenosin-Teil des Cofaktors. Wie in der Analyse des Wildtyp-NADH-Komplexes festgestellt wurde, erfolgt die effektive Bindung der 2'- und 3'-Hydroxyl-Gruppe des Adenin-Ribose-Rings von NADH durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den Sauerstoffatomen der Carboxyl-Gruppe von Asp177. Weiterhin scheint Asp177 ausschlaggebend zu sein für die Diskriminierung der NADPH Bindung, sowohl aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen als auch einer sterischen Hinderung der zusätzlichen Phosphat-Gruppe.

Die Mutante **D177A** trägt einen einzigen Aminosäureaustausch, Ala substituiert Asp an Position 177, was bedeutet, dass eine stark negativ geladene Aminosäure durch eine kleine und ungeladene Aminosäure ersetzt wurde. Durch diesen Austausch sollten sowohl elektrostatische Wechselwirkungen als auch eine sterische Hinderung der zusätzlichen Phosphat-Gruppe von NADPH ausgeschlossen werden. Interessanterweise ist die Mutante D177A tatsächlich in der Lage, NADPH effektiv zu oxidieren. In der modellierten NADPH-D177A-Struktur wird NADPH analog zu NADH an der gleichen Stelle der NAD(P)H-Bindedomäne gebunden und ist ebenfalls mit dem Nicotinamid-Teil in Richtung FAD ausgerichtet (Abbildung 107). Es werden 7 Wasserstoffbrücken sowohl mit der Proteinhauptkette als auch mit Seitenketten ausgebildet. Im Vergleich zur Bindung von NADH in der Wildtyp-NOX besteht insgesamt eine signifikante Ähnlichkeit in Bezug auf die Interaktionen mit der Pyrophosphatbrücke und dem Nicotinamid-Teil des Cofaktors. So werden ebenfalls Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Tyr157, Ile158, Gly241, Tyr186, Gly326 sowie Pro295 ausgebildet, hier jedoch 2 Bindungen zu Pro295 anstatt zu Tyr186. Es finden keine direkten Wechselwirkung mit der Phosphat-Gruppe in der 2'-Position statt. Verglichen mit anderen PNDORs bzw. deren Cofaktorbindungsstellen (siehe hierzu auch im Ergebnissteil 2.1.2.3) zeigt dieses Ergebnis, dass das Vorkommen einer positiv geladenen Aminosäuren wie Arg oder His in dieser Region keine zwingende Voraussetzung für die effektive Bindung und Oxidation von NADPH in der NOX aus *L. brevis* bzw. deren Mutante(n) darstellt, wenn Ala die negativ geladene Aminosäure Asp an Position 177 ersetzt.

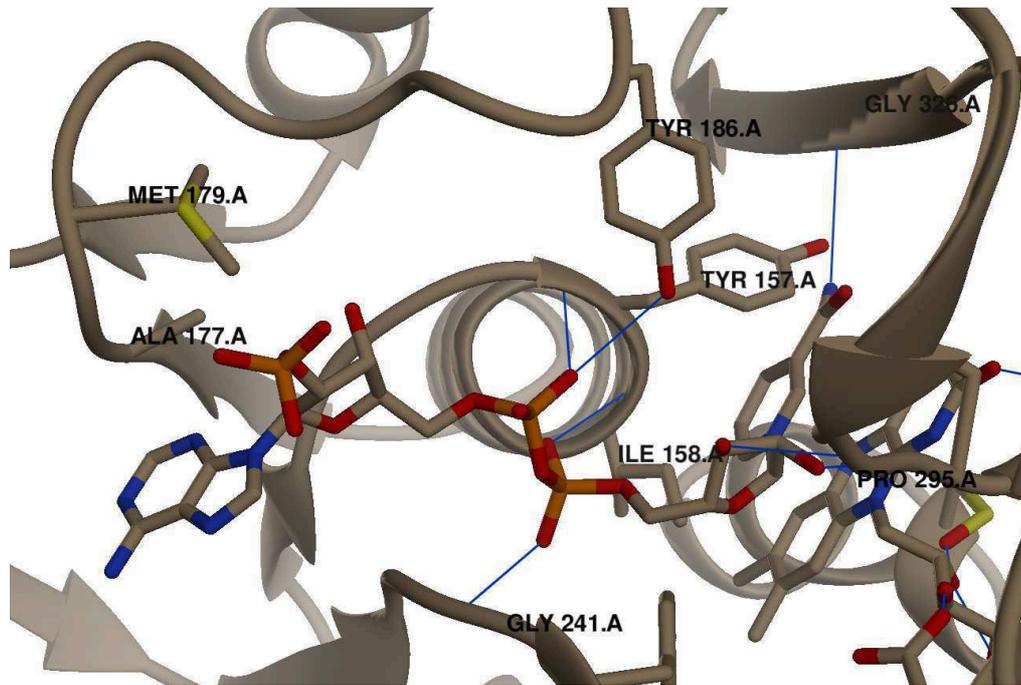


Abbildung 107: Bindungsstelle von NADPH in der Struktur der D177A Mutante, NADPH modelliert aus der Struktur der CoADR aus *B. anthracis* (pdb. 3CGE). Wasserstoffbrückenbindungen sind als blaue Linien dargestellt.

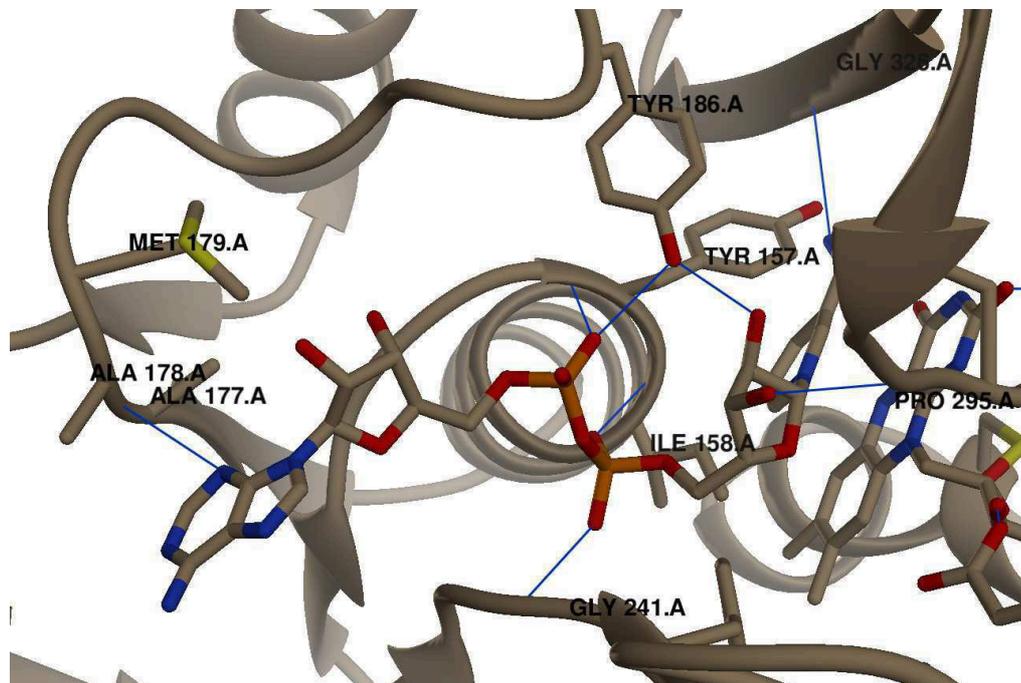


Abbildung 108: Bindungsstelle von NADH in der Struktur der D177A Mutante, NADH modelliert aus der Struktur der NPOX aus *S. faecalis* (pdb. 2NPOX). Wasserstoffbrückenbindungen sind als blaue Linien dargestellt.

Die Affinität und Aktivität der D177A Mutante gegenüber NADH ist deutlich gesenkt, wahrscheinlich durch das Wegfallen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der 2'- und 3'-Hydroxyl-Gruppe von NADH und der Seitenkette von D177 (Abbildung 108). Die restlichen im Wildtyp-NADH-Komplex festgestellten Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Tyr157, Ile158, Gly241, Tyr186 (2x), Ala178, Gly326 sowie Pro295 werden jedoch ausgebildet, so dass eine gewisse Affinität und Aktivität gegenüber NADH erhalten bleibt.

Im Gegensatz zur D177A Mutante ist die Affinität der Einzelmutante **M179H** gegenüber NADH nicht verändert, wahrscheinlich beeinflusst die eingeführte Mutation die im Wildtyp-NADH-Komplex festgestellten Wasserstoffbrückenbindungen nicht wesentlich. Lediglich die Wasserstoffbrückenbindung zu den Hydroxyl-Gruppen des Adenin-Ribose-Rings werden nicht mehr durch beide Sauerstoffatome der Carboxyl-Gruppe von Asp ausgebildet (Abbildung 109).

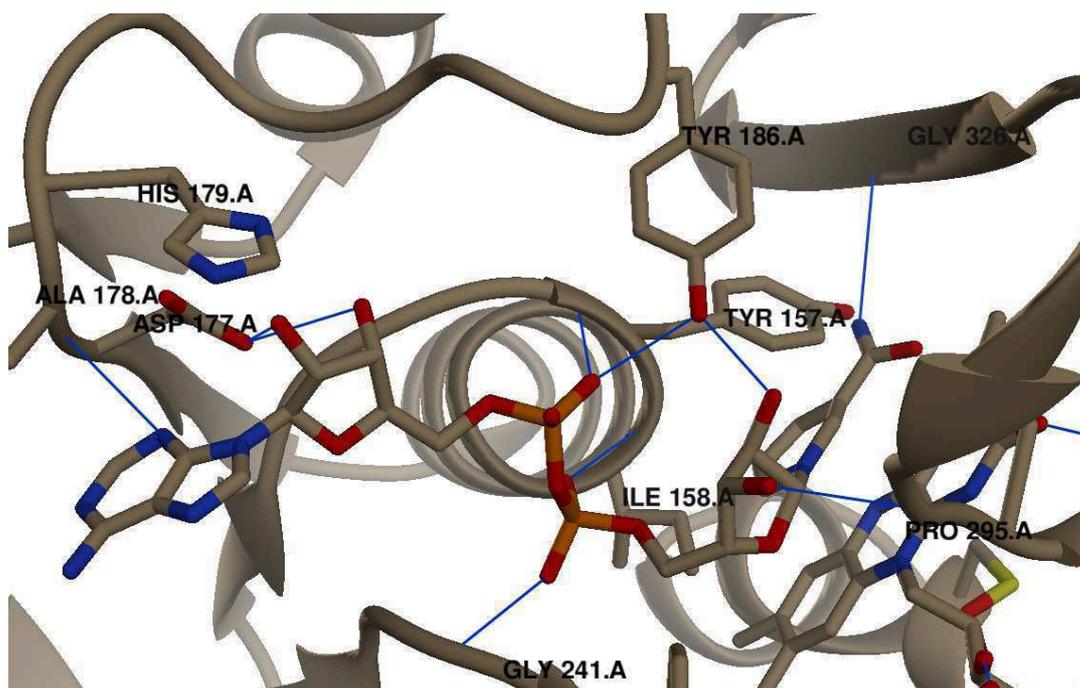


Abbildung 109: Bindungsstelle von NADH in der Struktur der M179H Mutante, NADH modelliert aus der Struktur der NPOX aus *S. faecalis* (pdb. 2NPOX). Wasserstoffbrückenbindungen sind als blaue Linien dargestellt.

Der Austausch M179H ermöglicht ebenfalls die Akzeptanz von NADPH als Substrat, im NADPH-M179H-Komplex (Abbildung 110) werden Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Tyr157, Ile158, Glu161, Tyr186, Gly241, Pro295 (2x) sowie Gly326 ausgebildet. Zusätzlich findet eine Stabilisierung von NADPH in Form von 2 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Phosphat-Gruppe sowie der 3'-Hydroxyl-Gruppe des Adenin-Ribose-Rings und der Seitenkette von His an Position 179 statt. Weiterhin wird eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der 3'-Hydroxyl-Gruppe des Adenin-Ribose-Rings und der Carboxyl-Gruppe von Asp177 ausgebildet.

Die NADH- und NADPH-Bindung in der M179H Mutante verläuft sehr ähnlich zu der Coenzym-A-Disulfide Reduktase aus *B. anthracis*, welche einen hybridartigen Aufbau der Cofaktorbindungsstelle besitzt mit einer negativ geladenen Aminosäure (Glu180) und einer positiv geladenen (Arg181) in direkter Nähe [Wallen et al., 2008]. Im NADPH-Enzym-Komplex (siehe auch Ergebnissteil 2.1.2.3, Abbildung 77) bilden beide Aminosäuren stabilisierende Wasserstoffbrückenbindungen zur Phosphat-Gruppe bzw. 3'-Hydroxyl-Gruppe aus.

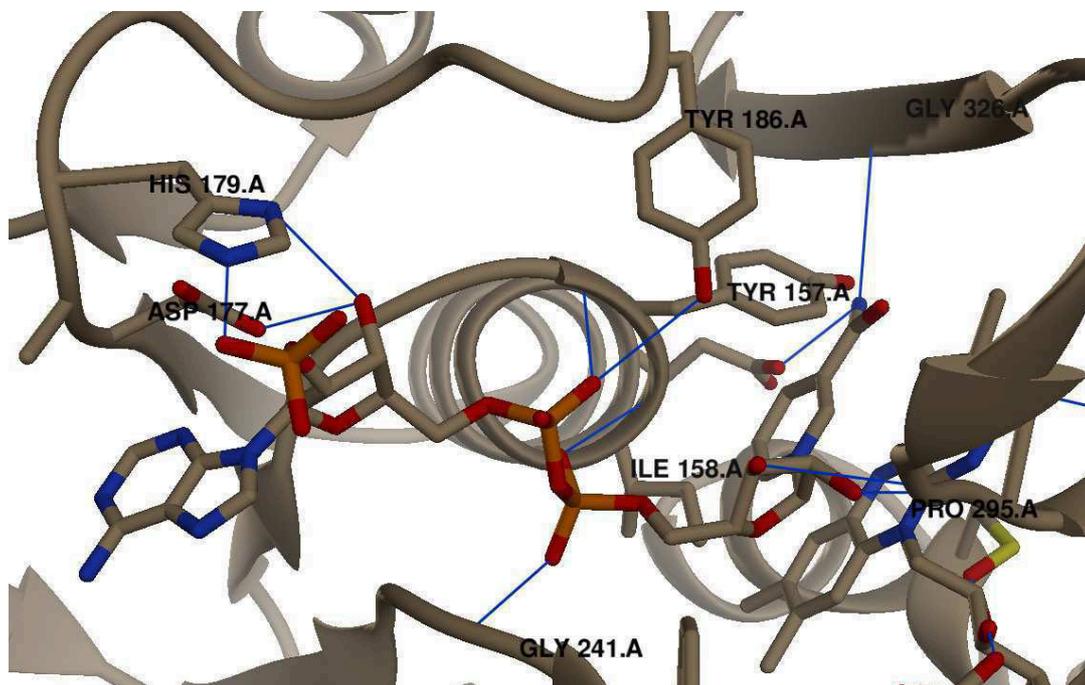


Abbildung 110: Bindungsstelle von NADPH in der Struktur der M179H Mutante, NADPH modelliert aus der Struktur der CoADR aus *B. anthracis* (pdb. 3CGE). Wasserstoffbrückenbindungen sind als blaue Linien dargestellt.

Das Einführen der Einzelmutationen D177A und M179H ermöglichte bereits die Akzeptanz von NADPH als Substrat in der Oxidation, jedoch konnte die Kombination der beiden Mutationen die Aktivität und Affinität der NOX gegenüber NADPH noch deutlich steigern. Interessanterweise ist die Affinität der hoch aktiven Doppelmutante **D177A/M179H** gegenüber dem unnatürlichen Substrat NADPH sogar deutlich höher als die der Wildtyp-NOX gegenüber dem natürlichen Substrat NADH. Die Analyse des D177A/M179H-NADPH-Komplexes (Abbildung 111) zeigt, dass die effektive Substraterkennung und Bindung von NADPH durch den Austausch von Asp an Position 177 gegen Ala ermöglicht wird, was sowohl elektrostatische Wechselwirkungen als auch eine sterische Behinderung ausschließt, kombiniert mit stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Phosphat-Gruppe sowie der 3'-Hydroxyl-Gruppe von NADPH und der Seitenkette der eingeführten Aminosäure His an Position 179.

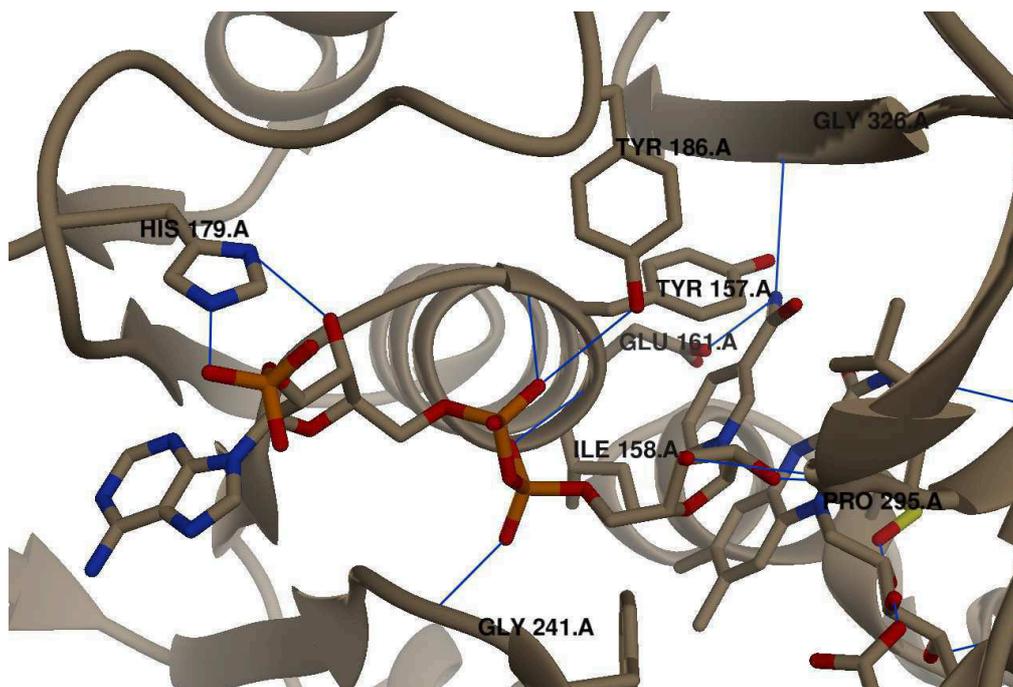


Abbildung 111: Bindungsstelle von NADPH in der Struktur der D177A/M179H Mutante, NADPH modelliert aus der Struktur der CoADR aus *B. anthracis* (pdb. 3CGE). Wasserstoffbrückenbindungen sind als blaue Linien dargestellt.

Ebenfalls werden Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Tyr157, Ile158, Glu161, Tyr186, Gly241, Gly326 sowie Pro295 (2x) ausgebildet. Die NADPH-Bindung in der D177A/M179H Mutante verläuft ähnlich zu NADPH-Bindung in der Gluthation-Reduktase des Menschen und aus *E. coli* (siehe auch Ergebnissteil 2.1.2.3, Abbildung 76), in diesen Enzymen sind unter anderem Arg bzw. Arg und His für die Stabilisierung bzw. Bindung von NADP(H) verantwortlich [Scrutton et al., 1990; Pai et al., 1988; Mallett et al., 2006].

