

# **Isolierung, Identifizierung und biochemische Charakterisierung Dialkylphthalat spaltender Esterasen**

**Inaugural-Dissertation**

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

angefertigt am Institut für Molekulare Enzymtechnologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und bei der  
Henkel KGaA, Düsseldorf, Abteilung Enzyme Technology

vorgelegt von

**André Pütz**

aus Salzgitter

November, 2006

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. K.-E. Jäger

Korreferent: Prof. Dr. J. Pietruszka

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2007

*When you walk through a storm  
Hold your head up high  
And don't be afraid of the dark.  
At the end of a storm  
Is a golden sky  
And the sweet, silver song of a lark.  
Walk on, through the wind,  
Walk on, through the rain,  
Though your dreams be tossed and blown.  
Walk on, walk on with hope in your heart,  
And you'll never walk alone,  
You'll never walk alone...*

(Richard Rodgers and Oscar Hammerstein II, 1945)

## Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger, Lehrstuhl für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, danke ich für die Überlassung der interessanten Thematik, die wissenschaftliche Unterstützung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die mir gewährte Selbstständigkeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Pietruszka, Lehrstuhl für Bioorganische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats.

Ich danke Herrn Dr. Karl-Heinz Maurer für die Bereitstellung eines Laborplatzes in der VTB Enzyme Technology der Firma Henkel KGaA, Düsseldorf und für das mir entgegengebrachte Vertrauen. Desweiteren danke ich Herrn Dr. Andreas Michels für die stetige Bereitschaft für wissenschaftliche Diskussionen und Anregungen während meiner Arbeit.

Herrn Dr. Thorsten Eggert bin ich aufgrund anregender Diskussionen im Rahmen meiner Arbeit überaus dankbar.

Herrn Dr. Robin Ghosh danke ich für seine Mühen während der Modellierungsarbeiten.

Ein großer Dank geht an alle Mitglieder des Institutes für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und der VTB Enzyme Technology der Henkel KGaA, Düsseldorf. Im Besonderen gilt mein Dank Stefan Evers, der mich vor einem folgenschweren Fehler bewahrt hat und somit diese Arbeit in ihrer jetzigen Form erst möglich gemacht hat. Brian Laufs danke ich für seine Geduld und seine aufbauenden Worte während all der Jahre.

Gunnar Schmidt, Hauke Wulff und Andrea Tapalaga danke ich für ihr Engagement und ihre Leistungsbereitschaft während ihres Praktikums bei der Henkel KGaA, Düsseldorf.

Abschließend möchte ich meinen Eltern, meinen Großeltern und meinem Bruder danken für den Rückhalt während dieser Arbeit. Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Simone, die mich in den letzten Jahren immer wieder aufbaute und mir die Kraft gab, diese „Geschichte“ durchzustehen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Summary</b> .....	<b>2</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>3</b>
2.1 Esterasen und Lipasen: Gemeinsamkeiten und Unterschiede .....	4
2.1.1 Nomenklatur lipolytischer Enzyme .....	4
2.1.2 Strukturverwandtschaft und katalytischer Mechanismus .....	4
2.1.3 Unterscheidung von Esterasen und Lipasen .....	7
2.2 Esterasen: Ein Überblick .....	8
2.2.1 Physiologische Funktion von Esterasen .....	8
2.2.2 Industrielle Bedeutung von Esterasen .....	9
2.2.3 Quellen neuer Biokatalysatoren .....	11
2.3 Esterasen aus <i>Bacillus</i> sp. ....	13
2.4 Phthalsäure- und Terephthalsäureester: Ein Überblick .....	15
2.5 Enzymatische Hydrolyse von Polyethylenterephthalat (PET) und PET-Esterasen als Zusatz für neue Waschmittel .....	17
2.6 Ziele dieser Arbeit .....	19
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
3.1 Chemikalien und Enzyme .....	21
3.2 Bakterienstämme und Plasmide .....	22
3.3 Oligonukleotide .....	23
3.4 Anzucht und Lagerung von Bakterien .....	24
3.4.1 Kurzfristige Lagerung .....	25
3.4.2 Langfristige Lagerung .....	26
3.5 Isolierung von Nukleinsäuren .....	26
3.5.1 Isolierung genomischer DNA .....	26
3.5.2 Isolierung plasmidärer DNA .....	27
3.5.3 Konzentrationsbestimmung von DNA .....	27
3.6 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren .....	27
3.6.1 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen .....	28
3.7 <i>In vitro</i> Rekombination von DNA .....	28
3.7.1 Standardprozeduren .....	28
3.7.2 Genombanken .....	28
3.8 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA .....	29
3.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	30
3.9.1 Standard-PCR-Reaktion .....	30
3.9.2 Ortspezifische Mutagenese .....	31
3.9.3 Sequenzierung von DNA .....	31
3.9.4 Zufallsmutagenese .....	31
3.10 Indikatorplatten mit Diethylphthalsäure .....	32
3.11 Gewinnung und Präparation von Zellrohextrakt .....	32
3.12 Ammoniumsulfat-Präzipitation .....	33
3.13 Entsalzung / Umpuffern von Proteinlösungen .....	33
3.14 <i>Fast Protein Liquid Chromatographie</i> (FPLC) .....	33
3.14.1 Affinitätschromatographie mit Chitin-Agarose .....	34
3.14.2 Affinitätschromatographie mit Nickel-NTA .....	35
3.15 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	35
3.16 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) .....	35
3.17 Färbungen von Proteinen in der Gelmatrix .....	36
3.17.1 Coomassie-Färbung .....	36

---

3.17.2 Silberfärbung .....	37
3.17.3 Esterase-Aktivitätsfärbung .....	37
3.18 Bestimmung von Enzymaktivitäten .....	38
3.18.1 Photometrische Bestimmung der Esterase-Aktivität.....	38
3.18.1.1 Esterase-Aktivitätsbestimmung mit <i>para</i> -Nitrophenyl-Estern.....	38
3.18.1.2 Esterase-Aktivitätsbestimmung mit Phenolrot.....	38
3.18.2 Bestimmung der Esterase-Aktivität mittels Titration.....	39
3.19 Herstellung von Polyethylenterephthalat-Nanopartikeln .....	39
3.20 Partikelgrößenverteilung .....	40
3.21 Synthese von (Bis-( <i>p</i> -methylbenzoesäure)-ethylenglykolester).....	40
3.22 Gekoppelte Gaschromatographie/Massenspektroskopie (GC/MS).....	41
3.23 Gekoppelte Flüssigchromatographie/Massenspektroskopie (LC/MS).....	42
3.24 Dünnschichtchromatographie.....	42
3.25 Auftragsarbeiten .....	42
3.25.1 RIBOPRINT-Analyse von Bodenisolaten .....	42
3.25.2 Sequenzierung von DNA.....	43
3.25.3 MALDI-TOF-Analyse von Proteinen .....	43
3.25.4 <sup>1</sup> H-NMR (Kernresonanzspektroskopie) .....	43
3.26 Computerprogramme und Online-Datenbanken .....	43
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
4.1 Mikrobiologisches <i>screening</i> , Isolierung und Identifizierung von Mikroorganismen .....	44
mit der Fähigkeit zur Dialkylphthalat-Hydrolyse .....	44
4.2 Biochemische Reinigung des Dialkylphthalat hydrolysierenden Enzyms aus dem	
isolierten Stamm <i>Bacillus subtilis</i> 17A1 .....	45
4.3 Massenspektrometrische Proteinanalytik des gereinigten Enzyms.....	47
4.4 Identifizierung der kodierenden DNA-Bereiche der <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterasen .....	
<i>pNB-Est17</i> und <i>pNB-Est19</i> .....	48
4.4.1 Anfertigung von Genombanken für die Stämme <i>Bacillus subtilis</i> 17A1 .....	
und <i>Bacillus licheniformis</i> 19C5 und Isolierung esterolytisch aktiver Klone.....	48
4.4.2 Identifizierung der <i>open reading frames</i> für die <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterasen .....	
<i>pNB-Est17</i> und <i>pNB-Est19</i> und Vergleich mit der <i>pNB</i> -Esterase aus <i>Bacillus</i>	
<i>licheniformis</i> DSM13 .....	49
4.5 Subklonierung der <i>pNB-Est17</i> und <i>pNB-Est19</i> , Klonierung der <i>para</i> -Nitrobenzyl-	
Esterase aus genomischer DNA von <i>B. licheniformis</i> DSM13 ( <i>pNB-Est13</i> ),	
Überexpression und Reinigung.....	53
4.5.1 Spezifische Amplifizierung der <i>pNB</i> -Esterase-Gene mittels PCR .....	53
4.5.2 Heterologe Überexpression der <i>pNB</i> -Esterasen in <i>E. coli</i> und deren .....	
Reinigung mittels Affinitätschromatographie.....	54
4.6 Analytischer Nachweis der Hydrolyseprodukte von verschiedenen .....	
Dialkylphthalaten nach Inkubation mit den <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterasen .....	
<i>pNB-Est17</i> , <i>pNB-Est19</i> und <i>pNB-Est13</i> .....	56
4.7 Biochemische Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten .....	
<i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterasen.....	58
4.7.1 Einfluß unterschiedlicher Puffersysteme auf die enzymatische Aktivität.....	58
4.7.2 Temperatur-Optimum der <i>pNB-Est13</i> .....	59
4.7.3 Temperaturstabilität der <i>pNB-Est13</i> .....	60
4.7.4 pH-Optimum der <i>pNB-Est13</i> .....	61
4.7.5 pH-Stabilität der <i>pNB-Est13</i> .....	62
4.7.6 pH-abhängige Temperaturstabilität der <i>pNB-Est13</i> .....	63
4.7.7 Biochemische Charakterisierung der untersuchten <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterasen	
gegenüber unterschiedlichen Phthalaten und Terephthalaten .....	64

---

4.7.7.1 <i>p</i> NB-Est17, <i>p</i> NB-Est19 und <i>p</i> NB-Est13 zeigen divergierende Substratspezifitäten bei Dimethylphthalsäureestern unterschiedlicher Orientierung der Seitenketten .....	64
4.7.7.2 Mit zunehmender Kettenlänge der Phthalsäureester steigt die Affinität des Substrates zum katalytischen Zentrum.....	66
4.7.7.3 Zusammenfassung aller kinetischen Daten der unersuchten <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterasen gegenüber den vermessenen Phthalaten und Terephthalaten .....	68
4.7.8 Substratspezifität gegenüber <i>para</i> -Nitrophenylestern, Metylestern und Triglyceriden mit unterschiedlichen Kettenlängen .....	70
4.7.9 Einfluß von Detergenzien und Metallsalzen auf <i>p</i> NB-Est13 .....	72
4.7.10 Einfluß von PMSF und 4-FPBA auf die enzymatische Aktivität.....	74
4.7.11 Sekretierbarkeit der <i>p</i> NB-Est19 .....	75
4.8 Modellsubstrat Bis-( <i>p</i> -methylbenzoesäure)-ethylenglykolester.....	76
4.8.1 Synthese von Bis-( <i>p</i> -methylbenzoesäure)-ethylenglykolester (PET-Dimer).....	77
4.8.2 <i>p</i> NB-Est17, <i>p</i> NB-Est19 und <i>p</i> NB-Est13 hydrolysieren Bis-( <i>p</i> -methylbenzoesäure)-ethylenglykolester .....	78
4.8.3 <i>p</i> NB-Est13 zeigt im Vergleich die höchste spezifische Aktivität gegenüber PET-Dimer; <i>p</i> NB-Est19 den kleinsten $k_M$ -Wert .....	78
4.8.4 Einbettung von PET-Dimer in eine Agarmatrix.....	79
4.8.5 <i>ep</i> PCR der <i>p</i> NB-Est13.....	81
4.8.6 Rationales Proteindesign .....	82
4.9 Enzymatische Hydrolyse von PET-Nanopartikeln durch <i>p</i> NB-Est13.....	83
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>85</b>
5.1 Mikrobielles <i>screening</i> auf der Basis von Diethylphthalsäure.....	85
5.2 Die Dialkylphthalat-Hydrolasen aus den Stämmen <i>B. subtilis</i> 17A1 und <i>B. licheniformis</i> 19C5 sind <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterasen .....	86
5.3 Die <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase aus <i>Bacillus licheniformis</i> DSM13.....	88
5.4 Reinigung der <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterasen durch Affinitätschromatographie .....	89
5.5 Biochemische Charakterisierung der <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterasen <i>p</i> NB-Est17, <i>p</i> NB-Est19 und <i>p</i> NB-Est13.....	89
5.5.1 Die untersuchten <i>p</i> -Nitrobenzyl-Esterasen zeigen gegenüber Dimethylphthalaten unterschiedliche Substratspezifitäten .....	92
5.5.2 Mit zunehmender Kettenlänge der Phthalsäureester sinkt der $k_M$ -Wert.....	94
5.5.3 Hydrolyseprodukt nach Inkubation der <i>p</i> NB-Esterasen mit Dialkylphthalaten ist jeweils der korrespondierende Monoester.....	95
5.6 PET-Dimer als neues Modellsubstrat.....	96
5.7 Enzymatische Hydrolyse von PET-Nanopartikeln.....	98
5.8 Sekretion der <i>p</i> NB-Est19 durch <i>Bacillus subtilis</i> TEB1030 .....	99
<b>6 Ausblick.....</b>	<b>101</b>
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>103</b>
<b>8 Anhang.....</b>	<b>124</b>
8.1 DNA-Sequenz des <i>inserts</i> vom isolierten Genombank-Klon 17A1-A8.....	124
8.2 DNA-Sequenz des <i>inserts</i> vom isolierten Genombank-Klon 19C5-A4.....	125
8.3 Aminosäuresequenzen der untersuchten Esterasen aus den Stämmen <i>B. subtilis</i> 17A1, <i>B. licheniformis</i> 19C5 und <i>B. licheniformis</i> DSM13 .....	126
8.4 MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken der <i>p</i> NB-Est17.....	127
8.5 MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken der <i>p</i> NB-Est19.....	128
8.6 MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken der <i>p</i> NB-Est13.....	129
8.7 Strukturformeln Phthal- bzw. Terephthalsäureester und Modellester.....	130

## Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgelistet. Zusätzlich ist der Ein- und Drei-Buchstabencode der Aminosäuren dargestellt.

°C	Grad Celsius	G	Guanin, Formel 3.1: Genomgröße
A	Adenin; enzymatische Aktivität	GC/MS	Gaschromatographie / Massenspektroskopie
Abb.	Abbildung	GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>	h	Stunde
BBP	Butylbenzylphthalat	HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-2- ethansulfonsäure
BCA	Bicinchoninsäure	I	durchschnittliche Fragmentgröße
(bi)dest.	(zweifach) destilliert	IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>	k	Kilo ( $10^3$ )
bp	Basenpaar(e)	l	Lichtweg
BSA	Rinderserumalbumin	L	Liter
bzw.	beziehungsweise	<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
C	Cytosin / Kohlenstoff	LB	LURIA-BERTANI
c	Konzentration	LC/MS	Flüssigchromatographie / Massenspektroskopie
ca.	circa	ln	<i>logarithmus naturalis</i> , natürlicher Logarithmus
cm	Zentimeter	$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
$\Delta$ Abs	Absorptionsänderung	m	Meter; Milli ( $10^{-3}$ )
$\Delta\varepsilon_{560nm}$	Differenz der Molaren Extink- tionskoeffizienten bei 560 nm	M	Molar (mol / Liter), Mega ( $10^6$ )
d.h.	das heißt	MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i>
Da	Dalton	MEP	Monoethylphthalat
DBP	Dibutylphthalat	min	Minute
ddNTP	Didesoxy-Nukleotidtriphosphate	mol	Mol
dE/dt	Veränderung der Extinktion mit der Zeit	MW	Molekulargewicht
DEHP	Diethylhexylphthalat	MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
DEP	Diethylphthalat	n	Nano ( $10^{-9}$ )
Dest.	destilliert	N	Norm, Formel 3.1: Anzahl der unabhängigen Klone
DET	Diethylterephthalat	n.b.	nicht bestimmt
DMIP	Dimethylisophthalat	OD	Optische Dichte
DMP	Dimethylphthalat	ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserasterrahmen
DMSO	Dimethylsulfoxid	p	Pico ( $10^{-12}$ )
DMT	Dimethylterephthalat	P	gewünschte Wahrscheinlichkeit
DNA	Desoxyribonukleinsäure	P <sub>T7</sub>	T7-Promotor
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen & Zellkulturen	PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
DTE	Dithiorythrol	PET	Polyethylterephthalat
DTT	Dithiothreitol	pH	negativer dekadischer Logarith- mus der Protonenkonzentration
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>	PLE	<i>pig liver esterase</i> , Scheineleber- Esterase
E	Extinktion	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
EC	Enzymklasse	pNB-Est	<i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	pNPA	<i>para</i> -Nitrophenyl-Acetat
EK	Endkonzentration	Q	Pufferfaktor
<i>ep</i>	<i>error-prone</i>		
EPSP	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1- propansulfonsäure		
<i>et al.</i>	<i>et aliteri</i> , und andere		
Fa.	Firma		
FPBA	Formylphenyl-Boronsäure		
g	Gramm; bei Zentrifugation Gravitationskonstante		

R <sub>F</sub>	<i>ratio of fronts</i> ; Substanz- Lauflängen	TOF	<i>time of flight</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute; <i>rounds per minute</i>	Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
RT	Raumtemperatur	U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
s.	siehe	UV	Ultraviolettes Licht
S	Siemens, Einheit für Leitfähigkeit	V	Volt
SDS	Natriumdodecylsulfat	V <sub>Reaktion</sub>	Reaktionsvolumen
s.o.	siehe oben	Vol.	Volumen
sp.	Spezies	v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
s.u.	siehe unten	v/vm	vom Reaktorvolumen unabhängige Begasungsrate
T	Thymin, Temperatur	Vol.	Volumen
T <sub>T7</sub>	T7-Terminator	WT	Wildtyp
Tab.	Tabelle	w/v	Masseneinheit pro Volumeneinheit
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer	X	eine beliebige Aminosäure
TB	TERRIFIC-BROTH	z.B.	zum Beispiel
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer		
TMS	Tetramethylsilan		

## Aminosäuren:

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Aspartat	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamat	Glu	E	Serin	Ser	S
Glutamin	Gln	Q	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 2.1:	Schematische Darstellung der Hydrolyse von Triglyceriden durch Esterasen und Lipasen. . . 4
Abb. 2.2:	Schematische Darstellung des $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungsmotivs nach OLLIS <i>et al.</i> (1992)..... 5
Abb. 2.3:	Reaktionsmechanismus von Esterasen und Lipasen..... 6
Abb. 2.4:	Schematische Darstellung der MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken von Esterasen und Lipasen im Vergleich nach SARDA & DESNUELLE (1958). ..... 7
Abb. 3.1:	Schematischer Aufbau zur Herstellung von Polyethylenterephthalat-Nanopartikeln. .... 40
Abb. 3.2:	Synthese von Bis-( <i>p</i> -methylbenzoesäure)-ethylenglykolester durch Veresterung von 4-Methylbenzoesäure und Ethylenglykol nach HEIM & POE (1944). ..... 41
Abb. 4.1:	Lysehofbildung des Stammes <i>B. subtilis</i> 17A1 auf Diethylphthalsäure haltigen Agarplatten. .... 44
Abb. 4.2:	SDS-PAGE aller durchgeführten Reinigungsschritte ausgehend vom Rohextrakt. .... 47
Abb. 4.3:	Titrationkurve des biochemisch gereinigten Enzyms aus <i>B. subtilis</i> 17A1. .... 47
Abb. 4.4:	Dünnschichtchromatographische Analyse von Diethylterephthalat nach Inkubation mit Rohextrakten esterolytisch aktiver Genombank-Klone..... 49
Abb. 4.5:	ORF - Analyse der genomischen Fragmente der isolierten, esterolytisch aktiven Genombank-Klone. .... 50
Abb. 4.6:	Aminosäure-Sequenz-Vergleich der <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterasen aus <i>B. licheniformis</i> DSM13, <i>B. subtilis</i> 168, <i>B. licheniformis</i> 19C5 und <i>B. subtilis</i> 17A1..... 52
Abb. 4.7:	Schematische Darstellung zur Klonierung der <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterasen..... 53
Abb. 4.8:	SDS-PAGE-Analyse der untersuchten <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterasen..... 54
Abb. 4.9:	Ermittlung der spezifischen Aktivität der <i>pNB</i> -Est17, <i>pNB</i> -Est19 und <i>pNB</i> -Est13 gegenüber <i>p</i> -Nitrophenyl-Acetat als Substrat nach der Methode von CHEN <i>et al.</i> (1995b). . 55
Abb. 4.10:	Schematische Darstellung der durch die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterasen katalysierten Reaktionen von Dimethylphthalat, Diethylphthalat, Dimethylphthalat, Diethylphthalat, Dibutylphthalat, Dimethylisophthalat und Phenylbenzoat. .... 57
Abb. 4.11:	Temperaturverlaufskurve der enzymatischen Reaktion von <i>pNB</i> -Est13 und <i>pNP</i> -Acetat... 59
Abb. 4.12:	Darstellung der Temperaturstabilität der <i>pNB</i> -Est13 bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. .... 60
Abb. 4.13:	Darstellung der pH-Optimum-Kurve der <i>pNB</i> -Est13..... 61
Abb. 4.14:	Darstellung der pH-Stabilität der <i>pNB</i> -Est13..... 62
Abb. 4.15:	Darstellung der pH-abhängigen Temperaturstabilität der <i>pNB</i> -Est13; aufgenommen durch photometrische Messungen mit <i>para</i> -Nitrophenyl-Acetat als Substrat. .... 63
Abb 4.16 bis 4.18:	MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken der <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterasen <i>pNB</i> -Est17, <i>pNB</i> -Est19 und <i>pNB</i> -Est13. .... 65
Abb 4.19 bis 4.21:	MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken der <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterasen <i>pNB</i> -Est17, <i>pNB</i> -Est19 und <i>pNB</i> -Est13. .... 67
Abb. 4.22:	Schematische Darstellung der unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten gegenüber Phthalsäureestern mit zunehmender Kettenlängen. .... 69
Abb. 4.23:	Substratspezifitäten der <i>pNB</i> -Est13 gegenüber Triglyceriden und Methylestern mit unterschiedlicher Kettenlänge..... 72
Abb. 4.24:	Inhibierender Einfluß von PMSF und 4-FPBA auf <i>pNB</i> -Est13. .... 74
Abb. 4.25:	Native PAGE der Überstände aus der Kultivierung der Sekretionsversuche nach einer Esterase-Aktivitäts-Färbung. .... 76
Abb. 4.26:	<sup>1</sup> H-NMR-Spektrum von Bis-( <i>p</i> -methylbenzoesäure)-ethylenglykolester..... 77
Abb. 4.27:	Nachweis der enzymatischen Hydrolyse und Identifizierung der Hydrolyseprodukte von Bis-( <i>p</i> -methylbenzoesäure)-ethylenglykolester durch <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterasen..... mittels gekoppelter GC/MS..... 78
Abb 4.28:	MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken der untersuchten <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterasen gegenüber PET-Dimer..... 79
Abb. 4.29:	Abhängigkeit der Lysehofgröße von der eingesetzten Enzymkonzentration von <i>pNB</i> -Est13..... 80
Abb. 4.30:	Agarplatten-Assay mit Bis-( <i>p</i> -methylbenzoesäure)-ethylenglykolester (PET-Dimer) als Substrat. .... 81
Abb. 4.31:	Enzymaktivitäten von <i>ep</i> PCR-Mutanten der <i>pNB</i> -Est13 (A1 bzw. B1) und der Wildtyp-Esterase (WT). .... 82
Abb. 4.32:	Darstellung des katalytischen Tasche der <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase aus <i>B. subtilis</i> 168. ... 83
Abb. 4.33:	Enzymaktivitäten von Mutanten die durch rationales Proteindesign erhalten wurden..... 83

Abb. 4.34:	Enzymatische Hydrolyse von PET-Nanopartikeln durch <i>pNB-Est13</i> .....	84
Abb. 5.1:	Dreidimensionale Ansicht der <i>pNB-Est</i> aus <i>B. subtilis</i> ..... (Protein Databse ID 1qe3; SPILLER <i>et al.</i> , 1999).....	90
Abb. 8.1 bis 8.7:	MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken der <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase ( <i>pNB-Est17</i> ) aus dem ..... Stamm <i>B. subtilis</i> 17A1 gegenüber unterschiedlichen Phthalaten, Terephthalaten ..... und PET-Dimer. ....	127
Abb. 8.8 bis 8.14:	MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken der <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase ( <i>pNB-Est19</i> ) aus dem ..... Stamm <i>B. licheniformis</i> 19C5 gegenüber unter-schiedlichen Phthalaten, Terephthalaten ..... und PET-Dimer. ....	128
Abb. 8.15 bis 8.21:	MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken der <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase ( <i>pNB-Est13</i> ) aus dem ..... Stamm <i>B. licheniformis</i> DSM13 gegenüber unterschiedlichen Phthalaten, Terephthalaten ..... und PET-Dimer. ....	129
Tab. 2.1:	Aufführung einiger unterschiedlicher Organismen, deren Esterasen bereits bekannt ..... und beschrieben sind (nach PANDA & GOWRISHANKAR, 2005). ....	10
Tab. 2.2:	Zusammenstellung biochemisch charakterisierter Esterasen aus der Gattung der ..... <i>Bacillaceae</i> .....	14
Tab. 2.3:	Übersicht über kurzkettige Phthal- und Terephthalsäureester abbauende Mikroorganismen. ....	16
Tab. 3.1:	Übersicht der verwendeten Bakterienstämme. ....	22
Tab. 3.2:	Übersicht der verwendeten Vektoren. ....	22
Tab. 3.3:	Übersicht der rekombinanten Plasmide.....	23
Tab. 3.4:	Übersicht der verwendeten Oligonukleotide. ....	24
Tab. 3.5:	Pipettierschema einer Standard-PCR. ....	30
Tab. 3.6:	Pipettierschema einer Sequenzierungs-PCR .....	31
Tab. 3.7:	Pipettierschema für die <i>error-prone</i> -PCR. ....	32
Tab. 4.1:	Substratpräferenzen ermittelt aus dem Rohextrakt der mikrobiellen Isolate.....	45
Tab. 4.2:	Darstellung der einzelnen Schritte der biochemischen Reinigung. ....	45
Abb. 4.2:	SDS-PAGE aller durchgeführten Reinigungsschritte ausgehend vom Rohextrakt. ....	47
Tab. 4.3:	Polypeptidsequenzen ermittelt durch MALDI-TOF-Analyse des gereinigten Enzyms. ....	48
Tab. 4.4:	Prozentuale Identitätswerte der verschiedenen <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterasen. ....	51
Tab. 4.5:	Reinigung der heterolog in <i>E. coli</i> B ER2566 exprimierten <i>pNB</i> -Esterasen durch ..... Chitin-Agarose bzw. Ni-NTA Affinitätschromatographie. ....	55
Tab. 4.6:	Charakteristische Lauflängen ( $R_f$ -Werte) der Edukte und Produkte ermittelt ..... durch dünn-schichtchromatographische Analysen der Reaktionsansätze mit ..... <i>pNB</i> -Esterasen.....	56
Tab. 4.7:	Einfluß unterschiedlicher Puffer auf die enzymatische Aktivität der <i>pNB-Est13</i> , ..... <i>pNB-Est17</i> und <i>pNB-Est19</i> . ....	58
Tab. 4.8:	$k_M$ - und $v_{max}$ -Werte sowie $k_{cat}$ und $k_{cat}/k_M$ von DMT, DMIP und DMP der <i>pNB-Est17</i> , ..... <i>pNB-Est19</i> und <i>pNB-Est13</i> . ....	66
Tab. 4.9:	$k_M$ - und $v_{max}$ -Werte sowie $k_{cat}$ und $k_{cat}/k_M$ von DEP, DBP und DET der <i>pNB-Est17</i> , ..... <i>pNB-Est19</i> und <i>pNB-Est13</i> . ....	68
Tab. 4.10:	Ermittelte Daten der <i>pNB-Est17</i> gegenüber Phthal- und Terephthalsäureestern. ....	69
Tab. 4.11:	Ermittelte Daten der <i>pNB-Est19</i> gegenüber Phthal- und Terephthalsäureestern. ....	69
Tab. 4.12:	Ermittelte Daten der <i>pNB-Est13</i> gegenüber Phthal- und Terephthalsäureestern. ....	69
Tab. 4.13:	Substratspezifitäten der <i>pNB-Est</i> DSM13, <i>pNB-Est</i> 17A1 und <i>pNB-Est</i> 19C5 ..... bei unterschiedlichen Kettenlängen der <i>para</i> -Nitrophenylester. ....	70
Tab. 4.14:	Spezifische Aktivitäten der <i>pNB-Est13</i> gegenüber Tri-, Di- und Monoacetin.....	71
Tab. 4.15:	Einfluss von unterschiedlichen Detergenzien und Metallsalzen auf die ..... enzymatische Aktivität der <i>pNB-Est</i> DSM13. ....	73
Tab. 4.16:	Darstellung der Ergebnisse der Sekretionsversuche mit <i>pNB-Est19</i> und dem ..... LipA- und LipB-defizienten Stamm <i>B. subtilis</i> TEB1030. ....	75
Tab. 4.17:	Kinetische Daten der untersuchten <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterasen <i>pNB-Est17</i> , <i>pNB-Est19</i> und <i>pNB-Est13</i> gegenüber PET-Dimer.....	79

## 1 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Isolierung und Identifizierung von Esterasen, die eine enzymatische Aktivität gegenüber Polyethylenterephthalat (PET) aufweisen. Ein auf dem Modellsubstrat Diethylphthalsäure (DEP) durchgeführtes mikrobiologisches *screening* führte zur Isolierung der Stämme *B. licheniformis* 19C5 und *B. subtilis* 17A1. Aus Letzterem wurde die Dialkylphthalat-Hydrolase biochemisch gereinigt, mittels MALDI-TOF analysiert und als *para*-Nitrobenzyl-Esterase (*p*NB-Est) identifiziert. Die korrespondierenden Gene der Esterasen aus den Isolaten *B. subtilis* 17A1 (*p*NB-Est17) und *B. licheniformis* 19C5 (*p*NB-Est19) wurden durch die Erstellung von Genombanken und die Sequenzierung der genomischen Fragmente esterolytisch aktiver Klone erhalten. Durch *database-mining* wurde eine weitere *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *B. licheniformis* DSM13 (*p*NB-Est13) identifiziert. Die *para*-Nitrobenzyl-Esterasen codierenden Gene wurden in Expressionsvektoren subkloniert, heterolog in *E. coli* als Intein- bzw. Poly-Histidin-Fusionsproteine exprimiert und mittels Affinitätschromatographie zur biochemischen Homogenität gereinigt. Bei der enzymologischen Charakterisierung stand die Ermittlung der kinetischen Parameter wie  $v_{\max}$ ,  $k_M$ ,  $k_{\text{cat}}$  und  $k_{\text{cat}}/k_M$  gegenüber verschiedenen kurzkettigen Dialkylphthalaten im Vordergrund. Das bei der enzymatischen Hydrolyse durch Esterasen entstehende Produkt konnte mittels GC/MS-Analysen als der jeweilige korrespondierende Monoester der Ausgangsverbindung identifiziert werden. Die Kettenlängenspezifitäten der Esterasen wurden durch Messungen mit *para*-Nitrophenylestern unterschiedlicher Kettenlängen ermittelt. Für die *para*-Nitrobenzyl-Esterase *p*NB-Est13 wurde sowohl das Temperatur- und pH-Optimum als auch die Temperatur- und pH-Stabilität ermittelt. Das Substratspektrum der *p*NB-Est13 wurde durch enzymatische Aktivitätstests gegenüber Triglyceriden und Methylestern erweitert und der Einfluss von Detergenzien, Metallsalzen, PMSF und 4-FPBA auf die Aktivität bestimmt. Bei der Hydrolyse von PET-Nanopartikeln konnte Terephthalsäure-Diethylenglykolester als Produkt mittels LC/MS nachgewiesen werden. Die N-terminale Fusion von *p*NB-Est19 und der Signalsequenz von LipA aus *B. subtilis* 168 führte zur Sekretion der Esterase durch *B. subtilis* TEB1030 ins Medium. Mit Bis-(*p*-methyl-benzoesäure)-ethylenglykolester (PET-Dimer) konnte ein Substrat synthetisiert werden, welches die Grundlage eines *high-throughput-screening*-Systems zur schnellen Identifizierung potentieller PET-Esterasen bildete. Gerichtete Evolution (*ep*PCR) führte zur Isolierung von zwei Enzym-Mutanten mit mutmaßlich erhöhter Aktivität, so dass die Funktionalität dieses Systems nachgewiesen werden konnte.

## 1 Summary

The aim of this work was to isolate and identify esterases that have the ability to hydrolyse poly(ethylene terephthalate) (PET). Two microorganisms *B. licheniformis* 19C5 and *B. subtilis* 17A1 were isolated using a screening based on model substrate diethyl phthalate (DEP). The dialkylphthalate hydrolase from the wild type organism *B. subtilis* 17A1 was biochemically purified, analyzed with MALDI-TOF, and identified as a *para*-nitrobenzyl esterase (*pNB-Est*). Two esterase genes (*pNB-Est19*; *pNB-Est17*) were identified from the two isolates *B. licheniformis* 19C5 and *B. subtilis* 17A1 after sequencing the inserts of active clones from genomic libraries. Using database-mining another *B. licheniformis* DSM13 *para*-nitrobenzyl esterase (*pNB-Est13*) was identified. The *para*-nitrobenzyl esterase genes were subcloned into expression vectors, heterologously expressed in *E. coli* as intein and poly histidine fusion proteins and purified to biochemical homogeneity using affinity chromatography.

The biochemical characterization of these enzymes resulted in the determination of the kinetic parameters  $v_{max}$ ,  $k_M$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/k_M$  using short chain dialkylphthalates. The product of the incubation of the three esterases with dialkylphthalates was identified as the corresponding monoester using GC/MS analysis. The chain length specificity was determined using *para*-nitrophenyl esters with different chain lengths.

The pH and temperature profile of *pNB-Est13* and the temperature and the pH stability was determined. The selectivity of *pNB-Est13* towards substrates was demonstrated using triglycerides and methyl esters with different chain lengths. The effect of metal ions, surfactants, PMSF and 4-FPBA were also determined. After incubation with *pNB-Est13* the hydrolysis product of PET nano particles was identified as diehtylene glycol terephthalate using LC/MS.

Using the N-terminal fusion of *pNB-Est19* with the signal sequence from lipase A (*B. subtilis* 168) and homologous expression of *B. subtilis* TEB1030, the esterase could be secreted to the growth media.

A new *high throughput* agar plate assay was developed based on the model substrate bis-(*p*-methylbenzoic acid)-ethylene glycol ester (PET dimer) that was synthesized in this work. Using this screening potential PET-esterases could be obtained easily. The functionality of this agar plate assay was demonstrated by isolating two potentially improved *epPCR* mutants demonstrating larger halos in this test system.

## 2 Theoretische Grundlagen

Berichte über die biotechnologische Herstellung von alkoholischen Getränken reichen über 8000 Jahre in die Vergangenheit zurück (ULBER & SOYEZ, 2004). Doch erst Wissenschaftler wie beispielsweise ANTONI VAN LEEUWENHOEK, LOUIS PASTEUR und ALEXANDER FLEMMING, die durch ihre Entdeckungen den Weg zur modernen Biotechnologie ebneten, erkannten und beschrieben, was in der altertümlichen Biotechnologie unwissentlich eingesetzt wurde. Die moderne Biotechnologie stellt eine interdisziplinäre Wissenschaft dar, die sich aus verschiedenen Wissenschaftszweigen wie Biochemie, Mikrobiologie, Zellbiologie und Verfahrenstechnik zusammensetzt. Als Ziel wird die technische Anwendung des Potentials von Mikroorganismen, Zell- und Gewebekulturen sowie Teilen hiervon angestrebt (EUROPEAN FEDERATION OF BIOTECHNOLOGY, 1981).

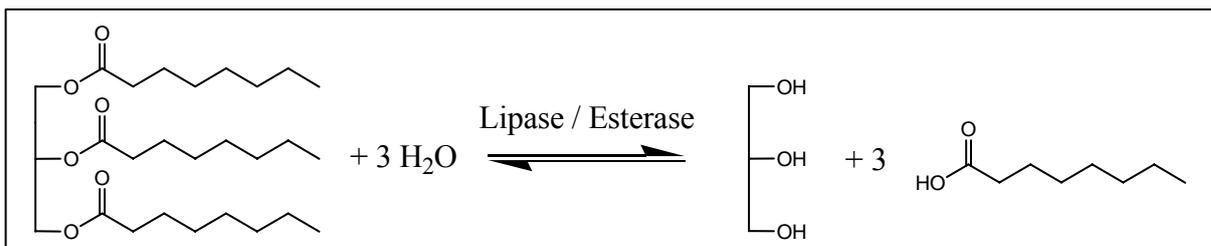
Die Umsetzung organischer Verbindungen durch Enzyme (Biokatalysatoren) ermöglicht katabole und anabole Stoffwechselwege von Organismen bei physiologischen Temperaturen. Diese Eigenschaft der Biokatalysatoren, sowie ihre hohe Spezifität und Funktionalität, legt eine technologische Nutzung von Enzymen nahe. Die Einsatzgebiete von Biokatalysatoren aus der heutigen Sicht sind äußerst mannigfaltig. So werden beispielsweise Carbonsäuren und Aminosäuren als essentielle Zwischen- und Endprodukte der Fein- und Spezialchemie mit Hilfe von Amidasen aus Amiden gewonnen (EGOROVA *et al.*, 2003). In der Nahrungsmittelindustrie werden zur Aroma- und Geschmackstoffbildung Thioglucosidasen zur Freisetzung von Senfölen aus Glucosinolaten eingesetzt (RUTTLOFF *et al.*, 1997). Die Bestimmung wichtiger diagnostischer Parameter wie beispielsweise Ammoniak und Harnstoff erfolgt in enzymatisch gekoppelten Messmethoden mit Glutamatdehydrogenase bzw. Urease (RUTTLOFF *et al.*, 1994).