Die Bindung von NADH im D177A/M179H-NADH-Komplex (Abbildung 112) verläuft analog zur D177A Mutante, es werden Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren Tyr157, Ile158, Gly241, Tyr186 (2x), Ala178, Gly326 sowie Pro295 ausgebildet.

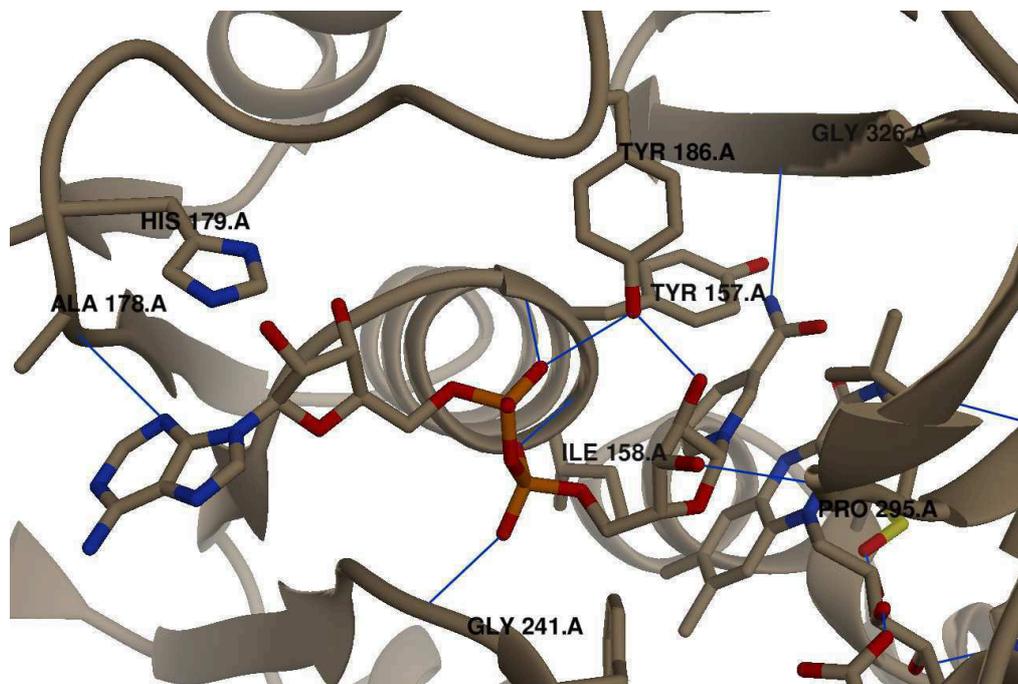


Abbildung 112: Bindungsstelle von NADH in der Struktur der D177A/M179H Mutante, NADH modelliert aus der Struktur der NPOX aus *S. faecalis* (pdb. 2NPOX). Wasserstoffbrückenbindungen sind als blaue Linien dargestellt.

Die zusätzlich eingeführten Mutationen G159S und A178G in der Vierfachmutante G159S/A178G/D177A/M179H führten zu einem drastischen Abfall der Affinität und Aktivität gegenüber NADH, verbunden mit einer signifikanten Veränderung in der Substratspezifität in Richtung NADPH. Interessanterweise werden die kinetischen Parameter durch die G159S und A178G Mutationen gegenüber NADPH ebenfalls negativ beeinflusst, jedoch ist der Effekt deutlich weniger ausgeprägt als gegenüber NADH.

In den NAD(P)H-Komplexen (Abbildungen 113 und 114) der Vierfachmutante können sowohl für NADH als auch NADPH zur Mutante D177A/M179H analoge Wasserstoffbrückenbindungen festgestellt werden.

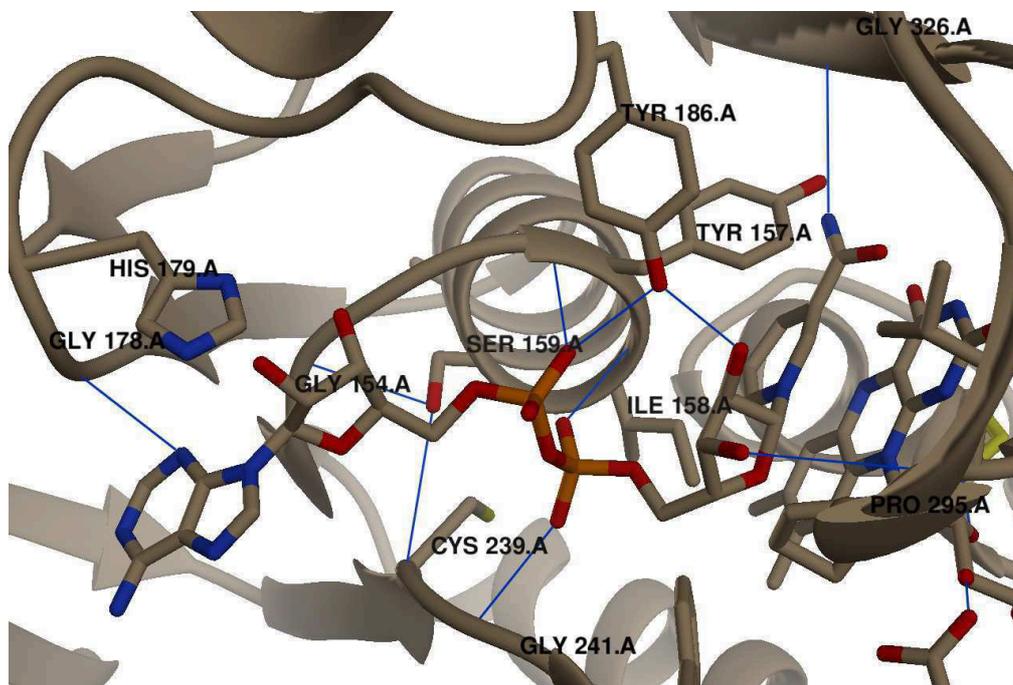


Abbildung 113: Bindungsstelle von NADH in der Struktur der G159S/A178G/D177A/M179H Mutante, NADH modelliert aus der Struktur der NPOX aus *S. faecalis* (pdb. 2NPOX). Wasserstoffbrückenbindungen sind als blaue Linien dargestellt.

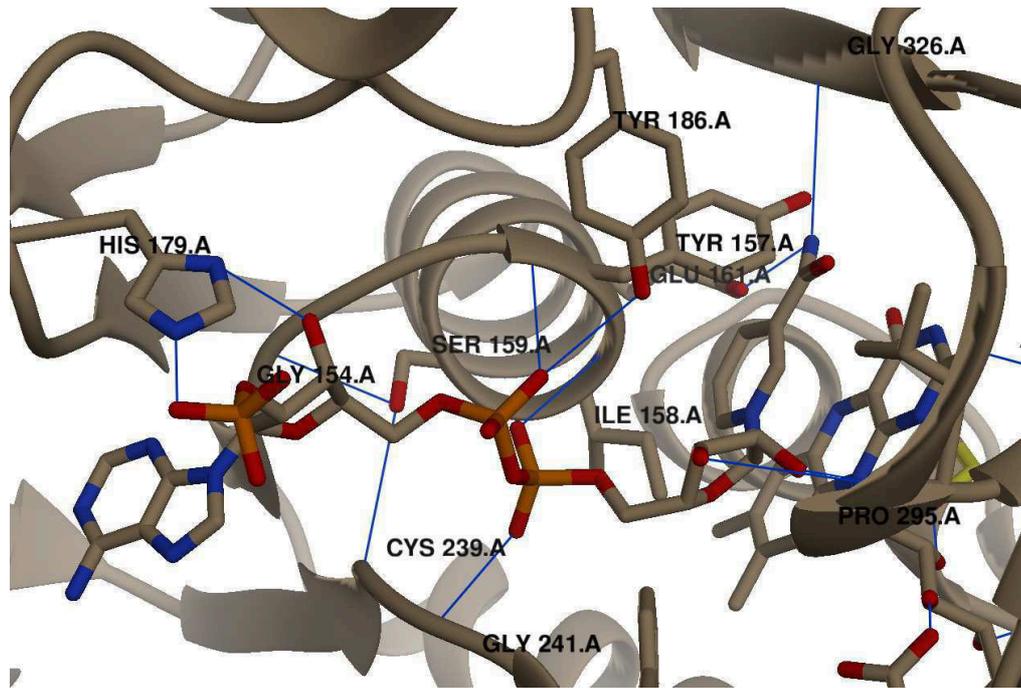


Abbildung 114: Bindungsstelle von NADPH in der Struktur der G159S/A178G/D177A/M179H Mutante, NADPH modelliert aus der Struktur der CoADR aus *B. anthracis* (pdb. 3CGE). Wasserstoffbrückenbindungen sind als blaue Linien dargestellt.

Die eingeführte Aminosäure Ser159 befindet sich an der dritten Gly-Position des konservierten GXGXXG „fingerprint“ NAD(H)-Bindemotivs (GAGYIG, Aminosäuren 154-159), welches sich am C-terminalen Ende des ersten β -Faltblattes einer alternierenden Abfolge von β -Faltblättern und α -Helices ($\beta\alpha\beta\alpha\beta$) befindet. Das GXGXXG-Motiv ist Teil eines Loops, welcher das erste β -Faltblatt mit der darauffolgenden α -Helix verbindet. In den modellierten NAD(P)H-G159S/A178G/D177A/M179H-Komplexen ist Ser159 an keiner direkten Wechselwirkung zum Co-Enzym bzw. Substrat beteiligt, bildet jedoch 2 Wasserstoffbrückenbindungen mit benachbarten Aminosäuren der NAD(P)H-Bindungsstelle aus, im genaueren mit Gly154, dem ersten Gly des GXGXXG „fingerprint“ Motivs, und mit Cys239. Befindet sich an der Position 159 wie in der Wildtyp-NOX oder der D177A/M179H Mutante die Aminosäure Gly, werden diese Wasserstoffbrückenbindungen nicht ausgebildet. Für die NAD(H)-spezifischen Vertreter der PNDORs ist bekannt, dass das Gly an der dritten Position des GXGXXG-Motivs aufgrund der fehlenden Seitenkette die Konformation des ersten β -Faltblattes vom $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ Motiv und der darauffolgenden α -Helix zueinander ermöglicht [Bellamacina, 1996; Dym and Eisenberg, 2001; Scrutton et al., 1990].

Das Gly substituierende Ser159 benötigt aufgrund der vorhandenen Seitenkette mehr Platz und bildet zusätzlich 2 Wasserstoffbrückenbindungen mit benachbarten Aminosäuren aus, so dass die Konformation des β -Faltblattes und der darauffolgenden α -Helix bzw. die des verbindenden Loops beeinflusst wird.

In der Überlagerung der NADH-Enzym-Komplexe der Mutanten D177A/M179H und G159S/A178G/D177A/M179H (Abbildung 115) ist eine leicht veränderte Konformation des Loops und der Seitenketten von His179 und Tyr157 zu erkennen, welche anscheinend zu der deutlich effektiveren Bindung von NADPH gegenüber NADH führt.

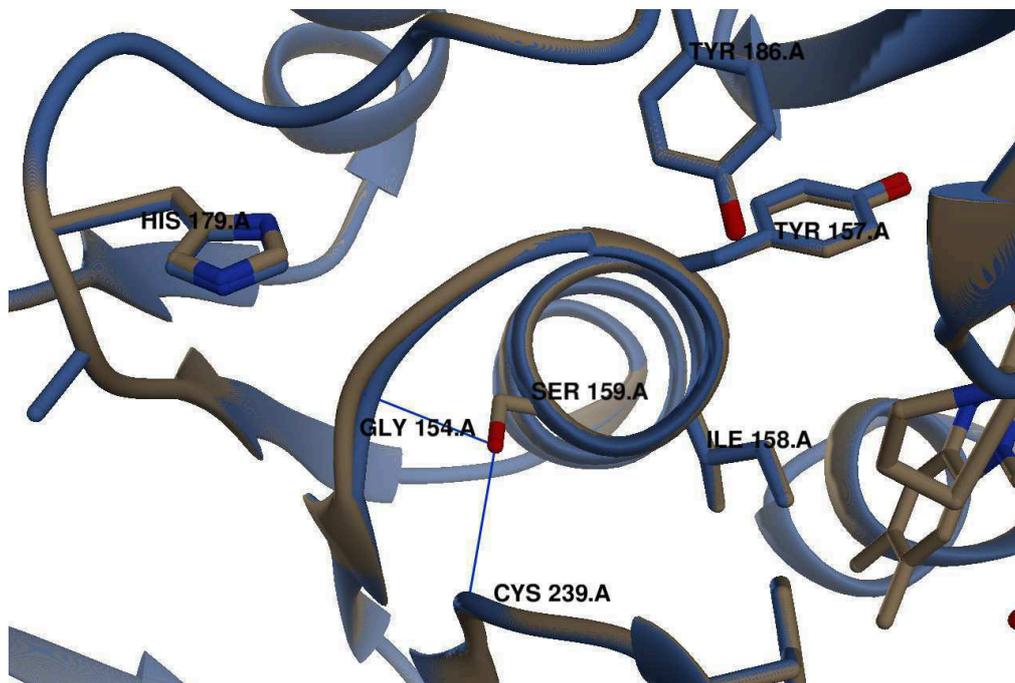


Abbildung 115: Überlagerung der NADH-Enzym-Komplexe der Mutanten D177A/M179H (blau) und G159S/A178G/D177A/M179H (grau), (rmsd 0,034 für 446 Atome). Die Überlagerung der Strukturen wurde mit dem Programm Chimera erstellt (Needleman-Wunsch Algorithmus, Matrix BLOSUM-62).

In einer Publikation von Park zur Mutagenese der NOX aus *L. plantarum*, die publizierten Daten zeigen deutlich abweichende und eher gegensätzliche Ergebnisse [Park et al., 2011] (siehe 2.1.2.3) sind keine Modelle der Wildtyp-NOX bzw. der NOX-Mutanten enthalten und die Interaktionen zwischen Cofaktor und Enzym wurden nicht im Detail diskutiert, was für einen Vergleich mit den doch sehr unterschiedlichen Ergebnissen dieser Arbeit hilfreich gewesen wäre.

2.2 Anwendung der NOX-Mutanten zur Cofaktorregenerierung - Oxidative Darstellung von enantiomerenreinen Alkoholen

Enantiomerenreine Alkohole finden heute vielfältigen Einsatz als sogenannte Bulkchemikalien zur Synthese von Produkten in der pharmazeutischen, kosmetischen und chemischen Industrie. Aufgrund ihrer vorteilhaften Eigenschaften werden in den letzten Jahren verstärkt ADHs für die Herstellung enantiomerenreiner Alkohole eingesetzt, da sie hohe Umsatzraten ermöglichen und ein breites Substratspektrum an prochiralen Ketonen oder Aldehyden bzw. chiralen Alkoholen umsetzen können [Hollmann et al., 2011]. ADHs sind für ihre katalytische Aktivität auf Nicotinamid-Cofaktoren angewiesen, welche während der Reaktion als Redoxäquivalente fungieren und in stöchiometrischen Mengen verbraucht werden. Zur enzymatischen Herstellung chiraler Alkohole stehen prinzipiell zwei entgegengesetzte Synthesewege zur Verfügung. Die Produktion chiraler Alkohole durch ADHs erfolgt in den meisten Fällen durch die enantioselektive Reduktion von prochiralen Ketonen. Es existieren jedoch auch Verbindungen, für die dieser Syntheseweg durch die fehlende Verfügbarkeit der Ketonvorstufe versperrt ist. In diesen Fällen bietet sich die Präparation durch die enantioselektive Oxidation eines der beiden Enantiomeren des Racemates an.

Aus *L. brevis* und *L. kefir* konnten zwei NADP(H)-abhängige ADHs identifiziert und isoliert werden, die im Gegensatz zu den meisten der bisher bekannten ADHs in der Lager sind, prochirale Ketone in ihre korrespondierenden (*R*)-Alkohole zu überführen. Die Enzyme besitzen ein breites Substratspektrum und den Vorteil, Alkohole mit sperrigen Seitenketten umsetzen zu können, so werden eine Vielzahl an zyklischen, polyzyklischen, aromatischen und aliphatischen Alkoholen als Substrat akzeptiert [Bradshaw et al., 1991, Hummel, 1990; Niefind et al., 2003, Kula und Hummel, 1993; Hummel und Riebel, 2000]. Beide ADHs wurden rekombinant hergestellt, gereinigt und umfassend biochemisch charakterisiert, weiterhin ist der Einsatz für verschiedenste präparative Zwecke aufgezeigt worden [Hummel, 1990; Kula und Hummel, 1993; Hummel und Riebel, 2000]. Die katalytischen Eigenschaften und die kommerzielle Verfügbarkeit machen diese beiden ADHs zu besonders interessanten Biokatalysatoren mit einem hohen biotechnologischen Potential für die Produktion von chiralen Alkoholen. Die NAD(H)-abhängige ADH aus *Rhodococcus ruber* DSM 44541 [Kosjek et al., 2003] oxidiert stereospezifisch neben (*S*)-Phenylethanol zahlreiche weitere (*S*)-Alkohole zu den entsprechenden Ketonen, das breite Substratspektrum des Enzyms macht was es für präparative Anwendungen höchst interessant.

Um das Anwendungspotential der neu-entwickelten NADPH-Oxidasen anhand entsprechender Beispiele aufzuzeigen, wurden verschiedene NOX-Mutanten zur *in situ*-Cofaktorregenerierung von NADP⁺ und NAD⁺ in Verbindung mit den oben aufgeführten ADHs, in der Synthese von enantiomerenreinen Alkoholen eingesetzt. Hierbei fanden sowohl isolierte Enzyme als auch ganze Zellen Verwendung als Biokatalysator. Als Standardsubstrat für die ADHs wurde *rac*-1-Phenylethanol eingesetzt, diese Verbindung wird von den Enzymen stereoselektiv zu Acetophenon oxidiert.

2.2.1 Cofaktorregenerierung in der oxidativen Darstellung von enantiomerenreinen Alkoholen mittels isolierter Enzyme

Aus der Serie an hergestellten NAD(P)H-oxidierenden Mutanten wurden die Mutanten D177A/M179H, D177A/A178G/M179H und G159S/D177A/A178G/M179H für den Einsatz zur Cofaktorregenerierung ausgewählt. Die einleitende Biotransformation von 10 mM *rac*-1-Phenylethanol wurde mit Hilfe der rekombinanten NADP⁺-abhängigen (*R*)-spezifischen ADHs aus *L. kefir* und *L. brevis* sowie der NAD⁺-abhängigen (*S*)-spezifischen ADH aus *R. ruber* (RrADH) durchgeführt. Zur *in situ*-Regenerierung von NADP⁺ bzw. NAD⁺ wurde die durch das rationale Proteindesign konstruierte NAD(P)H-Oxidase D177A/M179H eingesetzt. Mit allen drei ADHs konnte eine vollständige stereoselektive Oxidation des jeweiligen (*R*)- bzw. (*S*)-Alkohols erreicht werden, der Enantiomerenüberschuss (enantiomeric excess, ee) des verbleibenden Alkohols betrug in allen Biotransformationen 100 %.