Esterasen und Lipasen sind weit verbreitete Enzyme, die in vielen Mikroorganismen und in nahezu allen Pflanzen und Tieren vorkommen und denen ein enormes biotechnologisches Potential zugesprochen wird (BENJAMIN & PANDEY, 1998). Im Folgenden werden die Klassifizierung, die strukturellen Kongruenzen einschließlich des katalytischen Mechanismus sowie die Unterschiede im Substratspektrum und in der Wirkungsweise dieser Enzyme dargestellt und erläutert. Zusätzlich werden sowohl mögliche physiologische Funktionen von Esterasen als auch deren industrielle Bedeutung vorgestellt. Desweiteren wird der Wissensstand der mikrobiellen und enzymatischen Degradation von Phthalsäureestern einschließlich des Polyesters Polyethylenterephthalat (PET) dargestellt.

## 2.1 Esterasen und Lipasen: Gemeinsamkeiten und Unterschiede

### 2.1.1 Nomenklatur lipolytischer Enzyme

Die Klassifizierung von Enzymen erfolgt durch das *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB). Esterasen und Lipasen werden dort aufgrund ihrer Reaktivität zu den Hydrolasen (EC 3.), zu den Hydrolasen, die Esterbindungen hydrolysieren (EC 3.1) und zu den Carboxylester-Hydrolasen (EC 3.1.1) gezählt. Die Unterscheidung von Esterasen und Lipasen erfolgt aufgrund unterschiedlicher Substratspezifitäten in Carboxyl-Esterasen (EC 3.1.1.1) und Triacylglycerol-Lipasen (EC 3.1.1.3). Sowohl Lipasen als auch Esterasen katalysieren unter anderem die hydrolytische Umsetzung von Fettsäuren an Triglyceriden (Abb. 2.1) und werden daher auch unter dem Oberbegriff „lipolytisch-aktive Enzyme“ zusammengefasst.



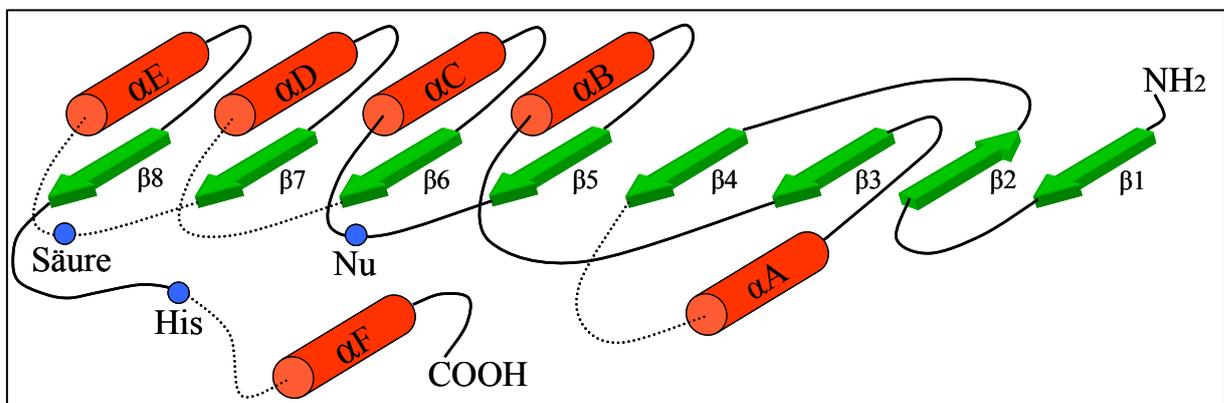
**Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Hydrolyse von Triglyceriden durch Esterasen und Lipasen.** Esterasen bevorzugen eher kurzkettenige Triglyceride, wohingegen Lipasen langkettige Triglyceride präferieren (JÄGER & REETZ, 1998).

### 2.1.2 Strukturverwandtschaft und katalytischer Mechanismus

Anhand der dreidimensionalen Strukturen der Acetylcholin-Esterase aus *Torpedo californica* (SUSSMANN *et al.*, 1991), der Dienlacton-Hydrolase aus *Pseudomonas* sp. (PATHAK & OLLIS, 1990), der Lipase aus *Geotrichum candidum* (SCHRAG *et al.*, 1991), der Carboxypeptidase aus Weizen (Liao & Remington, 1990) sowie der Haloalkandehalogenase aus *Xanthobacter autotrophicus* (FRANKEN *et al.*, 1991) zeigten OLLIS *et al.* (1992) ein bei allen Enzymen wiederzufindendes Strukturelement: das  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungsmotiv (Abb 2.2). Dieses Faltungsmotiv stellt das proteinogene Gerüst für die enzymatische Funktion und die Substratspezifität dar und ist beispielhaft für die divergierende Evolution.

Das  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungsmotiv besteht aus 8 zentralen  $\beta$ -Faltblättern, bei denen das zweite  $\beta$ -Faltblatt antiparallel angeordnet ist. Die  $\beta$ -Faltblätter sind von  $\alpha$ -Helices flankiert und

gegeneinander verdrillt, so dass die außen gelegenen Stränge in einem Winkel von etwa  $90^\circ$  zueinander liegen. Das aktive Zentrum der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen besteht aus einer katalytischen Triade mit einem Nukleophil, einer Säure und einem Histidin. Das nukleophile Serin befindet sich eingebettet in einem hochkonservierten Gly-X-Ser-X-Gly-Pentapeptid, welches zwischen dem  $\beta 5$ -Strang und der darauffolgenden  $\alpha C$ -Helix liegt und den „nukleophilen Ellenbogen“ ausbildet. Grund für die Ausbildung dieses Strukturelementes ist der energetisch ungünstige  $\psi$ - und  $\phi$ -Torsionswinkel des Peptidrückgrats, der das nukleophile Serin in eine exponierte Lage bringt. Die katalytische Säure (Aspartat oder Glutamat) liegt zwischen dem  $\beta 7$ -Strang und der  $\alpha E$ -Helix. Das Sauerstoffatom der Carboxylgruppe bildet eine Wasserstoffbrücke zu einem Stickstoffatom des Imidazolringes des am Katalysemechanismus beteiligten Histidins aus, welches hinter dem  $\beta 8$ -Strang lokalisiert ist.



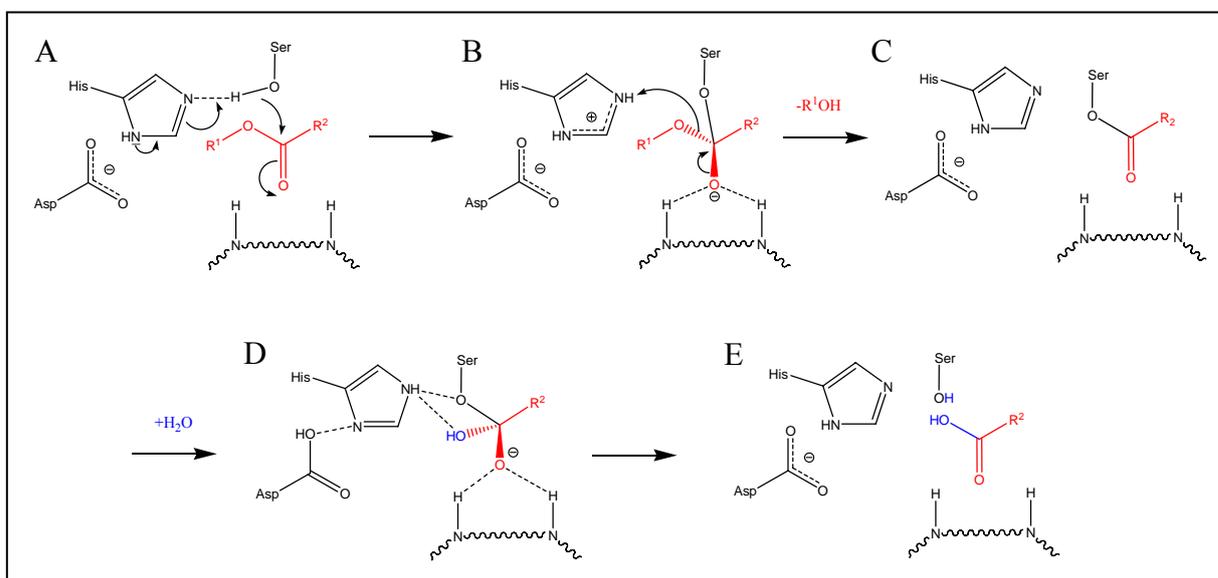
**Abb. 2.2: Schematische Darstellung des  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungsmotivs nach OLLIS *et al.* (1992).** Hierbei symbolisieren grüne Pfeile die in dem Faltungsmotiv vorkommenden  $\beta$ -Stränge und die roten Zylinder die flankierenden  $\alpha$ -Helices. Die katalytisch aktiven Aminosäuren sind als blaue Punkte dargestellt. Gestrichelte Linien zeigen die Bereiche mit Abweichungen bei den von OLLIS *et al.* (1992) untersuchten Hydrolasen. Nu: Nukleophil; His: Histidin; Säure: Aspartat oder Glutamat.

Die Zugehörigkeit der Esterasen und Lipasen zu den  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen und deren strukturelle Ähnlichkeit zu den Serin-Proteasen lassen auf denselben Reaktionsmechanismus rückschließen. Dieser Reaktionsmechanismus konnte durch Strukturanalysen mit gebundenem Lipase-Inhibitor verifiziert werden (NARDINI & DIJKSTRA, 1999). Der Mechanismus der Esterolyse von Esterasen und Lipasen ist in die Teilschritte Acylierung und Deacylierung aufgegliedert.

Acylierung: die Esterolyse beginnt mit dem Angriff der nukleophilen Hydroxylgruppe des katalytisch aktiven Serins auf den Carbonyl-Kohlenstoff des Substrats. Aufgrund der Abstraktion eines Protons durch das Histidin wird der nukleophile Charakter des Serins verstärkt. Die korrekte Ausrichtung des Histidin-Imidazolringes wird durch den Aspartat- bzw. Glutamatrest gewährleistet, der darüber hinaus auch die entstehende positive Ladung am

Histidin kompensiert. Der zu hydrolysierende, kovalent am Serinrest gebundene Ester bildet ein negativ geladenes, tetraedrisches Zwischenprodukt. Dieses tetraedrische Zwischenprodukt und damit die negative Ladung des Carbonyl-Sauerstoffs wird durch das sog. „oxyanion hole“ stabilisiert (Abb. 2.3). Dieses wird aus zwei NH-Gruppen des Peptid-Rückgrats gebildet, eines direkt hinter dem aktiven Serin und eines am Ende des  $\alpha 3$ -Stranges (KAZLAUSKAS, 1994; SCHRAG *et al.*, 1997). Bei einigen Lipasen bildet sich das „oxyanion hole“ erst bei einer Konformationsänderung durch die Reorientierung des „Deckels“ aus (CAMBILLAU & VAN TILBEURGH, 1993), wobei andere lipolytische Enzyme diese Struktur bereits enthalten (MARTINEZ *et al.*, 1994; VAN POUDEROYEN *et al.*, 2001). Nachfolgend wird der Alkohol durch den Protonentransfer vom Histidin auf das Sauerstoffatom des Substrates freigesetzt. Die Säurefunktion des Substrates wird kovalent mit dem Serinrest verestert („Acyl-Enzym“).

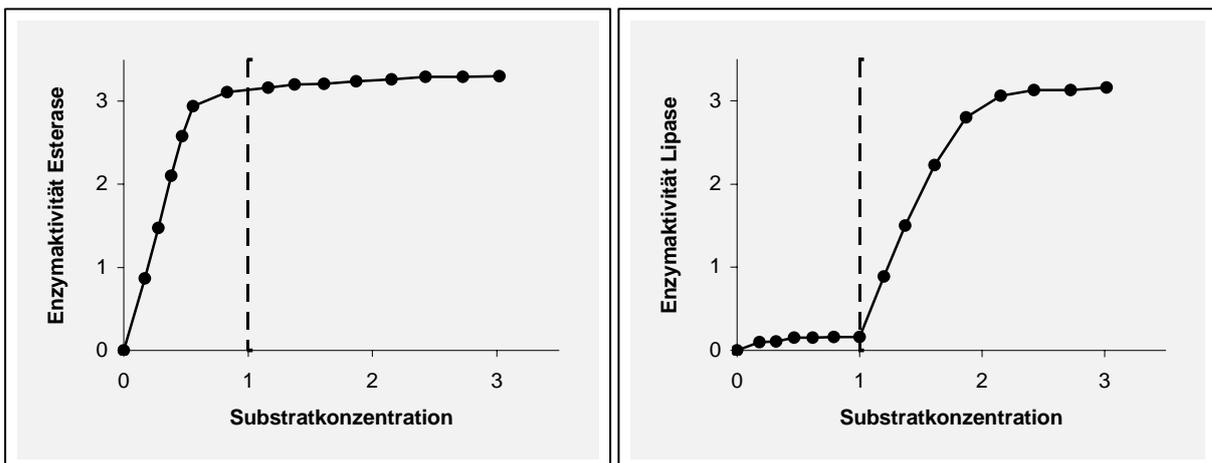
Deacylierung: Die Deacylierung beginnt mit der Abstraktion eines Protons von einem Wassermolekül durch das katalytisch aktive Histidin. Das entstehende Hydroxy-Ion reagiert mit dem Carbonyl-Kohlenstoff der kovalent am Enzym gebundenen Acylgruppe. Dadurch entsteht wiederum ein tetraedrischer Übergangszustand, der ebenfalls durch das „oxyanion hole“ des Enzyms stabilisiert wird. Das Enzym wird durch die Übertragung eines Protons vom Histidinrest auf das Serin Sauerstoffatom regeneriert. Die Acylgruppe wird dadurch freigesetzt, und das Enzym kann eine neue Hydrolysereaktion katalysieren.



**Abb. 2.3: Reaktionsmechanismus von Esterasen und Lipasen.** Schematische Darstellung der katalytischen Triade aus den Aminosäuren Serin (Ser), Aspartat (Asp) und Histidin (His) sowie die zur Stabilisierung des Übergangszustandes wichtigen NH-Gruppen des Peptid-Rückgrats („oxyanion hole“). (A) Aktivierung des nukleophilen Serinrestes durch das benachbarte Histidin und nukleophiler Angriff auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Substrates. (B) Tetraedrische Zwischenstufe mit negativer Ladung am Sauerstoffatom wird durch Wasserstoffbrücken zum „oxyanion hole“ stabilisiert. (C) Kovalentes Intermediat („Acyl-Enzym“). (D) Zweite tetraedrische Zwischenstufe, die durch das „oxyanion hole“ stabilisiert wird. (E) Die Fettsäure wird freigesetzt und das Enzym liegt in der aktiven Ausgangsform vor. Das dargestellte Reaktionsschema vereint Reaktionen der auf Seite 5 und 6 zitierten Veröffentlichungen.

### 2.1.3 Unterscheidung von Esterasen und Lipasen

Unterschiede im biochemischen Verhalten von Esterasen und Lipasen konnten bereits im Jahr 1958 aufgezeigt werden. SARDA und DESNUELLE beobachteten bei der Hydrolyse von Triacetin, dass Esterasen (Pferdeleber-Esterase) schon bei geringen Substratkonzentrationen hohe Aktivitäten aufweisen, wohingegen die enzymatische Aktivität von Lipasen (Schweinepankreas-Lipase) erst oberhalb der kritischen Micellarkonzentration des Substrates stark ansteigt (Abb. 2.4). Dieses für Lipasen typische Phänomen wird als „Grenzflächenaktivierung“ bezeichnet. Die Grenzflächenaktivierung basiert auf einem amphiphilen Peptidsegment, welches das aktive Zentrum bedeckt („lid“ oder „flap“) und erst durch eine Konformationsänderung in Gegenwart einer Grenzfläche den Zugang des Substrates zum katalytischen Zentrum ermöglicht (BRZOZOWSKI *et al.*, 1991).



**Abb. 2.4: Schematische Darstellung der MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken von Esterasen und Lipasen im Vergleich nach SARDA & DESNUELLE (1958).** Links: die klassische MICHAELIS-MENTEN-Kinetik für Pferdeleber Esterase mit Triacetin als Substrat; rechts: die Interphasenaktivierung von Schweinepankreas Lipase ebenfalls mit Triacetin als Substrat; die gestrichelten Linien in den Diagrammen symbolisieren die kritische Micellarkonzentration des Substrates.

Bei Esterasen wurden weder Grenzflächenaktivierungen noch Deckelstrukturen entdeckt, so dass diese Phänomene lange als Unterscheidungskriterien von Esterasen und Lipasen dienten. Die in den 90er Jahren aufkommende Flut an biochemischen Daten und dreidimensionalen Strukturen brachte jedoch auch Lipasen hervor, die keine Grenzflächenaktivierung aufzeigten (NOBLE *et al.*, 1993; JAEGER *et al.*, 1993; LESUISSE *et al.*, 1993; JAEGER *et al.*, 1994; UPPENBERG *et al.*, 1994; THIRSTRUP *et al.*, 1994) oder kein Strukturmerkmal „lid“ trugen (HJORTH *et al.*, 1993; UPPENBERG *et al.*, 1994; VAN POUDEROYEN *et al.*, 2001). Damit sind die Grenzflächenaktivierung und das Vorhandensein von Deckelstrukturen keine

ausreichenden Kriterien für die Unterscheidung von Esterasen und Lipasen. Das sicherste Merkmal für die Klassifizierung dieser lipolytischen Enzyme ist daher noch immer die Präferenz von kurzkettigen Glycerinestern für Esterasen und langkettigen Glycerinestern für Lipasen (BORNSCHEUER, 2002).

## 2.2 Esterasen: Ein Überblick

### 2.2.1 Physiologische Funktion von Esterasen

Die physiologischen Funktionen vieler bereits biochemisch charakterisierter Esterasen sind noch immer nicht geklärt (KHALAMEYZER *et al.*, 1998). Manche Esterasen sind in metabolischen Stoffwechselwegen eingegliedert, die zur Verfügbarkeit von Energie-Kohlenstoffquellen dienen. So entfernen Acetyl-Xylan-Esterasen die Acetyl-Gruppen der C-2 oder C-3 Position von D-Xylopyranosylresten (BIELY, 2003) und Feruloyl-Esterasen Ferulasäure der Positionen C-2 oder C-5 der  $\alpha$ -L-Arabinofuranosyl-Seitenketten (SAULNIER & THIBAUT, 1999). Diese Hydrolyse der Seitenketten ermöglicht den Zugang zur Hemicellulose-Hauptkette, die dann durch Endo-1,4- $\beta$ -Xylanasen,  $\alpha$ -Glucuronidasen,  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidasen und  $\beta$ -Xylosidasen degradiert wird (HOWARD *et al.*, 2003). Die Zellwand degradierenden Esterase-Aktivitäten mancher pflanzenpathogener Bakterien und Pilze werden als Pathogenitätsfaktor diskutiert. Die extrazelluläre Esterase aus *Streptomyces scabies* scheint beispielsweise bei der Penetration durch die Hydrolyse von Suberin der erste Schritt einer Pathogenitätskaskade zu sein (MCQUEEN & SCHOTTEL, 1987; RAYMER *et al.*, 1990).

Der hydrolytischen Aktivität von Esterasen wird die Resistenz einiger Stämme gegenüber Paraben zugesprochen: *Cladosporium resinae* (SOKOLOSKI *et al.*, 1962), *Pseudomonas aeruginosa* (ZEDAN & SERRY, 1984) und *Burkholderia cepacia* (CLOSE & NIELSEN, 1976; SUEMITSU *et al.*, 1990). Eine genauere Charakterisierung der Parabene hydrolysierenden Esterasen aus *Enterobacter cloacae* und *Enterobacter gergoviae* wurde erstmals von VALKOVA *et al.* (2001, 2002) vorgenommen.

Eine weitere wichtige Rolle der esterolytischen Aktivitäten ist die Detoxifikation von Bioziden. Die Resistenz gegenüber Insektiziden resultiert aus einer Expression von Esterasen, die die Insektizide hydrolysieren (BLACKMAN *et al.*, 1995). Die Resistenz gegenüber Fusidinsäure von *Streptomyces lividans* basiert auf einer esterolytischen Spaltung dieses

Antibiotikums (VAN DER HAAR *et al.*, 1997) genau wie die Hydrolyse von dem antiviralen Antibiotikum und Phytotoxin BREFELDIN A durch eine Esterase aus *Bacillus subtilis* (WEI *et al.*, 1996). Eine mögliche Involvierung einer Esterase aus *Lactococcus lactis* im Phospholipid-Metabolismus wird von FERNÁNDEZ *et al.* (2000) diskutiert, ebenso wie die Teilnahme an der Glutathion-abhängigen Formaldehyd-Detoxifikation. Die esterolytische Aktivität, die der Degradation von Phthalsäure- und Terephthalsäureestern zugrunde liegt, wird ausführlich in Kapitel 2.4 erläutert.

## 2.2.2 Industrielle Bedeutung von Esterasen

Das biotechnologische Interesse von lipolytischen Enzymen beruht darauf, dass Esterasen und Lipasen keine Cofaktoren benötigen und eine vergleichsweise hohe Stabilität in organischen Lösungsmitteln aufweisen (BORNSCHEUER, 2002). Zusätzlich spricht die Chemo-, Regio- und Stereoselektivität für einen industriellen Einsatz unterschiedlichster Biokatalysatoren. Die Verwendung erneuerbarer Rohstoffe, die milderen und umweltfreundlicheren Reaktionsbedingungen, die CO<sub>2</sub>-neutrale Produktion, der niedrigere Energieverbrauch und die leichtere Abfallentsorgung stellen Vorteile der biotechnologischen Herstellung von Produkten gegenüber den chemischen Verfahren dar. Außerdem ermöglicht der Einsatz von Biokatalysatoren die Herstellung komplexer Moleküle, die durch chemische Reaktionen nicht zugänglich sind (FESTEL *et al.*, 2004).

Eine Vielzahl von Esterasen aus unterschiedlichsten Organismen sind aufgrund des hohen biotechnologischen Interesses bereits beschrieben worden (Tab. 2.1; nach PANDA & GOWRISHANKAR, 2005). Neben der Suche nach grundsätzlich neuen Biokatalysatoren durch kultivierbare Mikroorganismen werden heute auch Metagenomansätze und Methoden der gerichteten Evolution angewendet. Näheres dazu findet sich in Kapitel 2.2.3.

Die Herstellung enantiomerenreiner Verbindungen ist für die pharmazeutische Industrie von größtem Interesse. Die unterschiedliche physiologische Wirkungsweise von Enantiomeren wurde auf tragische Weise Mitte der fünfziger Jahre bekannt. Das Pharmazeutikum THALIDOMID („Contergan“), welches als Racemat schwangeren Frauen als Schlaf- und Beruhigungsmittel verabreicht wurde, brachte bei den Neugeborenen verheerende Missbildungen hervor. Nachträglich durchgeführte Tierversuche zeigten, dass nur die R-Form die gewünschte Wirkungsweise hervorruft, die S-Form hingegen teratogen wirkt. Bezüglich dieser Enantiomeren-Problematik wurden die wissenschaftlichen Anstrengungen ausgeweitet,

um enantiomerenreine Stoffe zu produzieren. Diesbezüglich ist die Carboxylesterase NP (QUAX & BROEKHUIZEN, 1994) die am besten untersuchte Esterase (BORNSCHEUER, 2002).

**Tab. 2.1: Aufführung einiger unterschiedlicher Organismen, deren Esterasen bereits bekannt und beschrieben sind (nach PANDA & GOWRISHANKAR, 2005).**

<b>Organismus</b>	<b>Referenz</b>
<i>Bacillus</i> sp.	KIM <i>et al.</i> , 2004
<i>Lactobacillus</i> sp.	CHOI & LEE, 2001
<i>Sporotrichum</i> sp.	TOPAKAS <i>et al.</i> , 2003
<i>Ophistoma</i> sp.	CALERO-RUEDA <i>et al.</i> , 2002
<i>Humicola</i> sp.	HATZAKIS <i>et al.</i> , 2003
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp.	SHAO & WIEGEL, 1995
<i>Streptomyces</i> sp.	NISHIMURA & INOUE, 2000
<i>Pseudomonas</i> sp.	KIM <i>et al.</i> , 2002 (a, b)
<i>Saccharomyces</i> sp.	LOMOLINO <i>et al.</i> , 2003
<i>Candida</i> sp.	GHOSH <i>et al.</i> , 1991
<i>Micrococcus</i> sp.	FERNANDEZ <i>et al.</i> , 2004
<i>Aspergillus</i> sp.	GIULIANI <i>et al.</i> , 2001
<i>Penicillium</i> sp.	HORNE <i>et al.</i> , 2002
Tierischer Ursprung	FINER <i>et al.</i> , 2004
Pflanzlicher Ursprung	PRINGLE & DICKSTEIN, 2004

Eine Esterase aus *Trichosporum brassicae* wird bei der Produktion von optisch reinem (S)- und/oder (R)-Ketoprofen [2-(3-Benzoylphenyl)propionsäure] verwendet (SHEN *et al.*, 2002), ebenso wie eine Esterase aus *Pseudomonas* sp. zur Herstellung von Ibuprofen [(R, S)-2-(4-Isobutylphenyl)propionsäure] (KIM *et al.*, 2002 a, b). Untersuchungen von kinetischen Racematspaltungen von 1,2-*O*-Isopropylidenglycerol wurden u.a. mit einer Esterase aus *Bacillus coagulans* von MOLINARI *et al.* (1996) und von DRÖGE *et al.* (2001) mit einer Esterase aus *Bacillus subtilis* durchgeführt. Eine Esterase aus *Arthrobacter globiformis* wird bei der Synthese von (+)-trans-(1R,3R)-Chrysantemsäure eingesetzt.

Neben der Herstellung enantiomerenreiner Verbindungen werden Esterasen auch in vielen anderen, bereits technisch realisierten Verfahren eingesetzt oder sind Gegenstand akademischer Forschung. Feruloylesterasen wurden sowohl für die Biokonversion von Lignocelluloseabfällen eingesetzt (FAULDS *et al.*, 2004) als auch für die Synthese von Estern (z.B. Pentylferulat) in organischen Lösungsmitteln (GIULIANI *et al.*, 2001; TOPAKAS *et al.*, 2005). Neben der Eigenschaft Ferulasäure - eine natürliche bioaktive Substanz (GRAF, 1992) - freizusetzen (ASTHER *et al.*, 2002; KROON *et al.*, 2000) bietet die synergistische Aktivität von Xylanasen und Esterasen die Möglichkeit, diese Enzyme sowohl in der Papierindustrie als

auch in der Futtermittel-, Getränke- und Nahrungsmittelindustrie einzusetzen (RECORD *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 1995a; GRASSIN & FAUQUEMBERGUE, 1996; MAAT *et al.*, 1992).

Aufgrund der effektiven Hydrolyse von Triglyceriden und Sterolestern wird eine Sterolesterase aus *Ophistoma piceae* in der Papierherstellung angewendet (CALERO-RUEDA *et al.*, 2002). Um Harzablagerungen während des Papier-Herstellungsprozesses zu minimieren, werden ebenfalls Sterylesterasen und Cholesterylesterasen aus *Pseudomonas* sp., *Chromobacterium viscosum* und *Candida rugosa* eingesetzt (KONTKANEN *et al.*, 2004; CALERO-RUEDA *et al.*, 2004). Desweiteren bieten Phosphotriesterasen aus *Brevundimonas diminuta* und *Alteromonas* sp. die Möglichkeit, landwirtschaftlich eingesetzte Insektizide zu detoxifizieren (HORNE *et al.*, 2002). Die Kooperation von Esterasen und Cellulasen wird genutzt, um Celluloseacetat zu degradieren (MORIYOSHI *et al.*, 1999; MORIYOSHI *et al.*, 2003). HASONA *et al.* (2002) beschreiben den Einsatz einer heterolog exprimierten Esterase aus *Pseudomonas putida*, die bei der fermentativen Ethanolproduktion von *E. coli* KO11 in einer verringerten Ethylacetat-Produktion und damit in einer einfacheren Reinigung des Ethanols resultiert. Die Degradation von Polyesterurethanen und Polyetherurethanen ist auf die esterolytische Aktivität aus *Comamonas acidovorans* und *Pseudomonas chlororaphis* zurückzuführen (HOWARD *et al.*, 2001). Die *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *Bacillus subtilis* NRRL B8079 (CHEN *et al.*, 1995b) ist ein bereits in technischer Anwendung der Cephalosporinproduktion eingesetztes Enzym. Die Inertisierung der Carboxylgruppe am Grundgerüst der Cephalosporins LORACARBEF durch eine *para*-Nitrobenzyl-Gruppe ermöglicht eine weitere chemische Modifikation anderer funktioneller Gruppen. Der letzte Schritt der Synthese von LORACARBEF ist die Abspaltung der *para*-Nitrobenzyl-Gruppe mit der *para*-Nitrobenzyl-Esterase und somit die Überführung in die aktive Cephalosporin-Carboxylsäure (ZOCK *et al.*, 1994).

### **2.2.3 Quellen neuer Biokatalysatoren**

Bis vor wenigen Jahren wurden lipolytische Enzyme ausschließlich aus kultivierbaren Mikroorganismen isoliert. Da nur ein geringer Teil der Mikroorganismen aus natürlichen Habitaten im Labor kultiviert werden kann (0,001 bis 1%; MILLER, 2000), war ein wesentlicher Teil der mikrobiellen Vielfalt unzugänglich (AMANN *et al.*, 1995; HANDELSMAN *et al.*, 1998). Ausweg aus diesem „biologischen Dilemma“ bietet die Klonierung von metagenomischer DNA, die aus unterschiedlichen Standorten isoliert wurde. Die erfolgreiche

Anwendung dieser Vorgehensweise wurde beispielsweise für lipolytische Enzyme von ELEND *et al.* (2006), LEE *et al.* (2004) und RHEE *et al.* (2005) beschrieben. Der Vergleich von Aminosäuresequenzen von Proteinen, von denen bisher keine proteinbiochemischen Daten bekannt sind, mit Proteinen bekannter Funktionalität kann ebenfalls zu neuen Biokatalysatoren mit verbesserten Eigenschaften führen („*database-mining*“, MARRS *et al.*, 1999; WACKETT, 2004). Durch rationales Protein-Design und „gerichtete Evolution“ werden Enzyme an die geforderten Prozessbedingungen angepasst (NESS *et al.*, 2000; ARNOLD, 2001; POWELL *et al.*, 2001; REETZ, 2002; HULT & BERGLUND, 2003; REETZ, 2004). Voraussetzung für das rationale Protein-Design sind gute Kenntnisse über das Zielenzym wie z.B. die dreidimensionale Struktur und der Reaktionsmechanismus. Anhand dieser Daten und Strukturen können computergestützte Modellierungen („*molecular modelling*“) erarbeitet werden, die Vorhersagen über Veränderungen der Struktur bzw. Wirkungsweise des Enzyms ermöglichen. Die Vorhersagen der Veränderungen müssen experimentell nachgewiesen werden. Die erforderlichen strukturspezifischen Daten für das rationale Protein-Design beschränken die Anzahl der potentiellen Biokatalysatoren, jedoch sind die heutzutage generierten Kristallographie- und NMR-Datensätze die Grundlage für einige erfolgreiche Beispiele des rationalen Protein-Designs, beispielsweise bezüglich der Selektivität von Enzymen (CHEN-GOODSPEED *et al.*, 2001; ROTTICCI *et al.*, 2001; MUGFORD *et al.*, 2004).

Bei Methoden der „gerichteten Evolution“ werden zufällige Mutationen innerhalb des enzymcodierenden Gens eingefügt und anschließend große Enzybibliotheken auf verbesserte Eigenschaften durchsucht. Grundlage für die Anwendung von Methoden der „gerichteten Evolution“ ist dabei ein an die jeweilige Problemstellung angepasstes *screening*-System, welches die Durchmusterung großer Expressionsbibliotheken erlaubt. Im Gegensatz zum rationalen Protein-Design sind genaue Kenntnisse über Struktur und Funktionalität nicht erforderlich. Grundsätzlich werden Mutagenesarten der „gerichteten Evolution“ in nichtrekombinative und rekombinative Methoden unterteilt. Zu den nichtrekombinativen Mutagenesemethoden zählt unter Anderem die fehlerhafte Polymerase-Kettenreaktion (*epPCR*, „*error prone polymerase chain reaction*“, TINDALL & KUNKEL, 1988; ECKERT & KUNKEL, 1990). Das Fehlen der *proof reading* Aktivität der *Taq*-DNA-Polymerase wird genutzt, um eine spezifische auf das Experiment angepasste Mutationsrate von 1-10 Basensubstitutionen pro 1000 Basenpaare zu generieren. Dies geschieht durch Zugabe von  $MnCl_2$  oder unphysiologisch hohen Konzentrationen von  $MgCl_2$  zum PCR-Ansatz. Weitere nichtrekombinative Methoden sind die Kassettenmutagenese (CRAMERI & STEMMER, 1995), die Sättigungsmutagenese (AIRAKSINEN & HOVI, 1989; GEORGESCU *et al.*, 2003), die *Random*

*Insertion/Deletion Mutagenesis* (RID; MURAKAMI *et al.*, 2002), die *MAX Randomization* (HUGHES *et al.*, 2003), das *Codon-Shuffling* (CHOPRA *et al.*, 2003) als auch die Verwendung von Mutatorstämmen (GREENER *et al.*, 1996). Auf die in der Literatur beschriebenen homologieabhängigen und homologieunabhängigen rekombinativen *in vitro* Mutagenesemethoden wird in dieser Arbeit nicht näher eingegangen.

In der Literatur sind bereits einige Beispiele für die Anpassung von Esterasen an die jeweilige Applikation beschrieben worden. So erhöhten MOORE *et al.* (1996) die Lösungsmittelstabilität der *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *Bacillus subtilis* gegenüber DMF und SPILLER *et al.* (1999) die Aktivität gegenüber dem *para*-Nitrophenyl-Ester des Antibiotikums LORACARBEF in 25% Dimethylformamid um den Faktor 100. BORNSCHEUER *et al.* (1999) veränderten die Substratspezifität einer Esterase. Eine Optimierung bezüglich der Enantioselektivität durch Methoden der gerichteten Evolution wurden gegenüber Methyl-(*S*)-3-Bromo-2-methylpropanoat und Ethyl-(*R*)-3-phenylbutyrat einer Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* von HORSMAN *et al.* (2003) erreicht. HENKE und BORNSCHEUER (1999) wiesen eine erhöhte Enantioselektivität gegenüber 3-Phenylbutyrat-Resorufin-Ester nach ebenso wie SCHMIDT *et al.* (2006) bei der Hydrolyse vom racemischen Gemisch But-3-yn-2-ol mit einer veränderten Esterase aus *Pseudomonas fluorescens*.

### 2.3 Esterasen aus *Bacillus* sp.

Für die moderne Biotechnologie stellen die *Bacillaceae* eine für die Produktion von Enzymen wichtige Gattung von Mikroorganismen dar (SCHALLMEY *et al.*, 2004). So werden beispielsweise Waschmittelproteasen mit verschiedenen *Bacillus*-Stämmen (*B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. clausii*, *B. alkalophilus* und *B. halodurans*) hergestellt (MAURER, 2004). Grund für den Einsatz der *Bacilli* sind vor allem die hohen Sekretionsleistungen und die damit verbundenen geringeren *down-stream-processing*-Kosten für technische Enzyme (SIMONEN & PALVA, 1993; WONG, 1995).

Aufgrund taxonomischer 16S rRNA-Sequenzvergleiche gibt es heutzutage Hinweise auf mindestens sechs verschiedene Gruppen innerhalb der *Bacilli* (ASH *et al.*, 1991). Aus einer Vielzahl der Mitglieder dieser Gattung konnten bereits einige lipolytische Enzyme isoliert und charakterisiert werden. Die Tabelle 2.2 fasst die bisher untersuchten Esterasen zusammen.

Alle in Tab. 2.2 aufgeführten Esterasen zeigen eine optimale esterolytische Aktivität in neutralen pH-Bereichen von 6 bis 8,5. Dabei bilden die Esterasen aus *Lactobacillus acidophilus* (pH 5,6) und *B. stearothermophilus* G18A7 (pH 9,5) Ausnahmen. Die

Fettsäurespezifität bei der Hydrolyse von Triglyceriden zeigt die für Esterasen typischen kurzkettigen Fettsäuren mit zwei bis sechs Kohlenstoffatomen. Bei *para*-Nitrophenylestern liegt das Optimum der Kettenlänge bei C4 bzw. C6. Hierbei stellen die Esterasen *cesB* aus *B. subtilis* 168 und aus *L. casei* CL96 eine Ausnahme dar. Besonders hohe Temperaturoptima zeigten die Esterasen von ATESLIER & METIN (2006), MANCO *et al.* (1994), MATSUNAGA *et al.* (1974) und HENKE & BORNSCHEUER (2002).

**Tab. 2.2: Zusammenstellung biochemisch charakterisierter Esterasen aus der Gattung der *Bacillaceae*.** Aufgeführt sind das Molekulargewicht (*molecular weight*, MW), das pH- bzw. Temperaturoptimum (pH-Opt. und T-Opt.) und die Fettsäurespezifität. In manchen Fällen wurde die Spezifität auf *para*-Nitrophenyl-Ester bezogen (*p*-NP-Ester), sofern keine Daten für die Hydrolyse von Triglyceriden vorlagen; n.b. bedeutet nicht bestimmt.