Ausschlaggebend für die Beurteilung eines Systems zur Cofaktorregenerierung ist eine hohe „total turnover number“ (TTN) des Cofaktors, wobei dieser Wert angibt, wie viel Mol Produkt pro Mol an eingesetztem Cofaktor während der Reaktion gebildet werden. Für eine effiziente präparative Anwendung werden TTN von 10³ bis 10⁵ benötigt [Chenault et al., 1988; Woodyer et al., 2003]. Die TTN von NADP⁺ betrug in den ersten Biotransformationen 50. Um die Leistungsfähigkeit der konstruierten Mutanten D177A/A178G/M179H, D177A/A178G/M179H und G159S/D177A/A178G/M179H genauer zu untersuchen, sollte dieser Wert sollte zum einen durch das Absenken der eingesetzten Cofaktorkonzentration sowie durch die Erhöhung der Substratkonzentration gesteigert werden. Um hohe TTN Werte zu erreichen, wurden daher weitere Biotransformationen mit einer NADP⁺ Konzentration von 0,025 mM sowie einer Substratkonzentration von 25 mM bzw. 50 mM *rac*-1-Phenylethanol durchgeführt.

Durch den Einsatz der Mutanten D177A/M179H, D177A/A178G/M179H und G159S/D177A/A178G/M179H zur *in situ*-Cofaktorregenerierung konnte mit nur 0,2 % NADP⁺ (relativ zur eingesetzten Substratkonzentration) (*R*)-1-Phenylethanol mittels (*R*)-spezifischer ADH aus *L. kefir* nahezu quantitativ zu Acetophenon umgesetzt werden. Der Enantiomerenüberschuss (enantiomeric excess, *ee*) für (*S*)-1-Phenylethanol war hierbei 98 % (25 mM) bzw. 94 % (50 mM), die TTN von NADP⁺ in diesen Biotransformationen erreichte annähernd 500 bzw. 1000.

2.2.2 Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren mit *in vivo*-Cofaktorregenerierung von NADP⁺

Vorteile von Ganzzellbiokatalysatoren im Vergleich zum Einsatz isolierter Enzyme sind im Allgemeinen der geringe Arbeits- und Kostenaufwand, da eine Präparation und Reinigung der enzymatischen Biokatalysatoren entfällt. Weiterhin besteht die Möglichkeit, den Ganzzellkatalysator nach erfolgter Biotransformation einfach von der Produktlösung abzutrennen und erneut einzusetzen. Ganzzellbiokatalysatoren wurden bisher bereits vielfach erfolgreich in der Synthese von enantiomerenreinen Alkoholen genutzt, wobei für oxidative Anwendungen bisher ausschließlich Ganzzellbiokatalysatoren mit NAD⁺-abhängigen Enzymen eine Anwendung fanden. Dies ist vor allen Dingen auf das Fehlen von geeigneten enzymatischen Regenerierungssystemen für NADP⁺ zurückzuführen, welche durch die Co-Expression der entsprechenden Enzyme eine *in vivo*-Cofaktorregenerierung von NADP⁺ ermöglichen können.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren mit zellinterner enzymatischer Cofaktorregenerierung von NADP⁺, da ein solches System trotz eines breiten möglichen Einsatzbereiches mit NADP⁺-abhängigen Oxidoreduktasen bis heute noch nicht existiert. Durch das rationale Proteindesign bzw. die erfolgreiche ortsgerichtete Mutagenese der NOX aus *L. brevis* konnte die Bereitstellung leistungsfähiger enzymatischer Biokatalysatoren in Form der hergestellten NAD(P)H-Oxidasen für einen solchen Ganzzellbiokatalysator mit enzymatischer *in vivo*-Regenerierung von NADP⁺ realisiert werden. Ganzzellbiokatalysatoren wurden durch die Co-Expression der Gene der NADP⁺ abhängigen (*R*)-spezifischen ADHs aus *L. kefir* und *L. brevis* in Kombination mit der NOX-Mutante D177A/M179H zur *in vivo*-Cofaktorregenerierung von NADP⁺ konstruiert.

Bei der Verwendung der Ganzzellbiokatalysatoren in der Synthese von enantiomerenreinen Alkoholen konnte analog zur Verwendung isolierter Enzyme die nahezu vollständige stereoselektive Oxidation (> 98%) von 10 mM (*R*)-1-Phenylethanol erreicht werden, es wurde (*S*)-1-Phenylethanol mit hervorragender Enantiomerenreinheit ($ee > 98\%$) gewonnen. Im Vergleich zu den Biotransformationen mit Ganzzellbiokatalysatoren ohne Cofaktorregenerierungssystem zeigen die Ergebnisse, dass die NOX-Mutante D177A/M179H in der Lage ist, $NADP^+$ effektiv *in vivo* zu regenerieren.

Im Zuge dieser Arbeit gelang zum ersten Mal die Konstruktion von Ganzzellbiokatalysatoren mit *in vivo*-Cofaktorregenerierung von $NADP^+$. Die entwickelten NAD(P)H-Oxidasen eröffnen die biotechnologisch sehr interessante Möglichkeit, eine breite Palette an Ganzzellbiokatalysatoren mit alternativen $NADP^+$ -abhängigen Oxidoreduktasen wie z.B. Alkohol-Dehydrogenasen, Aminosäure-Dehydrogenasen oder auch Hydroxysäure-Dehydrogenasen herzustellen und für oxidative Zwecke einzusetzen.

2.2.3 Beurteilung des enzymatischen $NADP^+$ -Regenerierungssystems

Die bisher bekannten und durchgeführten Methoden zur enzymatischen Regenerierung von $NADP^+$ mittels ADH, LDH oder GluDH [Weckbecker et al., 2010; Carrea et al., 1985; Richter et al., 2011; Lee und Whitesides, 1985; Fossati et al., 2006; Hollmann et al., 2011] weisen entscheidende Nachteile für den Einsatz in der Biotechnologie auf. So ist beim Einsatz dieser Enzyme ist die Zugabe eines Co-Substrates zwingend notwendig. Externe Co-Substrate können die Prozesskosten beträchtlich erhöhen, im Falle der GluDH sind die Kosten für das Co-Substrat α -KG sehr hoch (77 € M^{-1} SIGMA-ALDRICH 03/2014). Weiterhin ist es möglich, dass eingesetzte Co-Substrate aufgrund der oft hohen erforderlichen molaren Überschüsse einen negativen Einfluss auf die Aktivität bzw. Stabilität des eigentlichen Synthesenzym ausüben. Der zweite wichtige Nachteil für eine Anwendung ist die Bildung von Neben-Produkten durch die jeweilige Regenerierungsreaktion wie z.B. Isopropanol, L-Lactat oder L-Glu, welche die Produktisolierung nach abgeschlossener Reaktionsführung deutlich erschweren und komplizieren können [Chenault et al., 1988].

NOXs besitzen verschiedene Eigenschaften, die sie für einen Einsatz in der Cofaktorregenerierung in Hinsicht auf ökonomische und ökologische Aspekte besonders interessant und geeignet erscheinen lassen. Im Vergleich zu den herkömmlichen Systemen zur Regenerierung von NADP⁺, bietet der Einsatz dieses Systems mehrere entscheidende Vorteile: NOXs sind in der Lage, unter relativ milden Reaktionsbedingungen die Oxidation des Cofaktors durchzuführen, wobei sie molekularen Sauerstoff als leicht und günstig verfügbares Reaktionsäquivalent nutzen. Der Zusatz eines weiteren Substrates ist nicht erforderlich und als Nebenprodukt der Reaktion entsteht lediglich Wasser. Da die Oxidation des Cofaktors irreversibel verläuft, ist die Regenerierungsreaktion in der Lage, das Reaktionsgleichgewicht einer thermodynamisch ungünstigen Oxidationsreaktion auf die Seite der Produktbildung hin zu verschieben. Eine vergleichende Zusammenfassung der NOX und anderen NADP⁺-Regenerierungssystemen ist in Tabelle 75 wiedergegeben.

Tabelle 75: Vergleich der NOX mit anderen enzymatischen NADP⁺-Regenerierungssystemen (¹ Fossati et al., 2006; ² Richter et al., 2011; ³ Carrea et al., 1985).

System	(Co-)Substrat	Produkt	Vorteile	Nachteile
NOX	O ₂	H ₂ O	Irreversibel Breiter pH-Bereich O ₂ als Co-Substrat Kein Nebenprodukt Einfache Produktisolierung	
ADH ¹	Aceton	Isopropanol		Reversibel Hoher molarer Überschuss an Substrat erforderlich
LDH ²	Pyruvat	L-Lactat		Nebenproduktbildung
GluDH ³	α-KG	L-Glu		Einfluss von Substrat und Produkt auf Enzyme Erschwerte Produktisolierung

Aus der Serie an konstruierten Mutanten, erscheinen die Mutanten D177A/M179H und G159S/D177A/A178G/M179H besonders interessant in Hinsicht auf die ermittelten kinetischen Parameter. Im Vergleich zu den anderen hergestellten NOX-Varianten zeigt die Oxidase D177A/M179H die höchste katalytische Aktivität sowie Affinität gegenüber NADPH. Insgesamt weist das Enzym exzellente kinetische Eigenschaften auf, so beträgt der v_{\max} in der Oxidation von NADPH $97,8 \text{ U mg}^{-1}$, was im Vergleich zu den bisher in der Literatur beschriebenen NAD(P)H-Oxidase relativ hoch ist. Ebenfalls zeigt diese Mutante eine signifikant höhere katalytische Aktivität (k_{cat}) mit NADPH, mit Ausnahme zu einer NOX-Mutante aus *L. plantarum* [Park et al., 2011]. In Tabelle 76 sind vergleichend die kinetischen Parameter der NAD(P)H-Oxidase D177A/M179H sowie G159S/D177A/A178G/M179H und die publizierten Daten anderer NAD(P)H-Oxidase dargestellt.

Tabelle 76: Vergleich der kinetischen Parameter der NOX-Mutanten D177A/M179H sowie G159S/D177A/A178G/M179H mit den publizierten Daten anderer NAD(P)H-Oxidase. (¹ Jia et al., 2008; ² Harris et al., 2005; ³ Riebel et al., 2002; ⁴ Nisar et al., 2013; ⁵ Park et al., 2011), (n.p.: nicht publiziert).

NOX	v_{\max} (U mg ⁻¹)		K_M (μM)		k_{cat} (s ⁻¹)		k_{cat}/K_M (μM ⁻¹ s ⁻¹)		k_{cat}/K_M
	NADH	NADPH	NADH	NADPH	NADH	NADPH	NADH	NADPH	
D177A/M179H	111,7	97,8	58	17	92,6	81,1	1,6	4,7	2,9
G159S/D177A/A178G/M179H	17,6	29,6	977	153	14,6	24,5	0,015	0,16	10,7
<i>T. profundus</i> ¹	7,0	4,0	53,1	12,1	6,2	2,5	0,12	0,20	1,8
<i>P. horikoshii</i> ²	n.p.	n.p.	73,0	13,0	8,2	2,0	0,11	0,15	1,3
<i>L. sanfranciscensis</i> ³	39,3	11,0	6,1	6,7	27,0	8,5	4,4	1,3	0,29
<i>T. kodakaraensis</i> ⁴	83,0	61,0	24,0	25,0	68,3	50,2	2,9	2,0	0,71
<i>L. plantarum</i> ⁵	n.p.	n.p.	2,5	9,7	34,0	114,0	13,2	11,7	0,88

Basierend auf den publizierten kinetischen Parametern zeigt lediglich eine der bislang bekannten NOX eine eindeutige Spezifität für NADPH. Für das Enzym aus *T. profundus* betragen k_{cat} und k_{cat}/K_M für NADPH 5 s^{-1} und $0,2 \text{ μM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [Jia et al., 2008] mit einem $(k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{NADPH}}/(k_{\text{cat}}/K_M)_{\text{NADH}}$ von 1,8.

Die Mutante G159S/D177A/A178G/M179H zeigt mit NADPH eine um den Faktor 10,7 höhere katalytische Effizienz als mit NADH. Im Vergleich zu anderen Enzymen besitzt die Mutante G159S/D177A/A178G/M179H die höchste Spezifität für NADPH, die jemals für eine NOX berichtet wurde.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit über das erfolgreiche Sequenz- und Strukturbasierte rationale Proteindesign der NOX aus *L. brevis* berichtet. Die Ergebnisse der durchgeführten Biotransformationen zeigen, dass sich die konstruierten Mutanten sehr gut für die Regenerierung des Cofaktors NADP⁺ eignen und in der Lage sind, einen biotechnologischen Prozess in Hinsicht auf die Cofaktorkosten ökonomisch zu gestalten. Hierbei können sowohl isolierte Enzyme als auch Ganzzellbiokatalysatoren Verwendung finden. Die identifizierten Aminosäurepositionen, welches ausschlaggebend für die Änderung der Substratspezifität der NOX von NADH hin zu NADPH sind, befinden sich alle in einem hoch konservierten Bereich der Cofaktorbinstelle. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit sollte es möglich sein, mittels gezielter Mutagenese der korrespondierenden Positionen die strikte NADH-Spezifität anderer NOXs zu verändern, um die Akzeptanz von NADPH als Substrat zu ermöglichen.

3. Ausblick

Folgende Punkte bieten sich für weiterführende Arbeiten an:

3.1 Darstellung alternativer Ketosäuren mittels GluOX

Für die GluOX aus *Streptomyces* sp. X-119-6 wurde durch Utsumi die gezielte Veränderung der Substratspezifität beschrieben [Utsumi et al., 2012]. Basierend auf der durch Arima gelösten Struktur [Arima et al., 2009] der GluOX, konnte das Substratspektrum mit Methoden des rationalen Proteindesigns erfolgreich erweitert werden. So sind verschiedene Enzym-Varianten in der Lage, neben L-Glu auch andere L-Aminosäuren wie L-Phe, L-His, L-Leu, L-Asp sowie L-Arg als Substrat in der oxidativen Desaminierung zu akzeptieren [Utsumi et al., 2012]. Durch die Verwendung der bekannten Mutanten der GluOX oder durch die Herstellung weiterer Varianten sollte es möglich sein, das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren in Richtung einer Plattformtechnologie auszubauen, um neben α -KG auch andere interessante Ketosäuren ausgehend von den verfügbaren L-Aminosäuren herzustellen.

3.2 Darstellung von D-Glutamat

Das GluOX basierte Verfahren bietet weiterhin die biotechnologisch sehr interessante Möglichkeit zur enzymatischen Herstellung von D-Glutamat aus D/L-Glutamat durch die spezifische Oxidation der L-Aminosäure. Das Interesse an D-Aminosäuren ist hoch, da sie als Bausteine für Antibiotika, Peptidhormone und Pestizide verwendet werden können. Aufgrund der oft sehr hohen Anforderungen an die Reinheit der produzierten D-Aminosäure wäre ein enzymatischer Prozess zur Enantiomerentrennung mittels einer GluOX besonders geeignet.

3.3 Biotransformation erhöhter Substratkonzentrationen an L-Glu mittels Ganzzellkatalysator und Immobilisat

In zukünftigen Versuchen sollten sowohl der konstruierte Ganzzellkatalysator als auch das Immobilisat in der Biotransformation erhöhter Substratkonzentrationen getestet werden. Auch die optimalen Bedingungen für die Immobilisierung sowie die optimale Enzymbeladung des Immobilisates müssen noch experimentell ermittelt werden.

3.4 Biotransformation von L-Glu mittels GluDH

Der vermeintliche Nachteil der unvollständigen Umsätze durch die GluDHs aufgrund der festgestellten Produktinhibierung könnte wahrscheinlich verfahrenstechnisch sehr einfach durch eine kontinuierliche Produktabtrennung während der Biotransformation gelöst werden. Diese Vermutung wird durch die gekoppelte Biotransformation mit der MenD zur Synthese von 4-Hydroxy-5-oxo-hexansäure gefestigt, in der ein vollständiger Umsatz von 30 mM L-Glu durch die GluDH aus *C. difficile* erzielt werden konnte, da das inhibierend wirkende Zwischenprodukt α -KG kontinuierlich durch die nachgeschaltete Synthesereaktion der Reaktionslösung entzogen wurde. Neben dem Einsatz der MenD ist es weiterhin denkbar, das GluDH/NOX-System mit alternativen Enzymen zu koppeln, die α -KG als Substrat nutzen, um das entstehende α -KG *in situ* in weitere sekundäre Produkte umzuwandeln. So ist z.B. die Synthese von Hydroxyketoglutarat, einer für die chemische und pharmazeutische Industrie ebenfalls sehr interessanten Verbindung, durch den Einsatz einer α -KG Reduktase möglich. Aufgrund der gekoppelten Synthese und der damit verbundenen kontinuierlichen *in situ*-Produktabtrennung sind in solchen Biotransformationen auch bei höheren Substratkonzentrationen deutlich höhere Gesamtumsatzraten zu erwarten.

3.5 NOX aus *L. brevis* - Entwicklung einer rein NADPH-spezifischen NOX

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit über das erfolgreiche Sequenz- und Strukturbasierte rationale Proteindesign der NOX aus *L. brevis* berichtet. Alle hergestellten Einfach-, Doppel- und Mehrfach-Mutanten zeigten aufgrund der deutlich voneinander abweichenden Aktivität und Affinität gegenüber NADH und NADPH eine unterschiedliche Spezifität für NADH bzw. NADPH auf.

Die G159S/D177A/A178G/M179H Mutante zeigt gegenüber NADPH eine um den Faktor 6 höhere Affinität und um den Faktor 10,7 höhere katalytische Effizienz auf gegenüber NADH. Im Vergleich zu anderen NAD(P)H-Oxidasen, besitzt die Mutante G159S/D177A/A178G/M179H damit die höchste Spezifität für NADPH, die jemals für eine NAD(P)H-Oxidase berichtet wurde. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit könnte es möglich sein, mittels weiterer gezielter Mutagenese die Substratspezifität der NOX so zu verändern, dass die Bindung und Oxidation von NADH verhindert wird und das Enzym eine strikte NADPH-Spezifität aufweist. Der Bedarf an solch einer ausschließlich NADPH als Substrat akzeptierenden Oxidase für die Cofaktorregenerierung ist durchaus gegeben.

Auf dem Gebiet der Stereo-inversion von racemischen Alkoholen, d.h. Umwandlung eines racemischen Gemisches in ein reines Enantiomer, wurden in den letzten Jahren beträchtliche Fortschritte erzielt. Hierbei wird das eine Enantiomer eines Alkohols selektiv zum entsprechenden Keton oxidiert, welches anschließend wiederum selektiv zum anderen Enantiomer reduziert wird [Romano et al., 2012, Xie et al., 1999]. Eine Möglichkeit, dieses Ziel zu erreichen, besteht darin, zwei ADHs mit entgegengesetzter Stereoselektivität und unterschiedlicher Spezifität für NAD(H) bzw. NADP(H) einzusetzen, wodurch eine ungewollte und unerwünschte Rückreaktion ausgeschlossen werden kann. Während der Stereo-inversion ist es notwendig, dass die beteiligten Cofaktoren durch zwei unterschiedliche Regenerierungssysteme zur Verfügung gestellt werden, die jeweils hoch spezifisch für NAD(H) bzw. NADP(H) sind und den jeweils anderen Cofaktor unangetastet lassen. Der große Vorteil eines solchen kombinierten Verfahrens ist es, dass es in einer sogenannten „Eintopfreaktion“ durchgeführt werden kann und eine zeitliche oder räumliche Trennungen zwischen der Reduktions- und Oxidationsreaktion nicht erforderlich ist.

V Zusammenfassung

Entwicklung enzymatischer Verfahren zur Darstellung von α -Ketoglutarat

α -Ketoglutarat (α -KG) ist von großer industrieller Bedeutung für die chemische und pharmazeutische Industrie. Bisher wurde α -KG auf chemischem Wege oder mit Hilfe von fermentativen Verfahren hergestellt, wobei beide Synthesemethoden verschiedene Nachteile wie hohe Prozesskosten, Einsatz toxischer Chemikalien und Katalysatoren sowie Nebenproduktbildung mit sich bringen.

Eine interessante, bisher jedoch kaum beachtete, Syntheseroute stellt die Herstellung mittels enzymatischer Biotransformation von L-Glutamat (L-Glu) dar, ein außerordentlich preisgünstiges und in großen Mengen verfügbares Ausgangssubstrat. Aufgrund der hohen Bedeutung von α -KG und der kostengünstigen Verfügbarkeit der korrespondierenden Aminosäure L-Glu sollten im Verlauf dieser Arbeit enzymatische Verfahren zur Darstellung von α -KG aus L-Glu entwickelt werden. Zu diesem Zweck wurden die Enzyme L-Glutamat-Dehydrogenase (GluDH), L-Glutamat-Oxidase (GluOX) sowie L-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) als Biokatalysatoren in der Biotransformation eingesetzt. Hierbei unterscheiden sich die Enzyme deutlich hinsichtlich der Art der katalysierten Reaktion, den benötigten Cofaktoren bzw. Co-Substraten sowie den entstehenden sekundären Produkten, so dass jedes Enzym individuelle Anforderungen an die Bedingungen der Biotransformation stellt. Nach dem „proof of concept“ wurden verschiedene Parameter untersucht, um die Bedingungen der Biotransformation den Erfordernissen der unterschiedlichen biokatalytischen Teilreaktionen (Cofaktor- und/oder Co-Substrat-Regenerierung) anzupassen und optimale Verhältnisse zu schaffen.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente verdeutlichen, dass die GluOX in der Biotransformation von L-Glu mit Abstand die besten Ergebnisse liefert. Die Biotransformationen von L-Glu unter Verwendung von GluDH bzw. GPT erzielten im Vergleich deutlich niedrigere Umsätze, Produktkonzentration und Raum-Zeit-Ausbeuten. Die niedrigen Umsätze und Produktkonzentrationen der Biotransformationen mittels GluDH sind vor allem auf eine relativ starke Inhibierung durch die Reaktionsprodukte α -KG und Ammonium zurückzuführen. Im Falle der GPT unter *in situ*-Regenerierung des Aminogruppen-Akzeptors sind die niedrigen erzielten Umsätze nicht auf einer Limitierung des eigentlichen Synthesenzym begründet, sondern vielmehr auf einer Limitierung der gekoppelten Co-Enzyme, so dass der Aminogruppen-Akzeptor nur unzureichend regeneriert und wieder für die Transaminierungsreaktion bereitgestellt wird.

Aus der Reihe der in dieser Arbeit untersuchten Enzyme erzielte die GluOX mit Abstand die besten Ergebnisse in der Biotransformation von L-Glu zu α -KG, es wurden vollständige Umsätze und hohe Produktausbeuten erreicht. Hierbei wurden sowohl isolierte Enzyme, immobilisierte Enzyme als auch ein Ganzzellkatalysator erfolgreich in der Biotransformation eingesetzt. Katalase zum *in situ*-Abbau von Wasserstoffperoxid aus der Reaktionslösung konnte hierbei neben der Protektion des Zielproduktes α -KG eine hohe Stabilität der Biokatalysatoren garantieren. Im Vergleich zu den bisher publizierten biotechnologischen Verfahren liefert das GluOX-Verfahren mit ca. 70 g l⁻¹ eine durchaus vergleichbare oder sogar deutlich höhere Produktendkonzentration verbunden mit einer signifikant verbesserten Raum-Zeit-Ausbeute von 1,4 g l⁻¹ h⁻¹ bzw. 32,8 g l⁻¹ d⁻¹. Zusammenfassend scheint die enzymatische Biotransformation von L-Glu unter Verwendung einer GluOX eine unter ökologischen und ökonomischen Gesichtspunkten höchst interessante und konkurrenzfähige Synthesealternative für α -KG darzustellen.

„Protein Engineering“ der NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis*

Nach dem heutigen Stand der Technik existieren kaum funktionelle enzymatische Regenerierungssysteme für die oxidierten Nicotinamid-Cofaktoren NAD^+ und NADP^+ , wobei insbesondere die Regenerierung von NADP^+ eine große Herausforderung darstellt. Um ein geeignetes enzymatisches Regenerierungssystem für NADP^+ zu entwickeln und um Zusammenhänge von Struktur und Funktion der NOX aus *L. brevis* aufzuklären, war es ein wesentliches Ziel dieser Arbeit, mittels Methoden des „protein engineering“ die Substratspezifität der NOX zu verändern, um die Oxidation von NADPH zu ermöglichen. Weiterhin war die Entwicklung eines Ganzzellbiokatalysators mit zellinterner enzymatischer NADP^+ -Regenerierung von größerer Bedeutung, da ein solches System bis heute noch nicht realisiert und beschrieben wurde, obwohl eine breite Anwendung in Kombination mit NADP^+ abhängigen Enzymen vorstellbar ist.

Durch die Strukturanalyse der Wildtyp-NOX sowie den Struktur- und Sequenzvergleich mit anderen NAD(H)-, NADP(H)- und NAD(P)(H)-abhängigen Pyridin-Nucleotid-Disulfid Oxidoreduktasen (PNDOR) gelang es, Kenntnisse über den NADH-Bindungsmechanismus und die Struktur-funktionsbeziehungen des Enzyms zu erlangen, so dass die Aminosäuren G159, D177, A178 und M179 identifiziert werden konnten, welche für die strikte NADH-Spezifität und die Diskriminierung der NADPH-Bindung in der NOX aus *L. brevis* von Bedeutung sind. Diese Aminosäuren wurden mittels ortsgerechter Mutagenese gezielt gegen andere ausgetauscht, die sich sowohl in Größe, Hydrophobizität als auch in Ladung deutlich von den natürlich vorkommenden unterscheiden.

Hierdurch gelang es Mehrfachmutanten zu generieren, die sowohl eine hohe katalytische Aktivität als auch Affinität gegenüber NADPH aufweisen. Im Vergleich zu den meisten der bisher in der Literatur beschriebenen NAD(P)H-Oxidasen weist die Mutante D177A/M179H mit einem k_{cat} von $81,8 \text{ s}^{-1}$ und einem $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ von $4,7 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ sowohl eine signifikant höhere katalytische Aktivität als auch Effizienz mit NADPH auf. Die Affinität dieser NOX-Mutante gegenüber dem unnatürlichen Substrat NADPH ($K_{\text{M}} 17 \mu\text{M}$) ist deutlich höher als die der Wildtyp-NOX gegenüber dem natürlichen Substrat NADH. Die katalytische Effizienz mit NADPH beträgt 63,4 % der Ausgangeffizienz des Wildtyp-Enzyms mit NADH. Basierend auf den bisher publizierten kinetischen Parametern ist lediglich eine NAD(P)H-Oxidase als eindeutig NADPH-spezifisch beschrieben. Die Mutante G159S/D177A/A178G/M179H zeigt eine katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) mit NADPH ($0.160 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), die deutlich höher ist als mit NADH ($0.015 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), mit einem $(k_{\text{cat}}/K_{\text{M}})_{\text{NADPH}}/(k_{\text{cat}}/K_{\text{M}})_{\text{NADH}}$ Wert von 10,7. Somit besitzt diese Mutante die höchste Spezifität für NADPH, die jemals für eine NAD(P)H-Oxidase berichtet wurde.

Verschiedene NOX-Mutanten wurden hinsichtlich der präparativen Anwendung zur *in situ*-Regenerierung von NADP^+ bzw. NAD^+ anhand der Synthese von enantiomerenreinen Alkoholen charakterisiert. Hierzu wurden unter Verwendung isolierter Enzyme gekoppelte Biotransformationen von *rac*-1-Phenylethanol mit Hilfe der NADP^+ -abhängigen (*R*)-spezifischen Alkohol-Dehydrogenase (ADH) aus *Lactobacillus kefir* und *Lactobacillus brevis* sowie der NAD^+ -abhängigen (*S*)-spezifischen ADH aus *Rhodococcus ruber* durchgeführt. Durch den Einsatz verschiedener NOX-Mutanten zur *in situ*-Cofaktorregenerierung konnte mit allen drei ADHs eine quantitative bzw. nahezu quantitative stereoselektive Oxidation des jeweiligen (*R*)- bzw. (*S*)-Alkohols erreicht werden, mit *ee*-Werten zwischen 97 und 100 %. In Abhängigkeit von der eingesetzten Cofaktor- und Substratkonzentration konnten hierbei „total turnover numbers“ (TTN) für NADP^+ von annähernd 500 bzw. 1000 erreicht werden.

Ebenfalls wurden Ganzzellbiokatalysatoren durch die Co-Expression der NADP⁺-abhängigen (*R*)-spezifischen ADHs aus *L. kefir* bzw. *L. brevis* sowie der NOX-Mutante D177A/M179H zur Regenerierung des Cofaktors konstruiert. Bei der Verwendung der Ganzzellbiokatalysatoren in der Synthese von enantiomerenreinen Alkoholen konnte analog zur Verwendung isolierter Enzyme die nahezu vollständige stereoselektive Oxidation von (*R*)-1-Phenylethanol erreicht werden (*ee*-Wert für (*S*)-1-Phenylethanol > 98%). Nach aktuellem Kenntnisstand gelang damit zum ersten Mal die Konstruktion von Ganzzellbiokatalysatoren mit *in vivo*-Cofaktorregenerierung von NADP⁺.

Die entwickelten NOX-Mutanten eröffnen somit die biotechnologisch sehr interessante Möglichkeit, neben dem Einsatz als isoliertes Enzym eine breite Palette an Ganzzellbiokatalysatoren mit alternativen NADP⁺-abhängigen Oxidoreduktasen herzustellen und für oxidative Zwecke einzusetzen. Die Ergebnisse der durchgeführten Biotransformationen zeigen, dass sich die konstruierten NOX-Mutanten für die *in situ*-Regenerierung des Cofaktors NADP⁺ eignen und in der Lage sind, einen biotechnologischen Prozess in Hinsicht auf die Cofaktorregenerierung ökonomisch und ökologisch zu gestalten.

VI Summary

Development of enzymatic processes for the production of α -KG

The production of α -ketoacids, in special α -ketoglutarate (α -KG), is of major interest for the chemical and pharmaceutical industry. Up to date α -KG can be produced by chemical synthesis or via fermentation with different bacteria and yeast. The chemical methods available to date, have different disadvantages like low productivity, high cost and the production of toxic compounds and the fermentation methods in general have the disadvantage of a low substrate related product yield, because a part of the substrate is converted to biomass and different by-products.

A promising new method for the biotechnological production of α -KG is the enzymatic biotransformation of L-glutamate (L-Glu) to α -KG. L-Glu has flavour enhancing activity and the monosodium salt is widely used as a seasoning for cooking and as a food additive. This amino acid can easy produced in high amounts via fermentation with *Corynebacterium glutamicum* and present an excellent low budget-priced and bulky precursor. Therefore the aim of our work was the development of enzymatic biotransformation processes for the production of α -KG from L-Glu. For this purpose three kinds of enzymes including L-glutamate dehydrogenase (GluDH), L-glutamate oxidase (GluOX) and L-glutamate pyruvate transaminase (GPT) have been used as biocatalysts in the biotransformation of L-Glu to α -KG. The enzymes differ fundamentally with respect to the type of catalysed reaction, the need of cofactors as well as cosubstrates and the production of by-products. After concerning the proof of concept, different parameters of the biotransformations were investigated to find the optimal conditions for enzymatic transformation of L-Glu to α -KG, in special with respect to cofactor- and cosubstrate regeneration. Biotransformations were carried out and α -KG was obtained with high recovery and productivity through the enzymatic oxidation of L-Glu catalyzed by GluOX. The approaches using GluDH and GPT both showed disadvantages like low conversion rate and product/space-time yield. For GluDH, the low conversion rate and product yield can be correlated with product inhibition of the biocatalysts by the products α -KG and ammonia. Inhibition by one reaction product is not complete, but α -KG and ammonia showed a strong synergetic inhibition effect. In the case of GPT the situation is more complex, low conversion rate and product yield are caused by a limitation of the coenzymes used for cosubstrate regeneration instead a limitation of the main biocatalyst.

Biotransformation of L-Glu to α -KG catalysed by GluOX were performed with various L-Glu concentrations and α -KG was obtained with high recovery and productivity. Besides isolated enzymes, immobilized enzymes and a whole-cell biocatalyst were used successfully in the biotransformation. To avoid degradation of the ketoacid product and biocatalyst inactivation, catalase was used as *in situ* H_2O_2 degrading system. With isolated enzymes, no difference was found between unprocessed and processed form of GluOX with respect to conversion rate and product yield. Using the whole-cell biocatalyst, permeabilization treatment with toluol showed no positive effect. When compared to presently known and reported biotechnological production processes, with α -KG amounts around 70 g l^{-1} the biotransformation of L-Glu using GluOX showed comparable or higher product concentrations and additional the space-time yield of $1.4 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ or $32.8 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ is significant higher. In summary, the biotransformation of L-Glu to α -KG catalyzed by GluOX seems to be a novel good working process for the biocatalytic production of α -KG, in special with respect to ecologically and economically aspects. Compared to the presently known and reported production processes via chemical or fermentation, the biotransformation of L-Glu to α -KG by GluOX is an attractive alternative with a good long-term competitive position.

„Protein Engineering“ of the NADH oxidase (NOX) from *Lactobacillus brevis*

For the enzymatic regeneration of the reduced nicotinamide cofactors NADH and NADPH, a set of useful and well known regeneration systems exist. In contrast, in the case of the oxidized cofactors NAD⁺ and NADP⁺, up to date only a few enzymes are known to be suitable and especially the regeneration of NADP⁺ remains a big challenge.

A promising approach for enzymatic regeneration of NAD⁺ is the use of NADH oxidase (NOX) from *Lactobacillus brevis*, which catalyses the oxidation of NADH to NAD⁺ with concomitant reduction of molecular oxygen. The enzyme is highly specific to NADH and fails to catalyse the reaction with NADPH. To investigate the structure-function relationships of the the strict NADH specificity and to alter the substrate specificity in the direction of NADPH oxidation, protein engineering of the substrate binding motif in NADH oxidase from *Lactobacillus brevis* has been done.

Based on informations derived from structure analysis of wild-type NOX as well as sequence and structure alignments with other pyridine nucleotide disulfide oxidoreductases with dual, the same or opposite cofactor preferences, residues G159, D177, A178 and M179 in the dinucleotide binding motif of NOX from *L. brevis* were identified, that presumably account for the observed strict NADH specificity and discrimination of NADPH binding and oxidation. Identified residues were mutated alone or in combination to investigate their role in discrimination of the cofactor specificity and to allow acceptance of NADPH as substrate.

The introduction of single mutations already introduced moderate levels of NADPH acceptance and the combination of positive mutations further increased NADPH activity and affinity. When compared to NAD(P)H oxidases from other sources, NADPH is bound very effective within the cofactor binding site the mutant D177A/M179H, which is shown by a K_M (0.017 mM), that is interestingly more than 2-fold lower than the one measured for the wild-type enzyme with its natural substrate NADH. Moreover, mutant D177A/M179H exhibit significant higher catalytic activity k_{cat} (81.8 s⁻¹) and efficiency k_{cat}/K_M (4.7 μM⁻¹ s⁻¹), when compared to other NOX. Based on its reported kinetic parameters, up to date just one known NOX shows a clear specificity for NADPH over NADH. Mutant G159S/D177A/A178G/M179H displayed a remarkable shift in its coenzyme specificity with a significant lower K_M value (0.153 mM) for NADPH than for NADH (0.977 mM) and a catalytic efficiency k_{cat}/K_M (0.160 s⁻¹ μM⁻¹), that was about 10-fold higher than for NADH (0.015 s⁻¹ μM⁻¹). G159S/D177A/A178G/M179H exhibits the highest specificity for NADPH over NADH ever reported, with a $(k_{cat}/K_M)_{NADPH}/(k_{cat}/K_M)_{NADH}$ of 10.7.

Practical applicability of the new NOX variants for the *in situ* regeneration of NADP⁺ and NAD⁺ was demonstrated by coupling with NADP⁺-dependent *R*-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir* and *Lactobacillus brevis* as well as NADP⁺-dependent *S*-specific alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus ruber* in the enantioselective oxidation of *rac*-1-phenylethanol to acetophenone. Starting with the *rac*-1-phenylethanol, using the free enzymes as biocatalyst, the *R*- or *S*-enantiomer could be oxidized quantitative or nearly quantitative, resulting in the *S*- or *R*-alcohol with an high enantiomeric excess (*ee*) between 94 % and 100 %. The effectiveness of the cofactor regeneration in the biotransformation process is described by high total turnover numbers (TTN) of the cofactor. Based on the applied cofactor concentration, TTNs of nearly 500 and 1000 for the cofactor NADP⁺ were reached.

In addition, we were successful in the construction and application of a whole-cell catalyst, co-expressing the NADP⁺-dependent alcohol dehydrogenase from *L. kefir* as well as *L. brevis* and NOX mutant D177A/M179H for *in situ* NADP⁺ regeneration. Analog to the use of free enzymes, the application of the whole-cell catalyst in the kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol was demonstrated to produce (*S*)-1-phenylethanol with high enantiomeric excess (*ee* > 98%). To the best of our knowledge, this is the first whole-cell biocatalyst with NADP⁺ regeneration, in special by NOX, ever reported, and this should open the way for the construction and application of a wide range of whole-cell biocatalysts with alternative NADP⁺-dependent oxidoreductases.

In summary, we were able to demonstrate the successful structure and sequence based rational protein engineering of NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*. Results shows, that mutant NAD(P)H oxidases are well suited for enzymatic *in situ* regeneration of NADP⁺ and can make a biotransformation process ecologically and economically in terms of cofactor costs. Based on the catalytic efficiency and the easy availability, NADPH oxidase is an attractive alternative for the regeneration of NADP⁺ and its application should help to extend the application range of nicotinamide cofactor-dependent oxidoreductases as biocatalyst, in special of NADP⁺-dependent dehydrogenases.

VII Anhang**1.1 Verwendete Klonierungsprimer**

Tabelle 77: Sequenzen der in dieser Arbeit eingesetzten Klonierungsprimer.