Mikroorganismus	MW (kDa)	pH-Opt.	T-Opt. (°C)	Fettsäure-Spezifität	Referenz
<i>B. subtilis</i> NRRL B8079	54	8,3	52	n.b.	CHEN <i>et al.</i> , 1995b
<i>B. subtilis</i> RRL BB1	52	8	37	C4	MAQBOOL <i>et al.</i> , 2006
<i>B. sp.</i> BP-7	53	6-9,5	45	( <i>p</i> -NP-Ester) C4	PRIM ET AL., 2001
<i>B. subtilis</i> NRRL 365 EstA	36	8	n.b.	C2	MEGHJI <i>et al.</i> , 1990
<i>B. subtilis</i> NRRL 365 EstB	105-110	8	n.b.	C2	MEGHJI <i>et al.</i> , 1990
<i>B. subtilis</i> RRL 1789	52	8	37	C4	KAISER <i>et al.</i> , 2006
<i>B. subtilis</i> ThaiI-8 Carboxylesterase NP	32±1	7,5	30	( <i>p</i> -NP-Ester) C6	DRÖGE <i>et al.</i> , 2004
<i>B. subtilis</i> 168, <i>cesA</i>	33,8	7,5	30	( <i>p</i> -NP-Ester) C6	DRÖGE <i>et al.</i> , 2004
<i>B. subtilis</i> 168, <i>cesB</i>	32,9	7,5	40	( <i>p</i> -NP-Ester) C8	DRÖGE <i>et al.</i> , 2004, 2001
<i>B. subtilis</i> sp.	81,9	6	65	( <i>p</i> -NP-Ester) C4	ATESLIER & METIN, 2006
<i>B. subtilis</i> DSM402	32	7,5-8	40	C4	HENKE & BORNSCHEUER, 2002
<i>B. sp. estB1</i> (in <i>Aplysina aerophoba</i> )	35	6,5-7,5	30-50	( <i>p</i> -NP-Ester) C4	KARPUSHOVA <i>et al.</i> , 2005
<i>B. sp. estB2</i> (in <i>Aplysina aerophoba</i> )	28	6,5-8	20-35	( <i>p</i> -NP-Ester) C4	KARPUSHOVA <i>et al.</i> , 2005
<i>B. licheniformis</i>	81,3	8-8,5	40-50	C6	ALVAREZ-MACARIE <i>et al.</i> , 1999b
<i>B. acidocaldarius</i>	36,5±2,5	8	70	C5	MANCO <i>et al.</i> , 1994
<i>B. stearothermophilus</i>	47	7	65	C6	MATSUNAGA <i>et al.</i> , 1974
<i>B. stearothermophilus</i>	31	7	65	C4	HENKE & BORNSCHEUER, 2002
<i>B. stearothermophilus</i> G18A7	38-45	9,5	n.b.	C2	OWUSU & COWAN, 1991
<i>B. coagulans</i>	70-73	7	65	n.b.	MOLINARI <i>et al.</i> , 1996
<i>L. acidophilus</i>	36	5,6	37	n.b.	WANG <i>et al.</i> , 2004
<i>L. casei</i> CL96	67,5	7,0	37	C8	CHOI <i>et al.</i> , 2004

## 2.4 Phthalsäure- und Terephthalsäureester: Ein Überblick

Alle im Folgenden aufgeführten und in der vorliegenden Arbeit als Substrate verwendeten Phthalsäure- und Terephthalsäureester sind als Strukturformel mitsamt den in der Literatur gängigen Trivialnamen in Kapitel 8.7 dargestellt.

Phthalate sind Ester der 1,2-Benzoldicarbonsäure (Phthalsäure) und bestehen aus einem planaren Ring mit zwei Seitenketten, die bei den meisten industriell bedeutenden Phthalsäureestern identisch sind (STAPLES *et al.*, 1997): z.B. Diethylhexylphthalsäure (DEHP), Dimethyl- (DMP), Diethyl- (DEP) und Dibutylphthalsäure (DBP). Eine Ausnahme stellt das Butylbenzylphthalat (BBP) dar. Aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften werden Phthalate für die Herstellung von Weich-PVC und anderen Polymeren eingesetzt (GÜLDEN *et al.*, 1997), um deren Verarbeitungseigenschaften zu verbessern. Phthalate sind „äußere Weichmacher“ und gehen mit dem Kunststoff keine kovalente Bindung ein, sondern sind physikalisch über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen mit diesem verbunden. Diese rein physikalische Bindung ermöglicht eine Migration der verwendeten Phthalsäureester aus dem Kunststoff in die jeweilige Umgebung (NILSSON, 1994). Wegen der großen Produktionsmengen (weltweit mehrere Millionen Tonnen; LEISEWITZ, 1997) und des breiten Einsatzes sind Phthalsäureester inzwischen ubiquitär verbreitet. Darüberhinaus wird in der Literatur das endokrine Potential einiger Phthalsäureester diskutiert. Endokrin wirksame Substanzen greifen in die hormonelle Regulation im Körper von Menschen und Tieren ein und können auf die prä- und postnatale Entwicklung Einfluss nehmen: die Wirkung kann sowohl agonistischen als auch antagonistischen Ursprungs sein, oder aber durch Hemmung oder Induktion enzymatischer Reaktionen bzw. Modifikation von Signalwegen bewirkt werden. So führte beispielsweise Dibutylphthalsäure (DBP) durch orale Zufütterung bei Ratten zu einer Abnahme des Keimdrüsenengewichtes und zu einer histologischen Veränderung der Samenkanäle (GANGOLLI, 1982). JOBLING *et al.* (1995) zeigten, dass DBP an den Östrogenrezeptor aus dem Cytosol von Forellenlebern bindet. Eine DNA schädigende Wirkung an menschlichen Sperma-Zellen durch Monoethylphthalat (MEP) - einem Metaboliten der Diethylphthalsäure - konnte von DUTY *et al.* (2003) gezeigt werden. Zudem wird vermutet, dass die durch enzymatische Hydrolyse gebildeten Monophthalsäureester zur Entwicklung von allergischen Atemwegserkrankungen beitragen (LARSEN *et al.*, 2001, 2003; JEPSEN *et al.*, 2004).

Terephthalate sind Ester der 1,4-Benzoldicarbonsäure und unterscheiden sich strukturell von den Phthalaten in der Orientierung der Seitenketten. Dimethylterephthalsäure (DMT) wird vor allem zur Produktion von Polyethylenterephthalat (PET) durch ein Umesterungsverfahren eingesetzt (HIPPE *et al.*, 1961).

Neben der Untersuchung des Potentials mancher Phthalsäureester als endokrine Disruptoren stellen die biologische Abbaubarkeit und damit die Mineralisierung von Phthal- und Terephthalsäureestern mit bakteriellen und pilzlichen Monokulturen einen wesentlichen Teil der wissenschaftlichen Literatur dar. Neben reinen Kulturen wurden aber auch Mischkulturen für die Bioremediation herangezogen. Die Tabelle 2.3 gibt einen kleinen Teil der Publikationen wieder; eine ausführliche Darstellung der Biodegradationsdaten bis 1997 ist bei STAPLES *et al.* (1997) zu finden.

**Tab. 2.3: Übersicht über kurz-kettige Phthal- und Terephthalsäureester abbauende Mikroorganismen.**  
BBP: Butylbenzylphthalat; DMT: Dimethylterephthalat; DET: Diethylterephthalat; DMP: Dimethylphthalat; DEP: Diethylphthalat; DBP: Dibutylphthalat; DMIP: Dimethylisophthalat.

Substanz	Mikroorganismus	Referenz
BBP	<i>Gordonia</i> sp. MTCC 4818	CHATTERJEE & DUTTA, 2003
DMT	<i>Pasteurella multocida</i> Sa	LI & GU, 2005
	<i>Pseudomonas</i> sp. 054	TSEROVSKA & DIMKOV, 2002
	<i>Aspergillus niger</i> (AG-1)	GANJI <i>et al.</i> , 1995
	<i>Rhodococcus rubber</i> Sa	LI <i>et al.</i> , 2005
	<i>Sclerotium rolfsii</i>	SIVAMURTHY, 1991
DET	<i>Aspergillus niger</i>	GANJI <i>et al.</i> , 1994
	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	JACKSON <i>et al.</i> , 1996
	<i>Rhodococcus rhodochorus</i>	JACKSON <i>et al.</i> , 1996
DMP	<i>Bacillus</i> sp.	NIAZI <i>et al.</i> , 2001
	<i>Rhodococcus rubber</i> Sa	LI <i>et al.</i> , 2005
	<i>Comamonas acidovorans</i> Fy-1	WANG <i>et al.</i> , 2003
DEP	<i>Micrococcus</i> sp.	KAREGOUDAR & PUJAR, 1984
	<i>Aureobacterium saperdae</i> NRRL B-14389	JACKSON <i>et al.</i> , 1996
	<i>Flavobacterium aquatile</i> NRRL B-14840	JACKSON <i>et al.</i> , 1996
	<i>Micrococcus kristinae</i> NRRL B-14845	JACKSON <i>et al.</i> , 1996
	Bakterielle Mischkultur	CARTWRIGHT <i>et al.</i> , 2000
DBP	<i>Delftia</i> sp. TBKNP-05	PATIL <i>et al.</i> , 2006
	<i>Micrococcus</i> sp. YGJ1	AKITA <i>et al.</i> , 2001
	<i>Micrococcus</i> sp. strain 12B	EATON & RIBBONS, 1982
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> B-1	XU <i>et al.</i> , 2005
DMIP	<i>Rhodococcus rubber</i> Sa	LI <i>et al.</i> , 2005

Die Bildung freier Phthalsäure aus den eingesetzten Dialkylphthalsäuren beinhaltet eine Esterolyse der Seitenketten. Diese Esterolyse wird bei *Micrococcus* sp. YGJ1 von zwei

unterschiedlichen Esterasen katalysiert: ein 56 kDa großes Enzym katalysiert die Bildung des Monoesters (AKITA *et al.*, 2001), welches keine weitere esterolytische Aktivität gegenüber dem Monoester aufweist. Eine Monoalkylphthalat-Esterase katalysiert die Esterolyse zur freien Phthalsäure und besitzt keine Aktivität gegen Dialkylphthalate (MARUYAMA *et al.*, 2005). NISHIOKA *et al.* (2006) zeigten das identische Verhalten bei einer Mono-2-Ethylhexyl-Phthalat-Hydrolase aus *Gordonia* sp., die ausschließlich den Monoester hydrolysiert. Im Gegensatz dazu beschreiben KURANE *et al.* (1984) nach Extraktion und Methylierung der Reaktionsprodukte mit Diazomethan die Bildung freier Phthalsäure durch Inkubation mit nur einer Hydrolase aus *Nocardia erythropolis*. Neben der Bildung freier Phthalsäure durch Esterolyse wird ein alternativer Weg mit Transesterifikation und Demethylierung durch Co-kontamination von Bodenproben mit Methanol diskutiert (CARTWRIGHT *et al.*, 2000). LI und GU (2005) beschrieben die Transesterifikation von Monomethylterephthalat zu Monoethylterephthalat von *Pasteurella multocida* durch Zugabe von Ethanol. Die Zugabe von Methanol hingegen führte zu keiner Transesterifikation.

Der mikrobielle Phthalsäureabbau beinhaltet bei gram-positiven Bakterien die Oxigenierung von freier Phthalsäure zu 3,4-Dihydro-3,4-dihydroxyphthalat, und die Dehydrogenierung zu 3,4-Dihydroxyphthalat bis hin zur Decarboxylierung zum Protocatechuate (EATON, 2001; HABE *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu werden bei gram-negativen Bakterien 4,5-Dihydro-4,5-dihydroxyphthalat, 4,5-Dihydroxyphthalat und letztendlich wieder Protocatechuate gebildet (CHANG & ZYLSTRA, 1998; NORUMA, 1992). Bei *Acinetobacter lwoffii* ISP4 wird Ispophthalsäure zu 4-Hydro-3,4-dihydroxyisophthalat und anschließend zu Protocatechuate umgewandelt. Beim Abbau von Terephthalsäure durch *Pseudomonas aeruginosa* PP4 und *Pseudomonas* sp. PPD wird 2-Hydro-1,2-dihydroxyterephthalat gebildet (VAMSEE-KRISHNA *et al.*, 2006), aus dem Protocatechuate gebildet wird.

## **2.5 Enzymatische Hydrolyse von Polyethylenterephthalat (PET) und PET-Esterasen als Zusatz für neue Waschmittel**

Im Jahr 2002 wurden weltweit insgesamt 33,6 Millionen Tonnen synthetischer Fasern hergestellt. Dies entspricht einem Gesamtmarktanteil am Fasermarkt von 55%. Der Anteil an synthetischen Fasern aus Polyethylenterephthalat (PET) entsprach 21,0 Millionen Tonnen und einem Gesamtmarktanteil von 38% (ENGELHARDT, 2003). Den positiven Eigenschaften von Polyethylenterephthalat-Textilien wie hohe Reißfestigkeit und Elastizität, Beständigkeit gegen Licht, gegen organische und mineralische Säuren, einfache Pflege und schnelle

Trocknung stehen negative Eigenschaften wie das starke *pilling* und die hohe Hydrophobizität entgegen (KOSLOWSKI, 1997). Analog zu der Reduktion der *pilling*-Strukturen durch Cellulasen auf Baumwolltextilien könnten Polyesterasen mit hoher Spezifität gegenüber Polyestern auf Terephthalsäurebasis die Qualität der Textilie durch *anti-pilling* dauerhaft sichern. Gleichzeitig würde eine Hydrolyse an der Faseroberfläche die Hydrophobizität senken und den Reinigungsvorgang erleichtern und auch die Färbbarkeit der Faser erhöhen (GÜBITZ & PAULO, 2003). Der Vorteil der enzymatischen gegenüber der chemischen Oberflächenbehandlung liegt in der hoch spezifischen und nicht-destruktiven Modifikation der Faseroberfläche bei milden Reaktionsbedingungen (GÜBITZ & PAULO, 2003). Chemische Behandlungen unter stark alkalischen Bedingungen führen hingegen zu einem starken Gewichts- und Festigkeitsverlust der Faser und sind insgesamt als umweltschädlich anzusehen (ZERONIAN & COLLINS, 1989).

Aufgrund der hohen Produktionsmengen an aromatischen Polyestern stellt die enzymatische Hydrolyse sowohl für die Textil- und Waschmittelindustrie als auch für umweltbiotechnologische Ansätze eine lukrative Anwendung dar.

Können aliphatische Polyester (Polyhydroxyalkanoate, Poly- $\epsilon$ -Caprolaktone, Poly-L-Milchsäure) und Co-Polymere schnell und effizient abgebaut bzw. hydrolysiert werden (KIM & RHEE, 2003; KI & PARK, 2001; TANIGUCHI *et al.*, 2002; NAGATA *et al.*, 1997), so wird der enzymatische bzw. mikrobielle Abbau von Polyestern auf Ethylenglykol- und Terephthalsäurebasis von MÜLLER *et al.* (2001) als unbedeutend gering eingeschätzt. Trotz dieser Aussage gelang es MÜLLER *et al.* (2005) einen Gewichtsverlust von PET-Filmen nach Inkubation mit einer Hydrolase aus *Thermobifida fusca* zu detektieren. YOON *et al.*, (2002) konnten unter Einsatz einer nicht näher spezifizierten Polyesterase durch HPLC-Analysen die Bildung von Hydrolyseprodukten nach Inkubation mit DACRON 54 nachweisen. Neben der Reduktion von *pilling*-Strukturen wurde eine geringere Schmutzanhaftung von öligen Anschmutzungen beobachtet, was auf eine abnehmende Hydrophobizität durch freie Carboxyl- bzw. Hydroxylgruppen zurückgeführt wurde. Aufgrund dieser freien, durch enzymatische Hydrolyse entstandenen Carboxyl- bzw. Hydroxylgruppen wurde eine bessere Anhaftung von kationischen Farbstoffen erzielt. Die Reduktion von *pilling*-Strukturen konnte durch Behandlung von Enzymen aus *Humicola* sp., *Candida* sp. und *Pseudomonas* sp. von (BENTE KONGGAARD ANDERSEN *et al.*, 1999) gezeigt werden wie auch von FISCHER-COLBRIE *et al.* (2004) und MCCLOSKEY & JUMP (2005). Die Cutinase aus *Fusarium solani pisi* (LIN & KOLATTUKUDY, 1978) und die Hydrolase aus *Thermobifida (Thermomonospora) fusca* (KLEEBERG *et al.*, 2005) erhöhten die hydrophilen Eigenschaften von PET-Fasern

(ALISH-MARK *et al.*, 2006). Eine enzymatische Aktivität der Cutinase aus *Fusarium solani pisi* wurde durch SILVA *et al.* (2005) diskutiert. VERTOMMEN *et al.* (2005) konnten zudem die wasserlöslichen Hydrolyseprodukte nach Inkubation von PET-Fasern mit der Cutinase aus *Fusarium solani pisi* identifizieren.

Für die Identifikation neuer Enzyme mit der potentiellen Eigenschaft Polyethylenterephthalat zu hydrolysieren werden auch Modellester mit struktureller Ähnlichkeit zu PET eingesetzt. Zu den Modellestern zählen unter anderem das PET-Trimer [Bis(benzpyloxyethyl)-terephthalat] (FISCHER-COLBRIE *et al.*, 2004) und das cyclische Trimer [Cyclo-trisethylenterephthalat] (FIGUEROA *et al.*, 2006), das mit anderen Oligomeren bei der Produktion von PET bis 1-3% anfällt (CIMECIOGLU *et al.*, 1986). MARTEN *et al.* (2003) berichten über Untersuchungen mit Lipasen, Proteinasen und Esterasen unter der Verwendung folgender Modellester: 1,4-Bis(benzoyloxy)butan, Diphenyladipat, 1,4-Bis(cyclohexanocarboxyloxy)butan, Dicyclohexyladipat und 1,4-Bis(phenylacetoxy)butan (Kap. 8.7). Hierbei wurde jedoch nicht die Hydrolyse von PET als Ziel definiert.

Alle genannten Modellester wurden für kinetische Untersuchungen von bereits bekannten Enzymen herangezogen, oder als einzige Kohlenstoffquelle in Anreicherungskulturen angewendet (FISCHER-COLBRIE *et al.*, 2004).

## 2.6 Ziele dieser Arbeit

Die enzymatische Hydrolyse von Phthal- und Terephthalsäureestern wurde bisher nur von wenigen Autoren detailliert beschrieben (AKITA *et al.*, 2001; MARUYAMA *et al.*, 2005; NISHIOKA *et al.*, 2006; KURANE *et al.*, 1984; KAYANO *et al.*, 1997; MENTLEIN & BUTTE, 1989). Daher galt es grundlegende Untersuchungen zur enzymatischen Hydrolyse Phthalsäure- und Terephthalsäureestern mit Esterasen durchzuführen, für die bisher keine Dialkylphthalat-Hydrolyse beschrieben wurde. Die zur Erreichung dieses Zieles zu bearbeitenden Aufgaben sind nachfolgend detailliert dargestellt:

1) Isolierung und Identifizierung Dialkylphthalat spaltender Esterasen: Die Durchführung eines mikrobiologischen *screening* sollte zur Isolierung und Identifizierung von Mikroorganismen führen, die die Fähigkeit zur Spaltung von Dialkylphthalaten besitzen. Die biochemische Reinigung und die anschließende massenspektrometrische Analyse des gereinigten Proteins sollte das Zielmolekül identifizieren. Die Identifizierung der offenen

Leserasterrahmen (*open reading frames*, ORF) der Enzyme durch Erstellen von Genombanken, die Subklonierung der Gene in Expressionsvektoren sowie deren heterologe Überexpression in *Escherichia coli* mit anschließender chromatographischer Reinigung sollten die Grundlage weiterer Untersuchungen bilden.

2) Biochemische Charakterisierung der Esterasen: Bei der biochemischen Charakterisierung sollte die Ermittlung kinetischer Konstanten gegenüber unterschiedlichen Dialkylphthalaten im Vordergrund stehen. Die Orientierung der Seitenketten und die Seitenkettenlänge sollten vergleichend untersucht und bewertet werden. Zusätzlich sollten die Esterasen ausführlich biochemisch charakterisiert werden. Die bei der Hydrolyse der Dialkylphthalate entstehenden Produkte sollten mit gängigen analytischen Methoden identifiziert werden.

3) Enzymatische Hydrolyse von Polyethylterephthalat (PET): Zusätzlich sollte das mögliche Potential der Dialkylphthalat-Hydrolasen bei der enzymatischen Hydrolyse von Polyethylterephthalat (PET) bewertet werden. Dazu galt es grundlegende Untersuchungen für ein *high-throughput-screening*-System durchzuführen, um die enzymatische Hydrolyse von Polyethylterephthalat (PET) bearbeiten zu können. Darin inbegriffen waren die Synthese eines Modellsubstrates mit struktureller Ähnlichkeit zu PET und die Einbettung des Modellsubstrates in eine Agar-Matrix. Desweiteren galt es polymeres PET in Form von Nanopartikeln enzymatisch zu hydrolysieren und die Hydrolyse analytisch nachzuweisen.

4) Directed Evolution: Die Funktionalität dieses *high-throughput-screening*-Systems sollte durch die Erhöhung der Aktivität der untersuchten Enzyme mit Methoden der gerichteten Evolution bewiesen werden. Dabei galt es mittels *error-prone*-PCR verbesserte Enzyme zu erzeugen und die veränderten Positionen einer Sättigungsmutagenese zu unterziehen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Chemikalien und Enzyme

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien, Antibiotika und Enzyme besaßen den Reinheitsgrad *pro analysis* und wurden von den folgenden Firmen bezogen:

**Chemikalien:** ACROS ORGANICS (Geel, Belgien), FLUKA CHEMIE AG (Buchs, Schweiz), INVITROGEN GMBH (Karlsruhe), MERCK (Darmstadt), RIEDEL DE HAËN (Seelze), ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim), SERVA (Heidelberg), SIGMA (Deisenhofen).

**Antibiotika:** SERVA (Heidelberg) und SIGMA (Deisenhofen).

**Enzyme:** Restriktionsendonukleasen wurden bezogen von GIBCO BRL (Eggstein), NEW ENGLAND BIOLABS (Frankfurt am Main), MBI FERMENTAS (St. Leon-Rot) und ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim); *Taq*-DNA-Polymerase, Platinum *Taq*-DNA-Polymerase, Platinum *Pfx*-DNA-Polymerase und DNase bzw. RNase wurden INVITROGEN GMBH (Karlsruhe) bezogen; T4-Ligase und Shrimps-Alkalische-Phosphatase von ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim); Lysozym wurde bei SIGMA (Deisenhofen) erworben; Proteinase K von MERCK (Darmstadt).

**Medienkomponenten:** BACTON & DICKINSON AND COMPANY (Le Pont de Claix, Frankreich), DIFCO BRL (Eggstein), MERCK (Darmstadt).

Alle Lösungen wurden mit hochreinem Wasser (ULTRA PURE WATER SYSTEM MILLI-Q<sup>PLUS</sup>, Fa. MILLIPORE, Eschborn) hergestellt. Die Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten erfolgte, soweit keine Einschränkungen durch die Reagenzien bestanden, durch Dampfdrucksterilisation (20 Minuten, 121°C, 1 bar Überdruck; Typ FVS, Fa. TECNOMARA DEUTSCHLAND GMBH, Fernwald). Nicht hitzebeständige Medienbestandteile wurden mittels einer 0,2 µm Membran steril filtriert (FP 30/0,2 CA-S, Fa. SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel). Die Sterilisation von Glasgeräten erfolgte durch trockene Hitze über Nacht bei 180°C (FUNCTION LINE; Fa. HERAEUS INSTRUMENTS, Hanau).

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten mikrobiologischen Arbeitsschritte wurden unter der *clean-bench* BSB 4A (Fa. GELAIRE<sup>®</sup> FLOW LABORATORIES, Meckenheim) durchgeführt. Vor jeder Nutzung wurde die Einlaufzeit von 15 Minuten eingehalten. Die Oberflächen der Arbeitsbank wurden vor und nach den Arbeiten mit BACILLOL<sup>®</sup> AF (BODE CHEMIE HAMBURG, Hamburg) desinfiziert.

### 3.2 Bakterienstämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Vektoren und rekombinante Plasmide sind in den Tabellen 3.1, 3.2 und 3.3 aufgeführt.

Tab. 3.1: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz / Bezugsquelle
<i>E. coli</i> B ER2566	F <sup>-</sup> λ <i>fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 genel gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn 10)2 R(zgb-210::Tn 10)1 (Tet<sup>r</sup>) endA1 [dcm]</i>	CHONG <i>et al.</i> , (1997) / NEW ENGLAND BIOLABS (Frankfurt am Main)
<i>E. coli</i> JM 109	F <sup>'</sup> <i>traD36 lacI<sup>f</sup> Δ(lacZ)M15 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>/ e14<sup>(McrA<sup>-</sup>) Δ(lac-proAB) thi gyrA96 (Nal<sup>r</sup>) endA1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) relA1 recA1 supE44</sup></i>	YANISH-PERRON <i>et al.</i> , (1985) / NEW ENGLAND BIOLABS (Frankfurt am Main)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal [dcm] [lon] hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3)</i>	STUDIER & MOFFAT, (1986) / NOVAGEN, (Madison, USA)
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	F <sup>'</sup> <i>::Tn 10 proA<sup>+</sup> B<sup>+</sup> lacI<sup>f</sup> Δ(lacZ)M15/ recA1 endA1 gyrA96 (Nal<sup>r</sup>) thi hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 lac</i>	BULLOCK <i>et al.</i> , (1987) / STRATAGENE (Heidelberg)
One Shot <sup>®</sup> TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	F <sup>'</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	Instruction Manual Zero Blunt <sup>®</sup> TOPO <sup>®</sup> PCR Cloning Kit / INVITROGEN (Karlsruhe)
<i>B. licheniformis</i> DSM13	Typstamm	VEITH <i>et al.</i> , (2004)
<i>B. licheniformis</i> 19C5	Bodenisolat	diese Arbeit
<i>B. subtilis</i> 17A1	Bodenisolat	diese Arbeit
<i>B. subtilis</i> TEB1030	<i>his nprE aprE bpf ispI ΔlipA ΔlipB</i>	EGGERT <i>et al.</i> , (2003)

Tab. 3.2: Übersicht der verwendeten Vektoren.

Vektor	Beschreibung	Referenz / Bezugsquelle
pBSMu2	Fusioniert zu exprimierendes Enzym N-terminal mit LipA Signalsequenz; Sekretion mit <i>Bacillus subtilis</i> TEB1030	BROCKMEIER <i>et al.</i> , (2006a)
pET22b(+)	Zu exprimierendes Enzym kann mit <i>pelB-leader</i> -Sequenz fusioniert werden; Enzym wird ins Periplasma geschleust	Bezugsquelle: NOVAGEN INC., Madison, USA
pET26b(+)	Zu exprimierendes Enzym kann mit 6-Histidin-Tag am C-Terminus fusioniert werden; Verwendung zur Erstellung von Genombanken	Bezugsquelle: NOVAGEN INC., Madison, USA
pTYB1	Zu exprimierendes Enzym wird mit C-terminalen <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Intein fusioniert	CHONG <i>et al.</i> , (1997) / NEW ENGLAND BIOLABS (Frankfurt am Main)
pUC19	Kontrollplasmid zur Bestimmung von Transformationsraten	YANISH-PERRON <i>et al.</i> , (1985) / NEW ENGLAND BIOLABS (Frankfurt am Main)
pCR <sup>®</sup> -Blunt II-TOPO <sup>®</sup>	Direkte Insertion von <i>blunt-end</i> -PCR-Produkten in linearisiertes, mit Topoisomerase I ( <i>Vaccinia</i> Virus) aktiviertes Plasmid	SHUMAN, (1994) / INVITROGEN (Karlsruhe)

Tab. 3.3 Übersicht der rekombinanten Plasmide.

Rekombinantes Plasmid	Beschreibung	Merkmale / Modifikationen
pET26b(+) <i>aGK17A1</i>	Esterolytisch aktiver Genombank-Klon; Fragmentgröße: 3677 bp	Genomische DNA vom Isolat <i>B. subtilis</i> 17A1 restringiert mit <i>Sau3A</i> und über <i>BamHI</i> in Vektor ligiert
pET26b(+) <i>aGK19C5</i>	Esterolytisch aktiver Genombank-Klon; Fragmentgröße: 4098 bp	Genomische DNA vom Isolat <i>B. licheniformis</i> 19C5 restringiert mit <i>Sau3A</i> und über <i>BamHI</i> in Vektor ligiert
TOPO- <i>pNB17A1</i>	<i>blunt-end</i> -PCR Produkte der <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase 17A1 zur zielgerichteten Mutagenese	Zwischenschritt zur Deletion der <i>NdeI</i> -site (1066-1071bp) im ORF über eine stille Mutation
TOPO- <i>pNB19C5</i>	<i>blunt-end</i> -PCR Produkte der <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase 19C5 zur zielgerichteten Mutagenese	Zwischenschritt zur Deletion der <i>NdeI</i> -site (1066-1071bp) im ORF über eine stille Mutation
TOPO- <i>pNB17A1m</i>	<i>blunt-end</i> -PCR Produkte der <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase 17A1 Mutagenese durchgeführt	<i>NdeI</i> -site (1066-1071bp) deletiert durch Austausch von CATATG zu CACATG
TOPO- <i>pNB19C5m</i>	<i>blunt-end</i> -PCR Produkte der <i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase 19C5 Mutagenese durchgeführt	<i>NdeI</i> -site (1066-1071bp) deletiert durch Austausch von CATATG zu CACATG
pTYB1- <i>pNB17A1</i>	<i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase 17A1 über <i>NdeI</i> und <i>SapI</i> in Vektor ligiert	Nach Überexpression erfolgt Reinigung des Enzyms über Intein-Tag (Affinitätschromatographie)
pTYB1- <i>pNB19C5</i>	<i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase 19C5 über <i>NdeI</i> und <i>SapI</i> in Vektor ligiert	Nach Überexpression erfolgt Reinigung des Enzyms über Intein-Tag (Affinitätschromatographie)
pTYB1- <i>pNBDSM13</i>	<i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase DSM13 über <i>NdeI</i> und <i>SapI</i> in Vektor ligiert	Nach Überexpression erfolgt Reinigung des Enzyms über Intein-Tag (Affinitätschromatographie)
pET26b(+)- <i>pNBDSM13</i>	<i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase DSM13 über <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> in Vektor ligiert	Nach Überexpression erfolgt Reinigung des Enzyms über 6-His-Tag (Affinitätschromatographie)
pET26b(+)- <i>pNB-Est13</i>	<i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase DSM13 über <i>NcoI</i> und <i>BamHI</i> in Vektor ligiert	Das exprimierte Enzym in <i>E. coli</i> wird durch die <i>pelB</i> -leader-Sequenz ins Periplasma transportiert
pTYB1- <i>pNB-Est19</i> Mut313 Leu > Ala	Austausch von Leucin an Position 313 gegen Alanin	Vergrößerung des Zuganges zum katalytischen Zentrum
pTYB1- <i>pNB-Est19</i> Mut314 Phe > Ala	Austausch von Phenylalanin an Position 314 gegen Alanin	Vergrößerung des Zuganges zum katalytischen Zentrum
pET22-LipA pET22-LipB	Expression eines Fusionsproteins bestehend aus <i>pelB</i> -leader und Lipase A / B aus <i>B. subtilis</i> 168	Das exprimierte Enzym in <i>E. coli</i> wird durch die <i>pelB</i> -leader-Sequenz ins Periplasma transportiert
pBSMul2-Cutinase	Cutinase-Sekretion ( <i>Fusarium solani pisi</i> ) wird durch Signalsequenz von Lipase A gesteuert	Cutinase wird über Sec-Weg ins Medium sekretiert
pBSMul2-19Sek.	<i>pNB-Est19</i> N-terminal mit Signalsequenz von LipA fusioniert	Sekretion der <i>pNB-Est19</i> über Sec-Weg in TEB1030-Zellen

### 3.3 Oligonukleotide

Sämtliche für die Erstellung dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der INVITROGEN GMBH (Karlsruhe) bezogen und sind detailliert in der Tabelle 3.4 dargestellt.

**Tab. 3.4 Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.** Die unterstrichenen Basen kennzeichnen (eingefügte) Restriktionsschnittstellen bzw. eingefügte Veränderungen.

Bezeichnung	DNA-Sequenzen (5' → 3'-Richtung)	Merkmale / Modifikationen
<i>pNB17fwd</i>	GGAGAGA <u>ACC</u> CATATGACTCATCAAATAG	Einfügen <i>NdeI</i> -site
<i>pNB19fwd</i>	GGAGAGAGT <u>C</u> CATATGTCTCATAAAACAG	Einfügen <i>NdeI</i> -site
<i>pNB17rev (Imp.)</i>	GTATCCTGTTTTGCTCTTCTGCATTCTCC	Einfügen <i>SapI</i> -site
<i>pNB19rev (Imp.)</i>	GTATCCTGTTTTGCTCTTCTGCATTCTCC	Einfügen <i>SapI</i> -site
<i>pNBMMfwd</i>	CTGGAAAGCCAAATT <u>C</u> ATGATGACTG	Entfernen der <i>NdeI</i> -site
<i>pNBMMrev</i>	ATCAGTCATCATGTGAATTTGGCTTTCCAG	Entfernen der <i>NdeI</i> -site
<i>pNB19L313Afw</i>	GCGATGAAGGATATG <u>C</u> ATTTTTACCCCCGG	Austausch von Leu an Position 313 gegen Ala
<i>pNB19L313Arev</i>	CCGGGGTGAAAAATG <u>C</u> ATATCCTTCATCGC	Austausch von Leu an Position 313 gegen Ala
<i>pNB19F314Afw</i>	GGATATTTAG <u>C</u> CTTCACCCCGGACTCAG	Austausch von Phe an Position 314 gegen Ala
<i>pNB19F314Arev</i>	CTGAGTCCGGGTGAAG <u>G</u> CTAAATATCC	Austausch von Phe an Position 314 gegen Ala
<i>pNB19EcoRIfw</i>	GGAAAAGGGAGAG <u>G</u> AATTCATGTCTCATAAAACAG	Einfügen <i>EcoRI</i> -site
<i>pNB13fwd (Imp.)</i>	GAAAGGGGTGGAATCATATGTATGATACAAC	Einfügen <i>NdeI</i> -site
<i>pNB13rev (Imp.)</i>	GACCACACAGGT <u>C</u> AGGCCGCTCTTCTGCAAATCTGCGGGTTCG	Einfügen <i>SapI</i> -site
<i>pNB13rev (His.)</i>	AGGTCAGGCCCGCTT <u>C</u> TCGAGAATCTGCGG	Einfügen <i>XhoI</i> -site
<i>pNB13fwd (pelB)</i>	AAAGGGGTGGAAT <u>A</u> CCATGGATGATACTGTCG	Einfügen <i>NcoI</i> -site
<i>pNB13rev (pelB)</i>	CAGGTCAGGCCCGCGGAT <u>C</u> CTAAATCTGCGGGTTG	Einfügen <i>BamHI</i> -site
SequPrim13_1	ATTCATGGGGGCGCTTTTTATCGCGG	Sequenzierungsprimer
SequPrim13_2	AACTATGTCCGATAAGCTTGC <del>G</del> AAAGCTGC	Sequenzierungsprimer
SequPrim13_3	TCAACGAGATTTTAGAAGAATACATGG	Sequenzierungsprimer
SequPrim17/19_1	TCCTGTCATGGTGTGGATTCACGGAGG	Sequenzierungsprimer
SequPrim17/19_2	ATCATGGAAAGCGGCGCTTCTCGAACG	Sequenzierungsprimer
SequPrim17/19_3	ATGAAGGATATTTATTTTTACCCCCGG	Sequenzierungsprimer
T7 Prom. Primer	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierungsprimer
T7 Term. Primer	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Sequenzierungsprimer

### 3.4 Anzucht und Lagerung von Bakterien

Zellen von *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Bacillus licheniformis* wurden je nach Versuch in LB- bzw. TB-Medium bei einer Temperatur von 37°C für 8 bis 16 Stunden kultiviert (LURIA-BERTANI-Medium: 10 g/L Trypton, 10 g/L NaCl, 5 g/L Hefeextrakt nach SAMBROOK *et al.*, 1989; TERRIFIC-BROTH-Medium: 12,8 g/L Trypton, 25,6 g/L Hefeextrakt, 4 mL Glycerin, 2,31 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> getrennt sterilisiert, 12,55 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> getrennt sterilisiert).

Flüssigkulturen bis 2 mL wurden in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten durchgeführt, wohingegen Flüssigkulturen von bis 5 bis 100 mL in Erlenmeyerkolben auf einem Inkubationsschüttler (CERTOMAT<sup>®</sup> HK, CERTOMAT<sup>®</sup> U; Fa. BRAUN) kultiviert wurden. Bei Verwendung von Erlenmeyerkolben entsprach das Verhältnis von Kulturvolumen zu Volumen des verwendeten Kolbens stets 1:10. Für Flüssigkulturen von größer als 500 mL wurden Kleinlaborfermenter (KLF2000 bzw. NLF22; Fa. BIOENGINEERING; Wald, Schweiz) mit einem Gesamtvolumen von 3,2 L bzw. 16 L verwendet. Nach einer *in-situ*-Sterilisation wurde die Temperatur des Reaktors auf 37°C, die Rührergeschwindigkeit auf 1000 rpm und der Luftstrom auf 150 NL/h (1,56 v/vm) eingestellt. Die Fermentationen wurden durch Zugabe des Inokulums (1-3% v/v) gestartet.

Zur Überexpression von Enzymen wurden die Expressionsstämme frisch auf LB-Agar ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Mit einer Einzelkolonie wurde eine TB-Vorkultur inokuliert und für mindestens 12 Stunden bei 37°C kultiviert. Mit der Vorkultur wurde die Hauptkultur inokuliert (0,1 bis 1% der Hauptkultur) und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7-0,8 inkubiert. Anschließend erfolgte eine Induktion mit 0,5 mM IPTG und eine weitere Inkubation bei 30°C für 5 Stunden. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation (6000 g) abgetrennt, entweder sofort verarbeitet oder bei -20°C gelagert.

Im Falle plasmid- oder genomcodierter Antibiotikaresistenzen wurde jeweils mit Selektionsdruck durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums kultiviert. Die Endkonzentration bei Verwendung von Kanamycin betrug 50 µg/mL bzw. für Ampicillin 100 µg/mL. Für Festmedien wurde dem entsprechenden Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 1,5% Agar (w/v) zugefügt.

Für einen qualitativen Nachweis enzymatischer Aktivität fanden folgende Indikatorplatten Verwendung: Tributyrin (KOK *et al.*, 1993); Esterase-Aktivitäts-Färbung (HIGERD & SPIZIZEN, 1973); Diethylphthalsäure-Agar (Kapitel 3.10); PET-Dimer-Agar (Kap. 4.8.4).

### **3.4.1 Kurzfristige Lagerung**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden unter Anderem auf festen Nährböden kultiviert. Nach Inkubation bei entsprechender Wachstumstemperatur erfolgte eine Versiegelung der Petrischalen mit PARAFILM<sup>®</sup> (Fa. PECHINEY PLASTIC PACKAGING, Menasha, Wisconsin, USA) und eine anschließende Aufbewahrung bei 4°C. Im Abstand von zwei Wochen wurden die Organismen auf frische Nährbodenplatten überimpft.