Enzym	Primer	Sequenz von 5' nach 3'
GluDH	GluDHBpfor	TGCCGGTCTCGCATGGCAGCCGATCAAAACGCCG
<i>B. pumilus</i>	GluDHBprev	CCTAGCGGCCGCTTAAATCCAGCCTCTGAAACGA GAAGCTTCAGCC
GluDH	GluDHCdfor	TGCCGGTCTCGCATGTCAGGAAAAGATGTAAATGT CTTCGAGATGGCGCAATC
<i>C. difficile</i>	GluDHCdrev	CATGGAGCTCTTAGTACCATCCTCTTAATTTTCATAG CTTCAGCAACTTTCTTAATTGAATGCATG
GluDH	GluDHTtfor	TGCCGGTCTCGCATGAAGAGCGAACCCCTTTCCT ACCTGG
<i>T. thermophilus</i>	GluDHTtrev	CATGGAGCTCTTACTAAGGGTATAGGCCCCGGAG GGC
GluDH	GluDHBsfor	TGCCGGTCTCGCATGTCAGCAAAGCAAGTCTCGA AAGATGAAGAAAAAGAAGCTC
<i>B. subtilis</i>	GluDHBsrev	CATGGAGCTCTTAGACCCATCCGCGGAAACGCGA TG
GluDH	GluDHKlfor	TGCCGGTCTCGCATGTTAAAAACTCCACTC
<i>K. lactis</i>	GluDHKlrev	CATGGAGCTCTCAAACGATTTCAAATCGCTTG
GluDH	GluDHFnfor	TGCCGGTCTCGCATGAGTAAAGAACTTTAAACCC ATTAGAAAGCGGACAAAAACAAGTTAAAAAAG
<i>F. nucleatum</i>	GluDHFnrev	CATGGAGCTCTTAGTACCATCCTCTAATTTTCATAG CTTCAGCTATTCTCTTAATAGATTTTCATATAAGTAG CTTGTCTA
GluDH	GluDHPpfor	GCTAATGGACCANNKACTCCAGAGGCTG
<i>P. pastoris</i>	GluDHPprev	CAGCCTCTGGAGTMNNTGGTCCATTAGC

(Fortsetzung nächste Seite)

(Fortsetzung der Tabelle 77)

Enzym	Primer	Sequenz von 5' nach 3'
GluDH	GluDHKtfor	TATGGGCCATGGTCGACAGACTCCAAG
<i>K. thermotolerans</i>	GluDHKtrev	CATGGAGCTCCTACAATCCCCGAGACTTGTA
AlaDH	AlaDHBsfor	ATGCTTTCCTCCCAAACTCAAAGGTGCC
<i>B. subtilis</i>	AlaDHBsrev	TTAAGCCAGAGCGAAATCCTCGGCTTCTC
GluOX	Gloxfor	TGCCGGTCTCGCATGATCATAGGGG
<i>Streptomyces</i> sp. X-119-6	Gloxrev	CGCGACTCGAGTTAAGCACCCGCC
Katalase HP11	KatK12forA	GGAATTCCATATGAACGAGATGACGTATGAACAG
<i>E. coli</i> K12	KatK12revA	CGCGACTCGAGTTAACTCGAGTCGCG
	KatK12forB	GCGCGAGCTCATGTGCGCAACATAAC
	KatK12revB	GAGGCGGCCGCTCAGGCAGGAA
NOX	NoxLbfor	TGCCGGTCTCGCATGTGCGCAACATAACGAAAAGAAC
<i>L. brevis</i>	NoxLbrev	CATGGAGCTCTCAGGCAGGAATTTGTCAATCTTAGG AATGCG

1.2 Verwendete Mutageneseprimer

Tabelle 78: Sequenzen der in dieser Arbeit eingesetzten Mutageneseprimer.

Enzym	Primer	Sequenz von 5' nach 3'
GluDH	Ser326for	GCTAATGGACCANNKACTCCAGAGGCTG
<i>C. difficile</i>	Ser326rev	CAGCCTCTGGAGTMNNTGGTCCATTAGC
NOX	G159Afor	CGGCTATATTGCCGCTGAACTAGCAG
<i>L. brevis</i>	G159Arev	CTGCTAGTTCAGCGGCAATATAGCCG
	G159Sfor	CGGCTATATTAGCGCTGAACTAGCAG
	G159Srev	CTGCTAGTTCAGCGCTAATATAGCCG
	D177Afor	CGTAACCTTAATTGCGGCGATGGACCGGG
	D177Arev	CCCGGTCCATCGCCGCAATTAAGGTTACG
	A178Gfor	CCTTAATTGATGGCATGGACCGGG
	A178Gev	CCCGGTCCATGCCATCAATTAAGG
	M179Hfor	CCTTAATTGATGCGCATGACCGGGTTATGCC
	M179Hrev	GGGCATAACCCGGTCATGCGCATCAATTAA GG
	D177A/H179Hfor	CGTAACCTTAATTGCAGCGCATGACCGGG
	D177A/H179Hrev	CCC GGT CAT GCG CTG CAA TTA AGG TTA CG
	A178G/H179Hfor	GTAACCTTAATTGATGGCCATGACCGGGTT ATGCC
	A178G/H179Hrev	GGGCATAACCCGGTCATGGCCATCAATTAA GGTTAC
	A178G/H179Rfor	GTAACCTTAATTGATGGCCGCGACCGGGTT ATGCC
	A178G/H179Rrev	GGGCATAACCCGGTCGCGGCCATCAATTAA GGTTAC
	D177R/H179Hfor	CGTAACCTTAATTAGGGCGCATGACCGGG
	D177R/H179Hrev	CCCGGTCATGCGCCCTAATTAAGGTTACG
	D177A/A178G/ H179Hfor	CGTAACCTTAATTGCGGGCCATGACCGGG
	D177A/A178G/ H179Hrev	CCCGGTCATGGCCCGCAATTAAGGTTACG

1.3 Codon usage Optimierung des *gluox* Gens

Im Abbildung 116 sind die ursprüngliche *gluox* Sequenz sowie die optimierte *gluox* Sequenz vergleichend dargestellt.

Abbildung 116: Alignment der Wildtyp *gluox* Sequenz sowie die optimierten *gluox* Sequenz (Programm ClustelW).

Wildtyp	ATGAACGAGATGACCTACGAGCAGCTGGCCCGGAACTGCTGCTGGTGGCCCCGGCGCC 60
Optimiert	ATGAACGAGATGACGTATGAACAGTTGGCAGTGAGCTTCTTTGGTTGGCCCGGCCCT 60 ***** ** ** ** **
Wildtyp	ACCAACGAGGACCTCAAGCTGCGGTACCTCGACGTGCTGATCGACAACGGACTCAATCCC 120
Optimiert	ACCAACGAAGATCTGAAGCTGCGTTATCTGGATGTCTCATTGACAATGGCTGAATCCG 120 ***** ** ** ****
Wildtyp	CCCGGACCGCCCAAGCGCATCTGATCGTGGCGCCGGTATCGCCGGCTGGTCGCCGGT 180
Optimiert	CCCGTCCACCTAAACGGATCCTTATCGTGGGTGCGGGGATTGCGGGCTTGTTCGGGC 180 ***** ** ** ****
Wildtyp	GACCTGCTGACCCGCGCCGGACACGACGTGACGATCCTGGAGGCCAACGCCAACCGGGTC 240
Optimiert	GATTACTGACTCGTGTGCTGGCCACGATGTAACAATTCTGGAAGCCAATGCGAATCGCGTG 240 ** * ***** ** ** ****
Wildtyp	GGCGGGCGGATCAAGACCTTCCACGCCAAGAAGGGCGAGCCGTCGCCGTTCCGCCACCCC 300
Optimiert	GGCGGACGGATCAAACCTTTCATGCAAAGAAAGGCGAACCGTCGCCATTGCGGGACCCCT 300 ***** ***** ** ** ****
Wildtyp	GCGCAGTACGCGGAGGGCGCGGATGCGCCTGCCAGCTTCCACCCGCTGACCCCTGGCG 360
Optimiert	GCGCAGTATGCGGAAGCTGGCGCCATGCGTCTGCCAAGTTTCCACCCGCTGACTCTGGCC 360 ***** ***** ** ** ****
Wildtyp	CTGATCGACAAACTCGGCCGAAGCGACGGCTGTTCTTCAACGTGACATCGATCCGCAG 420
Optimiert	TTAATCGACAAACTGGGCCGAAACGCCGCTGTTCTTCAACGTAGACATTGACCCCTCAG 420 * ***** ***** ** ** ****
Wildtyp	ACCGGCAACCAGGACGCGCCGGTCCCCCGGTGTTCTACAAGTCGTTCAAGGACGGCAAG 480
Optimiert	ACCGGCAACCAGGATGCGCCAGTGCCGCGCGGTGTTCTACAAGTCGTTAAAGATGGTAAA 480 ***** ***** ** ** ****
Wildtyp	ACCTGGACCAACGGCGCGCCAGCCCGGAGTTCAAGGAGCCGGACAAGCGCAACCACACC 540
Optimiert	ACCTGGACCAATGGAGCCCCGAGCCAGAAATTAAGAGCCCGATAAACGCAACCATACG 540 ***** ** ** ****
Wildtyp	TGGATCCGCACCAACCGCGAGCAGGTGCGGCGGCCAGTACGCCACGGACCCC--TCCA 598
Optimiert	TGGATCCGTACCAACCGCGAACAGTTTCGCGGGCCCAATATGCCACGGATCCGAGTTCG 600 ***** ***** ** ** ****
Wildtyp	GCATCAACGAGGGCTTCCACCTCACCGGCTGCGAGACCCGGCTGACCGTCTCGGACATGG 658
Optimiert	--ATCAATGAGGGTTCCATCTCACGGGTGTGAAACCCGCTGACTGTATCTGACATGG 658 ***** ***** ** ** ****
Wildtyp	TCAACCAGGCGCTGGAGCCGGTGC GCGACTACTACTCCGTGAAGCAGGACGACGGAACGC 718
Optimiert	TGAACCAAGCACTGGAGCCGGTGC GTGACTATTATAGCGTGAACAGGATGACGGAACCC 718 * ***** ** ** ****
Wildtyp	GGGTCAACAAGCCGTTCAAGGAATGGCTGGCGGGCTGGGCCGACGTCGTCGGCGACTTCG 778
Optimiert	GTGTGAACAAGCCGTTAAAGAATGGCTGGCGGGTGGGCAGATGTGGTTTCGCGATTTCG 778 * ** ***** ** ** ****

Wildtyp	GGATCGAGGTCTTCTACACCGGCGCCGGCCAGACCCAGAGTTGGCTGCGCGACCCGTACG	1798
Optimiert	GCATCGAAGTGTCTATAACCGGAGCCGGGCAAACGCAATCATGGCTGCGCGATCCGTATG	1798
	* * * * *	
Wildtyp	CGTGCGGAGAGGCGGCGGTCTACACCCCGCACCATGACCGCCTTCCACCTCGACGTGG	1858
Optimiert	CTTGCGGAGAAGCCGCCGTGTATACCCGCATCAGATGACTGCCTTTCATCTCGACGTG	1858
	* * * * *	
Wildtyp	TCCGCCCCGAGGGGCGGTTACTTCGCCGGTGAGCACGTGTCGCTGAAGCACGCCTGGA	1918
Optimiert	TTCGTCCGAGGGTCCCGTTTACTTTGCAGGGGAGCATGTCTCTCTGAAACACGCTTGA	1918
	* * * * *	
Wildtyp	TCGAGGGAGCGGTGGAACCGCCGTACGGGCCCATCGCCGTCAACGAGGCACCCGTGG	1978
Optimiert	TTGAGGGCGCTGTGAAACGGCGGTCCGCGCAGCAATTGCGGTCAACGAAGCGCCGTGG	1978
	* * * * *	
Wildtyp	GGGACACGGGCGTCACCGCGCCGCCGGTCCGCCGGGGCCCGCGGCAACGGAACCGA	2038
Optimiert	GTGATACAGGCGTAACCGCCCGCAGGCCGTCGCGGTGCGGCTGCGGCGACGGAACCCA	2038
	* * * * *	
Wildtyp	TGCGAGAGGAAGCACTGACGTATGA	2064
Optimiert	TGCGGAAGAAGCACTGACCAGTTAA	2064
	* * * * *	

VIII Literaturverzeichnis

Ahn, M. I. Y., Lee, B. M. U., & Kim, Y. S. (1997). Characterization and Cytotoxicity of L-Amino Acid Oxidase from the Venom of King Cobra (*Ophiopkagus hannah*). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29(6), 911–919.

Aileen, S., Eipper, A., Reetz, M. T., & Otte, N. (2003). Directed Evolution of an Enantioselective *Bacillus subtilis* Lipase. *Biocatalysis and Biotransformation*, 21(2), 67–73.

Anderson, B. M., Anderson, C. D., Vantassell, R. L., Lyerly, D. M., & Wilkins, T. D. (1993). Purification and Characterization of *Clostridium difficile* Glutamate Dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300(1), 483–488.

Andersson, J. O., & Roger, A. J. (2003). Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for lateral gene transfer within and between prokaryotes and eukaryotes. *BMC Evolutionary Biology*, 3, 1–10.

Andreadeli, A., Platis, D., Tishkov, V., Popov, V., & Labrou, N. E. (2008). Structure-guided alteration of coenzyme specificity of formate dehydrogenase by saturation mutagenesis to enable efficient utilization of NADP⁺. *FEBS Journal*, 275, 3859–3869.

Argyrou, A., & Blanchard, J. S. (2004). Flavoprotein disulfide reductases: advances in chemistry and function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 78, 89–142.

Arima, J., Sasaki, C., Sakaguchi, C., Mizuno, H., Tamura, T., Kashima, A., Inagaki, K. (2009). Structural characterization of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. *The FEBS Journal*, 276(14), 3894–3903.

Arima, J., Takashi, T., Kusakabe, H., Ashiuchi, M., Yagi, T., Tanaka, H., & Inagaki, K. (2003). Recombinant Expression, Biochemical Characterization and Stabilization through Proteolysis of an L-Glutamate Oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. *Journal of Biochemistry*, 134(6), 805–812.

Arnold, F. H. (2001). Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature*, 409, 253–257.

Arnold, F.H. Georgiou, G. (2003). Evaluating a Screen and Analysis of Mutant Libraries. *Humana Press*, 23, 85–97.

Arnold, F.H.; Georgiou, G. (2003). Generating Mutants Libraries Using Error-Prone PCR. *Humana Press*, 231, 3–9.

Arterburn, J. B. (2001). Selective oxidation of secondary alcohols. *Tetrahedron*, 57(593).

Asakura, Y., Kimura, E., Usuda, Y., Kawahara, Y., Matsui, K., Osumi, T., & Nakamatsu, T. (2007). Altered Metabolic Flux due to Deletion of *odhA* causes L-Glutamate Overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1308–1319.

Asano, Y. (1998). A Japanese Screening Approach: Selection of an Opine Dehydrogenase and Alkaline D-Peptidase. *New Frontiers in Screening for Microbial Biocatalysts*, (i), 19–28.

Asna, N. I., Park, H., Erdmann, H., & Sprinzp, M. (1995). NADH oxidase of *Thermus thermophilus* HB8 overproduced from *Escherichia coli*. *Protoplasma*, 184, 104–110.

Aurich, A., Stottmeister, U. (2006). Biotechnologische Gewinnung von Oxocarbonsäuren als Synthesebausteine. Abschlussbericht Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung.

Baker, P. J., Britton, K. L., Engel, P. C., Farrants, G. W., Lilley, K. S., Rice, D. W., & Stillman, T. J. (1992). Subunit Assembly and Active Site Location in the Structure of Glutamate Dehydrogenase. *PROTEINS Structure, Function, and Genetics*, 12, 75–86.

Bang-Ce, Y., Qing-Shan, L., You-Rong, L., Xiao-Bo, L., & Jun-Tang, Y. (1995). L-Glutamate biosensor using a novel l-glutamate oxidase and its application to flow injection analysis system. *Journal of Biotechnology*, 42(1), 45–52.

Barrett, D. G., Yousaf, M. N., Hill, C., Hill, C., & Carolina, N. (2008). Poly (triol α -ketoglutarate) as Biodegradable , Chemoselective , and Mechanically Tunable Elastomers. *Macromolecules*, 41, 6347–6352.

Basu, A. K., Chattopadhyay, P., Roychudhuri, U., & Chakraborty, R. (2006a). A biosensor based on co-immobilized L-glutamate oxidase and L-glutamate dehydrogenase for analysis of monosodium glutamate in food. *Biosensors & Bioelectronics*, 21(10), 1968–72.

Basu, A. K., Chattopadhyay, P., Roychudhuri, U., & Chakraborty, R. (2006b). Development of biosensor based on immobilized L-glutamate oxidase for determination of monosodium glutamate in food. *Indian Journal of Experimental Biology*, 44(5), 392–398.

Beigi, M., Loschonsky, S., Lehwald, P., Brecht, V., Andrade, S. L. a, Leeper, F. J., Müller, M. (2013). α -Hydroxy- β -keto acid rearrangement-decarboxylation: impact on thiamine diphosphate-dependent enzymatic transformations. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 11(2), 252–6.

Belitsky, B. R., & Sonenshein, a L. (1998). Role and regulation of *Bacillus subtilis* glutamate dehydrogenase genes. *Journal of Bacteriology*, 180(23), 6298–305.

Bellamacina, R. (1996). The nicotinamide dinucleotide binding motif: comparison of nucleotide binding proteins. *The FASEB Journal*, 10, 1257–1269.

Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H. (2000). The Protein Data Bank. *Nucl. Acids Res.*, 28, 235–242.

Berridge, M. V., & Tan., S. (2000). High-Capacity Redox Control at the Plasma Membrane of Mammalian Cells: Trans-Membrane, Cell Surface, and Serum NADH-Oxidases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2, 231–242.

Blitzke, T., Greif, D., Kernpe, R., Pink, M., Pulst, M., & Wilde, D. S. H. (1994). Synthesen auf der Basis von 2-Oxoglutarsäure. IV Regioselektive Synthese substituierter 2-(2-Methoxycarbonyl-2H-thiopyran-3-yl)glyoxylsäuremethylester. *Journal für praktische Chemie*, 336, 163–165.

Blitzke, T., Hartenstein, H., Sicker, H., & Wilde, D. (1993). Synthesen auf der Basis von 2-Oxoglutarsäure. III Synthese und Reaktionen von (E)-2-Oxoglutaconsäuredimethylester. *Journal für praktische Chemie*, 335, 683–686.

Blumenthal, K. M., & Smith, E. L. (1975). ALTERNATIVE SUBSTRATES FOR GLUTAMATE DEHYDROGENASES. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, 62(1), 78–84.

Böhm, P. A. (2013). Biokatalytische Oxidationsreaktionen unter in situ Cofaktorregenerierung mit einem Eisenporphyrin als biomimetische NAD(P)H-Oxidase. *Dissertation*.

Böhmer, a, Müller, A., Passarge, M., Liebs, P., Honeck, H., & Müller, H. G. (1989). A novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces endus*. Purification and properties. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 182(2), 327–332.

Boller, T., Meier, C., & Menzler, S. (2002). EUPERGIT Oxirane Acrylic Beads: How to Make Enzymes Fit for Biocatalysis. *Organic Process Research & Development*, 6, 509–519.

Bommarius, A., Schwarm, M., Stingl, K., Kottenhahn, M., Huthmacher, K., & Drauz, K. (1995). Synthesis and use of enantiomerically pure tert-leucine. *Tetrahedron Asymmetry*, 6, 2851–2888.

Bornscheuer, U. T., Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S., Moore, J. C., & Robins, K. (2012). Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, 485(7397), 185–194.

Bornscheuer, U. T., & Pohl, M. (2001). Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 137–143.

Böttcher, Horst and Bornscheuer, U. (2010). Protein engineering of microbial enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 274–282.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54.

Bradshaw, C., Hummel, W., & Wong, C.-H. (1992). *Lactobacillus kefir* Alcohol Dehydrogenase: A Useful Catalyst for Synthesis. *Journal of Organic Chemistry*, 57(5), 1532–1536.

- Brearley, G. M., Price, C. P., Atkinson, T., & Hammond, P. M. (1994). Purification and partial characterisation of a broad-range L-amino acid oxidase from *Bacillus carotarum* 2Pfa isolated from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41, 670–676.
- Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Keßeler, M., & Stürmer, R. (2004). Industrielle Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Zwischenprodukten. *Angewandte Chemie*, 116, 806–843.
- Britton, K. L., Yip, K. S. P., Sedelnikova, S. E., Stillman, T. J., Adams, M. W. W., Ma, K., Baker, P. J. (1999). Structure Determination of the Glutamate Dehydrogenase from the Hyperthermophile *Thermococcus litoralis* and its Comparison with that from *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Molecular Biology*, 293, 1121–1132.
- Brodelius, P., Nilson, K. & Mosbach, K. (1981). Production of α -Keto Acids Part I. Immobilized Cells of *Trigonopsis variabilis* Containing D-Amino Acid Oxidase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 308, 293–307.
- Brunhuber, N. M. W., & Blanchard, J. S. (1994). The Biochemistry and Enzymology of Amino Acid Dehydrogenases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 29(6), 415–467.
- Cadwell, R.C.; Joyce, G. F. (1992). Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.*, 2, 28–33.
- Camardella, L., Di, R., Antignani, A., Ciardiello, M. A., Coleman, J. K., Buchon, L., Russell, N. J. (2002). The Antarctic *Psychrobacter* sp . TAD1 has two cold-active glutamate dehydrogenases with different cofactor specificities. Characterisation of the NAD⁺ -dependent enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 131, 559–567.
- Cammaerts, D., & Jacobs, M. (1985). A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 163, 517–526.
- Carrea, G., Bovara, R., & Cremonesi, P. (1984). Enzymatic Preparation of 12-Ketochenodeoxycholic Acid with NADP Regeneration. *Biotechnology and Bioengineering*, 26, 560–563.

Carrea, G., Bovara, R., Longhi, R., Riva, S., & Bianco, V. M. (1985). Preparation of 12-ketochenodeoxy- cholic acid from cholic acid using dehydrogenase and glutamate dehydrogenase with NADP-cycling at high efficiency. *Enzyme and Microbial Technology*, 7, 597–600.

Case, C. L., Rodriguez, J. R., & Mukhopadhyay, B. (2009). Characterization of an NADH oxidase of the flavin-dependent disulfide reductase family from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Microbiology*, 155(Pt 1), 69–79.

Chenault HK, Simon ES, W. G. (1988). Cofactor regeneration for enzyme-catalyzed synthesis. *Biotechnologie and Genetic Engineering Reviews*, 6, 221–270.

Chernyavskaya, O. G., Shishkanova, N. V, Il'chenko, a P., & Finogenova, T. V. (2000). Synthesis of α -ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(2), 152–158.

Chien-Yuan, C., & Yuan-Chi, S. (1991). Amperometric L-glutamate sensor using a novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces platensis* NTU 3304. *Analytica Chimica Acta*, 243, 9–15.

Christen, P., & Mehta, P. K. (2001). From cofactor to enzymes. The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Chem. Rec.*, 1, 436–447.

Clairborne, A., Mallett, T., Yeh, J., Luba, J., & Parsonage, D. (2001). STRUCTURAL, REDOX, AND MECHANISTIC PARAMETERS FOR CYSTEINE-SULFENIC ACID FUNCTION IN CATALYSIS AND REGULATION. *Advances in Protein Chemistry*, 58, 215–276.

Commichau, F. M., Gunka, K., Landmann, J. J., & Stülke, J. (2008). Glutamate Metabolism in *Bacillus subtilis*: Gene Expression and Enzyme Activities Evolved To Avoid Futile Cycles and To Allow Rapid Responses to Perturbations of the System. *Journal of Bacteriology*, 190(10), 3557–64.

Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L., Gambacorta, A., Rosa, M. De, & Scandurra, R. (1991). Glutamate dehydrogenase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *European Journal of Biochemistry*, 467, 459–467.

- Coudert, M., & Vandecasteele, J. (1975). Characterization and Physiological Function of a Soluble L-Amino Acid Oxidase in *Corynebacterium*. *Archives of Microbiology*, 102, 151–153.
- De Rosa, G., Burk, T., & Swick, R. (1979). ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MITOCHONDRIAL ALANINE AMINOTRANSFERASE FROM PORCINE TISSUE. *Biochimica et Biophysica Acta*, 116–124.
- Debusk, R. M., & Ogilvie, S. (1984a). Nitrogen Regulation of Amino Acid Utilization by *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, 160(2), 493–498.
- Debusk, R. M., & Ogilvie, S. (1984b). Participation of an Extracellular Deaminase in Amino Acid Utilization by *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, 159(2), 583–589.
- Demir, A., Günay, A., & Debik, E. (2002). Ammonium removal from aqueous solution by ion-exchange using packed bed natural zeolite. *Water Environ. Res.*, 28(3), 329–336.
- Dermiki, M., Mounayar, R., Suwankanit, C., Scott, J., Kennedy, O. B., Mottram, D. S., Methven, L. (2013). Maximising umami taste in meat using natural ingredients: effects on chemistry, sensory perception and hedonic liking in young and old consumers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13), 3312–3321.
- Devaux-Basseguy, R., Bergel, A., & Comtat, M. (1997). Potential applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases in synthesis: A survey. *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 248–258.
- Dolin, M. (1953). The oxidation and peroxidation of DPNH₂ in extracts of *Streptococcus faecalis* 10C1. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 46, 483–485.
- Dunbrack, R.L. Jr. (2002). Rotamers libraries in the 21st century. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 12, 431-440
- Dym, O., & Eisenberg, D. (2001). Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Science*, 10, 1712–1728.
- Engel, P. C., & Chen, S. (1975). A Product-Inhibition Study of Bovine Liver Glutamate Dehydrogenase. *Biochem. J.*, 151, 305–318.

Engel, P. C. & Dalziel, K. (1969). Kinetic Studies of Glutamate Dehydrogenase with Glutamate and Norvaline as Substrates. *Biochem. J.*, 115, 621–631.

Engel, P. C. & Paradisi, F. (2010). 5.03 Novel Enzymes for Biotransformation and Resolution of Alpha-Amino Acids.

Ergan, F., Thomas, D., & Chang, T. M. (1984). Selection and microencapsulation of an “NADH-oxidizing” bacterium and its use for NAD regeneration. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 10, 61–71.

Eventoff, W., & Rossmann, M. G. (1976). The structure of dehydrogenases. *TIBS*, (1965), 227–230.

Felipe, F. L. De, & Hugenholtz, J. (2001). Purification and characterisation of the water forming NADH-oxidase from *Lactococcus lactis*. *International Dairy Journal*, 11, 37–44.

Felipe, F. L. (1998). Cofactor Engineering: a Novel Approach to Metabolic Engineering in *Lactococcus lactis* by Controlled Expression of NADH Oxidase. *Journal of Bacteriology*, 180(15), 3804–3808.

Fernandez-Lafuente, R., & Guisa, J. M. (1998). The coimmobilization of D-amino acid oxidase and catalase enables the quantitative transformation of D-amino acids (D-phenylalanine) into keto acids (phenylpyruvic acid). *Enzyme and Microbial Technology*, 23, 28–33.

Few, A., Fraser, M., & Gilby, A. (1957). THE INTRACELLULAR CATALASE OF *MICROCOCCLUS LYSEDEIKTICUS*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 24, 306–314.

Findrik, Z., Geueke, B., Hummel, W., & Vasić-Rački, Đ. (2006). Modelling of L-DOPA enzymatic oxidation catalyzed by L-amino acid oxidases from *Crotalus adamanteus* and *Rhodococcus opacus*. *Biochemical Engineering Journal*, 27(3), 275–286.

Findrik, Z., Presecki, A. V., & Vasić-Rački, Đ. (2007). Mathematical modelling of NADH oxidation catalyzed by new NADH oxidase from *Lactobacillus brevis* in continuously operated enzyme membrane reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(4), 275–280.

- Findrik, Z., & Vasić-Rački, Đ. (2008). Mathematical modelling of amino acid resolution catalyzed by L-amino acid oxidases from *Crotalus adamanteus* and *Crotalus atrox*. *Process Biochemistry*, 43(11), 1186–1194.
- Findrik, Z., Vasić-Rački, D., Geueke, B., Kuzu, M., & Hummel, W. (2005). Kinetic Modeling of Amino Acid Oxidation Catalyzed by a New D-Amino Acid Oxidase from *Arthrobacter protophormiae*. *Engineering in Life Sciences*, 5(6), 550–555.
- Findrik, Z., Presecki, A. V., & Vasić-Rački, Đ. (2012). The influence of aeration on activity and operational stability of two snake venom amino acid oxidases. *Biochemical Engineering Journal*, 60, 91–98.
- Finogenova, T. V. (1968). Keto-acid production by paraffin-oxidizing yeasts. *Mikrobiologiya*, 37(38-43).
- Finogenova, T. V., Morgunov, I. G., Kamzolova, S. V., & Chernyavskaya, O. G. (2005). Organic Acid Production by the Yeast *Yarrowia lipolytica*: A Review of Prospects. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(5), 418–425.
- Fossati, E., Polentini, F., Carrea, G., Riva, S., Molecolare, R., & Bianco, V. M. (2005). Exploitation of the Alcohol Dehydrogenase-Acetone NADP-Regeneration System for the Enzymatic Preparative-Scale Production of 12-Ketochenodeoxycholic Acid. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(6), 1216–1220.
- Fotheringham, I. G., Grinter, N., Pantaleone, D. P., Senkpeil, R. F., & Taylor, P. P. (1999). Engineering of A Novel Biochemical Pathway for the Biosynthesis of L -2-aminobutyric Acid in *Escherichia coli* K12. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7, 2209–2213.
- Geueke, B. (2002). Neue Aminosäureoxidasen aus *Rhodococcus opacus* und *Arthrobacter protophormiae*: Untersuchungen zur biochemischen Charakterisierung, Klonierung und Expression. *Dissertation*.
- Geueke, B., & Hummel, W. (2002). A new bacterial L-amino acid oxidase with a broad substrate specificity: purification and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 77–87.

Geueke, B., & Hummel, W. (2003). Heterologous expression of Rhodococcus opacus L-amino acid oxidase in *Streptomyces lividans*. *Protein Expression and Purification*, 28(2), 303–309.

Geueke, B., Riebel, B., & Hummel, W. (2003). NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*: a new catalyst for the regeneration of NAD. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(2), 205–211.

Gharbia, S. E., & Shah, H. N. (1991). Pathways of glutamate catabolism among *Fusobacterium* species. *Journal of General Microbiology*, 137(5), 1201–6.

Gomes, C. M., & Teixeira, M. (1998). The NADH oxidase from the thermoacidophilic archaea *Acidianus ambivalens*: isolation and physicochemical characterisation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243(2), 412–415.

Grimshaw, C. E., & Cleland, W. W. (1981). Kinetic Mechanism of *Bacillus subtilis* L-Alanine Dehydrogenase. *Biochemistry*, 20, 5650–5655.

Gröger, H., Chamouleau, F., Orogas, N., Rollmann, C., Drauz, K., Hummel, W., May, O. (2006). Enantioselective reduction of ketones with “designer cells” at high substrate concentrations: highly efficient access to functionalized optically active alcohols. *Angewandte Chemie-International Edition*, 45, 5677–5681.

Grover, A. K., & Kapoor, M. (2009). Studies on the Regulation, Subunit Structure, and some Properties of NAD-Specific Glutamate Dehydrogenase of *Neurospora*. *Journal of Experimental Botany*, 24(82).

Guex, N., Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18, 2714–2723.

Gutmann, M., Hoischen, C., & Krämer, R. (1992). Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1112, 115–123.

Halpern, B. P. (2000). The Use and Utility of Glutamates as Flavoring Agents in Foods. Glutamate and the Flavor of Foods. *The Journal of Nutrition*, 910–914.

- Hammer, B. A., & Johnson, E. A. (1988). Purification, properties, and metabolic roles of NAD⁺-glutamate dehydrogenase in *Clostridium botulinum* I13B. *Archives of Microbiology*, 150, 460–464.
- Harris, D. R., Ward, D. E., Feasel, J. M., Lancaster, K. M., Murphy, R. D., Mallet, T. C., & Crane, E. J. (2005). Discovery and characterization of a Coenzyme A disulfide reductase from *Pyrococcus horikoshii*. Implications for this disulfide metabolism of anaerobic hyperthermophiles. *The FEBS Journal*, 272(5), 1189–200.
- Hartenstein, H., Blitzke, T., Wilde, D., & Sicker, H. (1993). Synthesen auf der Basis von 2-Oxoglutarsäure. II Zur Synthese von Heterocyclen durch Reaktionen von 3-Brom-2-oxoglutar-säuredimethylester mit Binucleophilen. *Journal Für Praktische Chemie*, 335, 176–180.
- Hecht, H., Erdmann, H., Park, H. J., Sprinzl, M., & Schmidt, R. (1995). Crystal structure of NADH oxidase from *Thermus thermophilus*. *Nature*, 2, 1109–1114.
- Herles, C., Braune, A., & Blaut, M. (2002). Purification and characterization of an NADH oxidase from *Eubacterium ramulus*. *Archives of Microbiology*, 178(1), 71–4.
- Hermann, T. (2003). Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *Journal of Biotechnology*, 104(1-3), 155–172.
- Herrmann, K. M., & Somerville, R. C. (1983). Amino acids: Biosynthesis and genetic regulation. *Addison-Wesley Reading*.
- Heux, S., Cachon, R., & Dequin, S. (2006). Cofactor engineering in *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of a H₂O-forming NADH oxidase and impact on redox metabolism. *Metabolic Engineering*, 8(4), 303–14.
- Higuchi, S., Kobayashi, T., Kimura, K., Horikoshi, K., Kudo, T., & Laboratory. (1997). Molecular Cloning , Nucleotide Sequence and Expression in *Escherichia coli* of Hyperthermophilic Glutamate Dehydrogenase Gene from *Therrnococcus profundus*. *JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING*, 83(5), 405–411.

Hillmann, F., Riebe, O., Fischer, R.-J., Mot, A., Caranto, J. D., Kurtz, D. M., & Bahl, H. (2009). Reductive dioxygen scavenging by flavo-diiron proteins of *Clostridium acetobutylicum*. *FEBS Letters*, *583*(1), 241–245.

Hilt, G., Lewall, B., Montero, G., Utley, J. H. P., & Steckhan, E. (n.d.). Efficient in-situ redox catalytic NAD(P)⁺ regeneration in enzymatic synthesis using transition-metal complexes of 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its N-monomethylated derivative as catalysts. *Liebigs Ann/Recl.*, *11*, 2289–2296.

Hockenull, D. J. D., Wilkin, G. D., & Pinder, G. G. (1951). Production of ketoglutarate by *Penicillium chrysogenum*. *Nature*.

Hollmann, F., Arends, I. W. C. E., Buehler, K., & Bruno, B. (2011). Enzyme-mediated oxidations for the chemist. *Green Chemistry*, *13*, 226–265.

Hollmann, F., Hofstetter, K., Schmid, A., Care, D., Specialties, S., & Ag, G. (2006). Non-enzymatic regeneration of nicotinamide and flavin cofactors for monooxygenase catalysis. *Trends in Biotechnology*, *24*(4), 163–171.

Hollmann, F., & Schmid, A. (2004). Electrochemical Regeneration of Oxidoreductases for Cell-free Biocatalytic Redox Reactions. *Biocatalysis and Biotransformation*, *22*(2).

Hornby, D. P., & Engel, P. C. (1984). A kinetic study of the oxidative deamination of L-glutamate by *Peptostreptococcus asaccharolyticus* glutamate dehydrogenase using a variety of coenzymes. *European Journal of Biochemistry*, *560*, 557–560.

Hudson, R. C., & Daniel, R. M. (1993). L-glutamate dehydrogenases: Distribution, properties and mechanism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *106*(4), 767–792.

Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., Delcour, J., Vos, W. De, Hols, P., Hugenholtz, J., Delcour, J. (2000). *Lactococcus lactis* as a Cell Factory for High-Level Diacetyl Production. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(9).

Hummel, W. (1990). Reduction of acetophenone to R(+)-phenylethanol by a new alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *34*, 15–19.

- Hummel, W. (1999). Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments. *Trends in Biotechnology*, 17, 487-492.
- Hummel, W., & Kula, M. (1989). Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *European Journal of Biochemistry*, 184, 1–13.
- Hummel, W., Kuzu, M., & Geueke, B. (2003). An Efficient and Selective Enzymatic Oxidation System for the Synthesis of Enantiomerically Pure D-tert-Leucine. *Organic Letters*, 5, 3649–3650.
- Hummel, W., & Riebel, B. (2003). Isolation and biochemical characterization of a new NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*. *Biotechnology Letters*, 25(1), 51–54.
- Il'chenko, a P., Cherniavskaja, O. G., Shishkanova, N. V., & Finogenova, T. V. (2002). Metabolism of *Yarrowia lipolytica* grown on ethanol under conditions promoting the production of α -ketoglutaric and citric acids: a comparative study of the central metabolism enzymes. *Mikrobiologiya*, 71(3), 316–322.
- Ingoldsby, L. M., Geoghegan, K. F., Hayden, B. M., & Engel, P. C. (2005). The discovery of four distinct glutamate dehydrogenase genes in a strain of *Halobacterium salinarum*. *Gene*, 349, 237–244.
- Isobe, K., Tamauchi, H., Fuhshuku, K.-I., Nagasawa, S., & Asano, Y. (2010). A Simple Enzymatic Method for Production of a Wide Variety of D-Amino Acids Using L-Amino Acid Oxidase from *Rhodococcus* sp. AIU Z-35-1. *Enzyme Research*, 2010, 567210.
- Jaeger, E., Eggert, T., Eipper, A., & Reetz, T. (2001). Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Applied Microbiology Biotechnology*, 55, 519–530.
- Jahns, T. (1996). Unusually stable NAD-specific glutamate dehydrogenase from the alkaliphile *Amphibacillus xylanus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(1), 89–95.
- Jahns, T., & Kaltwasser, H. (1993). Properties of the cold-labile NAD⁺-specific glutamate dehydrogenase from *Bacillus cereus* DSM 31. *Journal of General Microbiology*, 139, 775–780.

Jahns, T., & Kaltwasser, H. (1994). Purification and properties of a heat-stable and cold-labile NAD-specific glutamate dehydrogenase from *Sporosarcina ureae*. *Archives of Microbiology*, 161(4), 531–534.

Jia, B., Lee, S., Pham, B. P., Cho, Y. S., Yang, J., Byeon, H., Cheong, G. (2010). An Archaeal NADH Oxidase Causes Damage to Both Proteins and Nucleic Acids under Oxidative Stress. *Molecules and Cells*, 29, 363–371.

Jia, B., Park, S.-C., Lee, S., Pham, B. P., Yu, R., Le, T. L., Cheong, G.-W. (2008). Hexameric ring structure of a thermophilic archaeon NADH oxidase that produces predominantly H₂O. *The FEBS Journal*, 275(21), 5355–66.