### 3.4.2 Langfristige Lagerung

Für die langfristige Konservierung der Zellen wurden Glycerinkulturen erstellt. Dazu wurden die jeweiligen Zellen in 50 mL LB-Medium in 500 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane über Nacht bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Danach wurden jeweils 16 mL des bewachsenen Mediums in sterile 50 mL FALCON®-Röhrchen (Fa. BECTON DICKINSON, Meylan Cedex, Frankreich) überführt, mit 4 mL 50%iger steriler Glycerinlösung versetzt, gut gemischt, in CRYOGENIC VIALS (Fa. CORNING INCORPORATED, New York, USA) aliquotiert und für eine Stunde auf Eis gestellt. Nach einer 20stündigen Lagerung bei -20°C wurden die Glycerinkulturen bei -80°C gelagert.

## 3.5 Isolierung von Nukleinsäuren

### 3.5.1 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung der chromosomalen DNA aus *Bacillus* sp. wurden die Zellen einer mit 1% Vorkultur inokulierten Hauptkultur (37°C; 200 rpm) bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 per Zentrifugation (15 Minuten, 9000 g, 4°C, SORVALL INSTRUMENTS RCSC5, Fa. DUPONT DE NEMOURS GmbH, Bad Homburg) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 30 mL vorgekühlten Suspensionspuffer (10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 100 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Anschließend wurde bei maximaler Leistung 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand wiederum verworfen.

Zur Lyse der Zellen wurden diese in 14 mL kaltem Lysepuffer (20 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) mit frisch zudosiertem Lysozym (4 mg/mL) für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach anschließender 15minütiger Inkubation bei 37°C wurden 500 µL Sarkosyllösung (30% Natrium-N-lauroylsarcosinat) und 80 µL Proteinase K (20 mg/mL) dazugegeben und vermischt. Für weitere 30 Minuten bei 70°C und 5 Minuten auf Eis wurde der Ansatz inkubiert. 14 mL Phenol wurden zugegeben und für 1 Minute durch Schwenken vermischt. Anschließend wurde bei 13000 rpm 20 Minuten zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und erneut mit Phenol extrahiert. Zu der erhaltenen wässrigen Phase wurden 12 mL Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und 30 Sekunden vermischt. Die Phasentrennung erfolgte wiederum mittels Zentrifugation bei 13000 rpm und 20 Minuten. Die obere Phase wurde mit 100 µL RNase A (1 mg/mL) vermischt und bei 37°C im Wasserbad 20 Minuten inkubiert.

Zu dem Ansatz wurden 20 mL 100%iges Ethanol und 200 µL Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 5,2) zugegeben und 60 Minuten bei -20°C inkubiert. Nach einer 20minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Pellet mit 20 mL 70%igen Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugations- und Waschschrift wurde das Pellet im SPEED VAC CONCENTRATOR (Fa. BACHOFER, Reutlingen) 10 Minuten getrocknet und anschließend in 1 mL TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte am BIOPHOTOMETER (Fa. EPPENDORF AG, Hamburg).

### **3.5.2 Isolierung plasmidärer DNA**

Die Standard-Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (BIRNBOIM & DOLY, 1979) oder durch das Mini-/Midipräparations Kit (Fa. QIAGEN, Hilden) nach den Angaben des Herstellerprotokolls unter Verwendung der mitgelieferten Puffer und Lösungen.

### **3.5.3 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration: Zur Bestimmung der Konzentration von doppelsträngiger DNA wurde ein definiertes Aliquot 1:50 mit H<sub>2</sub>O bidest. verdünnt und photometrisch am BIOPHOTOMETER (Fa. EPPENDORF AG, Hamburg) vermessen. Bei einem Extinktionsquotienten  $E_{260}/E_{280}$  von 1,7 bis 1,9 wurde die DNA als rein angesehen.

Bestimmung der DNA-Konzentration durch visuellen Vergleich: Zur Bestimmung der Konzentration linearer DNA wurde ein definiertes Aliquot neben einem Nukleinsäurestandard (s.u.) im Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Abschätzung der Konzentration der Probe erfolgte durch visuellen Vergleich der Intensitäten einzelner Banden im UV-Licht mit denen von standardisierten DNA-Mengen.

## **3.6 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren**

Die analytische und präparative Auftrennung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten erfolgte je nach Größe der DNA in 0,8 bis 2%igen Agarose-Gelen (SAMBROOK *et al.*, 1989). Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,3) oder TBE-Puffer (40 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA, pH 8,3) verwendet und die Elektrophorese erfolgte in MINI-SUB<sup>®</sup> CELL GT - bzw. WIDE MINI-SUB<sup>®</sup> CELL - Elektrophoresekammern (Fa. BIO-

RAD LABORATORIES GmbH, München). Die angelegten Spannungen variierten je nach Versuch zwischen 60 und 90 V (6 bis 9 V/cm) (MODEL 200/2.0 POWER SUPPLY, Fa. BIO-RAD LABORATORIES GmbH, München). Als Längenstandard für DNA-Gele diente der „1 kb DNA Ladder“ (Fa. GIBCO BRL<sup>®</sup> GmbH, Eggenstein). Die Detektion von DNA erfolgte durch die Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids (EK: 0,5 µg/ml Gel) bei Anregung mit UV-Licht.

### **3.6.1 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen**

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das QIAEX<sup>®</sup> II GEL EXTRACTION KIT (Fa. QIAGEN, Hilden) verwendet. Zur Isolierung des gewünschten DNA-Fragments wurde dieses aus dem Agarosegel ausgeschnitten und extrahiert. Die Extraktion der DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer und Lösungen.

## **3.7 *In vitro* Rekombination von DNA**

### **3.7.1 Standardprozeduren**

Die *in vitro* Rekombination von DNA erfolgte nach Standardprozeduren gemäß SAMBROOK *et al.* (1989). Analytische und präparative DNA-Restriktionen wurden in einfach konzentrierten Reaktionspuffern nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro 1 µg DNA und einem Reaktionsvolumen von 20 µl wurde eine Enzymeinheit (Unit) der entsprechenden Restriktionsendonuklease eingesetzt. Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus der PCR oder aus DNA-Restriktionen erfolgte nach der Auftrennung in Agarose-Flachbettgelen aus der excisierten Bande durch Extraktion (s.o.). Die Ligationen der Fragmente in Klonierungs- oder Expressionsvektoren erfolgte über die durch die Restriktion eingeführten kompatiblen, kohäsiven Enden mit T4 DNA-Ligase. Dabei wurde der Ligationsansatz für mindestens 16 Stunden bei 11°C inkubiert.

### **3.7.2 Genombanken**

Für die Erstellung von Genombanken wurde die genomische DNA isoliert (Kap. 3.5.1) und mit der Restriktionsendonuklease Sau3A zu einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 3-4 kb restringiert. Die nach Extraktion aus dem Agarosegel erhaltenen Fragmente wurden in den mit *Bam*HI restringierten und dephosphorilierten pET26b(+)-Vektor ligiert.

Anschließend erfolgte eine Transformation mittels Elektroporation (s.u.) in *E. coli* B ER2566 - Zellen und eine Kultivierung auf LB-Tributyrim-Agar (Kanamycin EK: 50 µg/mL) bei 37°C über Nacht (z.B. HASONA *et al.*, 2002).

Die Anzahl der unabhängigen Klone (N) einer Genombank, die annähernd alle Regionen eines zu untersuchenden Genoms erfasst, kann durch die von CLARK und CARBON (1976) erstellte Formel berechnet werden. Dabei gibt P die gewünschte Wahrscheinlichkeit wider, das gesamte Genom darzustellen. Die durchschnittliche Fragmentgröße wird durch I symbolisiert, die Größe des Genoms durch G.

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln[1-(I/G)]} \quad (3.1)$$

Bei einer Genomgröße von 4,21 Mbp bei *Bacillus subtilis* 168 (KUNST *et al.*, 1997) sowie einer Genomgröße von 4,22 Mbp bei *Bacillus licheniformis* DSM13 (VEITH *et al.*, 2004), einer Fragmentgröße von 3-4 kbp und einer Wahrscheinlichkeit von 99% sollten beide Genombanken aus mindestens ca. 6000 unabhängigen Klonen bestehen.

### 3.8 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Die Generierung elektrokompenter *E. coli* B ER2566 - Zellen wurde nach modifizierter Vorschrift von DOWER *et al.* (1988) durchgeführt. *E. coli* B ER2566 - Zellen wurden in 500 mL LB-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,7 kultiviert und anschließend bei 6000 g und 4°C mittels Zentrifugation pelletiert (SORVALL INSTRUMENTS RCSC, Fa. DUPONT DE NEMOURS GmbH, Bad Homburg). Die Zellen wurden mindestens fünfmal mit kalten, sterilen dest. Wasser gewaschen. Das gewaschene Bakterien-Pellet wurde in 3 mL einer kalten, sterilen 10%igen Glycerinlösung resuspendiert und in Volumina von 100 µL aliquotiert. Die Zellen wurden anschließend bei -70°C gelagert.

Für die Elektroporation wurden 100 µL elektrokompente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 bis 4 µL Plasmid-DNA (50 bis 200 ng) versetzt und für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der komplette Ansatz in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (GENE PULSER® CUVETTE 1 mm; Fa. BIO-RAD LABORATORIES GmbH, München) überführt. Folgende Elektroporationsparameter wurden eingestellt: Betriebsart: 2,5 KV/Widerstand High Voltage, Widerstand: 129 Ohm (R5), Ladespannung: 1,5 kV, Pulslänge: 5-6 ms (ELECTRO CELL MANIPULATOR 600, Fa. BTX ELECTROPORATION SYSTEM; GENE PULSER® CUVETTE 1 mm; Fa. BIO-RAD LABORATORIES GmbH, München). Nach der Elektroporation wurde das DNA-

Zell-Gemisch in 1 mL SOC-Medium (20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 10 mL 0,25 M KCl (\*), 10 mL 1 M MgCl<sub>2</sub> (\*), 20 mL 1 M Glucose (\*); (\*) getrennt sterilisiert bzw. steril filtriert) aufgenommen, eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert und anschließend auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum als Selektionsmarker ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Transformation von *Bacillus subtilis* TEB 1030 - Zellen (EGGERT *et al.*, 2003) wurde nach einem modifizierten Verfahren nach SPIZIZEN (ANAGNOSTOPOULOS & SPIZIZEN, 1961; YOUNG & SPIZIZEN, 1961) durchgeführt. *Bacillus subtilis* TEB1030 Zellen wurden in 5 mL PARIS-Medium (60 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 mM Na<sub>3</sub>-Citrat, 1% (w/v) Glucose, 20 mM K-Glutamat, 2,2 mg/L Fe(III)NH<sub>4</sub>-Citrat, 0,1% (w/v) Casamino Acids, 20 mg/L L-Tryptophan, 3 mM MgSO<sub>4</sub>) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 bei 37°C inkubiert und anschließend in 0,5 mL Aliquots aufgeteilt. Nach der Zugabe von 1 µg Plasmid wurden die Zellen für weitere 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Selektioniert wurde danach auf Agarplatten mit jeweiligem Antibiotikum.

### 3.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 3.9.1 Standard-PCR-Reaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus plasmidärer oder genomischer DNA wurde nach SAIKI *et al.* (1988) durchgeführt. Es wurden standardmäßig PCR-Ansätze mit einem Volumen von 20 bzw. 50 µl angesetzt; die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die PCR-Bedingungen wurden an das *template*, an die zu amplifizierende Fragmentlänge, an die verwendete Polymerase und an die thermodynamischen Eigenschaften der Primer/Template- Wechselwirkungen angepasst. Die PCR-Reaktionen wurden in einem PCR-Automaten MASTERCYCLER GRADIENT (Fa. EPPENDORF AG, Hamburg) durchgeführt. Die Produkte der PCR wurden mit dem PCR PURIFICATION KIT (Fa. QUIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

Tab. 3.5: Pipettierschema einer Standard-PCR.

PCR-Ansatz	
10-50 ng Plasmid- oder genomische DNA 0,4 mM dNTP's Im jeweiligen Reaktionspuffer (1x)	100 pmol pro Oligonucleotid 2 U <i>Pfu</i> - bzw. <i>Pfx</i> -DNA-Polymerase

### 3.9.2 Ortspezifische Mutagenese

Zielgerichtete Basenaustausche in den jeweiligen Esterase-Genen wurden mit dem QUICKCHANGE<sup>®</sup> SITE-DIRECTED MUTAGENESIS KIT (Fa. STRATAGENE<sup>®</sup>; Heidelberg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Sofern keine Restriktionsanalyse zur Überprüfung der eingefügten Mutation durchgeführt werden konnte, wurden die entsprechenden Bereiche sequenziert (s. Kapitel 3.9.3).

### 3.9.3 Sequenzierung von DNA

Für Sequenzierungen (Kettenabbruch-Methode nach SANGER & CLOUSON; 1977) wurden die jeweiligen DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert. Die dabei eingesetzten mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxy-Nukleotidtriphosphate (ddNTP) werden beim Verlassen der Fluoreszenz-Kapillarelektrophorese (ABI PRISM<sup>®</sup> 310 GENETIC ANALYZER; Fa. APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, USA) detektiert und als Sequenzsignal in Form von Chromatogrammen gespeichert. Gearbeitet wurde nach dem ABI „PRISM<sup>®</sup>BIGDYE-TMTERMINATOR CYCLE SEQUENCING READY REACTION KIT“ Protokoll nach Angaben des Herstellers. Sequenzierungen von Fragmenten ab einer Größe von 2 kbp wurden bei der AGOWA (AGOWA; GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNOLOGIE MBH; BERLIN) vorgenommen.

Tab. 3.6: Pipettierschema einer Sequenzierungs-PCR

PCR-Ansatz (20 µL)	PCR-Programm
500 ng <i>template</i> -DNA	96°C 10''
2 µL Sequenzierungsprimer (10 µM Stammlösung)	50°C 5''
4 µL BIGDYE-TERMINATOR READY MIX	60°C 4'
ad. bidest. H <sub>2</sub> O	halten bei 4°C

### 3.9.4 Zufallsmutagenese

Um ungerichtet über die gesamten Esterase-Gene verteilt Basensubstitutionen einzufügen, wurde der Ansatz der fehlerhaften Polymerase-Kettenreaktion (*epPCR* = *error-prone polymerase chain reaction*) gewählt (ZHOU *et al.*, 1991; CADWELL & JOYCE, 1992). Für unterschiedliche Mangan(II)-chloridkonzentrationen wurden Test-PCRs durchgeführt, die PCR-Produkte restringiert und in den pTYB1-Vektor ligiert. Nach Transformation des

jeweiligen Ligationsansatzes in *E. coli* B ER2566 - Zellen wurden anschließend jeweils 5 Klone sequenziert. Für eine Mutationsrate von 3 bis 4 Basensubstitutionen pro Gen wurde das in der nachfolgenden Tabelle aufgeführte Protokoll verwendet. Es wurden 20 Parallelansätze durchgeführt, die vor der Klonierung in den Expressionsvektor pTYB1 vereinigt wurden.

**Tab. 3.7: Pipettierschema für die *error-prone*-PCR.**

Zusatz	Pipettiertes Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
Reaktionspuffer	10
Primer 1 (10 $\mu\text{M}$ )	2
Primer 2 (10 $\mu\text{M}$ )	2
DNA (20 ng gesamt)	1
MnCl <sub>2</sub> (0,1 g / 100 mL)	3
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	4
dNTP's (5 mM jeweils)	4
<i>Taq</i> -Polymerase (Konz.)	1
bidest. H <sub>2</sub> O	73

### 3.10 Indikatorplatten mit Diethylphthalsäure

0,75 g Gummi arabicum wurden in 7,5 mL doppelt destilliertem Wasser gelöst. 4,96 mL Diethylphthalsäure wurden zugegeben und das entstehende zweiphasige System mittels MICROTIP-Ultraschallsonde (VIBRA CELL, Fa. SONICS & MATERIALS INC., Denburg, USA) 1 Minute homogenisiert. Anschließend wurde die Emulsion in 500 mL warmes LB-Medium gegeben (EK: 50 mM) und mit einem Ultra-Turrax (ULTRATURRAX<sup>®</sup> T25 BASIC; Fa. JANKE & KUNKEL, Staufen) 20 Sekunden stark vermischt. Zur Schaumreduktion wurde der Diethylphthalsäure-Agar vor dem Giessen 10 Minuten in einem 50°C warmen Wasserbad aufbewahrt. Aufgrund der geringen Haltbarkeit wurden die so hergestellten Indikatorplatten sofort nach der Herstellung verwendet.

### 3.11 Gewinnung und Präparation von Zellrohextrakt

Für die Gewinnung von Rohextrakt wurden der Zellmasse angepasste Verfahren zur Zelldisruption angewendet. Vor dem Aufschluss wurden die Zellen in den Versuchen angepassten Lysepuffern resuspendiert. Für bis zu 0,2 g Zellmasse wurde BUGBUSTER<sup>™</sup> (Fa. NOVAGEN INC., Madison, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei einer Zellmasse bis 5 g wurde gepulster Ultraschall (1 Sek. / 1 Sek.) unter Eiskühlung für

mindestens 10 Minuten (nach je einer Minute Aufschluss erfolgte eine 10minütige Kühlung auf Eis) benutzt (VIBRA CELL, Fa. SONICS & MATERIALS INC., Denburg, USA). Ab 5 g Zellmasse wurde der Aufschluss mit einer FRENCH-PRESS (MODELL Z-PLUS mit 1.1 kW Kompressorleistung, Fa. CONSTANT SYSTEMS LDT., Daventry; UK) vorgenommen. Dazu wurde eine 20 bis 30%ige Zellsuspension (w/v) mit DNase versetzt und aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation bei 20000 g abgetrennt (30 Minuten; 4°C) und der Überstand über eine 0,2 µm Membran steril filtriert.

### **3.12 Ammoniumsulfat-Präzipitation**

Für die Präzipitation von Proteinen wurden dem Rohextrakt bestimmte Mengen Ammoniumsulfat zugeführt. Dabei wurde das Salz unter langsamem Rühren in kleinen Volumina so zur Proteinlösung zugegeben, dass es vollständig gelöst war, bevor erneut Salz hinzugegeben wurde. Die Bestimmung der Ammoniumsulfat-Menge zur Einstellung einer gewählten Konzentration (in % Sättigung) erfolgte mit Hilfe eines Nomogramms. Nach Zugabe der gewünschten Menge Ammoniumsulfat wurde die Lösung weitere 2 Stunden bei 4°C gerührt, bevor das Präzipitat durch Zentrifugation (20000 g; 30 Minuten; 4°C) gewonnen wurde. Das Lösen des Pellets erfolgte in dem Puffer, mit dem die nachfolgenden Reinigungsschritte durchgeführt wurden.

### **3.13 Entsalzung / Umpuffern von Proteinlösungen**

Zur Entsalzung von Proteinlösungen wurde die jeweilige Probe in einem 100fachen Dialysevolumen über Nacht bei 4°C langsam gerührt (Dialysemembran: SPECTRA/POR<sup>®</sup> MWCO: 3500; Fa. SPECTRUM<sup>®</sup>, Rancho Dominguez, USA). Es wurde stets so lange dialysiert, bis eine Leitfähigkeit von kleiner 2 mS gemessen wurde (CDM 83 CONDUCTIVITY METER, Fa. RADIOMETER KOPENHAGEN). Zur Entsalzung oder Umpufferung kleiner Volumina wurden PD-10-Säulen (PD-10 DESALTING WORKMATE; Fa. AMERSHAM BIOSCIENCES, Uppsala, Schweden) verwendet.

### **3.14 Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC)**

Zur biochemischen Reinigung der Esterasen wurde die FPLC-Anlage ÄKTA<sup>™</sup> EXPLORER 100 (GE HEALTHCARE, Braunschweig) mit folgenden Komponenten verwendet: Monitor UV-900,

Pump P-901, Monitor pH/C-900, Mixer M-925, Conductivity Cell pH/C-900 und Flower Cell 2 mm (3 µL). Die zu trennenden Proben wurden vor dem Beladen der Säulen mittels einer 0,2 µm Membran steril filtriert. Die verwendeten Puffer wurden ebenfalls steril filtriert und zusätzlich entgast. Individuelle Parameter der Säulen bezüglich der Bindungskapazität, optimaler Flussrate, Rückdruck, chemischer und physikalischer Stabilität sowie Regenerierung wurden je nach Angaben des Herstellers beachtet. Die Chromatographie-Säulen wurden in 20% Ethanol bei Raumtemperatur gelagert. Eine direkte Umpufferung von 20% Ethanol zu einem salzhaltigen Eluenten oder umgekehrt wurde durch Spülen mit dest. Wasser vermieden.

### **3.14.1 Affinitätschromatographie mit Chitin-Agarose**

Für die Aufreinigung von C-terminalen Intein-Fusionsproteinen wurde eine Affinitätschromatographie mit Chitin-Agarose als Säulenmatrix durchgeführt (CHONG *et al.*, 1997; CHONG *et al.*, 1998). Die Chitin-Agarose-Säule (13 x 2,2 cm; Vol. = 50 mL) wurde mit 500 mL Equilibrierungspuffer (50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 0,1 % v/v Triton X100, 1 mM EDTA, pH 7,5) equilibriert. Der Proteinrohextrakt wurde mit einer Stammlösung auf eine Konzentration von 0,1% (v/v) Triton X100 eingestellt, über eine 0,2 µm Membran filtriert und dann mit einer Flussrate von 0,4 mL/min auf die Säule geladen. Das nicht-ionische Detergenz Triton X100 minimiert zusätzlich zu der hohen Salzkonzentration von 1 M NaCl unspezifische Wechselwirkungen mit der Säulen-Matrix. Nach Beladen der Chromatographie-Säule wurde diese mit insgesamt 500 ml Wasch-Puffer 1 (50 mM HEPES, 1 M NaCl, 0,1% v/v Triton X100, 1 mM EDTA, pH 7,5) und 500 mL Wasch-Puffer 2 (50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) gewaschen (Flussrate 1 mL/min). Der Protein-„*splicing*“-Mechanismus wurde dann durch die Einstellung der Säule auf 50 mM DTT induziert (50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 50 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7,5). Dafür wurde in einem möglichst kurzen Zeitraum (nicht länger als 30 Minuten) die Säule mit 100 mL Elutionspuffer (50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 50 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7,5) beladen (Flussrate 2 mL/min). Danach wurde die Pumpe gestoppt, die Säule verschlossen und für 16 bis 20 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurde das Protein mit Elutionspuffer (50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) von der Säule eluiert, wobei die Ziel-Moleküle in einem scharfen „Peak“ von der Säule eluierten. Die so präparierten Enzyme besaßen nach Abschätzung durch silbergefärbte SDS-PAGE-Gele eine Reinheit von mehr als 95%.

### 3.14.2 Affinitätschromatographie mit Nickel-NTA

Zur Aufreinigung von Poly-Histidin-Fusionsproteinen aus Zellrohextrakt wurde die immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie angewendet (PORATH *et al.*, 1975). Die Nickel-NTA-Säule (15 x 1,5 cm; Vol. = 25 mL) wurde mit 500 mL Equilibrierungspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) equilibriert. Der Proteinrohextrakt wurde mit einer 0,2 µm Membran filtriert und dann mit einer Flussrate von 0,4 mL/min auf die Säule geladen. Anschließend wurde die Säule mit 300 mL Waschpuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0) und einer Flussrate von 2 mL/min gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu eluieren. Die Elution des Zielproteins erfolgte durch Einsatz des Elutionspuffers (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0). Die so präparierten Enzyme besaßen nach Abschätzung durch silbergefärbte SDS-PAGE-Gelen eine Reinheit von mehr als 95%.

### 3.15 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte unter Verwendung des BCA PROTEIN ASSAY KIT (Fa. INTERCHIM, Montlucon Cedex, Frankreich) nach Angaben des Herstellers. Grundlage dieser Methode ist die BIURET-Reaktion, bei der die Proteine in alkalischer Lösung mit Cu<sup>2+</sup>-Ionen einen Komplex bilden. Die Cu<sup>2+</sup>-Ionen dieses Komplexes werden zu Cu<sup>+</sup>-Ionen reduziert, die mit Bicinchonininsäure (BCA) einen bei 562 nm absorbierenden Farbkomplex bilden (SMITH *et al.*, 1985). Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurde Rinderserumalbumin (BSA) in verschiedenen Konzentrationen verwendet.

### 3.16 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) können Proteine im analytischen oder präparativen Maßstab nach Größe von entfalteter oder gefalteter Proteinkette (SDS- und native PAGE) oder nach dem relativen Gehalt an sauren oder basischen Gruppen (IEF, isoelektrische Fokussierung) aufgetrennt werden (LAEMMLI, 1970). Im elektrisch geladenen Feld ist die Beweglichkeit der Proteine in stark vernetzten Polyacrylamidgelen in der Regel nur noch von der Größe und Ladung der Proteine, der Porengröße des Polyacrylamidgels und der angelegten Spannung abhängig. Bei der nativen PAGE erfolgt die Auftrennung der Proteine unter nicht denaturierenden Bedingungen, während bei der SDS-PAGE die Proteine

durch den Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert werden. Die denaturierten Proteine tragen eine proportional zu ihrem Molekulargewicht negative Ladung. Durch Zusatz von Mercaptoethanol bzw. Dithiothreitol (DTT) oder Dithiorythrol (DTE) können zudem Disulfidbrücken reduziert und entsprechend vernetzte Peptidstränge getrennt werden (WEBER und OSBORN, 1969).

Im Rahmen dieser Arbeit kamen zwei unterschiedliche PAGE-Systeme zur Anwendung. Zum einen wurde das PHASTSYSTEM<sup>TM</sup> (Fa. GE HEALTHCARE, Braunschweig) mit den dazugehörigen Polyacrylamid-Gelen (PHASTGEL GRADIENT 8-25 mit PHASTGEL SDS BUFFER STRIPS bzw. PHASTGEL NATIVE BUFFER STRIPS) verwendet. Zusätzlich wurden mit diesem System Titrationskurven mit IEF-Gelen (PHASTGEL IEF 3-9) erstellt. Sämtliche Arbeitsschritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zum Anderen wurden denaturierende (NUPAGE<sup>®</sup> 4-12% BIS-TRIS 1,0 MM X 12 WELL) und native Gele (10% TRIS-GLYCINE-GEL 1,0 MM X 12 WELL) mit den zugehörigen Puffern (NUPAGE<sup>®</sup> MOPS SDS RUNNING BUFFER bzw. TRIS-GLYCINE NATIVE RUNNING BUFFER) von der Firma INVITROGEN (Karlsruhe) bezogen. Die Gele wurden in der Elektrophoresekammer (Modell P8DS, Fa. OWL SEPARATION SYSTEMS INC., Portsmouth, USA) fixiert und beladen; den Strom lieferte das Gerät CONSORT E132 (Fa. PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GMBH, Erlangen). Die Proteinlösungen wurden je nach Versuch mit 5x SDS-Probenpuffer (100 mM Tris/HCl, 2% SDS (w/v), 20% Glycerin (v/v), 0,1% (w/v) Bromphenolblau, pH 7,0) bzw. 5x Nativ-Probenpuffer (100 mM Tris/HCl, 20% Glycerin (v/v), 0,1% (w/v) Bromphenolblau, pH 8,6) versetzt und im Falle der denaturierenden PAGE für 10 Minuten bei 100°C inkubiert. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine unter Wasserkühlung bei 200 Volt für 45 bis 60 Minuten. Die unterschiedlichen Färbemethoden für die Visualisierung von Proteinen in der Gelmatrix sind im folgenden Kapitel ausführlich dargestellt.

### **3.17 Färbungen von Proteinen in der Gelmatrix**

#### **3.17.1 Coomassie-Färbung**

Die nach der Polyacrylamid-Gelelektrophorese zu färbenden Gele wurden für mindestens 60 Minuten in der COOMASSIE-BRILLIANT-BLUE-Lösung geschwenkt (0,5 g Serva Blau R, 250 mL Isopropanol, 50 mL Eisessig). Nach kurzem Spülen der Gele mit destilliertem Wasser wurde der überschüssige Farbstoff mit Entfärberlösung (30% Ethanol, 10% Eisessig) entfernt.

### 3.17.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung von Proteinen in Gelmatrizes erfolgte nach der Methode von HEUKESHOVEN und DERNICK (1986), bei der die Nachweisgrenze bei 4-10 ng Protein liegt. Diese Färbung wurde in der Regel nach einer Coomassie-Färbung durchgeführt (LAEMMLI, 1970), um die Sensitivität zu erhöhen und damit die Intensität der Protein-Banden an der unteren Nachweisgrenze hervorzuheben (MORENO *et al.*, 1985).

Die Gele wurden nach der Elektrophorese mindestens eine Stunde in 30% Ethanol, 10% Essigsäure fixiert. Eine Inkubation von 30 bis 60 Minuten in der Reduktorlösung (30% (v/v) Ethanol, 0,5% (w/v) Na-Acetat, 0,2% (w/v) Na-Thiosulfat, 0,5% (v/v) Glutaraldehyd) diente der Signalverstärkung. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser für jeweils 10 Minuten wurden die Gele 30 Minuten in der Silberlösung (0,1% (w/v) AgNO<sub>3</sub>, 0,02% (v/v) Formaldehyd) inkubiert. Nach kurzem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Gele solange in Entwicklerlösung (2,5% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,02% (v/v) Formaldehyd) geschwenkt, bis die Banden deutlich sichtbar waren. Die Entwicklung wurde entweder durch Zugabe von Zitronensäure (EK 250 mM) oder nach Verwerfen der Entwicklerlösung mit 50 mM EDTA gestoppt.

### 3.17.3 Esterase-Aktivitätsfärbung

Um Esterase-Aktivität in einem nativen Proteingel nachzuweisen, wurden die Gele zwischen 2 und 15 Minuten in einer Mischung gleicher Volumina einer  $\alpha$ -Naphthylacetat-Lösung (20 mg  $\alpha$ -Naphthylacetat in 5 mL Aceton vermengt mit 45 mL 100 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,5) und einer FAST RED TR SALZ-Lösung (50 mg FAST RED TR, 50 mL 100 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,5) inkubiert. Die esterolytische Aktivität von Esterasen, Lipasen und Proteasen bewirkt eine Hydrolyse des Naphthylacetats zu  $\alpha$ -Naphthol und Essigsäure. Das gebildete  $\alpha$ -Naphthol bildet nachfolgend mit dem Diazoniumsalz (FAST RED TR) einen unlöslichen roten Azofarbstoff. Dieser dient als Nachweis für die esterolytische Aktivität (HIGERD & SPIZIZEN, 1973).

Nach einer denaturierenden Gelelektrophorese in Polyacrylamidgelen wurden die Proteine in der Gelmatrix renaturiert. Dazu wurden die Gele in 100 mL Renaturierungspuffer (100 mM Tris/HCl, 0,5% (v/v) Triton X 100, pH 7,5) eine Stunde inkubiert und nachträglich einer Esterase-Aktivitätsfärbung unterzogen.

## 3.18 Bestimmung von Enzymaktivitäten

### 3.18.1 Photometrische Bestimmung der Esterase-Aktivität

#### 3.18.1.1 Esterase-Aktivitätsbestimmung mit *para*-Nitrophenyl-Estern

Die Esterase-Aktivität wurde in der Regel mit *para*-Nitrophenyl-Acetat (*p*NPA) bestimmt. Dazu wurde eine 400 mM Stammlösung mit DMSO angesetzt. 980  $\mu$ L eines 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) wurden mit 10  $\mu$ L in DMSO gelösten *para*-Nitrophenyl-Acetat vermengt. Die Reaktion wurde - wenn nicht anders beschrieben - bei Raumtemperatur durchgeführt und durch Zugabe von 10  $\mu$ L Enzymlösung gestartet. Anschließend wurde die Absorptionzunahme bei 410 nm vermessen (UV MC<sup>2</sup>, Fa. SAFAS, Monaco). Die Enzymaktivität wurde mit einem Molaren Extinktionskoeffizienten von 17100 [ $M^{-1}cm^{-1}$ ] (MUSIDLOWSKA-PERSSON & BORNSCHEUER, 2003) errechnet, wobei 1 Unit als die Enzymmenge definiert wurde, die 1  $\mu$ mol *p*-Nitrophenol pro Minute freisetzte.

Zur Bestimmung von Kettenlängen-Spezifitäten der untersuchten Esterasen wurden *p*-Nitrophenyl-Ester mit unterschiedlichen Kettenlängen als Substrat für die spektroskopischen Aktivitätsmessungen verwendet. Dazu wurden die *p*-Nitrophenylester in 10 mL Isopropanol gelöst und mit 90 mL SØRENSEN-Phosphat-Puffer (pH 8, WINKLER & STUCKMANN; 1979) versetzt. Die Endkonzentration der Substrate lag bei 0,8 mM. Jeweils 990  $\mu$ L des Puffer-Substrat-Gemisches wurde mit 10  $\mu$ L der zu vermessenden Enzymprobe vermengt und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorptionzunahme bei 410 nm vermessen (UV MC<sup>2</sup>, Fa. SAFAS, Monaco). Die Enzymaktivität wurde mit einem Molaren Extinktionskoeffizienten von 17100 [ $M^{-1}cm^{-1}$ ] (MUSIDLOWSKA-PERSSON & BORNSCHEUER, 2003) errechnet, wobei 1 Unit als die Enzymmenge definiert wurde, die 1  $\mu$ mol *p*-Nitrophenol pro Minute freisetzte.

#### 3.18.1.2 Esterase-Aktivitätsbestimmung mit Phenolrot

Für die biochemische Reinigung der Dialkylphthalat-Hydrolase wurden esterolytische Aktivitätsbestimmungen gegenüber Diethylterephthalat (DET) als Substrat mit einem photometrisches Messverfahren angewendet, welches die Ansäuerung des Testsystems mittels pH-Indikator anzeigt. Grundlage dieses Testsystems ist die gleiche Protonenaffinität des eingesetzten Puffers (EPPS-Puffer;  $pK_a = 8,0$ ) und des eingesetzten pH-Indikators (Phenolrot;  $pK_a = 8,0$ ) (JANES *et al.*, 1998), die einen linearen Verlauf der Absorptionsabnahme bei

560nm ermöglichen. Zur Errechnung der Aktivität fanden die folgenden Formeln Verwendung:

$$Q = \frac{c_{\text{Puffer}}}{c_{\text{Indikator}}} * \frac{1}{\Delta \varepsilon_{560\text{nm}} * l} \quad (3.2)$$

$$A = (\mu\text{mol} * \text{min}^{-1}) = \frac{dE}{dt} * Q * V_{\text{Reaktion}} * 10^{-6} \quad (3.3)$$

**Q:** „Pufferfaktor“;  $c_{\text{Puffer}}$ : Endkonzentration an Puffer [M];  $c_{\text{Indikator}}$ : Endkonzentration an Indikator [M];  $\Delta \varepsilon_{560\text{nm}}$ : Differenz des molaren Extinktionskoeffizienten von deprotonierter Form und protonierter Form des Phenolrots; A: Aktivität;  $dE/dt$ : Extinktionsabnahme gegenüber einem Zeitintervall;  $V_{\text{Reaktion}}$ : Reaktionsvolumen [L]; l: Lichtweg durch die Küvette [cm]

Die Enzymaktivität wurde mit einem empirisch ermittelten Molaren Extinktionskoeffizienten von 58000 [ $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ] für die deprotonierte und von 100 [ $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ] für die protonierte Form errechnet, wobei 1 Unit als die Enzymmenge definiert wurde, die 1  $\mu\text{mol}$  Säure pro Minute freisetzte.

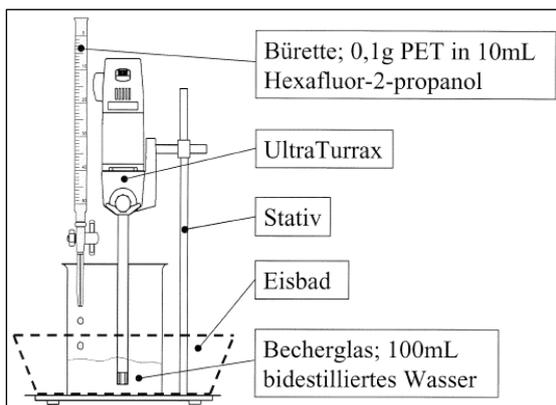
### 3.18.2 Bestimmung der Esterase-Aktivität mittels Titration

Enzymaktivitäten der Esterasen gegenüber verschiedenen Substraten der Phthalsäureester wurden mit dem Titrationsapparat 702 STAT (Fa. METROHM LDT., Schweiz) bestimmt. Die Phthalate wurden nach Vorschrift von KOLATTUKUDY *et al.* (1981) emulgiert und in unterschiedlichen Endkonzentrationen (0,3 mM bis 100 mM) in einem Gesamtreaktionsvolumen von 2 mL eingesetzt. Der Reaktionspuffer (2 mM Tris/HCl, pH 9) wurde für mindestens 10 Minuten bei 30°C vorinkubiert. Nach Zugabe des Enzyms wurde der NaOH-Verbrauch (Konzentrationsbestimmung durch dreimalige Titerbestimmung mit Oxalsäure) bei einer Reaktionstemperatur von 30°C aufgezeichnet. Eine Unit wurde als die Enzymaktivität definiert, die 1  $\mu\text{mol}$  Lauge pro Minute freisetzte.

### 3.19 Herstellung von Polyethylenterephthalat-Nanopartikeln

Zur Herstellung von Polyester-Nanopartikeln nach WELZEL *et al.* (2002) wurden 0,1 g PET in 10 mL 1,1,1,3,3,3,-Hexafluor-2-Propanol gelöst und in eine Bürette gefüllt. Diese Lösung wurde unter starkem Rühren mittels eines UltraTurrax<sup>®</sup> (ULTRATURRAX<sup>®</sup> T25 BASIC; Fa. IKA) bei 8000 rpm in ein mit einem Eisbad gekühltes Becherglas mit 100 mL bidestilliertem Wasser mit einem Volumenstrom von 1 mL/min getropft. Eventuell ausgefallenes Polymer

wurde mit einem Faltenfilter (597<sup>1</sup>/<sub>2</sub> FALTENFILTER, Fa. SCHLEICHER UND SCHUELL) abfiltriert. Das organische Lösungsmittel wurde anschließend mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (ROTAVAPOR R-144, Fa. BÜCHLI) aus dem Gemisch entfernt, separat aufgefangen und wiederverwendet. Zur Bestimmung der Polymerkonzentration wurden dreimal 1 mL der Suspension zentrifugiert und das Pellet bei 50°C 24 Stunden getrocknet und die Polymermasse gravimetrisch bestimmt. Anschließend wurde eine Partikelgrößenanalyse durchgeführt (s.u.).



**Abb. 3.1: Schematischer Aufbau zur Herstellung von Polyethylterephthalat-Nanopartikeln.**

### 3.20 Partikelgrößenverteilung

Die bei der PET-Substratpräparation (s.o.) erhaltenen Partikel wurden mittels der Dynamischen Lichtstreuung (ZETASIZER NANO ZS; Fa. MALVERN INSTRUMENTS, Worcestershire, United Kingdom) hinsichtlich ihrer Größe untersucht. Angeregt durch die BROWNSche Molekularbewegung der Flüssigkeit führen die Partikeln abhängig von ihrer Größe rein zufällige Schwankungsbewegungen aus. Diese führen zu Frequenzverschiebungen zwischen den Streulichtstrahlen und dadurch zu Schwankungen im Streulicht am Detektor (DOPPLER-Effekt). Das transformierte, verstärkte, gefilterte und digitalisierte Frequenzspektrum aus der DOPPLER-Verschiebung wird mathematisch analysiert, um eine Partikelgrößenverteilung zu rekonstruieren. Kleine, sich schnell bewegende Partikeln erzeugen höherfrequente Schwankungen als vergleichsweise größere, sich langsamer bewegende Partikel.

### 3.21 Synthese von (Bis-(*p*-methylbenzoesäure)-ethylenglykolester)

Bis-(*p*-methylbenzoesäure)-ethylenglykolester wurde durch die Veresterung von 4-Methylbenzoylchlorid und Ethylenglykol nach der Vorschrift von HEIM & POE (1944) synthetisiert.

Ethylenglykol und Pyridin wurden dabei im Rundkolben mit Rückflusskühler vorgelegt und 4-Methylbenzoylchlorid unter Eiskühlung zugetropft. Nach Stehenlassen des Ansatzes für 16 Stunden wurde der gewonnene feste Ester abfiltriert und in 70% Ethanol 30% Wasser rekristallisiert. Anschließend wurde der Feststoff mit 70% Ethanol gewaschen und für 24 Stunden unter vermindertem Druck getrocknet.

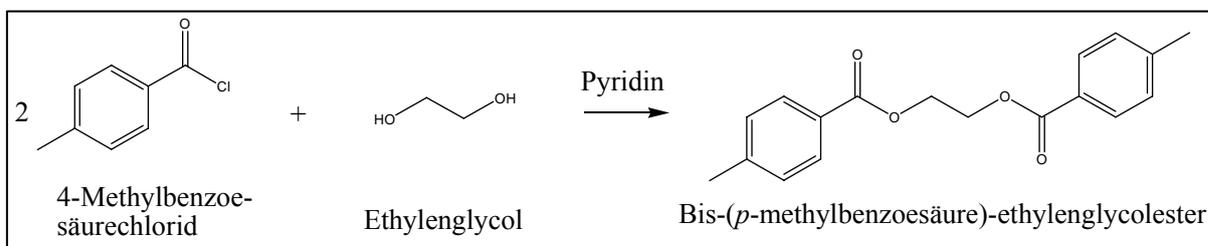


Abb. 3.2: Synthese von Bis-(*p*-methylbenzoesäure)-ethylglykolester durch Veresterung von 4-Methylbenzoesäure und Ethylenglykol nach HEIM & POE (1944).

### 3.22 Gekoppelte Gaschromatographie/Massenspektroskopie (GC/MS)

Die Identifikation der Hydrolyseprodukte nach Inkubation der Dialkylphthalate mit den untersuchten Enzymen erfolgte mittels GC/MS. Das GC/MS-System bestand aus einem Gaschromatographen (HP 5891 SERIES II PLUS; Fa. HEWLETT-PACKARD, Böblingen) und einem Injektor (HP 7673; Fa. HEWLETT PACKARD, Böblingen). Die Analyten wurden über eine DB5MS-Säule (25 m; Fa. AGILENT TECHNOLOGIES, Waldbronn) chromatographisch unter Verwendung von Helium als Trägergas mit folgendem Temperaturprogramm getrennt: 60°C für 2 Minuten, 8°C pro Minute bis auf eine Temperatur von 325°C; 15 Minuten bei 325°C. Als Massenspektrometer wurde das Modell TSQ700 (Fa. FINNIGAN, Bremen) verwendet.

Zur Probenvorbereitung wurde ein Aliquot von 500 µL mit 500 µL Chloroform und 100 µL Ethylacetat extrahiert und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Probe durch Begasung mit Stickstoff eingengt, durch Zugabe von 1 mL N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid und einer Inkubation von 30 Minuten bei 80°C silanisiert. Danach erfolgte die Messung. Die erhaltenen Chromatogramme der Gaschromatographie sowie die erhaltenen Massenspektren der getrennten Einzelsubstanzen wurden mit der WILEY-Datenbank verglichen und den jeweils besten Treffern zugeordnet.

### 3.23 Gekoppelte Flüssigchromatographie/Massenspektroskopie (LC/MS)

Für die Analyse möglicher Hydrolyseprodukte von PET-Nanopartikeln wurde ein LC/MS-System bestehend aus einer WATERS Liquid Chromatographie (Typ 2695; Eschborn) mit einer RP-8 Säule (LICHROSORB<sup>®</sup>, 5 µm; Fa. MERCK, Darmstadt) und einem Massenspektrometer LCQ Classic (Fa. FINNIGAN, Bremen) verwendet. 100 µl einer zu vermessenden Probe wurden mit 500 µL Hexafluoroisopropanol versetzt und anschließend vermessen. Die Analysen basierten auf der von LOPEZ-CERVANTES *et al.* (2003) beschriebenen Methode mit folgendem Gradienten aus Acetonitril (A) und bidest. Wasser (B): Minute 0-2 mit 30%A/70%B, Minute 2-20 30%A/70%B, Minute 20-23 80%A/20%B, Minute 23-30 100%A/0%B.

### 3.24 Dünnschichtchromatographie

Um einen - verglichen mit der GC/MS-Analyse - schnelleren analytischen Nachweis der Reaktionsprodukte zu erhalten, wurden Dünnschichtchromatographien mit 90% Dichlormethan / 10% Methanol als Laufmittel und einer vorgesättigten DC-Kammer durchgeführt. Je nach Versuch wurden entweder beschichtete Silica-Gel 60 F<sub>254</sub> Folien oder beschichtete RP-18 F<sub>254S</sub> Folien (Fa. MERCK KGaA, Darmstadt) verwendet. Die Detektion der einzelnen Spots wurde unter UV-Licht vorgenommen. Die errechneten R<sub>F</sub>-Werte („*ratio of fronts*“) dienen hierbei als Identifikationsmaß der Edukte und Produkte durch direkten Vergleich mit einem mitlaufenden Standard. Als Standard diente der jeweilige Reaktionsansatz, der mit Schweineleber-Esterase (PLE, E.C. 3.1.1.1) inkubiert wurde. Aus diesen Ansätzen mit PLE wurden die Hydrolyseprodukte mittels GC/MS identifiziert. Der R<sub>F</sub>-Wert ist definiert als Quotient aus der Entfernung der Substanzzone und der Fließmittelfront von der Startlinie.

### 3.25 Auftragsarbeiten

#### 3.25.1 RIBOPRINT-Analyse von Bodenisolaten

Für eine Klassifizierung der mikrobiellen Isolate wurden RIBOPRINT-Untersuchungen (BRUCE 1996, BRUCE 1995, WEBSTER *et al.* 1994) bei der DEUTSCHEN SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH (DSMZ, Braunschweig) durchgeführt.

### 3.25.2 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen von DNA-Fragmenten ab einer Größe von 2 kbp wurden bei der AGOWA (GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNOLOGIE MBH; BERLIN) vorgenommen.

### 3.25.3 MALDI-TOF-Analyse von Proteinen

Eine massenspektrometrische Analyse des biochemisch gereinigten Enzyms mittels MALDI-TOF wurde von der CHROMATEC GMBH (Greifswald) erbracht.

### 3.25.4 $^1\text{H-NMR}$ (Kernresonanzspektroskopie)

Zur Verifizierung des synthetisierten Bis-(*p*-methylbenzoesäure)-ethylenglykolesters wurden  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren aufgezeichnet (*nuclear magnetic resonance*, Kernresonanzspektroskopie). Durchgeführt wurde diese Analyse in der Zentralen Analytik der HENKEL KGaA, Düsseldorf.

## 3.26 Computerprogramme und Online-Datenbanken

Die Analyse von DNA- Sequenzen (Homologie- und Sequenzvergleiche) erfolgten mit Hilfe von VECTORNTI SUITE 7.0 (FA. INFOMAX). Zur Darstellung eines Aminosäure-Sequenz-Vergleiches wurde CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994) innerhalb des Programmpaketes BIOEDIT 7.0.4.1 (HALL, 1999) verwendet. DNA-Sequenzinformationen von *B. subtilis* 168 wurden über die SUBTILIST-Datenbank (<http://genolist.pasteur.fr/Subtilist/>) abgerufen. DNA-Sequenz-Informationen von *B. licheniformis* DSM13 wurden aus der EMBL NUCLEOTIDE SEQUENCE DATABASE COLLABORATION unter der Accession Number AE017333 erhalten.

In dieser Arbeit wurden SDS-PAGE-Gele und native PAGE-Gele sowie Indikatorplatten digitalisiert und elektronisch in das Manuskript eingebunden. Es wurden keine inhaltlichen Veränderungen an den Bildern vorgenommen. Für die Digitalisierung wurde ein Scanner (HP SCANJET 5400C, Fa. HEWLETT-PACKARD) und die Video- bzw. Photo-Dokumentationsanlage CHEMI DOC<sup>TM</sup> GEL DOCUMENTATION SYSTEM (Fa. BIO-RAD LABORATORIES GmbH, München) verwendet. Für die Darstellungen der chemischen Strukturen wurde CHEMDRAW ULTRA 8.0 (Fa. CAMBRIDGE) verwendet. Die Ergebnisse der enzymologischen Untersuchungen wurden mit GRAFIT PROGRAM 3.0.1.0 (ERITHACUS SOFTWARE LTD. 1989-1992) dargestellt und ausgewertet. Die dargestellten Strukturabbildungen der *para*-Nitrobenzyl-Esterase (Protein ID 1qe3) wurde mit folgendem Programm erstellt: SYBYL (Modul MOPAC, Fa. TRIPOS).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Mikrobiologisches *screening*, Isolierung und Identifizierung von Mikroorganismen mit der Fähigkeit zur Dialkylphthalat-Hydrolyse

Von insgesamt 30 verschiedenen Bodenproben, die auf mit Diethylphthalsäure (DEP) versetzten LB-Agar ausplattiert und inkubiert wurden, konnten zwei Stämme isoliert werden, die deutliche Lysehöfe ausbildeten (Abb. 4.1). Durch mehrfaches Überimpfen auf frische DEP-Platten wurden Reinkulturen erhalten, die für eine Charakterisierung und Klassifizierung zur DEUTSCHEN SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH (DSMZ, Braunschweig) gesendet wurden. Die bei der DSMZ durchgeführten RIBOPRINT-Untersuchungen ergaben, dass keiner der beiden Stämme eine Ähnlichkeit von mehr als 0,85 (Grenzwert für Identifizierung von Organismen: 0,94; Artniveau: 0,85) zu einem Eintrag der DUPONT IDENTIFICATION LIBRARY aufwies, so dass keine automatische Identifizierung erfolgte. Stamm 17A1 zeigte innerhalb der DSMZ-internen Datenbank die größte Ähnlichkeit im Muster zu den *Bacillus subtilis* Stämmen DSM 3256 (0,81) und DSM 10<sup>T</sup> (0,73). Stamm 19C5 wies in der DSMZ-internen Datenbank die größte Ähnlichkeit im Muster zu den *Bacillus licheniformis* Stämmen DSM 7459 (0,75) und DSM 394 (0,70) auf. Auf der Grundlage der vorliegenden Ergebnisse werden die isolierten Stämme im Folgenden *Bacillus subtilis* 17A1 und *Bacillus licheniformis* 19C5 benannt.

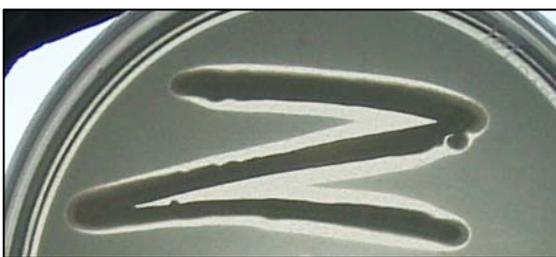


Abb. 4.1: Lysehofbildung des Stammes *B. subtilis* 17A1 auf Diethylphthalsäure haltigen Agarplatten.

Der nach acht Stunden Kultivierung erhaltene Rohextrakt der Stämme *Bacillus subtilis* 17A1 und *Bacillus licheniformis* 19C5 wurde mit dem modifizierten pH-Assay nach JANES *et al.* (1998) gegenüber vier Dialkylphthalaten getestet. Neben Diethylphthalat (DEP) wurden Diethylterephthalat (DET), Dimethylterephthalat (DMT) und Dimethylisophthalat (DMIP) als Substrat für die Messungen herangezogen. Nach Vergleich der Absorptionsabnahmen pro Stunde und abzüglich der durchgeführten Blindproben stellte sich für beide Stämme folgende Substratpräferenz dar: mit Diethylterephthalat als Substrat konnte die größte Absorptions-

abnahme detektiert werden, gefolgt von Dimethylterephthalat, Dimethylisophthalat und Diethylphthalat (Tab. 4.1). Aufgrund der höchsten Aktivität gegen Diethylterephthalat wurde dieses Substrat für die begleitende Analytik der biochemischen Reinigung verwendet. Im ebenfalls getesteten Kulturüberstand konnte keine Aktivität an DET detektiert werden.

**Tab. 4.1: Substratpräferenzen ermittelt aus dem Rohextrakt der mikrobiellen Isolate.** Dargestellt sind Absorptionsänderungen pro Stunde [ $\Delta$ Abs/h] abzüglich der durchgeführten Blindproben. *B.s.*: *Bacillus subtilis*; *B.l.*: *Bacillus licheniformis*. Die Konzentration an Substrat lag jeweils bei 6,67 mM; die Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Substrat	Rohextrakt <i>B.s.</i> 17A1	Rohextrakt <i>B.l.</i> 19C5
Diethylterephthalat (DET)	0,39 [ $\Delta$ Abs/h]	0,91 [ $\Delta$ Abs/h]
Dimethylterephthalat (DMT)	0,21 [ $\Delta$ Abs/h]	0,31 [ $\Delta$ Abs/h]
Dimethylisophthalat (DMIP)	0,16 [ $\Delta$ Abs/h]	0,27 [ $\Delta$ Abs/h]
Diethylphthalat (DEP)	0,09 [ $\Delta$ Abs/h]	0,24 [ $\Delta$ Abs/h]

## 4.2 Biochemische Reinigung des Dialkylphthalat hydrolysierenden Enzyms aus dem isolierten Stamm *Bacillus subtilis* 17A1

Alle Reinigungsschritte wurden, sofern nicht anders vermerkt, bei 4°C vorgenommen. Die dabei erhaltenen Daten sind in der Tabelle 4.2 zusammengefasst. Die Aktivitätsmessungen wurden mit dem modifizierten pH-Assay nach JANES *et al.* (1998) und Diethylterephthalat (DET) als Substrat bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei das Substrat stets mit einer Endkonzentration von 6,67 mM eingesetzt wurde. Die Vereinigung aktiver Fraktionen erfolgte vor dem jeweils nächsten Reinigungsschritt, nachdem mittels Dünnschichtchromatographie die Bildung von Hydrolyseprodukten nachgewiesen wurde (ohne Abbildung).

**Tab. 4.2: Darstellung der einzelnen Schritte der biochemischen Reinigung.** Die esterolytisch aktiven Fraktionen wurden vereinigt und dem nächsten Reinigungsschritt zugeführt. Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurden Aliquots eines jeden Reinigungsschrittes gegen 20 mM EPPS-Puffer dialysiert und anschließend mit DET als Substrat (EK = 6,67 mM) vermessen. Q-Seph. 5: Q-Sepharose bei pH-Wert von 5,0; Q-Seph. 7: Q-Sepharose bei pH-Wert von 7,0.

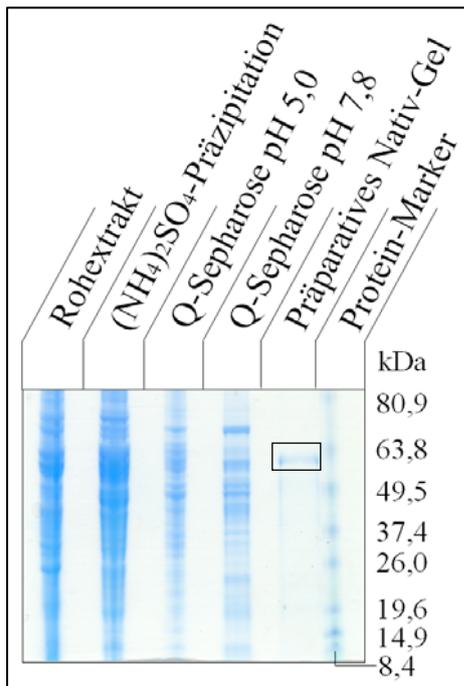
Reinigungsschritt	Volumen [mL]	Volumen-Aktivität [mU/mL]	Protein-Gehalt [mg]	Gesamt-Aktivität [mU]	Spez. Aktivität [mU/mg]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	68	16,2	1722	1120	0,6	100	1
Fällung (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	45	18,0	305	810	2,7	72,2	4,2
Q-Seph. 5,0	66	10,5	72	690	9,6	61,5	15,0
Q-Seph. 7,0	9	31,8	5,3	290	54	25,8	84,7

Mit einem 25 mL Inokulum des Stammes *Bacillus subtilis* 17A1 wurde eine acht Stunden andauernde Kultivierung in einem KLF2000-Fermenter ( $T = 37^{\circ}\text{C}$ , 150 NL/h, pH-ungeregelt) durchgeführt. Nach Abtrennung der Zellen per Zentrifugation (6000 g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15 Minuten) wurde der Überstand durch Dekantieren abgetrennt und das Zellpellett zweifach in 20 mM Citrat-Puffer (pH 5,0) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels gepulsten Ultraschalls 10-mal für eine Minute unter Eiswasser-Kühlung. Anschließend wurden die Zelltrümmer mittels Zentrifugation (20000 g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 30 Minuten) abgetrennt und der Rohextrakt steril filtriert.

Das Präzipitat nach einer fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung zwischen 50 und 70% Sättigung und einer Zentrifugation bei 20000 g ( $4^{\circ}\text{C}$ , 30 Minuten) wurde in 45 mL 20 mM Citrat-Puffer (pH 5,0) aufgenommen und gegen selbigen Puffer dialysiert. Das Dialysat wurde bei Raumtemperatur über eine Q-Sepharose-Säule (3 x 18 cm; Q SEPHAROSE<sup>TM</sup> FAST FLOW; Fa. AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AG) gepumpt, die zuvor mit 10 Säulenvolumen Puffer (20 mM Citrat-Puffer, pH 5,0) equilibriert wurde. Die Probe wurde mit einem Fluss von 2 mL/min aufgetragen und der Durchbruch mit der Dialkylphthalat-Hydrolase aufgefangen. Der Durchbruch wurde gesammelt und über Nacht gegen 20 mM EPPS-Puffer (pH 7,8) dialysiert. Die Esterase-Lösung wurde bei RT mit einem Fluss von 2 mL/min auf die Q Sepharose-Säule (1,5 x 7 cm; Q SEPHAROSE<sup>TM</sup> FAST FLOW; Fa. AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AG) aufgetragen, die mit 15 Säulenvolumen 20 mM EPPS-Puffer (pH 7,8) equilibriert wurde. Nach dem Auftrag der Probe wurde die Säule mit weiteren 5 Volumen Equilibrierungspuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu eluieren. Die Elution der Dialkylphthalat-Hydrolase erfolgte mit einem zweistufigen, linearen Gradienten unterschiedlicher Steigung durch den Elutionspuffer (20 mM EPPS, 1 M NaCl, pH 7,8): 0-50% Elutionspuffer in 6 Säulenvolumen, 50-100% Elutionspuffer in 10 Säulenvolumen, 100% Elutionspuffer für 3 Säulenvolumen.

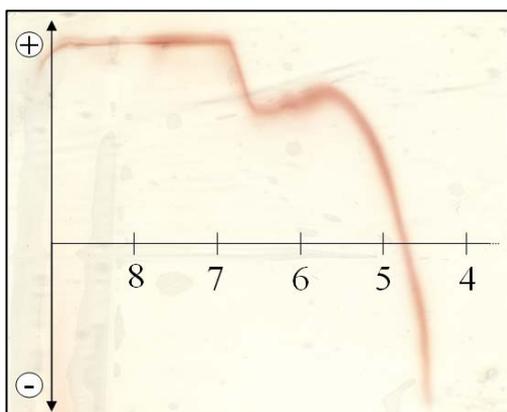
Der letzte Aufreinigungsschritt bestand aus einer präparativen nativen Gelelektrophorese. Pro Probentasche wurden 20  $\mu\text{L}$  Probe aufgetragen und bei  $4^{\circ}\text{C}$  über 4,5 Stunden bei konstanter Stromstärke von 60 mA elektrophoretisch aufgetrennt. Eine anschließende Esterase-Aktivitätsfärbung diente der Lokalisierung der Esterase im Gel. Die aktive Bande wurde mit dem Skalpell ausgeschnitten und die Gelstücke in 5 mL 20 mM EPPS-Puffer (pH 7,8) aufgenommen sowie in einem POTTER-ELVEHJEM-Homogenisator zerkleinert. Nach Abtrennung der Gelstücke mittels Zentrifugation wurde der Überstand mit VIVASPIN 6ML CONCENTRATORS (MWCO 10000, Fa. VIVASCIENCE) auf 250  $\mu\text{L}$  eingengt. Eine Proteinfällung mit TCA und eine anschließende denaturierende SDS-PAGE diente der Überprüfung

der Reinheit (Abb. 4.2). Das apparente Molekulargewicht der Dialkylphthalat-Hydrolase ist der SDS-PAGE-Analyse zur Folge ca. 60 kDa.



**Abb. 4.2: SDS-PAGE aller durchgeführten Reinigungsschritte ausgehend vom Rohextrakt.** Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit Coomassie gefärbt. Die in der Abbildung umrahmte Proteinbande wurde mittels MALDI-TOF bei der CHROMATEC GMBH (Greifswald) analysiert.

Zusätzlich zur SDS-PAGE wurde von dem gereinigten Enzym eine Titrationskurve im Bereich pH 9 bis 3 erstellt (Abb 4.3). Der pH-Wert, an dem das untersuchte Enzym auf der waagerechten Auftragsachse (mit pH-Skalierung) verbleibt, besitzt eine Nettoladung von Null. Demnach besitzt das Enzym einen isoelektrischen Punkt zwischen 4,5 bis 5,0.



**Abb. 4.3: Titrationskurve des biochemisch gereinigten Enzyms aus *B. subtilis* 17A1.** Das native PHAST-Gel bildet in der ersten Phase, die ohne Probe gefahren wird, den pH-Gradienten aus. Nach einer Drehung des Gels um 90° wurde die Probe mittig auf das Gel aufgetragen und erneut elektrophoretisiert. Je nach Ladung, die die Enzyme bei lokalen pH-Wert besitzen, wandern diese zur Anode oder zur Kathode. Enzyme mit einer Nettoladung von 0 (Isoelektrischer Punkt) verblieben auf der Auftragsachse (waagrecht). Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit der Esterase-Aktivitäts-Färbung gefärbt.

### 4.3 Massenspektrometrische Proteinanalytik des gereinigten Enzyms

Die Proteinbande des biochemisch gereinigten Enzyms in der SDS-PAGE (Abb. 4.2) nach der präparativen, nativen Elektrophorese wurde mittels MALDI-TOF-Analyse (*matrix assisted*

laser desorption ionisation - time of flight) bei der CHROMATEC GMBH (Greifswald) analysiert. Das zu untersuchende Protein wurde dazu mit Trypsin im Gel verdaut und die dabei entstehenden Fragmente massenspektrometrisch vermessen. Die aus der Messung hervorgegangenen Peptidfragmente sind in der folgenden Tabelle (4.3) aufgeführt.

**Tab. 4.3: Polypeptidsequenzen ermittelt durch MALDI-TOF-Analyse des gereinigten Enzyms.** Die Proteinbande wurde im Gel mit Trypsin verdaut, extrahiert und anschließend vermessen. Die erhaltenen Polypeptid-Sequenzen zeigten eine Aminosäureabdeckung zur *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *B. subtilis* 168 von 30%.

Submitted (m/z)	Matched (MH <sup>+</sup> )	Datenbank-Sequenz
904,4551	904,4628	(K)AEITDEVK(Q)
937,4294	937,4413	(K)AIMESGASR(T)
1225,6711	1225,6792	(K)LHTVSAEDLLK(A)
1422,6986	1422,7051	(-)MTHQIVTTQYGK(V)
1468,8071	1468,8065	(K)GIPYAKPPVGQWR(F)
1645,9258	1645,9277	(K)LAAQGEVIVVTLNYR(L)
2145,1104	2145,1133	(K)AFHALELPFVFGNLDGLER(M)
2248,2031	2248,2018	(R)IAEKENIFQLFFQPALDPK(T)
2331,1563	2331,1567	(R)ETLILDSEITIENDPESEKR(Q)
2390,2273	2390,2203	(K)EQAASTSA AFLQVLGINEGQLDK(L)

Der Datenbankvergleich der Analysenergebnisse zeigte eine 30%ige Aminosäureabdeckung mit der *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *Bacillus subtilis* 168 (149 identische von 489 Aminosäuren), die ein Molekulargewicht von 54 kDa und einen theoretisch ermittelten isoelektrischen Punkt von 4,9. Sowohl die SDS-PAGE-Analyse (Abb. 4.2) als auch die Titrationskurve des biochemisch gereinigten Enzyms (Abb. 4.3) untermauerten das Ergebnis der MALDI-TOF-Analyse.

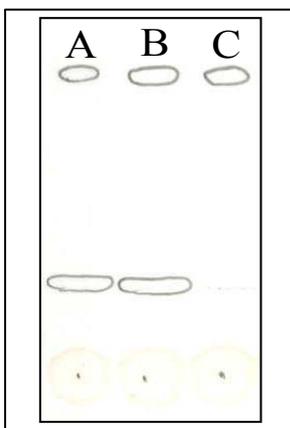
#### 4.4 Identifizierung der kodierenden DNA-Bereiche der *para*-Nitrobenzyl-Esterasen *pNB-Est17* und *pNB-Est19*

##### 4.4.1 Anfertigung von Genombanken für die Stämme *Bacillus subtilis* 17A1 und *Bacillus licheniformis* 19C5 und Isolierung esterolytisch aktiver Klone

Von den aus dem mikrobiologischen *screening* hervorgegangenen Stämmen *Bacillus subtilis* 17A1 und *Bacillus licheniformis* 19C5 wurden Genombanken angefertigt (Kap. 3.7.2). Für *B. subtilis* 17A1 wurden insgesamt ca. 25000 Klone erstellt, für *B. licheniformis* 19C5 insgesamt ca. 26500 Klone. Bei einer Genomabdeckung von 99% entspricht die Anzahl der

Klone nach CLARK & CARBON (1976) für beide Organismen damit theoretisch einer 4-fachen Abdeckung des jeweiligen Genoms.

Für *B. subtilis* 17A1 bzw. *B. licheniformis* 19C5 wurden 78 bzw. 28 Klone isoliert, die sowohl auf Tributyrin-Agarplatten deutliche Lysehöfe ausbildeten als auch durch eine „Overlay“-Esterase-Färbung (HIGERD & SPIZIZEN, 1973) als positiv zu bewerten waren. Auf die Verwendung von Diethylphthalsäure-Agar wurde aufgrund der geringen Haltbarkeit von ca. 48 Stunden verzichtet (Kap. 3.10). Der nach Kultivierung und Zelldisruption erhaltene Rohextrakt der esterolytisch aktiven Genombank-Klone wurde für eine Stunde bei 37°C mit Diethylterephthalat (EK = 10 mM) inkubiert und anschließend auf Bildung von Hydrolyseprodukten mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Bei fünf Genombankklonen für den Stamm *B. subtilis* 17A1 und bei acht Genombank-Klonen für den Stamm *B. licheniformis* 19C5 zeigte der Vergleich mit den Dünnschichtchromatographien der biochemischen Reinigung aufgrund identischer  $R_F$ -Werte die Bildung des gleichen Hydrolyseproduktes. Vergleichende Untersuchungen des Expressionsstammes mit Leervektor zeigten keine Bildung von Hydrolyseprodukten (Abb. 4.4). Eine zusätzlich mit dem Rohextrakt des Klones 17A1-A8 erstellte Titrationskurve war deckungsgleich mit der Titrationskurve des biochemisch gereinigten Enzyms (ohne Abbildung).



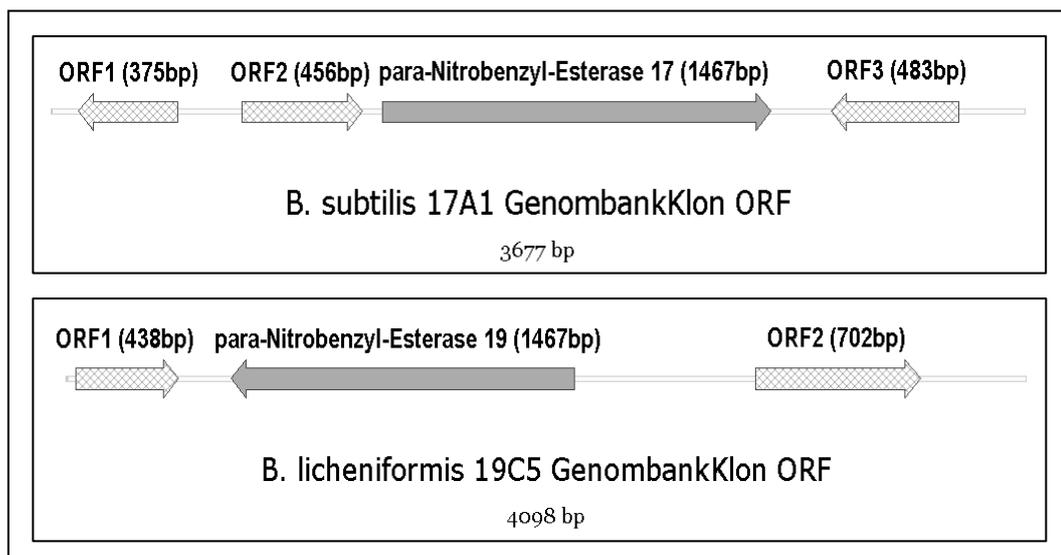
**Abb. 4.4: Dünnschichtchromatographische Analyse von Diethylterephthalat nach Inkubation mit Rohextrakten esterolytisch aktiver Genombank-Klone.** Der Rohextrakt wurde nach einstündiger Inkubation bei 37°C mit Diethylterephthalat (EK = 10 mM) untersucht. A: Klon 17A1-A8; B: Klon 19C5-A4; C: *E. coli* B ER2566 mit pET26b(+)-Leervektor;  $R_F$ -Wert des Substrates 0,75;  $R_F$ -Wert für entstandenes Hydrolyseprodukt 0,22. In der vorgesättigten DC-Kammer wurde 90% Dichlormethan / 10% Methanol als Laufmittel verwendet. Die unter UV-Licht detektierten *spots* wurden mit Bleistift nachgezeichnet.

#### 4.4.2 Identifizierung der *open reading frames* für die *para*-Nitrobenzyl-Esterasen *pNB-Est17* und *pNB-Est19* und Vergleich mit der *pNB*-Esterase aus *Bacillus licheniformis* DSM13

Zur Identifizierung der *open reading frames* der Dialkylphthalat-Hydrolasen wurden die Plasmide der Genombank-Klone 17A1-A8 und 19C5-A4 isoliert und für eine Einzelstrangsequenzierung zur AGOWA (GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNOLOGIE MBH; Berlin) gesendet. Der Genombank-Klon von *B. subtilis* 17A1-A8 trug ein

3677 bp langes genomisches Fragment, wohingegen der Genombankklon von *B. licheniformis* 19C5-A4 ein 4098 bp langes *insert* trug (komplette *insert*-Sequenzen im Anhang).

Mit den erhaltenen Sequenzen wurde eine *open reading frame* - Analyse (ORF) mit folgenden Parametern durchgeführt: *minimum ORF size* 100 *codons*; *start codons* ATG und GTG; *stop codons* TAA, TGA und TAG. Als ORFs identifizierte Sequenzen (Abb. 4.5) wurden mit bestehenden DNA-Sequenzdaten mittels BLAST-Analyse verglichen. Die Esterasen *pNB-Est17* und *pNB-Est19* zeigten im Vergleich mit der *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *B. subtilis* 168 eine 97,8%ige bzw. 90,0%ige Sequenzidentität auf Nukleinsäurebasis.



**Abb. 4.5: ORF - Analyse der genomischen Fragmente der isolierten, esterolytisch aktiven Genombankklone.** oben *E. coli* Bs 17A1-A8 und unten *E. coli* Bl 19C5-A4. Als ORFs identifizierte Sequenzen sind mit Pfeilen dargestellt; Bs steht für *Bacillus subtilis*, wohingegen die Abkürzung Bl für *Bacillus licheniformis* verwendet wurde.

Die der *para*-Nitrobenzyl-Esterasen zugeordneten Sequenzen wurden in eine Aminosäureabfolge translatiert und mit der jeweiligen Aminosäuresequenz der *para*-Nitrobenzyl-Esterasen des Modellstammes (*Bacillus subtilis* 168; KUNST *et al.*, 1997) bzw. Typstammes (*Bacillus licheniformis* DSM13, Protein Accession Number AAU39577.1; VEITH *et al.*, 2004) verglichen (Abb. 4.6). Die Sequenzen für *Bacillus subtilis* 168 und *Bacillus licheniformis* DSM13 wurden demgegenüber als prozentuale Identitätswerte - wie in der Tabelle 4.4 dargestellt - angegeben.

Die Identitätswerte der *para*-Nitrobenzyl-Esterasen zeigt eine hohe Homologie der in dieser Arbeit isolierten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen mit der Esterase von dem Stamm *Bacillus subtilis* 168. So ist die *para*-Nitrobenzyl-Esterase vom Stamm *Bacillus subtilis* 17A1 auf Aminosäureebene zu 98% und die *para*-Nitrobenzyl-Esterase vom Stamm *Bacillus licheniformis* 19C5 zu 92% identisch mit der des Modellstammes *Bacillus subtilis* 168. Eine

geringe prozentuale Identität (58 bis 60%) zeigt die *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *Bacillus licheniformis* DSM13 im direkten Vergleich mit den anderen Esterasen. Da im Rohextrakt von *B. licheniformis* DSM13 ebenfalls eine Aktivität gegenüber Dialkylphthalaten detektiert wurde (Daten nicht gezeigt) und weil diese *para*-Nitrobenzyl-Esterase biochemisch noch nicht charakterisiert wurde, wurde dieses Enzym in weiterführenden Versuchen einbezogen.

**Tab. 4.4: Prozentuale Identitätswerte der verschiedenen *para*-Nitrobenzyl-Esterasen.** *pNB-Est13*: *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *Bacillus licheniformis* DSM13; *pNB-Est168*: *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *Bacillus subtilis* 168; *pNB-Est19*: *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *Bacillus licheniformis* 19C5; *pNB-Est17*: *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *Bacillus subtilis* 17A1

<i>pNB-Esterase</i>	<i>pNB-Est13</i>	<i>pNB-Est168</i>	<i>pNB-Est19</i>	<i>pNB-Est17</i>
<i>pNB-Est13</i>	100	58	60	<b>59</b>
<i>pNB-Est168</i>		100	92	<b>98</b>
<i>pNB-Est19</i>			100	<b>92</b>
<i>pNB-Est17</i>				<b>100</b>

Die hohen Identitätswerte der Aminosäure-Sequenz-Vergleiche der *pNB-Est17* und *pNB-Est19* mit der *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *B. subtilis* 168 (SPILLER *et al.*, 1999) erlauben eine Zuordnung der potentiellen Aminosäuren der katalytischen Triade. Dieser Ableitung zur Folge besteht die katalytische Triade der im Rahmen dieser Arbeit isolierten Esterasen aus dem nukleophilen Ser<sub>189</sub>, dem Glu<sub>308</sub> und dem His<sub>399</sub>. Das Serin liegt zentral im strikt konservierten Pentapeptid G<sub>187</sub>-E<sub>188</sub>-S<sub>189</sub>-A<sub>190</sub>-G<sub>191</sub>, welches den „nukleophilen Ellenbogen“ ausbildet (Kap. 2.1.2). Die an der Katalyse beteiligte Säurefunktion wird durch das Glutamat an Position 308 gestellt. Das seltene Vorhandensein von Glutamat anstatt von Aspartat als Säurefunktion innerhalb der katalytischen Triade teilen die *para*-Nitrobenzyl-Esterasen mit der Acetylcholin-Esterase (JAENICKE & BÖHM, 1998). Das für die Aktivierung des nukleophilen Serinrestes nötige Histidin befindet sich an Position 399. Auf Grundlage der von SPILLER *et al.* (1999) veröffentlichten Kristallstruktur konnten die an der Bildung des „oxyanion hole“ (Kap. 2.1.2) beteiligten Aminosäuren Ala<sub>107</sub> und Gly<sub>106</sub> ebenfalls zugeordnet werden.