Jiang, R., Riebel, B. R., & Bommarius, A. S. (2005). Comparison of Alkyl Hydroperoxide Reductase (AhpR) and Water-Forming NADH Oxidase from *Lactococcus lactis* ATCC 19435. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 347(7-8), 1139–1146.

Jinap, S., & Hajeb, P. (2010). Glutamate. Its applications in food and contribution to health. *Appetite*, 55(1), 1–10.

Jones, J. B., & Taylor, K. E. (1976). Nicotinamide coenzyme regeneration. Flavin mononucleotide as an efficient, economical, and enzyme-compatible recycling agent. *Can. J. Chem.*, 54, 2969–2973.

Julliard, M., & Henri, R. (1986). Regeneration of NAD⁺ Cofactor by Photosensitized Electron Transfer in an Immobilized Alcohol Dehydrogenase System. *Biotechnology and Bioengineering*, XXVIII, 1774–1779.

Kamei, T., Asano, K., Kondo, H., Matsuzaki, M., & Nakamura, S. (1983). L-Glutamate Oxidase from *Streptomyces violascens*. I. Production, Isolation and Some Properties. *Chem. Pharm. Bull.*, 31(4), 1307–1314.

Kara, S., Schrittwieser, J. H., Hollmann, F., & Ansorge-schumacher, M. B. (2014). Recent trends and novel concepts in cofactor-dependent biotransformations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 1517–1529.

- Kataoka, M., Hashimoto, K.-I., Yoshida, M., Nakamatsu, T., Horinouchi, S., & Kawasaki, H. (2006). Gene expression of *Corynebacterium glutamicum* in response to the conditions inducing glutamate overproduction. *Letters in Applied Microbiology*, 42(5), 471–6.
- Kawakami, R., Sakuraba, H., & Ohshima, T. (2007). Gene Cloning and Characterization of the Very Large NAD-Dependent L-Glutamate Dehydrogenase from the Psychrophile *Janthinobacterium lividum*, Isolated from Cold Soil. *Journal of Bacteriology*, 189(15), 5626–5633.
- Kawasaki, S., Ishikura, J., Chiba, D., Nishino, T., & Niimura, Y. (2004). Purification and characterization of an H₂O-forming NADH oxidase from *Clostridium aminovalericum*: existence of an oxygen-detoxifying enzyme in an obligate anaerobic bacteria. *Archives of Microbiology*, 181(4), 324–30.
- Keinan, E., Seth, K., & Lamed, R. (1987). Synthetic applications of alcohol-dehydrogenase from *Thermoanaerobium brockii*. *Ann. NY Acad. Sciences*, 501, 130–149.
- Kengen, W. M., Oost, J. Van Der, & Vos, W. M. De. (2003). Molecular characterization of H₂O₂-forming NADH oxidases from *Archaeoglobus fulgidus*. *European Journal of Biochemistry*, 270, 2885–2894.
- Khan, I. H., Im, H. K., Shida, H. A., Shikawa, T. I., Hibata, H. S., & Awa, Y. S. (2005). Altering the Substrate Specificity of Glutamate Dehydrogenase from *Bacillus subtilis* by Site-Directed Mutagenesis. *Biosci Biotechnol Biochem*, 69(9), 1802–1805.
- Knapp, S., Vos, W. M. De, Rice, D., Ladenstein, R., & Institutet, K. (1997). Crystal Structure of Glutamate Dehydrogenase from the Hyperthermophilic Eubacterium *Thermotoga maritima* at 3.0 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 267, 916–932.
- Kim, Y. H., & Yoo, Y. J. (2009). Enzyme and Microbial Technology Regeneration of the nicotinamide cofactor using a mediator-free electrochemical method with a tin oxide electrode, 44, 129–134.
- Kobori, H., Ogino, M., Orita, I., Nakamura, S., Imanaka, T., & Fukui, T. (2010). Characterization of NADH Oxidase/NADPH Polysulfide Oxidoreductase and Its Unexpected Participation in Oxygen Sensitivity in an Anaerobic Hyperthermophilic Archaeon. *Journal of Bacteriology*, 192(19), 5192–5202.

Kochius, S., Bum, J., Ley, C., Könst, P., Hollmann, F., Schrader, J., & Holtmann, D. (2014). Electrochemical regeneration of oxidised nicotinamide cofactors in a scalable reactor. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 103, 94–99.

Kochius, S., Magnusson, A. O., Hollmann, F., Schrader, J., & Holtmann, D. (2012). Immobilized redox mediators for electrochemical NAD(P)⁺ regeneration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 2251–2264.

Koepsell, J., Stodola, H., & Ps, B. Y. (1952). Production of α -Ketoglutarate in Glucose Oxidation by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of the American Chemical Society*, 74, 5142–5144.

Koh, J., Chung, H., Chang, W., Tanokura, M., & Kong, K. (2009). Discovery and Characterization of a Thermostable NADH Oxidase from *Pyrococcus horikoshii*. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 30(12), 2984–2988.

Kohlmann, C., Märkle, W., & Lütz, S. (2008). Electroenzymatic synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 51, 57–72.

Kondoh, T., Mallick, H. N., & Torii, K. (2009). Activation of the gut-brain axis by dietary glutamate and physiologic significance in energy homeostasis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90, 832–837

Kosheleva, N.A., Smirnova, L.S., Baikova, L.A., (1967). Biosynthesis of α -ketoglutaric acid by microorganisms. *Izv. Akad. Nauk. SSSR Ser. Biol.* (Russia) 1, 74–90.

Kosjek, B., Stampfer, W., Pogorevc, M., Goessler, W., Faber, K., & Kroutil, W. (2004). Purification and Characterization of a Chemotolerant Alcohol Dehydrogenase Applicable to Coupled Redox Reactions. *Biotechnology and Bioengineering*, 86, 55–62.

Koyama, H. (1984). Oxidation and Oxygenation of L-Amino Acids Catalyzed by a L-Phenylalanine Oxidase (Deaminating and Decarboxylating) from *Pseudomonas* Sp. P-501. *Journal of Biochemistry*, 96, 421–427.

Kroutil, W., Mang, H., Edegger, K., & Faber, K. (2004a). Biocatalytic Oxidation of Primary and Secondary Alcohols. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 346.

- Kroutil, W., Mang, H., Edegger, K., & Faber, K. (2004b). Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of sec-alcohols. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8, 120–126.
- Kujo, C., Sakuraba, H., Nunoura, N., & Ohshima, T. (1999). The NAD-dependent glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum*: cloning, sequencing, and expression of the enzyme gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1434, 365–371.
- Kula, M., & Kragl, U. (2000). Dehydrogenases in the Synthesis of Chiral. In *Stereoselective Biocatalysis*, Patel, R. (Editor) (pp. 839–866).
- Kunkel, T. A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 488–492.
- Kusakabe, H., Midorikawa, Y., Fujishima, T., Kuninaka, A., & Yoshino, H. (1983). Purification and Properties of a New Enzyme, L-Glutamate Oxidase, from *Streptomyces* Grown on Wheat Bran. *Agric. Boil. Chem.*, 47(6), 1323–1328.
- Kuzu, M. (2005). Charakterisierung mikrobieller Oxidasen. *Dissertation*.
- Kuzu, M., Niefind, K., Hummel, W., & Schomburg, D. (2005). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a flavoprotein NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 61(5), 528–30.
- Labrou, N. E. (2010). Random Mutagenesis Methods for In Vitro Directed Enzyme Evolution. *Current Protein and Peptide Science*, 11, 91–100.
- Lebbink, J. H. G., Eggen, R. I. L., & Vos, W. M. De. (1995). Exchange of domains of glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and the mesophilic bacterium *Clostridium difficile*: effects on catalysis, thermoactivity and stability. *Protein Engineering*, 8(12), 1287–1294.

Lee, L. G., & Whitesides, G. M. (1985). Enzyme-catalyzed organic synthesis: a comparison of strategies for in situ regeneration of NAD⁺ from NADH. *Journal of the American Chemical Society*, 107(24), 6999–7008.

Lerchner, A. (2013). Crystallographic Analysis and structure-guided engineering of NADPH-dependent *Ralstonia* sp. Alcohol dehydrogenase toward NADH cosubstrate specificity, *Biotechnology and Bioengineering*, 10(11), 2803-2814.

Li, Q., Zhang, S., & Yu, J. (1996). Immobilization of L-glutamate oxidase and peroxidase for glutamate determination in flow injection analysis system. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 59(1), 53–61.

Liu, L., Li, Y., Zhu, Y., Du, G., & Chen, J. (2007). Redistribution of carbon flux in *Torulopsis glabrata* by altering vitamin and calcium level. *Metabolic Engineering*, 9, 21–29.

Liu, L., Sakir, G., Shin, H., Li, J., Du, G., & Chen, J. (2013). One-step production of α -ketoglutaric acid from glutamic acid with an engineered l-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis*. *Journal of Biotechnology*, 164(1), 97–104.

Liu, W., & Wang, P. (2007). Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. *Biotechnology Advances*, 25(4), 369–84.

Lorenz, B. P., & Eck, J. (2004). Review Screening for Novel Industrial Biocatalysts. *Engineering in Life Sciences*, 4(6), 501–504.

Lountos, G. T., Jiang, R., Wellborn, W. B., Thaler, T. L., Bommaris, A. S., Orville, A. M., June, V. (2006). The Crystal Structure of NAD(P)H Oxidase from *Lactobacillus sanfranciscensis*: Insights into the Conversion of O₂ into Two Water Molecules by the. *Biochemistry*, 45, 9648–9659.

Lountos, G. T., Riebel, B. R., Wellborn, W. B., Bommaris, A. S., & Orville, A. M. (2004). Crystallization and preliminary analysis of a water-forming NADH oxidase from *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 60(Pt 11), 2044–2047.

Lukasheva, E. V, & Berezov, T. T. (2002). L-Lysine α -Oxidase: Physicochemical and Biological Properties. *Biochemistry (Moscow)*, 67(10), 1152–1158.

Macheroux, P., Seth, O., Bollschweiler, C., Schwarz, M., Kurfu, M., & Pflanzenwissenschaften, È. (2001). L-Amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma* Comparative sequence analysis and characterization of active and inactive forms of the enzyme L -Amino-acid. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 268, 1679–1686.

Maldonado, P., Desmarquest, J., Gaillardin, C., Binet, D., & Malmaison, R. (1976). Process for getting diploid *Candida lipolytica* strains for α -ketoglutarate fermentation. Patent US3930946.

Mallett, T. C., Wallen, J. R., Karplus, P. A., Sakai, H., Tsukihara, T., & Claiborne, A. (2006). Structure of coenzyme A-disulfide reductase from *Staphylococcus aureus* at 1.54 Å resolution. *Biochemistry*, 45(38), 11278–11289.

Mcmahon, C. P., Rocchitta, G., Serra, P. A., Kirwan, S. M., Lowry, J. P., & Neill, R. D. O. (2006). Control of the Oxygen Dependence of an Implantable Polymer/Enzyme Composite Biosensor for Glutamate. *Analytical Chemistry*, 78(7), 2352–2359.

McNeil, C., Spoor, J., Cocco, D., Cooper, J., & Bannister, J. (1989). Thermostable reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase: application to amperometric enzyme assays. *Analytical Chemistry*, 61, 25–29.

Minambres, B., Olivera, R., Jensen, R. A., & Luengo, M. (2000). A New Class of Glutamate Dehydrogenases (GDH). *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 275(50), 39529–

Mittl, P., Berry, A., Scrutton, N. S., Perham, R. N., & Schulz, G. E. (1993). Structural differences between wild-type NADP-dependent glutathione reductase from *Escherichia coli* and a redesigned NAD-dependent mutant. *Journal of Molecular Biology*, 231, 191–195.

Mittl, P. R., Berry, A., Scrutton, N. S., Perham, R. N., & Schulz, G. E. (1994). Anatomy of an engineered NAD-binding site. *Protein Science*, 3(9), 1504–1514.

Moreno, J. A., Montes, F. J., Catakin, J., & Gahln, M. A. (1996). Inhibition of D-amino acid oxidase by keto acids analogs of amino acids. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(95), 379–382.

Mortarino, M., Negri, A., Tedeschi, G., Simonic, T., Duga, S., Gassen, H. G., & Ronchi, S. (1996). L-Aspartate oxidase from *Escherichia coli* I. Characterization of coenzyme binding and product inhibition Michele. *European Journal of Biochemistry*, 426, 418–426.

Moser, P., Greilberger, J., Maier, A., Juan, H., Bücherl-Harrer, C., & Kager, E. (2007). Verwendung von alpha-Ketoglutar Säure und 5- Hydroxy-methylfurfural zur Reduktion von oxidativem Stress. C. Y. L. P. GmbH. Patent EP1842536 A1.

Munoz-Blanco, J., Hidalgo-Martinez, J., & Cardenas, J. (1990). Extracellular deamination of L-amino acids by *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Planta*, 182, 194–198.

Nakamura, K., & Yamanaka, R. (2002). Light-mediated regulation of asymmetric reduction of ketones by a cyanobacterium. *Tetrahedron: Asymmetry*, 13, 2529–2533.

Niimura, Y. (2007). THE NADH OXIDASE-PRX SYSTEM IN *AMPHIBACILLUS XYLANUS*. In L. Flohé and J. R. Harris (eds.), *Peroxiredoxin Systems*, 195–205.

Niimura, Y., Nishiyama, Y., Saito, D., Tsuji, H., Hidaka, M., Miyaji, T., & Massey, V. (2000). A Hydrogen Peroxide-Forming NADH Oxidase That Functions as an Alkyl Hydroperoxide Reductase in *Amphibacillus xylanus*. *Journal of Bacteriology*, 182, 5046–5051.

Nisar, M. A., Rashid, N., Bashir, Q., Gardner, Q. A., Hassan, M., & Akhtar, M. (2013). TK1299, a highly thermostable NAD(P)H oxidase from *Thermococcus kodakaraensis* exhibiting higher enzymatic activity with NADPH. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1–6.

Nishizawa, T., Aldrich, C. C., & Sherman, D. H. (2005). Molecular Analysis of the Rebecamycin L-Amino Acid Oxidase from *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243. *Journal of Bacteriology*, 187(6), 2084–2092.

- Nuutinen, J. T., Marttinen, E., Soliymani, R., Hildén, K., & Timonen, S. (2012). L-Amino acid oxidase of the fungus *Hebeloma cylindrosporum* displays substrate preference towards glutamate. *Microbiology*, *158*, 272–283.
- Nyguen, M. L., & Tanner, C. C. (1998). Ammonium removal from wastewaters using natural New Zealand zeolites. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, *41*, 427–446.
- Ödman, P., Wellborn, W. B., & Bommarius, A. S. (2004). An enzymatic process to α -ketoglutarate from L-glutamate: the coupled system L-glutamate dehydrogenase/NADH oxidase. *Tetrahedron: Asymmetry*, *15*(18), 2933–2937.
- Ohshima, T. (1998). Enzymological Characteristics of the Hyperthermostable NAD-Dependent Glutamate Dehydrogenase from the Archaeon *Pyrobaculum islandicum* and Effects of Denaturants and Organic Solvents. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(6), 2152–2157.
- Ojha, S., Meng, E. C., & Babbitt, P. C. (2007). Evolution of Function in the “Two Dinucleotide Binding Domains” Flavoproteins. *PLOS Computational Biology*, *3*(7), 1268–1280.
- Otten, L. G., & Quax, W. J. (2005). Directed evolution: selecting today’s biocatalysts. *Biomolecular Engineering*, *22*, 1–9.
- Otto, C., Yovkova, V., & Barth, G. (2011). Overproduction and secretion of α -ketoglutaric acid by microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *92*(4), 689–695.
- Pai, E. F., Karplus, P. a, & Schulz, G. E. (1988). Crystallographic analysis of the binding of NADPH, NADPH fragments, and NADPH analogues to glutathione reductase. *Biochemistry*, *27*(12), 4465–74.
- Pagala, V. R., Park, J., Reed, D. W., & Hartzell, P. L. (2002). Cellular localization of D-lactate dehydrogenase and NADH oxidase from *Archaeoglobus fulgidus*. *Archaea*, *2*, 95–104.
- Palenik, B., & Morel, F. M. A. L. (1990). Amino acid utilization by marine phytoplankton. A novel mechanism. *Limnol. Oceanogr.*, *35*(2), 260–269.

Park, H. J., Reiser, C. O., Kondruweit, S., Erdmann, H., Schmid, R. D., & Sprinzl, M. (1992). Purification and characterization of a NADH oxidase from the thermophile *Thermus thermophilus* HB8. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 205(3), 881–885.

Pawelek, P. D., Cheah, J., Coulombe, R., Macheroux, P., Ghisla, S., Vrielink, A., & Zu, C.-. (2000). The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. *The EMBO Journal*, 19(16), 4204–4215.

Perham, R., Scrutton, N., & Berry, A. (1991). New Enzymes for Old: Redesign the Coenzyme and Substrate Specificities of Glutathione Reductase. *BioEssays*, 13, 515–525.

Petterson EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. (2004). UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.*; 25(13):1605-12.

Pick, A., Ott, W., Howe, T., Schmid, J., Sieber, V. (2014). Improving the NADH-cofactor specificity of the highly active AdhZ3 and AdhZ2 from *Escherichia coli* K-12. *Journal of Biotechnology*, 189,157-65.

Pilone, M. S. (2000). D-Amino acid oxidase: new findings. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57, 1732–1747.

Pilone, M. S., & Pollegioni, L. (2002). D-amino Acid Oxidase as an Industrial Biocatalyst. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20(3), 145–159.

Pistorius, E., & Voss, H. (1980). SOME PROPERTIES OF A BASIC L-AMINO-ACID OXIDASE FROM *ANACYSTIS NIDULANS*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 611, 227–240.

Pläß, & Sekoulov. (2007). Innovative Rückgewinnung von Stickstoff aus industriellen Grund- und Abwässern mittels einer neu entwickelten kontinuierlich betriebenen Ionentauscher-/ Regenerationseinheit zur Verwertung des Stickstoffs z.B. als Düngemittel. *Abschlussbericht Delphin Umwelttechnik GmbH*.

Pollegioni, L., Caldinelli, L., Molla, G., Sacchi, S., & Pilone, M. S. (2004). Catalytic Properties of D-Amino Acid Oxidase in Cephalosporin C Bioconversion: A Comparison between Proteins from Different Sources. *Biotechnol. Prog.*, 20, 467–473.