**Durch ein selektives mikrobiologisches *screening*, eine biochemische Reinigung mit anschließender MALDI-TOF-Analyse konnte das für die Dialkylphthalat-Hydrolyse verantwortliche Enzymprotein aus *B. subtilis* 17A1 als *para*-Nitrobenzyl-Esterase identifiziert werden. Durch Erstellung von Genombanken und Sequenzierung esterolytisch aktiver Genombank-Klone konnten die korrespondierenden Gene aus *B. subtilis* 17A1 und das der *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *B. licheniformis* 19C5 isoliert werden.**

<i>pNB-Est13</i>	1	MYDTTVETRF	GKLGRAENG	VRIFKGVPIYA	KPPVGDRLFR	EPQRMEAWEG	50
<i>pNB-Est168</i>	1	MTHQIVTTQY	GKVKGTTENG	VHKWKGIPIYA	KPPVGQWRFK	APEPPEVWED	50
<i>pNB-Est19</i>	1	MSHKTIVTTQY	GKVKGTTENG	VHKWKGIPIYA	KPPVGPLRFK	APEPPEAWEN	50
<i>pNB-Est17</i>	1	MTHQIVTTQY	GKVKGTTENG	VHKWKGIPIYA	KPPVGQWRFK	APEPPEVWED	50
<i>pNB-Est13</i>	51	ELDAFQFGPV	CPQPDGVLPE	SAGVQ--KSE	DCLYLNVIYAP	EEADGDLPMV	98
<i>pNB-Est168</i>	51	VLDATAYGSI	CPQPSDLLSL	SYTELPRQSE	DCLYVNVFAP	DTPSKNLPVM	100
<i>pNB-Est19</i>	51	ELDATAYGSI	CPQPSDLLSL	SYTELPRQSE	DCLYINVFAP	DTPSQNLPMV	100
<i>pNB-Est17</i>	51	VLDATAYGPI	CPQPSDLLSL	SYTELPRQSE	DCLYVNVFAP	DTPSQNLPMV	100
<i>pNB-Est13</i>	99	VWIHGGAFFYR	GAGSEPLYDG	TQLAKQGVKI	VVTINRYLGP	FGFLHLSSID	148
<i>pNB-Est168</i>	101	VWIHGGAFFYL	GAGSEPLYDG	SKLAAQGEVI	VVTLNRYLGP	FGFLHLSSFN	150
<i>pNB-Est19</i>	101	VWIHGGAFFYL	GAGSEPLYDG	SRLAAQGEVI	VVTLNRYLGP	FGFLHLSSFE	150
<i>pNB-Est17</i>	101	VWIHGGAFFYL	GAGSEPLYDG	SKLAAQGEVI	VVTLNRYLGP	FGFLHLSSFD	150
<i>pNB-Est13</i>	149	DSYSSNLGLL	DQIAALEWVK	DNIAFFGGDR	HHITVFGESA	GSMSIASLLA	198
<i>pNB-Est168</i>	151	EAYSDNLGLL	DQAAALKWVR	ENISAFGGDP	DNVTVFGESA	GGMSIAALLA	200
<i>pNB-Est19</i>	151	ETYSDNLGLL	DQAAALKWVR	DNISAFGGDP	DNVTVFGESA	GGMSIAALLA	200
<i>pNB-Est17</i>	151	EAYSDNLGLL	DQAAALKWVR	ENISAFGGDP	DNVTVFGESA	GGMSIAALLA	200
<i>pNB-Est13</i>	199	MPKAKGLFQQ	AIMESGASAT	MSDKLAKAAA	ERFLRILDID	HHHLERLHDV	248
<i>pNB-Est168</i>	201	MPAAKGLFQK	AIMESGASRT	MTKEQAASTS	AAFLOVLGIN	EGQLDKLHTV	250
<i>pNB-Est19</i>	201	MPAAKGLFQK	AIMESGASRT	MTKEKAASTA	AAFLEVLGID	ESQLDRLHTV	250
<i>pNB-Est17</i>	201	MPAAKGLFQK	AIMESGASRT	MTKEQAASTS	AAFLOVLGIN	EGQLDKLHTV	250
<i>pNB-Est13</i>	249	SDQELLEAAD	QLRTLGENI	FELIFLPALD	EKTLPLKPEV	AVAKGAAKEI	298
<i>pNB-Est168</i>	251	SAEDLLKAAD	QLRIAENI	FQLFFQPALD	PKTLPEEPEK	AIAEGAASGI	300
<i>pNB-Est19</i>	251	SAEDLLKAAD	QLRKAENENL	FQLFFQPALD	PKTLPAEPEK	AIAEGAAAGI	300
<i>pNB-Est17</i>	251	SAEDLLKAAD	QLRIAENI	FQLFFQPALD	PKTLPAEPEK	AISEGAASGI	300
<i>pNB-Est13</i>	299	NLLIGTNRDE	GVLFFPSDSD	LLPESKINEI	LEEYMGKEAA	EAASSLYPRS	348
<i>pNB-Est168</i>	301	PLLIGTTRDE	GYLFFTPDSD	VHSQETLDA	LEYLLGKPLA	EKVADLYPRS	350
<i>pNB-Est19</i>	301	PLLIGTNRDE	GYLFFTPDSD	VHSQETFDA	LVYLLGQPLA	EKAADLYPRS	350
<i>pNB-Est17</i>	301	PLLIGTTRDE	GYLFFTPDSD	VHSQETLDA	LEYLLGKPLA	EKAADLYPRS	350
<i>pNB-Est13</i>	349	LEGHVDMMTD	LIFWHPSVVF	ASAQSRYSV	FMYRFDWHAD	SEQPPFNKAA	398
<i>pNB-Est168</i>	351	LESQIHMMTD	LLFWRPAVAY	ASAQSHYAPV	WMYRFDWHPK	--KPPYNKAF	398
<i>pNB-Est19</i>	351	LESQIHMMTD	LLFWRPAVAC	ASAQSHYAPV	WMYRFDWHS	--KPPYNKAF	398
<i>pNB-Est17</i>	351	LESQIHMMTD	LLFWRPAVAY	ASAQSHYAPV	WMYRFDWHPK	--KPPYNKAF	398
<i>pNB-Est13</i>	399	HGLEIPFVFG	NMDILEQLTG	TKAGEEAQLL	AEQIQAAWVS	FARSGNPSTD	448
<i>pNB-Est168</i>	399	HALELPFVFG	NLDGLERMAK	AEITDEVKQL	SHTIQSAWIT	FAKTGNPSTE	448
<i>pNB-Est19</i>	399	HALELPFVFG	NLDGLERMAK	AEITDEVKQL	SHTIQSAWIT	FAKTGNPSTE	448
<i>pNB-Est17</i>	399	HALELPFVFG	NLDGLERMAK	AEITDEVKQL	SHTIQSAWIT	FAKTGNPSTE	448
<i>pNB-Est13</i>	449	DVSWPDYDED	SRKTLIFDQE	VAVESDPYSD	KRKMLTAPNP	QI	490
<i>pNB-Est168</i>	449	AVNWPAYHEE	TRETLILDSE	ITIENDPESE	KRQKLFPSKG	E-	489
<i>pNB-Est19</i>	449	DVKWPAYHEE	TRETLILNSE	IAIENDPEAE	KRQKLFPSQG	E-	489
<i>pNB-Est17</i>	449	AVNWPAYHEE	TRETLILDSE	ITIENDPESE	KRQKLFPSKG	E-	489

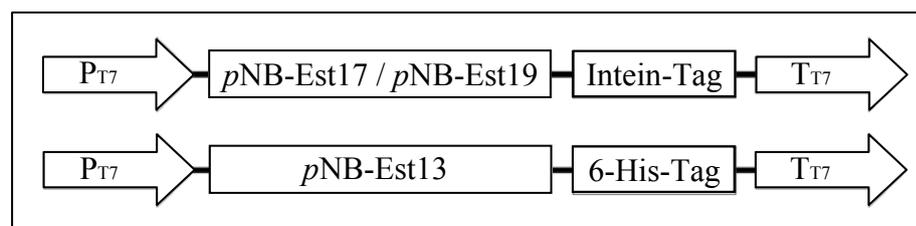
Abb. 4.6: Aminosäure-Sequenz-Vergleich der *para*-Nitrobenzyl-Esterasen aus *B. licheniformis* DSM13, *B. subtilis* 168, *B. licheniformis* 19C5 und *B. subtilis* 17A1. Die Abkürzung *pNB* steht jeweils für *para*-Nitrobenzyl-Esterase. Identische Aminosäuren in den dargestellten Sequenzen sind dunkelgrau hinterlegt. Der Austausch ähnlicher Aminosäuren wurde mit hellgrauer Hinterlegung kenntlich gemacht. Positionen mit Aminosäuren ohne jegliche Übereinstimmung sind nicht hinterlegt. Die bei der MALDI-TOF-Analyse erhaltenen Peptidfragmente für die *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *B. subtilis* 168 sind zusätzlich unterstrichen (Kap. 4.3).

## 4.5 Subklonierung der *pNB-Est17* und *pNB-Est19*, Klonierung der *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus genomischer DNA von *B. licheniformis* DSM13 (*pNB-Est13*), Überexpression und Reinigung

### 4.5.1 Spezifische Amplifizierung der *pNB*-Esterase-Gene mittels PCR

Anhand der Daten, die aus der Sequenzierung der Fragmente aktiver Genombankklone gewonnen werden konnten, wurden die codierenden Bereiche der *para*-Nitrobenzyl-Esterasen mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Primer sollten neben der spezifischen Amplifizierung der Esterase-Gene während der PCR-Reaktion singuläre Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *SapI* in das 5'- bzw. 3'-Ende der Gensequenz einfügen. Die amplifizierten, 1494 bp langen *blunt-end* Sequenzen wurden anschließend in den TOPO-Vektor ligiert. Nach einer Transformation der Plasmide in TOP10-Zellen, deren Kultivierung und erneuter Plasmidpräparation wurde eine im Gen befindliche *NdeI*-Schnittstelle (bei jeweils 1066-1072 bp) durch eine „stille“ Mutation mittels *missmatch*-Primer (*pNBMMfwd*, *pNBMMrev*) inaktiviert. Die erhaltenen, veränderten Plasmide wurden erneut transformiert und durch Restriktionsanalyse mit *NdeI* auf die Mutation untersucht. Die als positiv bewerteten Plasmide wurden mit *NdeI* und *SapI* verdaut. Die Fragmente der Esterase-Gene wurden nach Agarosegelelektrophorese aus dem Gel excisiert, gereinigt und in den mit *NdeI* und *SapI* restringierten und dephosphorilierten pTYB1-Vektor ligiert. Anschließend wurden die Plasmide in *E. coli* B ER2566 transformiert.

Der kodierende Bereich der *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *Bacillus licheniformis* DSM13 wurde aus der genomischen DNA amplifiziert. Als Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen wurden *NdeI* und *SapI* bzw. *XhoI* eingefügt. Die amplifizierte Sequenz wurde anschließend in den pTYB1-Vektor (*NdeI*, *SapI*) und in den pET26b(+)-Vektor (*NdeI*, *XhoI*) kloniert und in *E. coli* B ER2566 transformiert (Abb. 4.7).



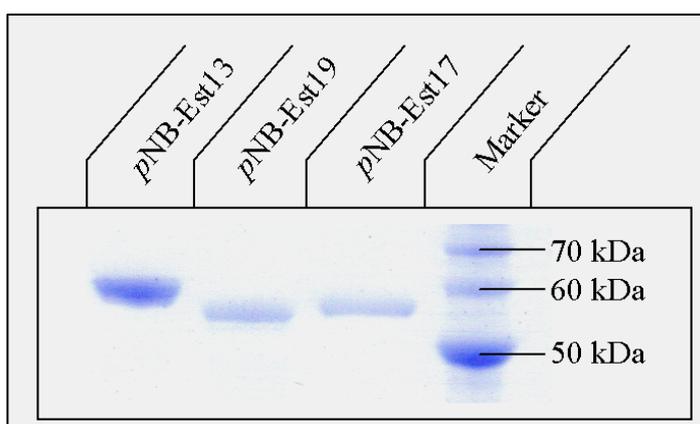
**Abb. 4.7: Schematische Darstellung zur Klonierung der *para*-Nitrobenzyl-Esterasen.** Da die letzte Aminosäure der *pNB-Est13* ein Isoleucin ist und diese Aminosäure nach Angaben des Herstellers die Ausbeute beim Protein-*splicing* durch DTT vermindert, wurde für die chromatographische Reinigung ein Poly-Histidin-Fusionsprotein hergestellt.

Um zufällig auftretende Mutationen auszuschließen und die Richtigkeit der Klonierungsarbeiten zu verifizieren, wurden alle *para*-Nitrobenzyl-Esterasen nach der Klonierung komplett sequenziert und überprüft.

#### 4.5.2 Heterologe Überexpression der *pNB*-Esterasen in *E. coli* und deren Reinigung mittels Affinitätschromatographie

Die drei *para*-Nitrobenzyl-Esterasen wurden mit den in Kapitel 4.5.1 beschriebenen Konstrukten heterolog in *E. coli* B ER2566 - Zellen exprimiert. Nach der unter Kapitel 3.4 beschriebenen Kultivierung in einem Kleinlaborfermenter (16 L), die zu einer intrazellulären Akkumulation des Zielproteins führte, wurden die Zellen aufgeschlossen und die Zielenzyme mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Für die Reinigung von C-terminalen Intein-Fusionsproteinen wurde als Affinitätsmatrix Chitin-Agarose verwendet. Von dieser Matrix wurde das Zielprotein über einen Intein- und DTT-vermittelten *splicing*-Mechanismus eluiert. Diese Aufreinigung erlaubte die Herstellung von 116,61 mg *pNB*-Est17 bzw. 111,96 mg *pNB*-Est19 mit einer jeweiligen apparenten Reinheit von größer 95%. Zur Reinigung von C-terminalen Poly-Histidin-Fusionsproteinen wurde eine Nickel-Affinitätschromatographie verwendet, bei der die Zielenzyme durch erhöhte Konzentration von Imidazol von der Säule eluierten. Dadurch konnte eine Proteinmenge von 696,18 mg *pNB*-Est13 mit einer apparenten Reinheit von größer 95% erzielt werden. Die so präparierten Esterasen zeigten eine hohe Aktivität gegenüber einem typischen Esterase-Substrat (*para*-Nitrophenyl-Acetat, s.u.) und eigneten sich ohne Einschränkungen für eine weitere enzymologische Charakterisierung.

Der Vergleich der Molekulargewichte der *para*-Nitrobenzyl-Esterasen im Rahmen einer SDS-PAGE-Analyse ergab eine gute Übereinstimmung mit den aus den Gensequenzen abgeleiteten theoretischen Molekulargewichten (Abb. 4.8). Die Daten der Überexpression und Reinigung sind in der Tabelle 4.5 zusammengefasst.

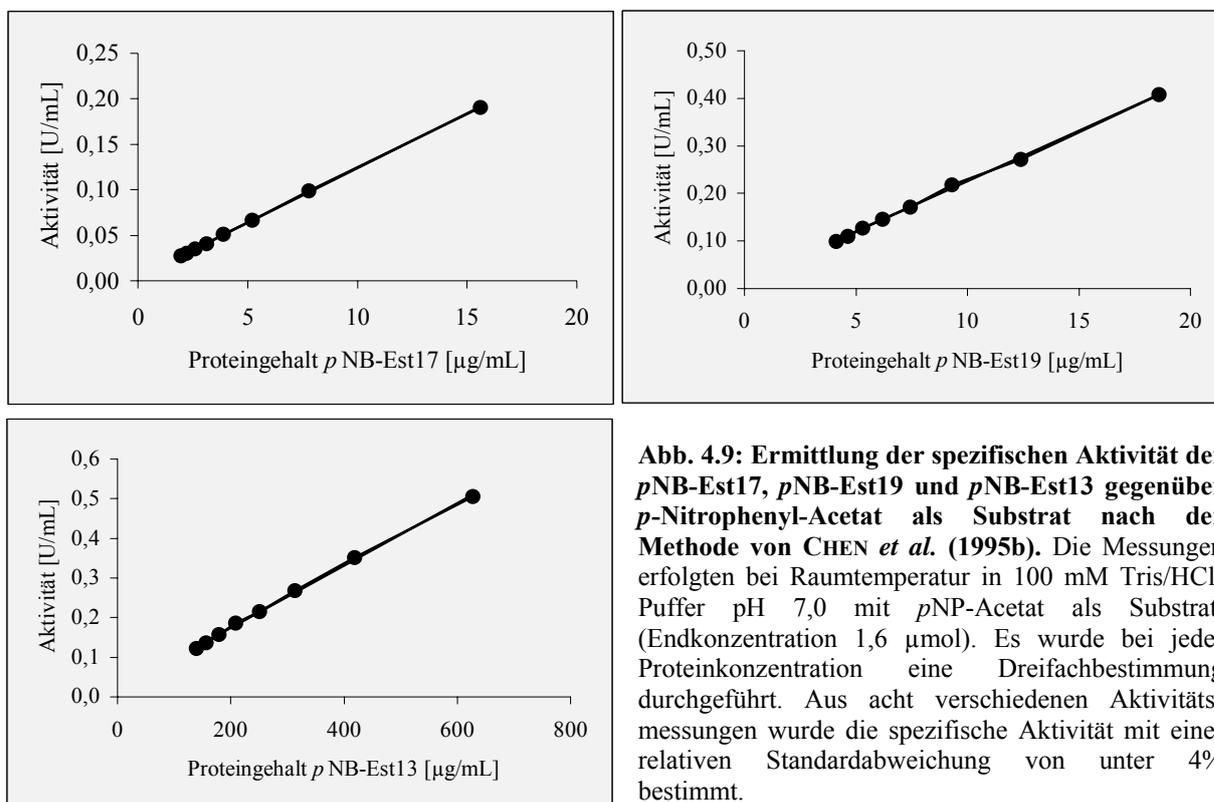


**Abb. 4.8: SDS-PAGE-Analyse der untersuchten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen.** Für die Esterasen *pNB*-Est17 (theoretisches MW: 54064,13 Da) und *pNB*-Est19 (theoretisches MW: 53813,90 Da) wurden 3  $\mu$ g aufgetragen, für *pNB*-Est13 (theoretisches MW: 54396,66 Da; plus 6His-Tag 55219,50 Da) wurden 8  $\mu$ g aufgetragen und für 45 Minuten bei 200V elektrophiert. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie gefärbt. Als Marker wurde BENCHMARK™ PROTEIN LADDER verwendet.

**Tab. 4.5: Reinigung der heterolog in *E. coli* B ER2566 exprimierten *pNB*-Esterasen durch Chitin-Agarose bzw. Ni-NTA Affinitätschromatographie.** Die spezifische Aktivität wurde nach CHEN *et al.* (1995b) mit *para*-Nitrophenyl-Acetat als Substrat bestimmt und auf die Proteinmenge an Reinezym bezogen; die SDS-PAGE wurde nach einer Coomassie-Färbung einer Silberfärbung unterzogen; die Überprüfung der Reinheit erfolgte anschließend visuell.

Nach Affinitätschromatographie	Proteinmenge [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Reinheitsüberprüfung durch SDS-PAGE
Chitin-Agarose <i>pNB</i> -Est17	116,61	55,98	> 95%
Chitin-Agarose <i>pNB</i> -Est19	111,96	99,17	> 95%
Ni-NTA <i>pNB</i> -Est13	696,18	3,68	> 95%

Die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der drei *para*-Nitrobenzyl-Esterasen erfolgte nach der Methode von CHEN *et al.* (1995b). Zu diesem Zweck wurden acht unterschiedliche Konzentrationen an Reinezym mit *para*-Nitrophenyl-Acetat als Substrat eingesetzt und bei Raumtemperatur vermessen (Abb. 4.9). Die Bestimmung der Extinktionszunahme bei 405 nm und die Verwendung des Molareren Extinktionskoeffizienten von 11680 [M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>] diene als Grundlage für die Berechnung der enzymatischen Aktivität. Nach den zugrunde liegenden Daten besitzt *pNB*-Est19 mit 99,17 U/mg die von den untersuchten Esterasen höchste spezifische Aktivität gegenüber *para*-Nitrophenyl-Acetat. Die *pNB*-Est17 zeigt eine spezifische Aktivität von 55,98 U/mg und die *pNB*-Est13 eine von 3,68 U/mg (Abb. 4.9).



**Abb. 4.9: Ermittlung der spezifischen Aktivität der *pNB*-Est17, *pNB*-Est19 und *pNB*-Est13 gegenüber *p*-Nitrophenyl-Acetat als Substrat nach der Methode von CHEN *et al.* (1995b).** Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur in 100 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,0 mit *pNP*-Acetat als Substrat. (Endkonzentration 1,6 µmol). Es wurde bei jeder Proteinkonzentration eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Aus acht verschiedenen Aktivitätsmessungen wurde die spezifische Aktivität mit einer relativen Standardabweichung von unter 4% bestimmt.

#### 4.6 Analytischer Nachweis der Hydrolyseprodukte von verschiedenen Dialkylphthalaten nach Inkubation mit den *para*-Nitrobenzyl-Esterasen *p*NB-Est17, *p*NB-Est19 und *p*NB-Est13

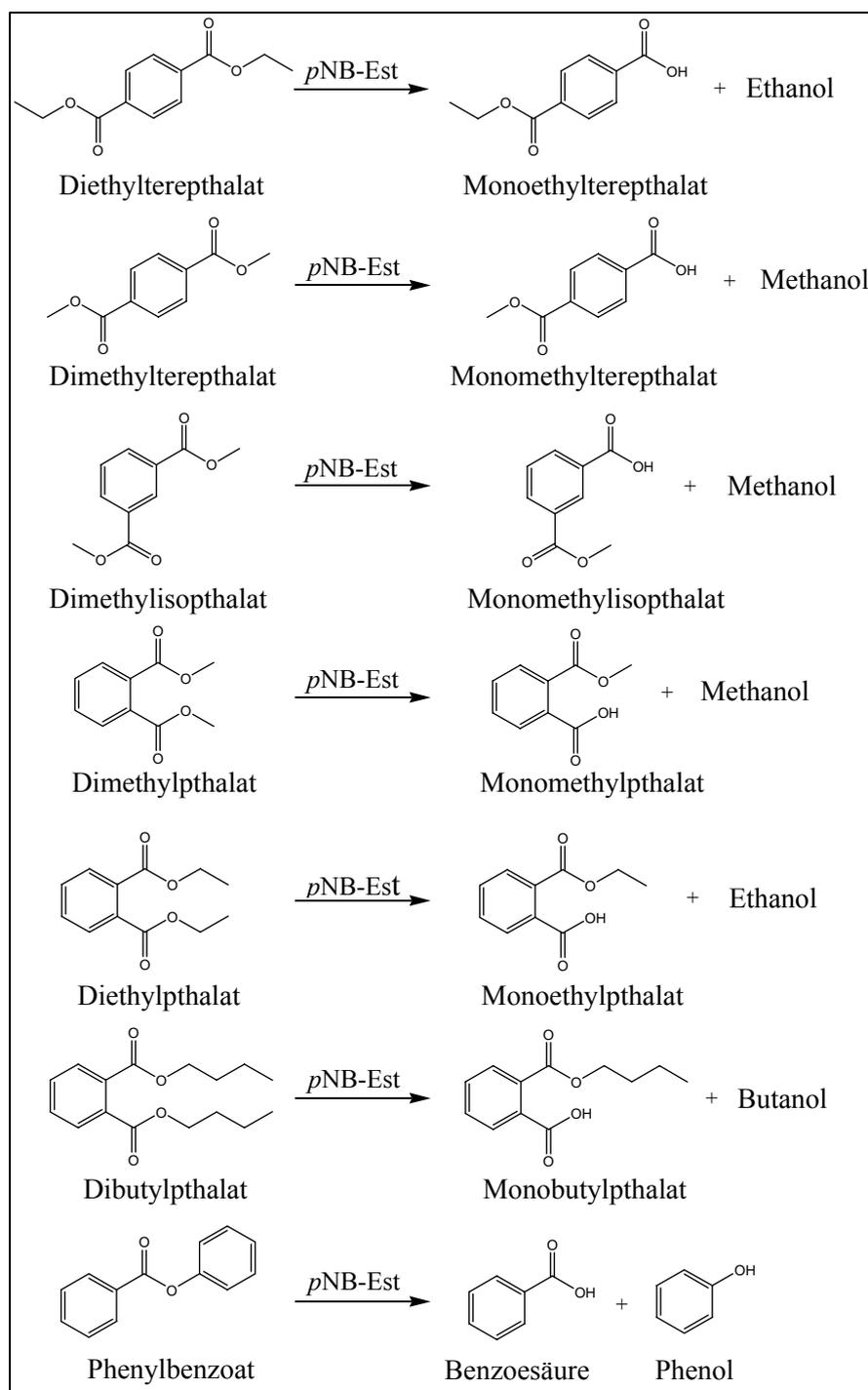
Die esterolytische Aktivität der untersuchten *p*NB-Esterasen gegenüber unterschiedlichen Dialkylphthalaten wurde durch den Nachweis der Reaktionsprodukte verifiziert. Der Nachweis erfolgte sowohl über Dünnschichtchromatographie als auch durch gekoppelte Gaschromatographie / Massenspektroskopie (GC/MS). Die durch Dünnschichtchromatographie ermittelten  $R_F$ -Werte der Edukte und Produkte sind in der Tabelle 4.6 aufgeführt. Die Detektion eines bzw. zweier neuer *spots* deutete bereits auf eine Hydrolyse hin. Die jeweils parallel durchgeführten Blindproben wiesen keine zusätzlichen *spots* auf. Als Referenz dienten Reaktionsansätze mit dem jeweiligen Substrat unter Einsatz der Schweineleber-Esterase (PLE). Die Hydrolyseprodukte nach der Inkubation mit den Dialkylphthalaten mit PLE konnten mittels GC/MS identifiziert werden (ohne Abbildung).

**Tab. 4.6: Charakteristische Lauflängen ( $R_F$ -Werte) der Edukte und Produkte ermittelt durch dünnschichtchromatographische Analysen der Reaktionsansätze mit *p*NB-Esterasen.** Als Laufmittel in vorgesättigter DC-Kammer wurde 90% Dichlormethan / 10% Methanol verwendet; die Trennung der Substanzen erfolgte auf mit Silica-Gel 60 F<sub>254</sub> beschichteten Folien; die Detektion der einzelnen Spots wurde unter UV-Licht vorgenommen; die Substratkonzentration im Ansatz betrug 6,67 mM, die Inkubationsdauer lag bei 2 h, Raumtemperatur. Die  $R_F$ -Werte wurde für alle drei untersuchten *p*NB-Esterasen ermittelt.

Substrat	$R_F$ -Wert Substrat	$R_F$ -Wert Produkt 1	$R_F$ -Wert Produkt 2
Dimethylterephthalat	0,78	0,18	-
Diethylterephthalat	0,75	0,21	-
Dimethylisophthalat	0,78	0,23	-
Dimethylphthalat	0,70	0,07	-
Diethylphthalat	0,73	0,13	-
Dibutylphthalat	0,74	0,13	-
Phenylbenzoat	0,76	0,45	0,25

Nach der GC/MS-Analyse der Reaktionsansätze erfolgte die Zuordnung der Massenpeaks der Spaltprodukte durch Vergleich mit der WILEY-Datenbank und bestätigte die Hydrolyse, die schon in den dünnschichtchromatographischen Analysen beobachtet wurde. In der Abbildung 4.10 sind alle beobachteten Reaktionen schematisch dargestellt. Für jede enzymatische Reaktion wurden Blindproben vermessen, die aus Reaktionsansatz ohne Enzym bzw. Reaktionsansatz ohne Substrat bestanden. Es zeigte sich, dass bei allen untersuchten Phthalaten und Terephthalaten nur eine von zwei möglichen funktionellen Estergruppen hydrolysiert wird. Die freie Phthalsäure bzw. Terephthalsäure oder Isophthalsäure wurde in

keinem Reaktionsansatz detektiert. Das jeweilige Reaktionsprodukt ist der Monoester der Ausgangsverbindung sowie der jeweilige Alkohol. Als Substrat, welches nicht zu den Phthalaten gehört, wurde die Hydrolyse von Phenylbenzoat untersucht. Als Hydrolyseprodukte wurden Phenol und Benzoesäure detektiert.



**Abb. 4.10:** Schematische Darstellung der durch die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen katalysierten Reaktionen von Dimethylphthalat, Diethylphthalat, Dimethylphthalat, Diethylphthalat, Dibutylphthalat, Dimethylisophthalat und Phenylbenzoat. Bei allen drei untersuchten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen (*pNB-Est*17, *pNB-Est*19 und *pNB-Est*13) konnte der jeweils korrespondierende Monoester der Ausgangsverbindung als Hydrolyseprodukt nachgewiesen werden. Bei Phenylbenzoat konnte jeweils Benzoesäure und Phenol als Reaktionsprodukt identifiziert werden.

Die *para*-Nitrobenzyl-Esterasen *pNB-Est17*, *pNB-Est19* und *pNB-Est13* wurden in Expressions-Vektoren kloniert, heterolog in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie zur biochemischen Homogenität gereinigt. Nach Inkubation der gereinigten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen mit Dialkylphthalaten bzw. Dialkylterephthalaten konnte der jeweils korrespondierende Monoester der Ausgangsverbindung als Hydrolyseprodukt mittels GC/MS identifiziert werden.

#### 4.7 Biochemische Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen

Die biochemische Charakterisierung von Enzymen liefert detaillierte Aussagen über die jeweiligen katalytischen Eigenschaften und die funktionelle Stabilität des untersuchten Enzymproteins. Die bei definierten Bedingungen für jedes Enzym charakteristischen Größen wie Temperaturoptimum und -stabilität, sowie pH-Optimum und -stabilität als auch die pH-abhängige Temperaturstabilität sind im Folgenden für die *pNB-Est13* ausführlich dargelegt. Die ermittelten Substratspezifitäten gegenüber Substraten mit unterschiedlichen Kettenlängen sowie die Wirkung von Detergenzien und Metallsalzen liefern wichtige Informationen bezüglich der enzymatischen Funktionalität und der potentiellen technischen Nutzung.

##### 4.7.1 Einfluss unterschiedlicher Puffersysteme auf die enzymatische Aktivität

Die Quantifizierung des Einflusses unterschiedlicher Puffersubstanzen auf die enzymatische Aktivität ist bei vergleichender Betrachtung unterschiedlichster Enzyme im Bezug auf die spezifische Aktivität von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wurden die in Tabelle 4.7 aufgeführten Puffersubstanzen zusammen mit den untersuchten Esterasen und *para*-Nitrophenyl-Acetat als Substrat vermessen. Das ermittelte Aktivitätsmaximum wurde auf 100% normiert. Insgesamt wurden sechs Dreifachbestimmungen pro Puffer durchgeführt mit einer relativen Standardabweichung von unter 5%.

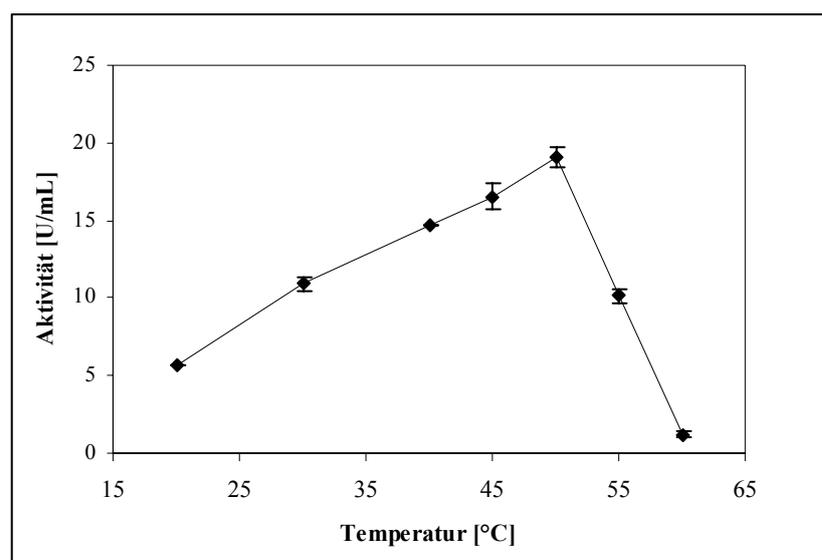
**Tab. 4.7: Einfluss unterschiedlicher Puffer auf die enzymatische Aktivität der *pNB-Est13*, *pNB-Est17* und *pNB-Est19*.** Tris-HCl (RIEDEL-DE HAËN; Seelze); Natrium-Phosphat (J.T. BAKER CHEMICALS; Deventer, Holland); EPPS (ACROS ORGANICS; Geel, Belgien); HEPES (MP BIOMEDICAL; Illkirch, Frankreich).

Verwendeter Puffer (50 mM; pH 8,0)	<i>pNB-Est13</i> rel. Aktivität [%]	<i>pNB-Est17</i> rel. Aktivität [%]	<i>pNB-Est19</i> rel. Aktivität [%]
Tris-HCl	100	98	100
Natrium-Phosphat	96	99	93
EPPS	93	100	98
HEPES	93	93	100

Unter Berücksichtigung der Standardabweichung konnten geringe Aktivitätsverluste mit Natrium-Phosphat als Puffer für die *p*NB-Est19 und für *p*NB-Est17 bei der Verwendung des HEPES-Puffers detektiert werden. *p*NB-Est13 zeigte einen Aktivitätsverlust von 7% bei EPPS- bzw. HEPES-Puffer. Aufgrund dieser Daten wird im Folgenden - wenn nicht anders beschrieben - Tris-HCl als Puffer verwendet.

#### 4.7.2 Temperatur-Optimum der *p*NB-Est13

Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur führt einerseits zu einer Erhöhung der enzymatischen Aktivität, die im einfachsten Fall der ARRHENIUS-Gleichung folgt. Andererseits führen Temperaturerhöhungen auch zu einer thermischen Denaturierung und damit zu einer Inaktivierung der Enzyme. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur ergibt sich aus der Überlagerung des Anstiegs der Reaktionsgeschwindigkeit gemäß der ARRHENIUS-Gleichung und dem Absinken der Aktivität infolge thermischer Denaturierung. Zur Bestimmung des Temperatur-Optimums der *p*NB-Est13 wurden kinetische Messungen mit *para*-Nitrophenyl-Acetat als Substrat bei Temperaturen von 20 bis 60°C durchgeführt (Abb. 4.11). Der Reaktionspuffer wurde bei jeder Messtemperatur hinsichtlich des pH-Wertes überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Die Enzyme wurden bei der jeweiligen Messtemperatur für exakt 5 Minuten vorinkubiert und die Reaktion durch Zusatz des Substrates gestartet.

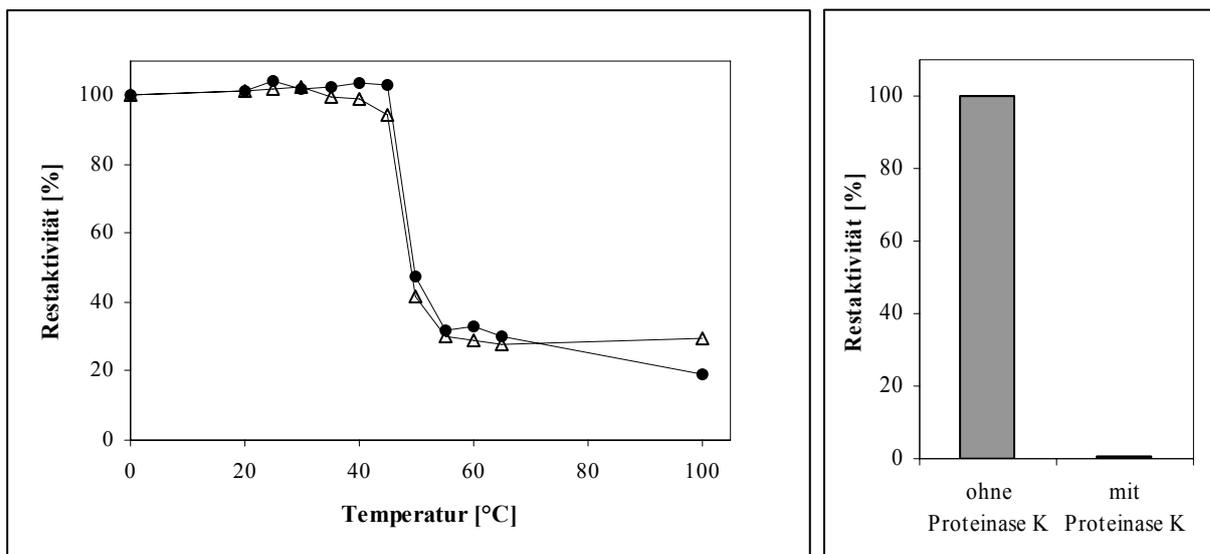


**Abb. 4.11:** Temperaturverlaufskurve der enzymatischen Reaktion von *p*NB-Est13 und *p*NP-Acetat. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Messreihen (jeweils Dreifachbestimmung) in 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) mit einer relativen Standardabweichung von unter 5%.

Die bei unterschiedlichen Temperaturen ermittelte enzymatische Aktivität war bei 50°C maximal (19,09 U/mL). Bei Reaktionstemperaturen von 20 bis 45°C stieg die Aktivität von 5,6 U/mL auf 16,55 U/mL. Die Inkubation von *p*NB-Est13 bei einer Temperatur von 55°C führte zu einem Aktivitätsverlust von ca. 50% (10,13 U/mL) bzw. bei 60°C von ca. 95% (1,12 U/mL) verglichen mit der enzymatischen Aktivität bei 50°C.

#### 4.7.3 Temperaturstabilität der *p*NB-Est13

Neben der Temperatur selbst spielt auch die Dauer deren Einwirkung eine wesentliche Rolle bei der thermischen Inaktivierung von Enzymen. Die Temperaturstabilität der *p*NB-Est13 wurde ermittelt, indem jeweils ein Volumen von 150 µL (gereinigtes Enzym in 20 mM EPPS-Puffer, pH 7,8) für 15 bzw. 30 Minuten bei Temperaturen von 0 bis 100°C inkubiert wurden (Abb. 4.12). Die Enzymproben wurden vor der Messung der enzymatischen Aktivität mit *para*-Nitrophenyl-Acetat als Substrat für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Reaktionen wurden bei Raumtemperatur in 50 mM Tris/HCl-Puffer durchgeführt.



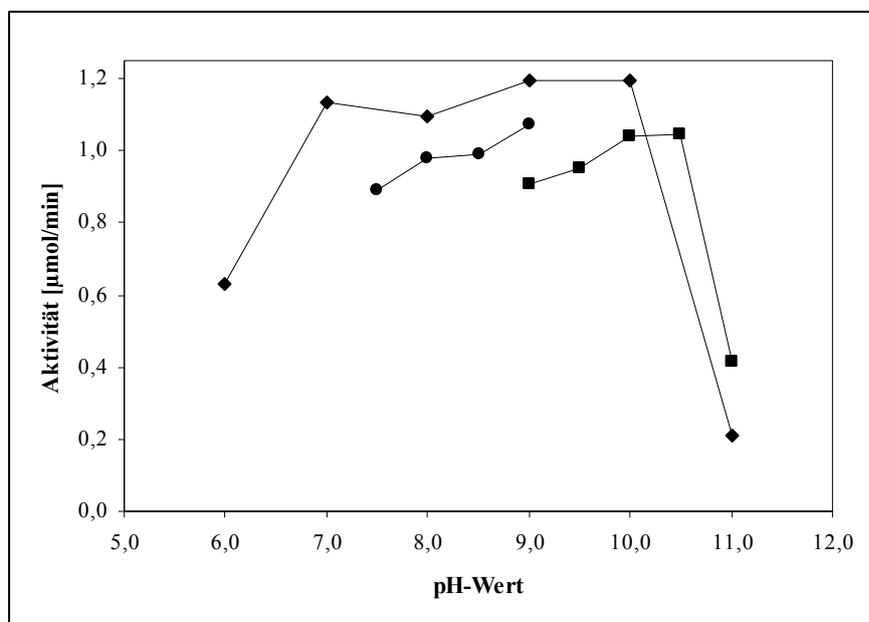
**Abb. 4.12: Darstellung der Temperaturstabilität der *p*NB-Est13 bei unterschiedlichen Inkubationszeiten.**  $\Delta$  - 15 Minuten;  $\bullet$  - 30 Minuten (links). Die Messungen wurden bei Raumtemperatur in 50 mM Tris/HCl-Puffer mit *p*NP-Acetat als Substrat durchgeführt; die dargestellten Werte sind Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Messreihen (jeweils Dreifachbestimmung) mit einer relativen Standardabweichung von unter 5%; rechts: Einwirkung von Proteinase K auf *p*NB-Est13 nach einer Inkubation für 1 Stunde auf Eis (Einsatz: 2 mg Proteinase K pro Ansatz).

Obwohl die Dauer der Inkubation variiert wurde, wies der Temperaturstabilitätsverlauf nur bei einer Inkubationstemperatur von 100°C einen deutlichen Unterschied auf (Abb 4.12 links). Bei beiden Inkubationstemperaturen war die *p*NB-Est13 bis 45°C temperaturstabil. Deutliche Aktivitätsverluste traten erst bei einer Temperatur von 50°C auf (jeweils ca. 50%

Aktivitätsverlust). Von einer Inkubationstemperatur von 55 bis 100°C wurde eine jeweilige Restaktivität von ca. 25 bis 30% gemessen. Bei 30 Minuten und 100°C wurden jeweils noch 20% Restaktivität detektiert. Demnach konnte *p*NB-Est13 bis 100°C nicht vollständig inaktiviert werden. Eine vollständige Inaktivierung der *p*NB-Est13 konnte mit einer Inkubation mit Proteinase K (2 mg pro Reaktionsansatz in 50 mM Tris/HCl, pH 8) auf Eis für 60 Minuten erzielt werden (Abb. 4.12 rechts). Eine Autohydrolyse des Substrates konnte durch diese Experimente mit proteolytisch inaktivierten Enzym ausgeschlossen werden.

#### 4.7.4 pH-Optimum der *p*NB-Est13

Die Abhängigkeit enzymatischer Reaktionen vom pH-Wert basiert auf unterschiedlichen Ladungszuständen ionisierbarer Aminosäureseitenketten, die sowohl die enzymatische Aktivität als auch die Substratbindung beeinflussen können. Zur Bestimmung des pH-Optimum der *p*NB-Est13 wurden die enzymatischen Aktivitäten titrimetrisch mit Dibutylphthalat (EK = 10 mM) bei unterschiedlichen pH-Werten zwischen 6 und 11 ermittelt. Hierfür wurde einerseits der über den pH-Bereich von 2 bis 12 einsetzbare DAVIES-Puffer verwendet, andererseits wurden die pH-Bereiche von 7,5 bis 9 mit Tris/HCl-Puffer bzw. 9 bis 11 mit Glycin-Puffer vermessen.

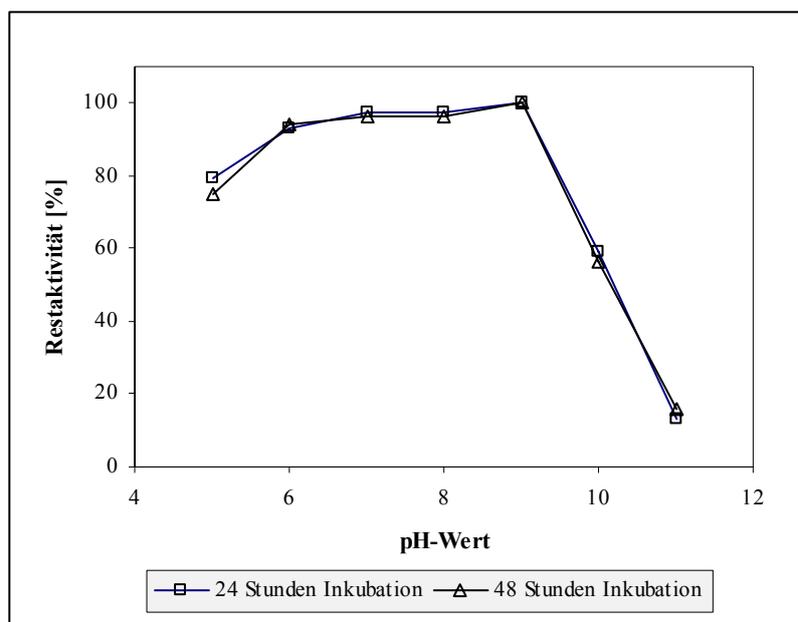


**Abb. 4.13: Darstellung der pH-Optimum-Kurve der *p*NB-Est13.** Erhalten wurden die Daten durch titrimetrische Messungen in einem Reaktionsvolumen von 2 mL mit Dibutylphthalat (DBP) als Substrat (EK = 10 mM). Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt;  $\blacklozenge$  = 2 mM DAVIES-Puffer,  $\bullet$  = 2 mM Tris/HCl oder  $\blacksquare$  = 2 mM Glycin-Puffer; die dargestellten Werte sind Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Messungen mit einer relativen Standardabweichung von unter 5%.

Wie in Abbildung 4.13 zu erkennen, zeigt *p*NB-Est13 ein Stabilitätsplateau zwischen pH 7 und pH 10 deutlich (DAVIES-Puffer). Der Vergleich unterschiedlicher Puffer zeigt, dass das Plateau bis pH-Wert 10,5 (Glycin-Puffer) anhält. Bei pH-Werten von 6 bzw. 11 konnten nur vergleichsweise geringe Aktivitäten gemessen werden.

#### 4.7.5 pH-Stabilität der *p*NB-Est13

Zur Bestimmung der pH-Stabilität wurde die *p*NB-Est13 in DAVIES-Puffer unterschiedlicher pH-Werte umgepuffert und für 24 bzw. 48 Stunden auf Eis inkubiert. Die Aktivitätsmessungen wurden anschließend bei Raumtemperatur unter Verwendung von *para*-Nitrophenyl-Acetat als Substrat durchgeführt. Die Messungen wurden in 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8) durchgeführt. Um eine temperaturbedingte Abnahme der enzymatischen Aktivität auszuschließen wurde der bei allen Messungen ermittelte Maximalwert gleich 100% gesetzt. Nach Auswertung der biochemischen Daten konnte die höchste pH-Stabilität bei den pH-Werten von 6 bis 9 verzeichnet werden. Bei einem pH-Werte von 5 wurde ca. 80% Restaktivität gemessen, was neben der Stabilitätsverluste auch auf präzipitiertes Enzym zurückzuführen ist. Bei einem pH-Wert von 10 bzw. 11 sinkt die enzymatische Aktivität auf ca. 60% bzw. 10% unabhängig von der Dauer der Inkubation (Abb. 4.14).

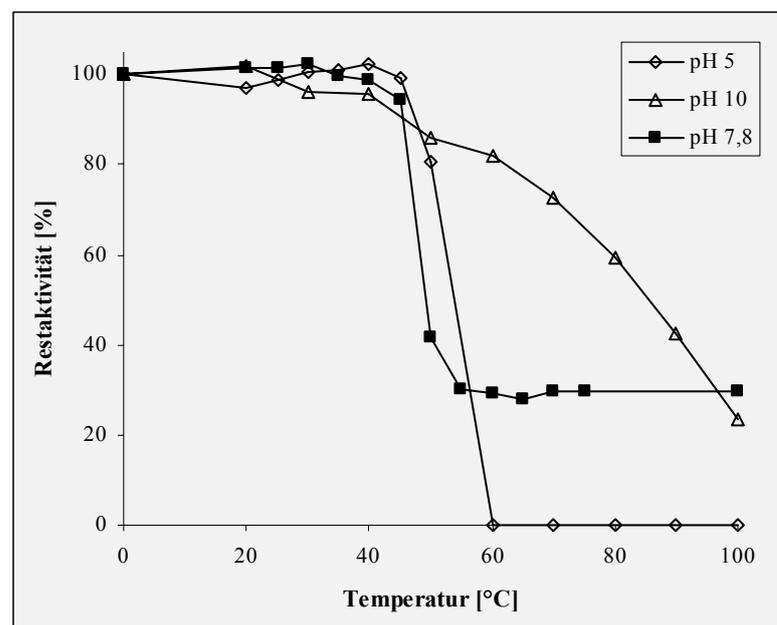


**Abb. 4.14: Darstellung der pH-Stabilität der *p*NB-Est13.** Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt mit *para*-Nitrophenyl-Acetat als Substrat; die dargestellten Werte sind Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen mit einer relativen Standardabweichung von unter 5%.

#### 4.7.6 pH-abhängige Temperaturstabilität der *p*NB-Est13

Die pH-abhängige Temperaturstabilität wurde bestimmt, indem die Esterase *p*NB-Est13 in Citrat-Puffer (50 mM; pH 5,0) und Glycin-Puffer (50 mM; pH 10) umgepuffert und für mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert wurde. Anschließend wurden je 150  $\mu$ L der Probe für 15 Minuten bei entsprechender Temperatur inkubiert. Die enzymatische Aktivität wurde spektrophotometrisch mit *para*-Nitrophenyl-Acetat als Substrat gemessen. Als Reaktionspuffer diente HEPES-Puffer (50 mM; pH 8,0).

Bei einem pH-Wert von 5 und einer Inkubationstemperatur von 50°C präzipitierte die *p*NB-Est13 teilweise. Daher wurden die inkubierten Ansätze für 2 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert und der Überstand vermessen. Ab 60°C konnte keine Aktivität mehr detektiert werden. Bei pH 10 zeigte das Enzym ein insgesamt thermostabileres Verhalten. Es erfolgte zwar eine Abnahme der gemessenen Aktivität über die Zunahme der Inkubationstemperatur, jedoch verläuft die Kurve im Vergleich zu der bei pH 7,8 wesentlich flacher. Die nach Inkubation bei 100°C gemessene Restaktivität entspricht mit leichter Abweichung die der Temperaturstabilitätskurve bei pH 7,8 (Abb. 4.15).



**Abb. 4.15:** Darstellung der pH-abhängigen Temperaturstabilität der *p*NB-Est13; aufgenommen durch photometrische Messungen mit *para*-Nitrophenyl-Acetat als Substrat. *p*NB-Est13 wurde vor dem Versuch in den jeweiligen pH-Wert umgepuffert und 60 Minuten auf Eis inkubiert. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt; die dargestellten Werte sind Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen mit einer relativen Standardabweichung von unter 5%.

**Für die *p*NB-Est13 wurde sowohl das Temperatur- und pH-Optimum für die enzymatische Aktivität als auch die pH- und Temperaturstabilität einschließlich der pH-abhängigen Temperaturstabilität bestimmt.**

#### 4.7.7 Biochemische Charakterisierung der *para*-Nitrobenzyl-Esterasen gegenüber unterschiedlichen Phthalaten und Terephthalaten

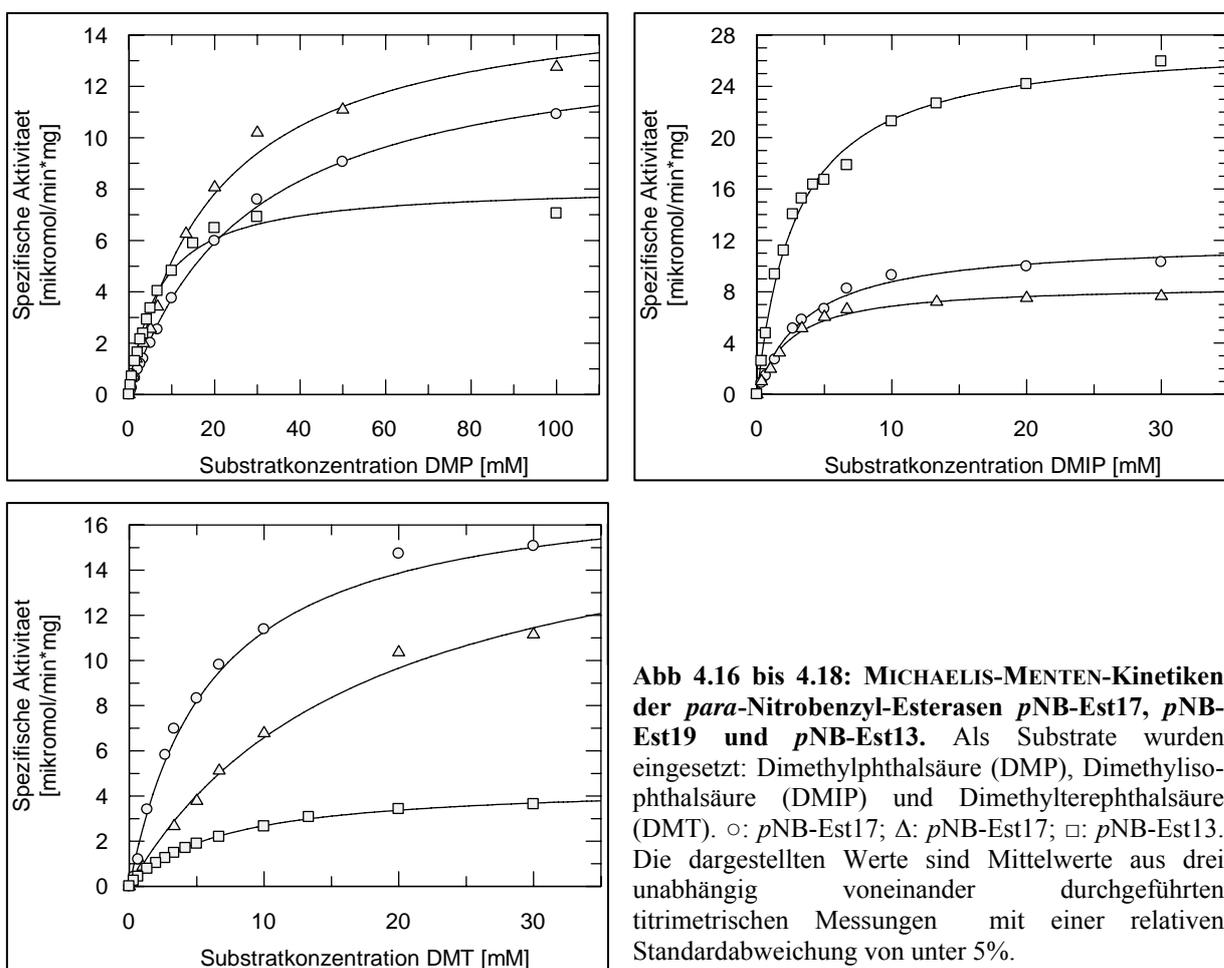
Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten  $k_M$ ,  $v_{max}$ ,  $k_{cat}$  und  $k_{cat}/k_M$  der drei *para*-Nitrobenzyl-Esterasen *pNB-Est17*, *pNB-Est19* und *pNB-Est13* gegenüber verschiedenen Phthalaten und Terephthalaten wurden titrimetrische Aktivitäts-Messungen durchgeführt (Kap. 3.18.2). Bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen wurden die jeweiligen Enzymaktivitäten bestimmt und die kinetischen Konstanten durch Anpassung an die Funktion für eine enzymatisch katalysierte Reaktion nach MICHAELIS-MENTEN ermittelt. Die ermittelten  $k_M$ - sowie  $v_{max}$ -Werte und die eingesetzten Enzymkonzentrationen wurden für die Berechnung der kinetischen Konstante ( $k_{cat}$  bzw.  $k_2$ ) und der katalytischen Effizienz ( $k_{cat}/k_M$ ) herangezogen. Dabei ist die kinetische Konstante  $k_{cat}$  - auch Wechselzahl bzw. *turnover number* genannt - ein Maß der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ausgedrückt als Anzahl der umgesetzten Moleküle pro Sekunde bei Substratsättigung. Die katalytische Effizienz ergibt sich aus dem Quotienten von  $k_{cat}$  und der Affinität des Substrates zum katalytischen Zentrum ( $k_M$ ). Die durchgeführten Berechnungen basieren auf der Annahme, dass die eingesetzte Enzymkonzentration der Konzentration an Aktiv-Enzym entspricht.

##### 4.7.7.1 *pNB-Est17*, *pNB-Est19* und *pNB-Est13* zeigen divergierende Substratspezifitäten bei Dimethylphthalsäureestern unterschiedlicher Orientierung der Seitenketten

Die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Konzentration an Dimethylphthalsäureestern mit unterschiedlicher Orientierung der Seitenketten ist in der Abbildungen 4.16, 4.17 und 4.18 als MICHALIS-MENTEN-Plot dargestellt. Beim direkten Vergleich der einzelnen Esterasen mit der Orientierung der Seitenketten zeigt *pNB-Est17* die höchste spezifische Aktivität von 18,52 U/mg gegenüber der *para*-Orientierung. Die spezifische Aktivität bei der *ortho*- und *meta*-Orientierung liegt bei 14,09 U/mg bzw. 11,99 U/mg. Die *pNB-Est19* zeigt gegenüber der *ortho*- und *para*-Orientierung nur eine gering voneinander abweichende spezifische Aktivität von 15,76 U/mg bzw. 15,69 U/mg. Wie bei *pNB-Est17* wurde die geringste spezifische Aktivität bei der *meta*-Orientierung detektiert (8,55 U/mg). Demgegenüber zeigt *pNB-Est13* im Vergleich zu *pNB-Est17* und *pNB-Est19* die größte spezifische Aktivität von 27,67 U/mg bei Dimethylisophthalsäure (*meta*-Orientierung), gefolgt von 9,11 U/mg bei der *ortho*- bzw. 4,53 U/mg bei der *para*-Orientierung. Zeigten die untersuchten Esterasen bezüglich der spezifischen Aktivitäten unterschiedliche Präferenzen bei der Orientierung des Substrates, so verhalten sich die Werte

für die Substrataffinitäten bei den drei *para*-Nitrobenzyl-Esterasen ähnlich. Die höchste Affinität des Substrates zum katalytischen Zentrum und damit die geringsten  $k_M$ -Werte wurden bei allen untersuchten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen bei Dimethylisophthalsäure (*meta*-Orientierung) ermittelt (*pNB-Est17*: 3,67 mM; *pNB-Est19*: 2,44 mM; *pNB-Est13*: 2,93 mM). Die Vergleichbarkeit der  $k_M$ -Werte bei diesem Substrat und die stark unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten sollten theoretisch durch die katalytischen Konstanten erklärbar sein. So konnte gezeigt werden, dass der Wert für  $k_{cat}$  für die *pNB-Est13* deutlich größer waren als die der beiden vergleichend betrachteten Enzyme *pNB-Est17* bzw. *pNB-Est19*, was folglich in einer deutlich größeren katalytischen Effizienz resultierte (Tab 4.8).

Für Dimethylterephthalat (*para*-Orientierung) wurde für die *pNB-Est17* bzw. *pNB-Est19* ein  $k_M$ -Wert von 5,99 mM bzw. 13,56 mM ermittelt. *pNB-Est13* zeigte nach Auswertung der kinetischen Daten einen  $k_M$ -Wert von 6,87 mM. Die geringsten Substrataffinitäten wurden mit Dimethylphthalat (*ortho*-Orientierung) als Substrat erhalten. *pNB-Est17* und *pNB-Est19* zeigen im Vergleich zu *pNB-Est13* (8,68 mM) deutlich höhere  $k_M$ -Werte von 27,70 mM bzw. 20,35 mM.



Aufgrund der geringen  $k_M$ -Werte der untersuchten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen gegenüber Dimethylisophthalat als Substrat wurden hier auch die höchsten katalytischen Effizienzen ermittelt (*pNB-Est17*: 10594; *pNB-Est19*: 11327; *pNB-Est13*: 30808 in  $1 / \text{mM} \cdot \text{s}$ ). Eine ähnlich hohe katalytische Effizienz zeigt die Esterase *pNB-Est17* mit Dimethylterephthalat als Substrat. Die aus den kinetischen Messungen mit Dimethylphthalat als Substrat ermittelten Quotienten aus katalytischer Konstante und dem  $k_M$ -Wert zeigen für *pNB-Est17* und *pNB-Est19* die geringsten ermittelten Werte (*pNB-Est17*: 1649; *pNB-Est19*: 2505 in  $1 / \text{mM} \cdot \text{s}$ ). Für *pNB-Est13* wurde die geringste katalytische Effizienz mit Dimethylterephthalat erhalten.

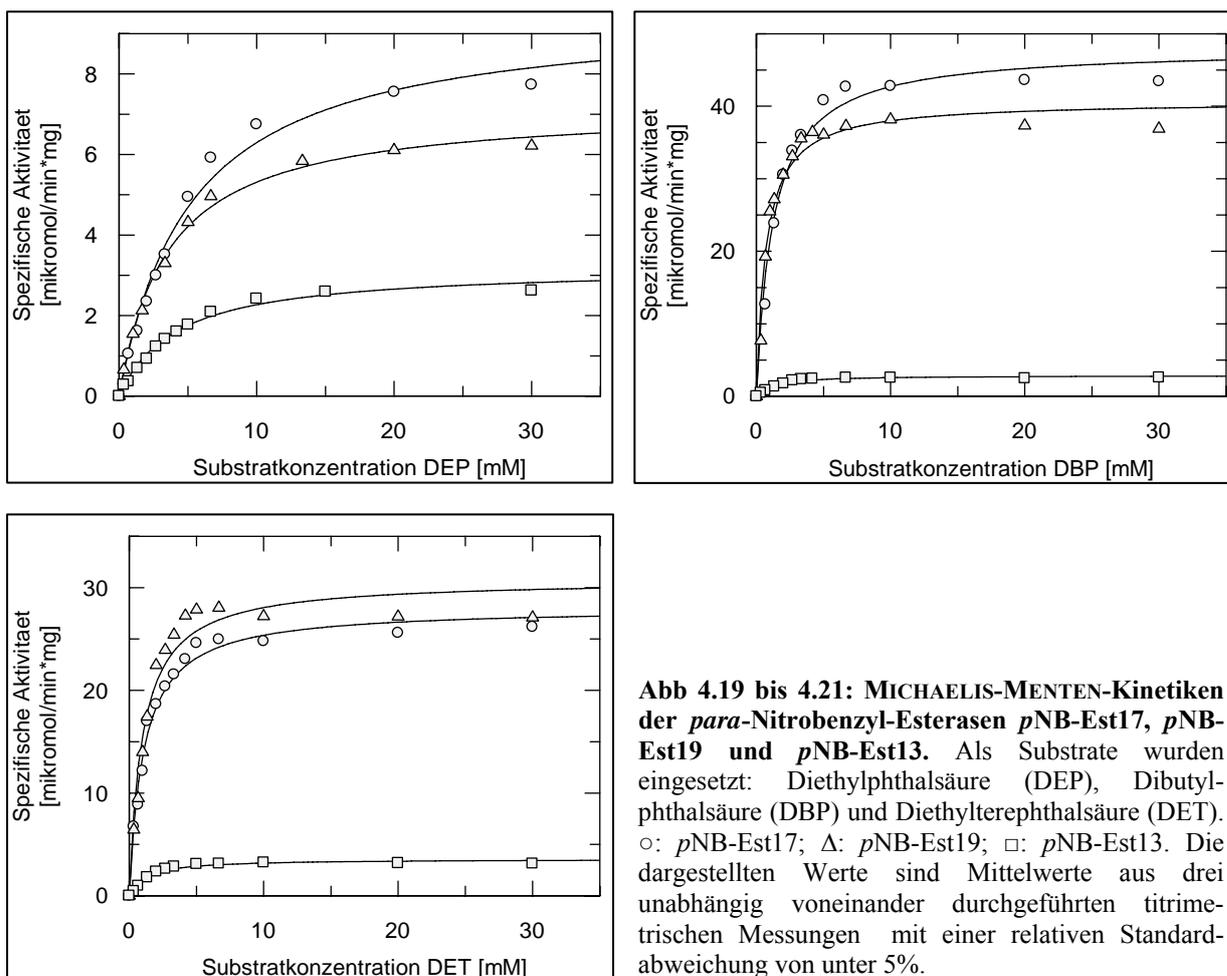
**Tab. 4.8:  $k_M$ - und  $v_{\text{max}}$ -Werte sowie  $k_{\text{cat}}$  und  $k_{\text{cat}}/k_M$  von DMT, DMIP und DMP der *pNB-Est17*, *pNB-Est19* und *pNB-Est13*.** Die Errechnung von  $k_{\text{cat}}$  und  $k_{\text{cat}}/k_M$  wurde aufgrund der Voraussetzung bestimmt, dass die eingesetzte Enzymkonzentration gleich der Konzentration an Aktiv-Enzym ist. DMP = Dimethylphthalsäure (*ortho*); DMIP = Dimethylisophthalsäure (*meta*); DMT = Dimethylterephthalsäure (*para*)

<b>Substrat DMP</b>	<b><i>pNB-Est17</i></b>	<b><i>pNB-Est19</i></b>	<b><i>pNB-Est13</i></b>
$v_{\text{Max}}$ [U/mg]	14,09	15,76	9,11
$k_M$ [mM]	27,70	20,35	8,68
$k_{\text{cat}}$ [1/s]	45672	50970	29735
$k_{\text{cat}}/k_M$ [1/mM*s]	1649	2505	3427
<b>Substrat DMIP</b>	<b><i>pNB-Est17</i></b>	<b><i>pNB-Est19</i></b>	<b><i>pNB-Est13</i></b>
$v_{\text{Max}}$ [U/mg]	11,99	8,55	27,67
$k_M$ [mM]	3,67	2,44	2,93
$k_{\text{cat}}$ [1/s]	38880	27637	90267
$k_{\text{cat}}/k_M$ [1/mM*s]	10594	11327	30808
<b>Substrat DMT</b>	<b><i>pNB-Est17</i></b>	<b><i>pNB-Est19</i></b>	<b><i>pNB-Est13</i></b>
$v_{\text{Max}}$ [U/mg]	18,52	15,69	4,53
$k_M$ [mM]	5,99	13,56	6,87
$k_{\text{cat}}$ [1/s]	60028	50718	14784
$k_{\text{cat}}/k_M$ [1/mM*s]	10021	3741	2152

#### 4.7.7.2 Mit zunehmender Kettenlänge der Phthalsäureester steigt die Affinität des Substrates zum katalytischen Zentrum

Neben der Orientierung der funktionellen Seitenketten wurden die Substratspezifitäten der drei *para*-Nitrobenzyl-Esterasen gegenüber Phthalsäureestern unterschiedlicher Kettenlänge bestimmt. Zu diesem Zweck wurden Diethyl- und Dibutylphthalsäure sowie Diethylterephthalsäure als Substrat bei den titrimetrischen Aktivitätsmessungen eingesetzt (Abb. 4.19 bis 4.21). Die erhaltenen Ergebnisse wurden anschließend mit den in Kapitel 4.7.7.1 dargestellten, verglichen. Bei der Betrachtung der Phthalsäureester zeigen *pNB-Est17* und *pNB-Est19* bei zunehmender Kettenlänge einen sehr ähnlichen Verlauf. So sinkt die

spezifische Aktivität der beiden Esterasen von 14,09 U/mg bzw. 15,76 U/mg bei Dimethylphthalat (auch Kap. 4.6.1) auf 9,57 U/mg bzw. auf 7,20 U/mg bei Diethylphthalat. Für Dibutylphthalat wurden spezifische Aktivitäten von 48,03 U/mg (*p*NB-Est17) und 40,69 U/mg (*p*NB-Est19) ermittelt. Die Esterase *p*NB-Est13 zeigte demgegenüber einen gänzlich anderen Verlauf. Mit zunehmender Kettenlänge des Substrates sank die spezifische Aktivität von 9,11 U/mg für Dimethylphthalat über 3,21 U/mg für Diethylphthalat bis zu 2,87 U/mg bei Dibutylphthalat.



**Abb 4.19 bis 4.21: MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken der *para*-Nitrobenzyl-Esterasen *p*NB-Est17, *p*NB-Est19 und *p*NB-Est13.** Als Substrate wurden eingesetzt: Diethylphthalsäure (DEP), Dibutylphthalsäure (DBP) und Diethylterephthalsäure (DET). ○: *p*NB-Est17; △: *p*NB-Est19; □: *p*NB-Est13. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten titrimetrischen Messungen mit einer relativen Standardabweichung von unter 5%.

Der Vergleich der Terephthalsäureester mit Methyl- bzw. Ethyl-Seitenketten zeigt im Gegensatz zu den analogen Phthalsäureestern eine Zunahme der spezifischen Aktivität von 18,52 U/mg auf 28,06 U/mg (*p*NB-Est17) bzw. 15,69 U/mg auf 30,79 U/mg (*p*NB-Est19) mit Diethylterephthalat als Substrat. Die spezifische Aktivität der *p*NB-Est13 sinkt - genau wie bei den Phthalsäureestern - bei Substraten mit zunehmender Kettenlänge. Gemessen wurden dabei 4,53 U/mg mit Dimethylterephthalat als Substrat und 3,57 U/mg mit Diethylterephthalat. Bei der Betrachtung der  $k_M$ -Werte zeigten *p*NB-Est17, *p*NB-Est19 und *p*NB-Est13 gleiches Verhalten: mit zunehmender Kettenlänge sinken die  $k_M$ -Werte (Tab. 4.9).

Lagen die  $k_M$ -Werte bei Diethylphthalat bei 3,5 bis 5,2 mM, so sanken diese bei der Verwendung von Dibutylphthalat als Substrat auf 0,7 bis 1,2 mM. Diethylterephthalat zeigte im Vergleich zu Diethylphthalat bei den untersuchten Esterasen einen kleineren  $k_M$ -Wert.

**Tab. 4.9:**  $k_M$ - und  $v_{max}$ -Werte sowie  $k_{cat}$  und  $k_{cat}/k_M$  von DEP, DBP und DET der *p*NB-Est17, *p*NB-Est19 und *p*NB-Est13. Die Errechnung von  $k_{cat}$  und  $k_{cat}/k_M$  wurde unter der Annahme bestimmt, dass die eingesetzte Enzymkonzentration gleich der Konzentration an Aktiv-Enzym ist. DMP = Dimethylphthalsäure; DEP = Diethylphthalsäure; DBP = Dibutylphthalsäure

<b>Substrat DEP</b>	<b><i>p</i>NB-Est17</b>	<b><i>p</i>NB-Est19</b>	<b><i>p</i>NB-Est13</b>
$v_{Max}$ [U/mg]	9,57	7,20	3,21
$k_M$ [mM]	5,20	3,55	4,14
$k_{cat}$ [1/s]	31065	23265	10468
$k_{cat}/k_M$ [1/mM*s]	5974	6554	2528
<b>Substrat DBP</b>	<b><i>p</i>NB-Est17</b>	<b><i>p</i>NB-Est19</b>	<b><i>p</i>NB-Est13</b>
$v_{Max}$ [U/mg]	48,03	40,69	2,87
$k_M$ [mM]	1,24	0,70	1,16
$k_{cat}$ [1/s]	155676	23265	9356
$k_{cat}/k_M$ [1/mM*s]	125545	187329	8066
<b>Substrat DET</b>	<b><i>p</i>NB-Est17</b>	<b><i>p</i>NB-Est19</b>	<b><i>p</i>NB-Est13</b>
$v_{Max}$ [U/mg]	28,06	30,79	3,57
$k_M$ [mM]	1,06	0,97	1,21
$k_{cat}$ [1/s]	90998	99411	12574
$k_{cat}/k_M$ [1/mM*s]	85847	102486	10392

Die Auswertung der kinetischen Daten nach MICHAELIS-MENTEN bestätigte für *p*NB-Est17 und *p*NB-Est19 die unter Kapitel 4.1 dargestellten Tendenzen.

#### 4.7.7.3 Zusammenfassung aller kinetischen Daten der untersuchten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen gegenüber den vermessenen Phthalaten und Terephthalaten

Im Folgenden werden alle erhaltenen Daten bezüglich der Phthalsäure- und Terephthalsäureester tabellarisch zusammengefasst. Dabei werden die einzelnen untersuchten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen getrennt voneinander dargestellt.

Die auf der Seite 69 dargestellte Abbildung 4.22 zeigt die Unterschiede zwischen den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Enzymen und denen von AKITA *et al.* (2001), KAYANO *et al.* (1997) und MENTLEIN & BUTTE (1989) beschriebenen. Aufgetragen sind die spezifischen Aktivitäten in U/mg bei der Verwendung von Phthalsäureestern mit unterschiedlicher Kettenlänge als Substrat.

Tab. 4.10: Ermittelte Daten der *p*NB-Est17 gegenüber Phthal- und Terephthalsäureestern.

Substrat	$k_M$ [mM]	$V_{max}$ [ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ ]	$k_{cat}$ [1/s]	$k_{cat}/k_M$ [1/mM*s]
Dimethylphthalat (DMP)	27,70	14,09	45672	1649
Dimethylisophthalat (DMIP)	3,67	11,99	38880	10594
Dimethylterephthalat (DMT)	5,99	18,52	60028	10021
Diethylphthalat (DEP)	5,20	9,57	31065	5974
Diethylterephthalat (DET)	1,06	28,06	90998	85847
Dibutylphthalat (DBP)	1,24	48,03	155676	125545

Tab. 4.11: Ermittelte Daten der *p*NB-Est19 gegenüber Phthal- und Terephthalsäureestern.

Substrat	$k_M$ [mM]	$V_{max}$ [ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ ]	$k_{cat}$ [1/s]	$k_{cat}/k_M$ [1/mM*s]
Dimethylphthalat (DMP)	20,35	15,77	50970	2505
Dimethylisophthalat (DMIP)	2,44	8,55	27637	11327
Dimethylterephthalat (DMT)	13,56	15,69	50718	3741
Diethylphthalat (DEP)	3,55	7,20	23265	6554
Diethylterephthalat (DET)	0,97	30,79	99411	102486
Dibutylphthalat (DBP)	0,70	40,69	131318	187329

Tab. 4.12: Ermittelte Daten der *p*NB-Est13 gegenüber Phthal- und Terephthalsäureestern.

Substrat	$k_M$ [mM]	$V_{max}$ [ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ ]	$k_{cat}$ [1/s]	$k_{cat}/k_M$ [1/mM*s]
Dimethylphthalat (DMP)	6,94	8,16	26616	3835
Dimethylisophthalat (DMIP)	2,93	27,67	90267	30808
Dimethylterephthalat (DMT)	6,87	4,53	14784	2152
Diethylphthalat (DEP)	4,14	3,21	10468	2528
Diethylterephthalat (DET)	1,21	3,57	12574	10392
Dibutylphthalat (DBP)	1,16	2,87	9356	8066

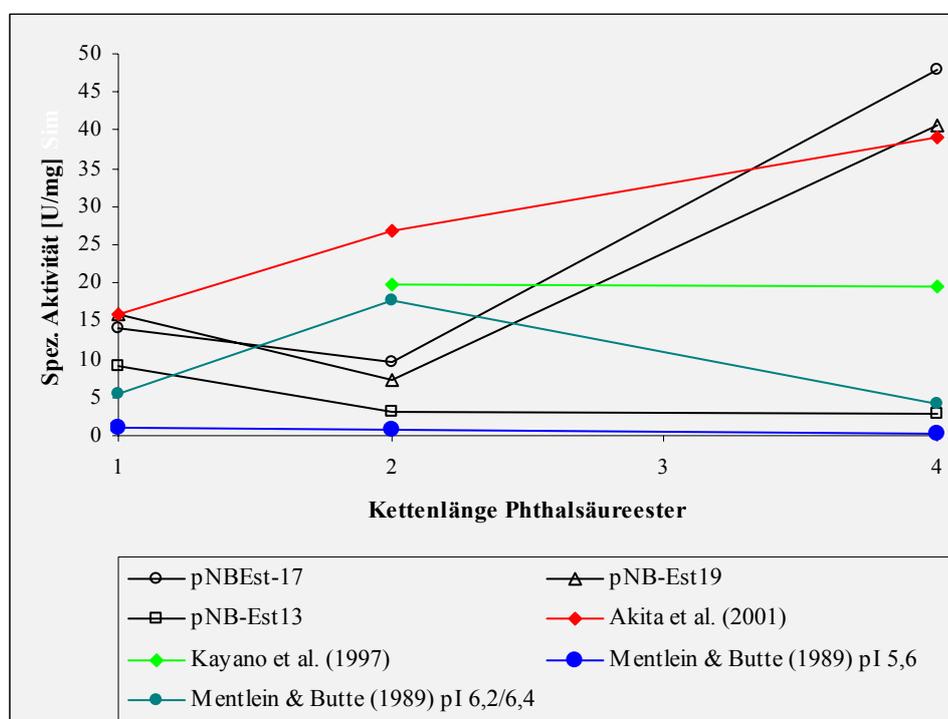


Abb. 4.22: Schematische Darstellung der unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten gegenüber Phthalsäureestern mit zunehmender Kettenlängen. Vergleichend dargestellt sind die in dieser Arbeit untersuchten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen (*p*NB-Est17, *p*NB-Est19 und *p*NB-Est13) und die Esterase aus *Micrococcus* sp. YGJ1 (AKITA *et al.*, 2001), die Esterase aus Lebermikrosomen der Maus (KAYANO *et al.*, 1997) und die Esterasen aus Rattenleber (pI 5,6 und pI 6,2/6,4; MENTLEIN & BUTTE; 1989).

#### 4.7.8 Substratspezifität gegenüber *para*-Nitrophenylestern, Methylestern und Triglyceriden mit unterschiedlichen Kettenlängen

Zur weiteren Charakterisierung der *p*NB-Est13, *p*NB-Est17 und *p*NB-Est19 wurden die spezifischen Aktivitäten mit *para*-Nitrophenylestern, Methylestern und Triglyceriden unterschiedlicher Kettenlänge bestimmt. Die spezifischen Aktivitäten gegenüber den *para*-Nitrophenylestern wurde spektroskopisch bestimmt (Kap. 3.18.1.1), wohingegen die enzymatische Aktivität gegenüber Methylestern und Triglyceriden titrimetrisch über die zum Reaktionsansatz zudosierte Menge an 0,01 M NaOH ermittelt wurde (Kap. 3.18.2).