- Ponnudurai, G., Chung, M. C., & Tan, N. H. (1994). Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 313, 373–378.
- Priestley, N. D., & Robinson, J. A. (1989). Purification and catalytic properties of L-valine dehydrogenase from *Streptomyces cinnamonensis*. *Biochem. J.*, 261, 853–861.
- Primoz, M., Findrik, Z., & Vasic, Đ. (2005). Enzymatic activity of L-amino acid oxidase from snake venom *Crotalus adamanteus* in supercritical CO₂. *Biocatalysis and Biotransformation*, 23, 315–321.
- Reetz, M. T. (2011). Gerichtete Evolution stereoselektiver Enzyme: Eine ergiebige Katalysator-Quelle für asymmetrische Reaktionen. *Angewandte Chemie*, 123, 144–182.
- Reid, M.-F. Fewson, C.-A. (1994). Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Critical Reviews Microbiology*, 20(1), 13–56.
- Richter, N., Zienert, A., & Hummel, W. (2011). A single-point mutation enables lactate dehydrogenase from *Bacillus subtilis* to utilize NAD⁺ and NADP⁺ as cofactor. *Engineering in Life Sciences*, 11(1), 26–36.
- Riebel, B., Hummel, W., Niefind, K., & Schomburg, D. (2003). The Crystal Structure of R-specific Alcohol Dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* Suggests the Structural Basis of its Metal Dependency. *Journal of Molecular Biology*, 327, 317–328.
- Riebel, B. R., Gibbs, P. R., Wellborn, W. B., & Bommarius, A. S. (2002). Cofactor Regeneration of NAD⁺ from NADH: Novel Water-Forming NADH Oxidases. *Advanced Synthesis & Catalysis*, (10), 1156–1168.
- Riebel, B. R., Gibbs, P. R., Wellborn, W. B., & Bommarius, A. S. (2003). Cofactor Regeneration of both NAD⁺ from NADH and NADP⁺ from NADPH:NADH Oxidase from *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 345(67), 707–712.
- Robb, F. T., Park, J.-B., & Adams, M. W. W. (1992). Characterization of an extremely thermostable glutamate dehydrogenase: a key enzyme in the primary metabolism of the hyperthermophilic archaebacterium, *Pyrococcus furiosus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1120, 267–272.

Romano, D., Villa, R., & Molinari, F. (2012). Preparative Biotransformations: Oxidation of Alcohols. *ChemCatChem*, 4, 739–749.

Ross, R. P., & Claiborne, A. (1991). Cloning, Sequence and Overexpression of NADH Peroxidase from *Streptococcus faecalis* 1061 Structural Relationship with the Flavoprotein Disulfide Reductases. *Journal of Molecular Biology*, 221, 857–871.

Ross, R. P., & Claiborne, A. (1992). Molecular cloning and analysis of the gene encoding the NADH oxidase from *Streptococcus faecalis* 10C1. Comparison with NADH peroxidase and the flavoprotein disulfide reductases. *Journal of Molecular Biology*, 227(3), 658–71.

Ruiz, L., & Ferrer, J. (1998). NAD-specific glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8: purification and enzymatic properties. *FEMS Microbiology Letters*, 159, 15–20.

Ruppert, R., & Steckhan, E. (1989). Efficient photoelectrochemical in situ regeneration of NAD(P)⁺ coupled to enzymatic oxidation of alcohols. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 7, 811–814.

Ryan, M. R., Lowry, J. P., & O'Neill, R. D. (1997). Biosensor for neurotransmitter L-glutamic acid designed for efficient use of L-glutamate oxidase and effective rejection of interference. *The Analyst*, 122(11), 1419–1424.

Sakamoto, M., Uchimura, T., & Komagata, K. (1996). Comparison of H₂O-Forming NADH Oxidase from *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NRIC 1541 and H₂O₂-Forming NADH Oxidase from *Sporolactobacillus inulinus* NRIC 1133. *JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING*, 82(6), 531–537.

Sano, C. (2009). History of glutamate production. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90, 728–732.

Schilling, B., & Lerch, K. (1995). Cloning, sequencing and heterologous expression of the monoamine oxidase gene from *Aspergillus niger*. *Mol Gen Genet*, 430–438.

Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., & Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409, 258–268.

- Schmidt, H. L., Stöcklein, W., Danzer, J., Kirch, P., & Limbach, B. (1986). Isolation and properties of an H₂O-forming NADH oxidase from *Streptococcus faecalis*. *European Journal of Biochemistry/FEBS*, 156(1), 149–155.
- Schritt Wieser, J. H., Sattler, J., Resch, V., Mutti, F. G., & Kroutil, W. (2011). Recent biocatalytic oxidation–reduction cascades. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15, 249–256.
- Schubert, T., Hummel, W., & Müller, M. (2002). Highly enantioselective preparation of multifunctionalized propargylic building blocks. *Angewandte Chemie-International Edition*, 114, 656–659.
- Schulz, A. (2008). Identifizierung und Struktur-basierte Optimierung biokatalytisch relevanter Alkohol-Dehydrogenasen. *Dissertation*.
- Schultz, C., Niebisch, A., & Gebel, L. (2007). Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76, 691–700.
- Schütte, H., Hummel, W., Tsai, H., & Kula, M. (1985). L-Leucine dehydrogenase from *Bacillus cereus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 306–317.
- Scrutton, N., Berry, A., & Perham, R. (1990). Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature*, 343, 38–43.
- Seal, R.P., and Edwards, R.H. (2005) Functional implications of neurotransmitter co-release: glutamate and GABA share the load. *Curr Opin Pharmacol*
- Shargool, P. D., & Jain, J. C. (1989). PURIFICATION AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF AN NAD(H) DEPENDENT GLUTAMATE DEHYDROGENASE FROM SOYBEAN CELLS (*GLYCINE MAX L.*). *Plant Science*, 60, 173–179.
- Shimizu S, Ogawa J, K. M. and K. M. (1997). Screening of novel microbial enzymes for the production of biologically and chemically useful compounds. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 58, 45–87.

Shin, J., & Kim, B. (2002). Exploring the Active Site of Amine:Pyruvate Aminotransferase on the Basis of the Substrate Structure-Reactivity Relationship: How the Enzyme Controls Substrate Specificity and Stereoselectivity. *Journal of Organic Chemistry*, 67, 2848–2853.

Singh, S., Gogoi, B. K., & Bezbaruah, R. L. (2009). Optimization of medium and cultivation conditions for L -amino acid oxidase production by *Aspergillus fumigatus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 55, 1096–1102.

Skopelitis, D. S., Paranychianakis, N. V, Kouvarakis, A., Spyros, A., Stephanou, E. G., & Roubelakis-angelakis, K. A. (2007). The Isoenzyme 7 of Tobacco NAD(H)-Dependent Glutamate Dehydrogenase Exhibits High Deaminating and Low Aminating Activities in Vivo. *Plant Physiology*, 145, 1726–1734.

Smith, E. L., Austen, B. M., Blumenthal, K. M., & Nyc, J. F. (1975). Glutamate dehydrogenases. *The Enzymes (Boyer, P. D., Ed.)*, 11, 293–367.

Smith, T. J., & Stanley, C. a. (2008). Untangling the glutamate dehydrogenase allosteric nightmare. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(11), 557–64.

Stehle, T., Claiborne, A., & Schulz, G. E. (1993). NADH binding site and catalysis of NADH peroxidase. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 211(1-2), 221–226.

Stehle, T., Claiborne, A., Schulz, G. E., & Carolina, N. (1991). Structure of NADH Peroxidase from *Streptococcus faecalis* 10CI Refined at 2.46 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 1325–1344.

Stemmer, W. P. C. (1994). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Nature*, 370, 389–391.

Stewart, J. D. (2001). Dehydrogenases and transaminases in asymmetric synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 120–129.

Stottmeister, U., Aurich, A., Wilde, H., Andersch, J., Schmidt, S., & Sicker, D. (2005). White biotechnology for green chemistry: fermentative 2-oxocarboxylic acids as novel building blocks for subsequent chemical syntheses. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 32(11-12), 651–64.

- Stoyan, T., Recktenwald, A., & Kula, M.-R. (1997). Cloning, sequencing and overexpression of the leucine dehydrogenase gene from *Bacillus cereus*. *Journal of Biotechnology*, 54, 77–80.
- Suhr, S., & Kim, D. (1996). Identification of the Snake Venom Substance That Induces Apoptosis. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, 224, 134–139.
- Sukhacheva, M. V., & Faculty, B. (2000). *Streptomyces* sp . Z-11-6 , a Novel Producer of Extracellular L-Glutamate Oxidase. *Microbiology*, 69(1), 13–16.
- Sukhacheva, M. V., & Zhuravleva, N. I. (2004). Properties and prospects of practical use of extracellular L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. Z-11-6. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(2), 173–177.
- Switala, J., & Loewen, P. C. (2002). Diversity of properties among catalases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 401(2), 145–54.
- Szwajcer, E., Brodelius, P., & Mosbach, K. (1982). Production of keto acids: 2. Immobilized whole cells of *Providencia* sp . PCM 1298 containing L-amino acid oxidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 4, 409–413.
- Tan, N., & Fung, S. (2008). Snake Venom L-Amino Acid Oxidases and Their Potential Biomedical Applications. *Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 16, 1–10.
- Tanaka, K., Kimura, K., & Yamaguchi, H. (1964). Verfahren zur Herstellung von L-Glutaminsäure und α -Ketoglutarinsäure. Patent DE000001442262A.
- Tanaka, K., Kimura, K., & Yamaguchi, H. (1965). Verfahren zur Herstellung von L-Glutaminsäure durch Gärung. Patent DE000001442259A.
- Tanaka, K., Kimura, K., & Yamaguchi, H. (1969). Process for producing L-glutamic acid and α -ketoglutaric acid. Patent US3450599.

Taylor, P. P., Pantaleone, D. P., Senkpeil, R. F., & Fotheringham, I. G. (1998). Novel biosynthetic approaches to the production of unnatural amino acids using transaminases. *TIBTECH*, *16*(r), 412–418.

Tegel, H., Tourle, S., Ottosson, J., & Persson, A. (2010). Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, *69*(2), 159–167.

Teller, K., J., S. R., McPherson, M. J., C., E. P., & R., G. J. (1992). The glutamate dehydrogenase gene of *Clostridium symbiosum* Cloning by polymerase chain reaction, sequence analysis and over-expression in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, *206*, 151–159.

Tian, F., Gourine, A. V, Huckstepp, R. T. R., & Dale, N. (2009). A microelectrode biosensor for real time monitoring of L-glutamate release. *Analytica Chimica Acta*, *645*(1-2), 86–91.

Timmler, H., & Wegler, R. (1971). Verfahren zur Herstellung von Ketoglutarensäure. Patent CH000000509960A.

Tishkov, V. I., & Popov, V. O. (2004). Catalytic Mechanism and Application of Formate Dehydrogenase. *Biochemistry (Moscow)*, *69*(11), 1537–1554.

Torii, S., Naito, M., & Tsuruo, T. (1997). Cell Biology and Metabolism: Apoxin I, a Novel Apoptosis-inducing Factor with L-Amino Acid Oxidase Activity Purified from Western Diamondback Rattlesnake Venom. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*, 9539–9542.

Trost, E.-M., & Fischer, L. (2002). Minimization of by-product formation during d-amino acid oxidase catalyzed racemate resolution of d/l-amino acids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *19-20*, 189–195.

Tsugawa R, Nakase T, Kobayashi T, Yamashita K, O. S. (1969). Fermentation of n-paraffins by yeast. Part I: fermentative production of α -ketoglutaric acid by *Candida lipolytica*. *Agric. Boil. Chem.*, *33*, 158–167.

Tsugawa, R.; Nakase, T.; Kobayshi, K. (1971). PRODUCTION OF α -KETOGLUTARIC ACID BY FERMENTATION OF HYDROCARBONS. Patent US3616213.

Turner, N. J. (2009). Directed evolution drives the next generation of biocatalysts. *NATURE CHEMICAL BIOLOGY*, 5(8).

Upadhyay, R., & Bhat, S. G. (2000). Stabilization of D-Amino Acid Oxidase and Catalase in Permeabilized *Rhodotorula gracilis* Cells and Its Application for the Preparation of α -Ketoacids. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, 430–436.

Upadhyay, R., Nagajyothi, H., & Bhat, S. G. (1999). D-Aminoacid oxidase and catalase of detergent permeabilized *Rhodotorula gracilis* cells and its potential use for the synthesis of α -keto acids. *Process Biochemistry*, 35, 7–13.

Upadhyay, S., Ohgami, N., Kusakabe, H., Mizuno, H., Arima, J., Tamura, T., Suzuki, H. (2006). Performance characterization of recombinant L-glutamate oxidase in a micro GOT/GPT sensing system. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 119(2), 570–576.

Uppada, V., Bhaduri, S., & Noronha, S. B. (2014). Cofactor regeneration – an important aspect of biocatalysis. *Current Science*, 106, 1–12.

Utsumi, T., Arima, J., Sakaguchi, C., Tamura, T., Sasaki, C., Kusakabe, H., Inagaki, K. (2012). Arg305 of *Streptomyces* L-glutamate oxidase plays a crucial role for substrate recognition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(3), 951–5.

Van der Donk, W. a, & Zhao, H. (2003). Recent developments in pyridine nucleotide regeneration. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4), 421–426.

Verseck S, Karau A, W. M. (2007). Fermentative Herstellung von α -Ketoglutar säure. Evonik Degussa GmbH. Patent DE102007051451.6.

Verseck, S., Karau, A., & Weber, M. (2009). Fermentative production of α -ketoglutaric acid. Evonik Degussa GmbH. Patent WO2009053489.

Vuorilehto, K., Lütz, S., & Wandrey, C. (2004). Indirect electrochemical reduction of nicotinamide coenzymes. *Bioelectrochemistry*, 65, 1–7.

Wachiratianchai, S., Bhumiratana, A., & Udomsopagit, S. (2004). Isolation, purification, and characterization of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. 18G. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7(3), 274–281.

Wagenknecht, P. S., Penney, J. M., & Hembre, R. T. (2003). Transition metal catalyzed regeneration of nicotinamide coenzymes with hydrogen. *Organometallics*, 22, 1180–1182.

Wallen, J. R., Paige, C., Mallett, T. C., Karplus, P. A., & Claiborne, A. (2008). Pyridine nucleotide complexes with *Bacillus anthracis* coenzyme A-disulfide reductase: a structural analysis of dual NAD(P)H specificity. *Biochemistry*, 47(18), 5182–93.

Ward, D. E., Donnelly, C. J., Mullendore, M. E., van der Oost, J., de Vos, W. M., & Crane, E. J. (2001). The NADH oxidase from *Pyrococcus furiosus*. Implications for the protection of anaerobic hyperthermophiles against oxidative stress. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 268(22), 5816–5823.

Weckbecker, A. (2005). Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren zur Synthese von chiralen Alkoholen. *Dissertation*.

Weckbecker, A., Gröger, H., & Hummel, W. (2010). Regeneration of Nicotinamide Coenzymes: Principles and Applications for the Synthesis of Chiral Compounds. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 120, 195–242.

Weißbrodt E, Gey M, Barth G, Weber H, Stottmeister U, Düresch R, R. H. (1989). Verfahren zur Herstellung von 2-Oxoglutarsäure durch Hefen. Patent DD267999.

Wibke Hußmann. (2009). Herstellung von L-tert-Leucin mit immobilisierten Zellen und verkapselten Enzymen mit Cofaktorregenerierung. *Dissertation*.

Wichmann, R., & Vasic-Racki, D. (2005). Cofactor Regeneration at the Lab Scale. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 92, 225–260.

Wohlgemuth, R. (2010). Asymmetric biocatalysis with microbial enzymes and cells. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 283–292.

Wolberg, M., Ji, A., Hummel, W., & Müller, M. (2001). Enzymatic reduction of hydrophobic β , δ -diketo esters. *Synthesis*, 937–942.

- Woodyer, R., Johannes, T. W., & Zhao, H. (2003). Regeneration of Cofactors for Enzyme Biocatalysis. *Enzyme Technology*, 5, 83–101.
- Woodyer, R., Van Der Donk, W. A., Zhao, H. (2003). Relaxing the Nicotinamide Cofactor Specificity of Phosphite Dehydrogenase by Rational Design. *Biochemistry*, 42, 11604–11614.
- Wu, X., Kobori, H., Orita, I., Zhang, C., Imanaka, T., Xing, X., & Fukui, T. (2012). Application of a Novel Thermostable NAD(P)H Oxidase From Hyperthermophilic Archaeon for the Regeneration of Both NAD⁺ and NADP⁺. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(1), 53–62.
- Xiao, Z., Lv, C., Gao, C., Qin, J., Ma, C., Liu, Z., & Liu, P. (2010). A Novel Whole-Cell Biocatalyst with NAD⁺ Regeneration for Production of Chiral Chemicals. *PLoS ONE*, 5(1), 1–6.
- Xie, S.-X., Ogawa, J., & Shimizu, S. (1999). NAD⁺-dependent (S)-specific secondary alcohol dehydrogenase involved in stereoinversion of 3-pentyn-2-ol catalyzed by *Nocardia fusca* AKU 2123. *Biosci Biotechnol Biochem*, 63, 1721–1729.
- Xue, F., Miao, J., Zhang, X., & Tan, T. (2010). A New Strategy for Lipid Production by Mix Cultivation of *Spirulina platensis* and *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, 498–503.
- Yamamoto, I., Abe, A., & Ishimoto, M. (1987). Properties of Glutamate Dehydrogenase Purified from *Bacteroides fragilis*. *Journal of Biochemistry*, 101, 1391–1397.
- Yang, X., & Ma, K. (2005). Purification and characterization of an NADH oxidase from extremely thermophilic anaerobic bacterium *Thermotoga hypogea*. *Archives of Microbiology*, 183(5), 331–337.
- Zeller, E. A., & Maritz, A. (1944). Über eine neue l-Aminosäure-oxydase. *Helv. Chim. Acta*, 27, 1888–1902.
- Zhang, D., Liang, N., Shi, Z., Liu, L., Chen, J., & Du, G. (2009). Enhancement of α -ketoglutarate Production in *Torulopsis glabrata*: Redistribution of Carbon Flux from Pyruvate to α -ketoglutarate. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, 134–139.

Zhao, H., & van der Donk, W. a. (2003). Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(6), 583–589.

Zhu, Y., Li, J., Liu, L., Du, G., & Chen, J. (2011). Production of α -ketoisocaproate via free-whole-cell biotransformation by *Rhodococcus opacus* DSM 43250 with L-leucine as the substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(4), 321–325.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Werner Hummel danke ich für die Aufnahme als Doktorand in seine Arbeitsgruppe, die hervorragenden Arbeitsbedingungen am IMET, die Überlassung des sehr interessanten und aktuellen Themas sowie für die hervorragende, engagierte und freundschaftliche Betreuung, die aufschlussreichen Gespräche und die vielen wertvollen Ratschläge während der letzten Jahre.

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger möchte ich für die Möglichkeit danken, an seinem Institut unter hervorragenden Bedingungen diese Arbeit durchführen zu können.

Frau Prof. Dr. Vlada B. Urlacher danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. Harald Gröger, Universität Bielefeld, für die hervorragende und erfolgreiche Kooperation und für die stete Diskussionsbereitschaft.

Den Mitarbeitern des Instituts für molekulare Enzymtechnologie möchte ich für das angenehme und kameradschaftliche Arbeitsklima während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit danken. Daniel, Till, Andreas, Thorsten, Astrid und Dalia für die Zusammenarbeit im Laboralltag und für viele fachliche und manche weniger fachliche Gespräche.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern danken, die mich immer nach allen Möglichkeiten unterstützt haben, egal was der Sohn auf dem Herzen hatte. Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Schwester Birgit, die auch immer ein offenes Ohr für ihren Bruder hatte. Meinem Sohn Philipp danke ich für die ausgezeichnete Ablenkung von der Arbeit

Ganz besonders möchte ich Natascha für die liebevolle Unterstützung, ihre Geduld und ihren Zuspruch in den letzten Jahren danken: Du hattest immer Verständnis und hast mir stets Halt gegeben.

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

Düsseldorf, den 26.06.2015

(Carsten Lanzerath)