Die Präferenzen gegenüber verschiedenen *p*-Nitrophenyl-Estern waren für *p*NB-Est13 und *p*NB-Est19 vergleichbar. Beide Esterasen zeigten maximale Aktivitäten gegenüber den *p*-Nitrophenyl-Estern mit einer Fettsäureseitenkette von 6 Kohlenstoffatomen. Dabei wies die spezifische Aktivität der *p*NB-Est19 (249,6 U/mg) einen fünffach höheren Wert als *p*NB-Est13 (50,5 U/mg) auf. Die Esterase *p*NB-Est17 zeigte die höchste spezifische Aktivität gegenüber *para*-Nitrophenylbutyrat mit 196,3 U/mg. Jenseits des Kettenlängen-Optimums (Tab. 4.13) sank die spezifische Aktivität mit zunehmender Kettenlänge bei allen untersuchten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen. Für *p*NB-Est13 und *p*NB-Est17 konnten noch geringe spezifische Aktivitäten von 1,3 bzw. 3,4 U/mg bei *p*-NP-Laurat (C12) detektiert werden. Für *p*NB-Est19 konnte für *p*-NP-Myristat (C14) eine nennenswerte Aktivität gemessen werden. Für *p*-NP-Palmitat (C16) und *p*-NP-Stearat (C18) konnten zwar Reaktionen qualitativ detektiert werden, diese waren jedoch nicht quantitativ auszuwerten.

**Tab. 4.13: Substratspezifitäten der *p*NB-Est DSM13, *p*NB-Est 17A1 und *p*NB-Est 19C5 bei unterschiedlichen Kettenlängen der *para*-Nitrophenylester.** Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Messungen mit einer relativen Standardabweichung von unter 10%.

Substrat	spezifische Aktivität [U/mg]		
	<i>p</i> NB-Est13	<i>p</i> NB-Est17	<i>p</i> NB-Est19
<i>p</i> -NP-Butyrat (C4:0)	22,4	196,3	234,8
<i>p</i> -NP-Caproat (C6:0)	50,5	102,7	249,6
<i>p</i> -NP-Caprylat (C8:0)	13,0	73,2	83,6
<i>p</i> -NP-Caprat (C10:0)	4,4	10,2	3,9
<i>p</i> -NP-Laurat (C12:0)	1,3	3,4	4,0
<i>p</i> -NP-Myristat (C14:0)	< 1	< 1	1,3
<i>p</i> -NP-Palmitat (C16:0)	< 1	< 1	< 1
<i>p</i> -NP-Stearat (C18:0)	< 1	< 1	< 1

Bei den Methylestern konnte die höchste spezifische Aktivität der *p*NB-Est13 bei Methylcaproat festgestellt werden, wohingegen bei den Triglyceriden das Tributyrin am

besten umgesetzt wurde (Abb. 4.23). Zusätzlich wurden die spezifischen Aktivität von *p*NB-Est13 gegenüber Triacetin, Diacetin und Monoacetin bestimmt. Dabei zeigte *p*NB-Est13 bei Triacetin die höchste Aktivität gefolgt von Di- und Monoacetin (Tab. 4.14).

**Tab. 4.14:** Spezifische Aktivitäten der *p*NB-Est13 gegenüber Tri-, Di- und Monoacetin. Die dargestellten Messwerte sind Mittelwerte aus mindestens drei durchgeführten titrimetrischen Messungen mit einer relativen Standardabweichung von unter 5%. Bei einer Reaktionstemperatur von 30°C betrug die Konzentration an Substrat stets 10 mM.

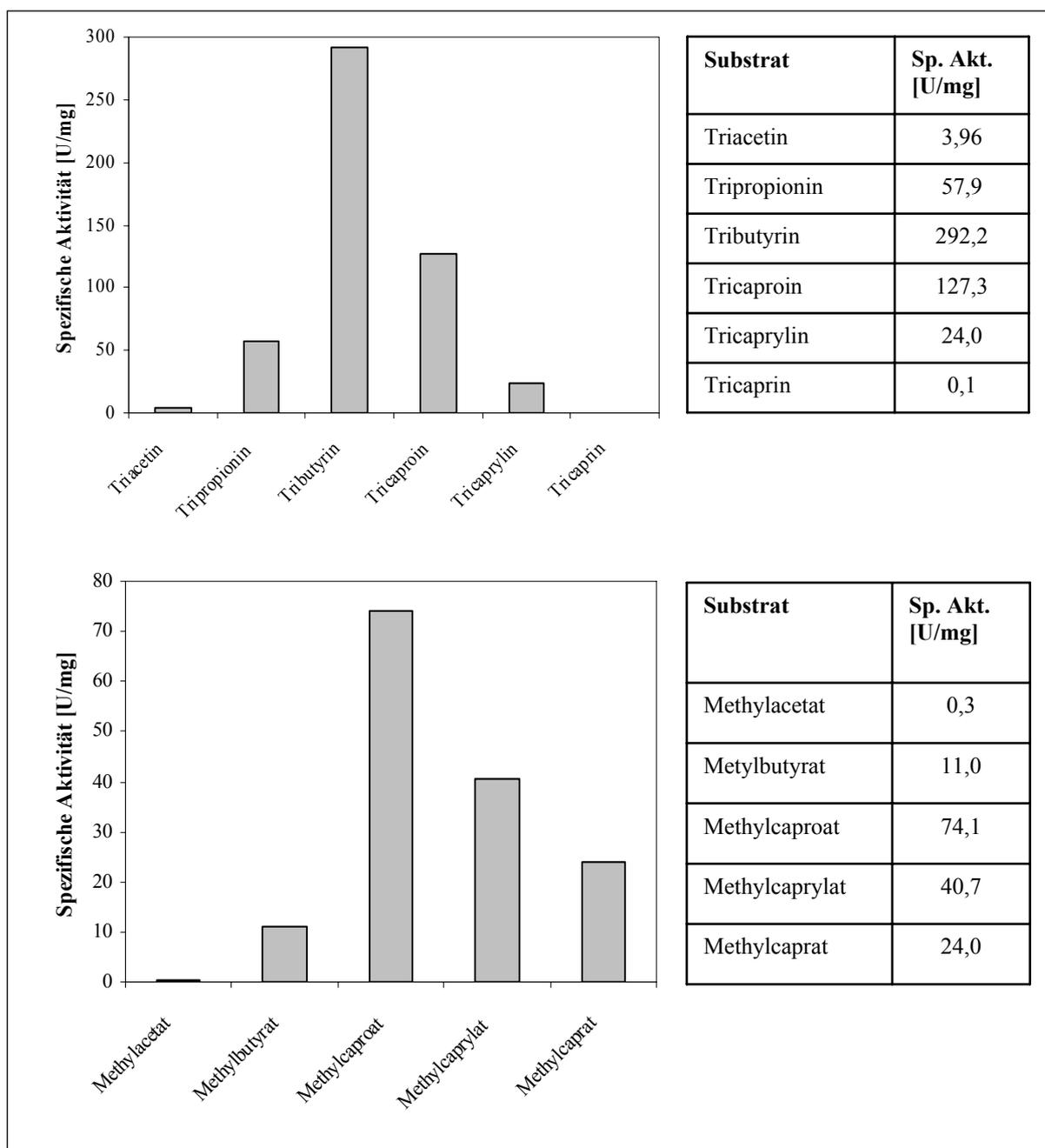
Substrat	Spezifische Aktivität [U/mg]
Triacetin	3,96
Diacetin	1,48
Monoacetin	0,47

**Im Rahmen der biochemischen Charakterisierung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen *para*-Nitrobenzyl-Esterasen stand die Ermittlung der kinetischen Parameter wie  $v_{max}$ ,  $k_M$ ,  $k_{cat}$  und  $k_{cat}/k_M$  gegenüber verschiedenen kurzkettigen Dialkylphthalaten im Vordergrund. Bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen wurden die jeweiligen Enzymaktivitäten titrimetrisch bestimmt und die kinetischen Konstanten durch Anpassung an die Funktion für eine enzymatisch katalysierte Reaktion nach MICHAELIS-MENTEN ermittelt. Aus diesen Werten wurden anschließend die katalytischen Konstanten und katalytischen Effizienzen errechnet.**

**Orientierungen:** Beim Vergleich der unterschiedlichen Orientierungen (*ortho*, *meta*, *para*) zeigten die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen bezüglich der spezifischen Aktivität unterschiedliche Präferenzen: *p*NB-Est17 zeigte die höchste spezifische Aktivität bei Dimethylterephthalat, *p*NB-Est19 bei Dimethylterephthalat bzw. Dimethylphthalat und *p*NB-Est13 bei Dimethylisophthalat. Der kleinste  $k_M$ -Wert wurde jeweils bei der Verwendung von Dimethylisophthalat als Substrat erhalten.

**Kettenlängenspezifität:** Für die Esterasen *p*NB-Est17 und *p*NB-Est19 konnte eine Abnahme der spezifischen Aktivität von Dimethylphthalat zu Diethylphthalat detektiert werden. Die spezifische Aktivität nahm bei der Verwendung von Dibutylphthalat als Substrat sprunghaft zu. Im Gegensatz dazu zeigte *p*NB-Est13 mit zunehmender Kettenlänge eine Abnahme der spezifischen Aktivität. Allen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Esterasen ist gemein, dass mit zunehmender Kettenlänge der Phthalsäure bzw. Terephthalsäureester die  $k_M$ -Werte abnehmen.

**Die Substratspezifitäten der *p*NB-Est17, *p*NB-Est19 und *p*NB-Est13 wurden mit *para*-Nitrophenyl-Estern unterschiedlicher Kettenlänge bestimmt. Das Substratspektrum der *p*NB-Est13 wurde durch Verwendung von Triglyceriden und Methylestern unterschiedlicher Kettenlänge als Substrate erweitert. Ferner konnten leichte Aktivitätssteigerungen der *p*NB-Est13 durch  $Mn^{2+}$  und Tween 20 detektiert werden.**



**Abb. 4.23: Substratspezifitäten der *p*NB-Est13 gegenüber Triglyceriden und Methylestern mit unterschiedlicher Kettenlänge.** Die enzymatischen Aktivitäten wurden titrimetrisch über die zum Reaktionsansatz titrierte Menge an NaOH bestimmt. Die Konzentration an Substrat lag bei jedem Ansatz bei 10 mM; die Reaktionstemperatur war 30°C. Die aufgeführten Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte, die aus mindestens drei unabhängigen Messungen bestimmt wurden.

#### 4.7.9 Einfluss von Detergenzien und Metallsalzen auf *p*NB-Est13

Die Beeinflussung der enzymatischen Aktivität durch Inkubation mit Metallsalzen wurde bereits für verschiedene Esterasen beschrieben (WANG *et al.*, 2004; QUYEN *et al.*, 2006; PRIM *et al.*, 2000; STAUBMANN *et al.*, 1999). KAISER *et al.* (2006) zeigten beispielsweise aktivierende Effekte bei einer *Bacillus subtilis* Esterase nach Inkubation mit  $\text{Ca}^{2+}$ . Eine

eventuelle Erhöhung der enzymatischen Aktivität durch Zusatz von unterschiedlichen Detergenzien sollte ebenfalls untersucht werden. Der Einfluss von unterschiedlichen Detergenzien und Metallsalzen auf die enzymatische Aktivität der *p*NB-Est13 wurde photometrisch mit *p*NP-Acetat als Substrat ermittelt. Die Detergenzien wurden in einer Endkonzentration von 0,1% (w/v) und die Metallsalze in einer Endkonzentration von 1 mM im Reaktionsansatz eingesetzt und zusammen mit dem Enzym für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit Zugabe des Substrates gestartet. Als Referenzwert wurde die enzymatische Aktivität bei gleicher Vorgehensweise ohne Zusatz von Detergenz bzw. Metallsalz vermessen.

**Tab. 4.15: Einfluss von unterschiedlichen Detergenzien und Metallsalzen auf die enzymatische Aktivität der *p*NB-Est DSM13.** Die Endkonzentration der Detergenzien lag bei 0,1% (w/v) und für Metallsalze bei 1 mM; Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von vier unabhängig voneinander durchgeführten Dreifachbestimmungen mit einer relativen Standardabweichung von unter 5%.

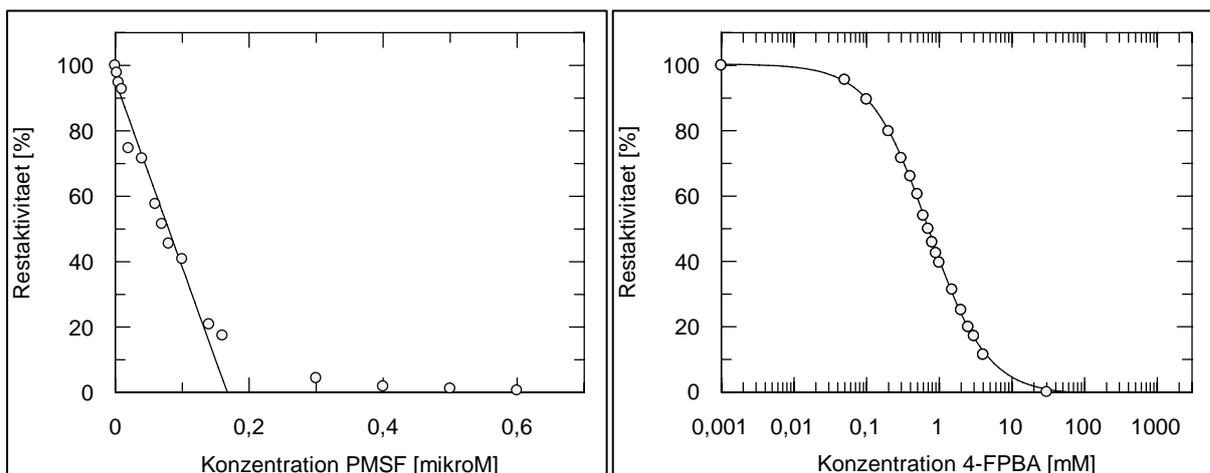
Metallsalz (1 mM)	relative Aktivität [%]	Detergenz 0,1% (w/v)	relative Aktivität [%]
Ohne Metallsalz	100	Ohne Detergenz	100
CoCl <sub>2</sub>	96	Na-Desoxycholat	74
CaCl <sub>2</sub>	107	Tween 20	123
CuCl <sub>2</sub>	100	Tween 80	106
CuSO <sub>4</sub>	99	SDS	0
FeCl <sub>2</sub>	100	Triton X100	97
FeCl <sub>3</sub>	91	Triton X102	93
MgCl <sub>2</sub>	104	Triton X405	104
MnCl <sub>2</sub>	110		
ZnSO <sub>4</sub>	48		
AgNO <sub>3</sub>	0		

Bei der Untersuchung von unterschiedlichen Detergenzien zeigten die beiden eingesetzten anionischen Tenside Natrium-Desoxycholat und SDS eine inhibierende Wirkung. So wurde bei Natrium-Desoxycholat eine Restaktivität von 74% detektiert wohingegen SDS zu einem vollständigen Aktivitätsverlust führte. Das nichtionische Tensid Tween 20 zeigt als einziges von den getesteten nichtionischen Tensiden einen aktivitätsteigernden Effekt (Tab. 4.15).

Die meisten getesteten Metallsalze zeigten keine Auswirkung auf die enzymatische Aktivität. Der Zusatz von FeCl<sub>3</sub> führt zu einer geringen Abnahme der enzymatischen Aktivität (91%) wohingegen MnCl<sub>2</sub> zu einer geringen Zunahme der Aktivität führt (110%). ZnSO<sub>4</sub> führte zu einer signifikanten Herabsetzung der enzymatischen Aktivität (48%) und AgNO<sub>3</sub> zu einer kompletten Inaktivierung.

#### 4.7.10 Einfluss von PMSF und 4-FPBA auf die enzymatische Aktivität

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) ist irreversibler Inhibitor für Serinhydrolasen, der eine kovalente Bindung mit Serin eingeht (JAMES, 1978; PROUTY & GOLDBERG, 1972). 4-Formylphenyl-Boronsäure (4-FPBA) ist reversibler Inhibitor mit hoher Affinität zu Serinhydrolasen. 4-FPBA wird daher zur Stabilisierung von Proteasen eingesetzt, um Autoproteolyse in Flüssigwaschmitteln zu reduzieren und damit eine bessere Lagerstabilität in wässrigen Formulierungen proteolytischer Enzyme zu erhalten. Der Einfluss von verschiedenen Konzentrationen von PMSF und 4-FPBA auf die enzymatische Aktivität wurde durch spektroskopische Aktivitätsmessungen nach Angaben aus Kapitel 3.18.1.1 bestimmt. Dazu wurde das Enzym für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit entsprechendem Inhibitor inkubiert und anschließend nach Zugabe von Substratlösung vermessen. Die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität gegenüber PMSF und 4-FPBA ist graphisch in der nachfolgenden Abbildung dargestellt (Abb. 4.24).



**Abb. 4.24: Inhibierender Einfluss von PMSF und 4-FPBA auf *pNB-Est13*.** Die enzymatische Aktivität wurde mit *para*-Nitrophenyl-Acetat als Substrat bestimmt. Jeder der dargestellten Werte setzt sich aus mindestens auf drei voneinander unabhängig durchgeführten Messreihen zusammen. Die relative Standardabweichung lag jeweils unter 5%.

Die aus der Geradengleichung der empirisch ermittelten Restaktivitäten (Abb. 4.23, links) errechnete Konzentration an PMSF (0,17 µM) und die Einbeziehung der nötigen Verdünnung des Enzyms führt rein rechnerisch zu einer Enzymkonzentration von 13,7 mg/mL. Die Enzymlösung vor Verdünnung besaß nach BCA-Proteinbestimmungsmethode (Kap. 3.14) eine Konzentration von 8,3 mg/mL. Eine Konzentrationsbestimmung der aktiven Zentren mittels Titration mit PMSF scheint auf Grundlage der vorliegenden Daten nicht möglich zu sein. Nach Auswertung der enzymatischen Aktivitäten und der halblogarithmischen

Auftragung konnte für 4-FPBA als reversibler Inhibitor ein  $IC_{50}$ -Wert von 0,71 mM ermittelt werden.

#### 4.7.11 Sekretierbarkeit der *pNB-Est19*

Um die Sekretierbarkeit der *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *Bacillus licheniformis* 19C5 zu überprüfen, wurde das entsprechende Gen über die Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* in den *pBSMul2*-Vektor (BROCKMEIER *et al.*, 2006a) kloniert. Dieser Vektor fusioniert den N-Terminus der Esterase mit der Signalsequenz der Lipase A aus *Bacillus subtilis* 168. Um die Klonierung zu überprüfen, wurden die Klonierungspositionen sequenziert und ein analytischer Restriktionsverdau durchgeführt. Das überprüfte Plasmid wurde anschließend mittels PARIS-Methode in *Bacillus subtilis* TEB1030 - Zellen (EGGERT *et al.*, 2003) transformiert (Kap. 3.8) und kultiviert. Als Vergleich diente die Kultivierung von *Bacillus subtilis* TEB1030 - Zellen, die mit dem Leervektor ausgestattet waren.

Nach 17 bzw. 19 Stunden Kultivierung der Zellen in LB-Medium wurde eine durchschnittliche Esterase-Aktivität an *pNP*-Acetat im Überstand von 0,09 bis 0,1 U/mL gemessen. Die Kultivierung der Zellen mit Leervektor ergab bei vergleichbarer optischer Dichte Werte von 0,02 U/mL im Überstand. Nach der Inkubation des Überstandes mit Diethylterephthalat konnte nur bei der Kultivierung mit plasmidcodiertem Enzym der Monoester per Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

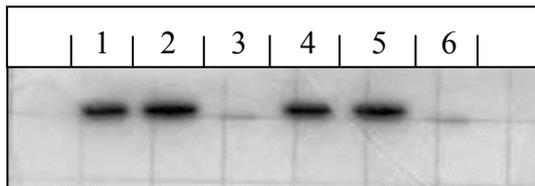
**Tab. 4.16:** Darstellung der Ergebnisse der Sekretionsversuche mit *pNB-Est19* und dem LipA- und LipB-defizienten Stamm *B. subtilis* TEB1030.

<b>Nach 17 Std. Kultivierung</b>	<b>OD<sub>600</sub></b>	<b>Aktivität [U/mL]</b>	<b>Monoesternachweis</b>
Mittelwert mit <i>pNB-Est19</i>	3,98	0,09	ja
Mittelwert ohne <i>pNB-Est19</i>	4,54	0,01	nein
<b>Nach 19 Std. Kultivierung</b>	<b>OD<sub>600</sub></b>	<b>Aktivität [U/mL]</b>	<b>Monoesternachweis</b>
Mittelwert mit <i>pNB-Est19</i>	3,98	0,085	ja
Mittelwert ohne <i>pNB-Est19</i>	4,42	0,2	nein

Bezogen auf die spezifische Aktivität der *pNB-Est19* von 99,17 U/mg gegenüber *para*-Nitrophenyl-Acetat wurden - abzüglich der Aktivität bei der Kultivierung mit Leervektor - 0,8 µg *pNB-Est19* pro Milliliter Kultivierungsvolumen nach 17 bzw. 19 Stunden ins Medium sekretiert. Eine native Gelelektrophorese mit anschließender Esterase-Färbung zeigte nur bei Zellen mit plasmidcodierter Esterase ein deutliches Signal (Abb. 4.25). Nach 19 Stunden bis 23 Stunden der Kultivierung nahm die esterolytische Aktivität im Überstand deutlich ab, so

dass nach 23 Stunden nur noch eine durchschnittliche Esteraseaktivität von 0,35 U/mL detektiert werden konnte.

Nach 23 Stunden Kultivierung wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen und zentrifugiert. Die esterolytische Aktivität im Rohextrakt der Zellen mit plasmidcodierter *pNB*-Esterase lag bei ca. 1 U/mL. Der Rohextrakt der Zellen mit Leervektor zeigte eine Aktivität von 0,5 U/mL.



**Abb. 4.25: Native PAGE der Überstände aus der Kultivierung der Sekretionsversuche nach einer Esterase-Aktivitäts-Färbung.** 1 und 2: Überstände nach 17 Stunden; 3: Kontrolle mit Leervektor nach 17 Stunden; 4 und 5: Überstände nach 19 Stunden; 6: Kontrolle mit Leervektor nach 19 Stunden.

**Die N-terminale Fusion der *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus dem Stamm *B. licheniformis* 19C5 und der Signalsequenz der Lipase A aus *B. subtilis* 168 führte unter Verwendung des LipA-LipB defizienten Stammes *B. subtilis* TEB1030 zu einer Sekretion der Esterase ins Medium.**

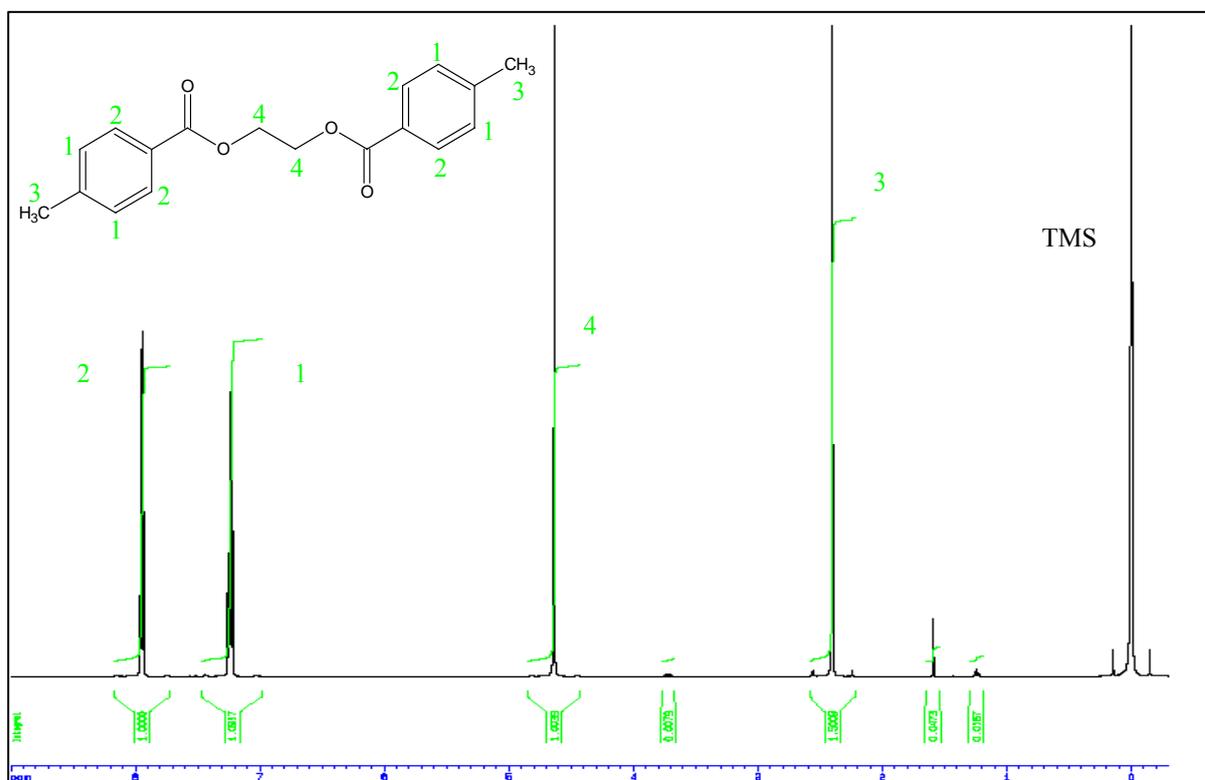
#### 4.8 Modellsubstrat Bis-(*p*-methylbenzoesäure)-ethylenglykolester

Die enzymatische Hydrolyse von Polyethylenterephthalat (PET) bietet ein breites technisches Anwendungspotential (Kap. 2.5). Da PET durch seine physikochemischen Eigenschaften (z.B. Kristallinität) nur bedingt für biochemische Assays einsetzbar ist, ist der Einsatz von Modellsubstraten aufgrund einfacherer und besserer Handhabbarkeit und Präparation ein häufig angewandtes Vorgehen (FISCHER-COLBRIE *et al.*, 2004; FIGUEROA *et al.*, 2006; CIMECIOGLU *et al.*, 1986; MARTEN *et al.*, 2003).

Die Synthese eines solchen Modellsubstrates sowie der analytische Nachweis der Hydrolyseprodukte sollten als Grundlage für ein *high throughput screening* dienen. Damit sollte für weiterführende Forschungsaufgaben ein geeignetes Substrat zur Verfügung gestellt werden, welches potentielle PET-Hydrolasen bzw. PET-Esterasen detektiert. Die Voraussetzungen für die Synthese eines neuen Modellsubstrates waren: einfache und kostengünstige Herstellung durch eine Einschritt-Synthese mit geringem apparativen Aufwand, hoher Reinheit der Zielsubstanz und wasserlösliche Hydrolyseprodukte für die mögliche Einbettung in eine Agar-Matrix und die damit verbundene Detektion enzymatischer Aktivität durch die Bildung von Lysehöfen.

#### 4.8.1 Synthese von Bis-(*p*-methylbenzoesäure)-ethylenglykolester (PET-Dimer)

Bis-(*p*-methylbenzoesäure)-ethylenglykolester (PET-Dimer) wurde nach HEIM und POE (1944) synthetisiert (Kap. 3.20). Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der synthetisierten Substanz zeigt die für das Syntheseprodukt Bis-(*p*-methylbenzoesäure)-ethylenglykolester zu erwartenden Signale (Abb. 4.25). Die chemischen Verschiebungen  $\delta_1 = 7,25$  ppm und  $\delta_2 = 7,95$  ppm sind typisch für aromatische Protonen, ebenso wie die chemische Verschiebung der Methylprotonen am aromatischen System ( $\delta_3 = 2,4$ ). Das Verhältnis der Signalintensitäten (Integralflächen) von 2:2:2:3 deutet auf die korrekte Anzahl an Protonen im Molekül hin (Abb. 4.26). Eine dreifache Schmelztemperaturanalyse des Produktes ( $114^\circ\text{C}$ ) zeigte eine leichte Abweichung zu dem in der Literatur beschriebenen Wert ( $117^\circ\text{C}$ ; DEGUIRE & BRISSE, 1988). In Anbetracht der Geräteabweichungen bei der Schmelzpunktbestimmung, der NMR-Daten und den im NMR-Spektrum sichtbaren Restalkoholgehalt ist die ermittelte Schmelztemperatur akzeptabel. Aufgrund der erhaltenen Daten wurde die Synthese als gelungen erklärt. Insgesamt konnte eine Ausbeute von 85% erzielt werden.



**Abb. 4.26:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Bis-(*p*-methylbenzoesäure)-ethylenglykolester. Kalibriersubstanz: TMS; Lösungsmittel:  $\text{CDCl}_3$ ; die Protonen-tragende Kohlenstoffatome sind mit grünen Ziffern nummeriert und den jeweiligen Peaks zugeordnet; die Integraldaten sind zusätzlich unterhalb der Basislinie aufgeführt. Chemische Verschiebungen:  $\delta_1 = 7,25$  ppm;  $\delta_2 = 7,95$  ppm;  $\delta_3 = 2,4$ ;  $\delta_4 = 4,65$ .

#### 4.8.2 *p*NB-Est17, *p*NB-Est19 und *p*NB-Est13 hydrolysieren Bis-(*p*-methylbenzoesäure)-ethylenglykolester

Nach Inkubation des PET-Dimers mit den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *p*NB-Esterasen konnten die Hydrolyseprodukte mittels GC/MS-Messungen identifiziert werden. Neben dem im Ansatz verbliebenen PET-Dimer wurden als Produkte 4-Methylbenzoesäure, und 4-Methylbenzoesäureethylenglykol detektiert (Abb. 4.27). Ob auch 4-Methylbenzoesäure-ethylenglykol als Substrat hydrolysiert wird, wurde nicht untersucht.

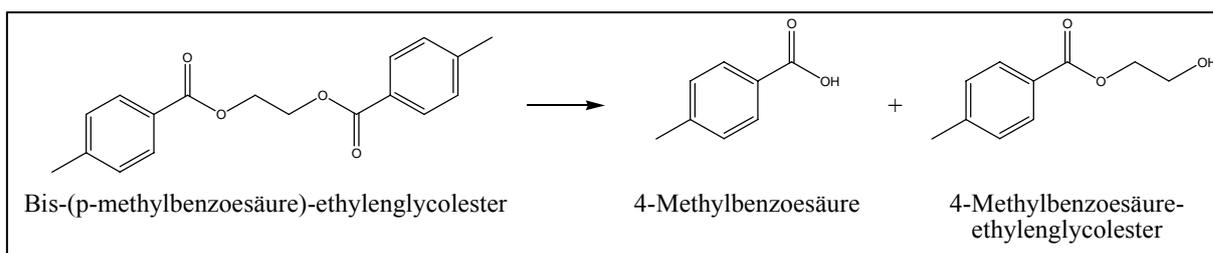


Abb. 4.27: Nachweis der enzymatischen Hydrolyse und Identifizierung der Hydrolyseprodukte von Bis-(*p*-methylbenzoesäure)-ethylenglykolester durch *para*-Nitrobenzyl-Esterasen mittels gekoppelter GC/MS.

#### 4.8.3 *p*NB-Est13 zeigt im Vergleich die höchste spezifische Aktivität gegenüber PET-Dimer; *p*NB-Est19 den kleinsten $k_M$ -Wert

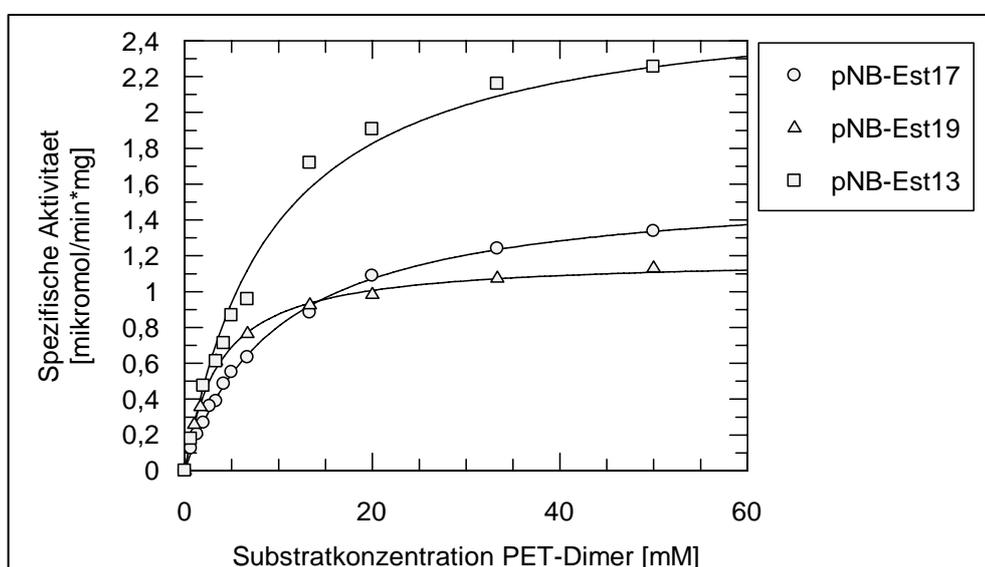
Wie für die unterschiedlichen Phthalate und Terephthalate beschrieben, wurde auch die enzymatische Aktivität bei unterschiedlichen Konzentrationen an Bis-(*p*-methylbenzoesäure)-ethylenglykolester bestimmt (Abb. 4.28). Zur Herstellung einer PET-Dimer-Lösung wurde eine dem Versuch angepasste Menge des synthetisierten Bis-(*p*-methylbenzoesäure)-ethylenglykolester mit 1 g Triton X100 in 50 mL Ethanol (99%ig, vergällt) unter Erwärmung gelöst. Diese Lösung wurde unter starkem Rühren mittels ULTRATURRAX® bei 8000 U/min in ein mit einem Eisbad gekühltes Becherglas mit 100 mL 2 mM Tris-Puffer (pH 9) gegeben. Anschließend wurde die Suspension zur Entfernung des eingesetzten Ethanols für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Die Auswertung nach MICHAELIS-MENTEN zeigte, dass *p*NB-Est13 die höchste spezifische Aktivität gegenüber PET-Dimer besitzt (2,87 U/mg). Eine geringere spezifische Aktivität wurde für die Esterasen *p*NB-Est17 (1,60 U/mg) und *p*NB-Est19 (1,19 U/mg) ermittelt. Die größte Affinität von Bis-(*p*-methylbenzoesäure)-ethylenglykolester zum katalytischen Zentrum zeigte *p*NB-Est19 ( $k_M$ -Wert 3,59 mM), gefolgt von *p*NB-Est17 ( $k_M$ -Wert 9,83 mM) und *p*NB-Est13 ( $k_M$ -Wert 11,21 mM). Die zusätzlich ermittelten katalytischen Konstanten

( $k_{\text{cat}}$ ) und die jeweilige katalytische Effizienz ( $k_{\text{cat}} / k_{\text{M}}$ ) sind in der nachfolgenden Tabelle 4.17 aufgeführt.

**Tab. 4.17: Kinetische Daten der untersuchten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen *pNB-Est17*, *pNB-Est19* und *pNB-Est13* gegenüber PET-Dimer.** Die erhaltenen Daten wurden durch titrimetrische Messungen ermittelt und stellen Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen mit einer relativen Standardabweichung von unter 10% dar. Die Errechnung von  $k_{\text{cat}}$  und  $k_{\text{cat}}/k_{\text{M}}$  wurde aufgrund der Voraussetzung bestimmt, dass die eingesetzte Ezymkonzentration gleich der Konzentration an Aktiv-Enzym ist.

PET-Dimer	$V_{\text{max}}$ [ $\mu\text{mol}/\text{min}$ ]	$k_{\text{M}}$ [mM]	$k_{\text{cat}}$ [1/s]	$k_{\text{cat}} / k_{\text{M}}$ [1/mM*s]	Spezifische Aktivität [ $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ ]
<i>pNB-Est17</i>	0,642	9,83	5177	527	1,60
<i>pNB-Est19</i>	0,385	3,59	3838	1070	1,19
<i>pNB-Est13</i>	1,801	11,21	9358	835	2,87



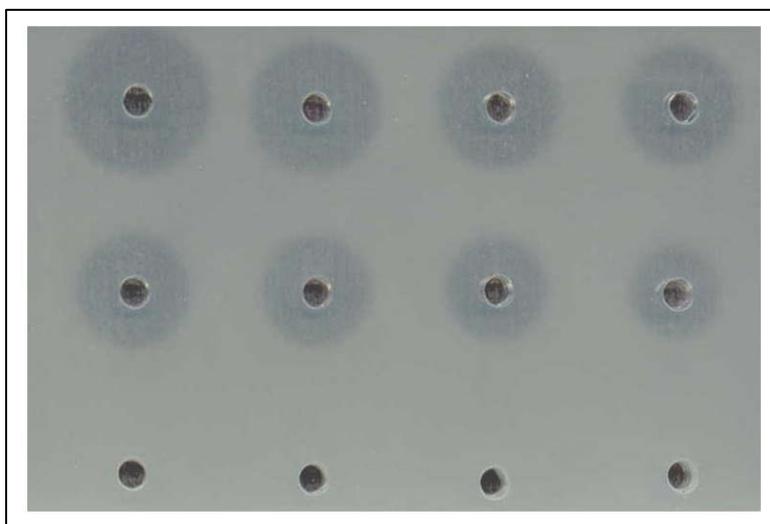
**Abb 4.28: MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken der untersuchten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen gegenüber PET-Dimer.** *pNB-Est17* ( $\circ$ ), *pNB-Est19* ( $\Delta$ ) und *pNB-Est13* ( $\square$ ). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten titrimetrischen Messungen mit einer relativen Standardabweichung von unter 10%. Die Reaktionstemperatur lag bei 30°C, das Reaktionsvolumen bei 2 mL.

#### 4.8.4 Einbettung von PET-Dimer in eine Agarmatrix

Die Einbettung von Bis-(*p*-methylbenzoesäure)-ethylenglykolester in eine Agarmatrix sollte eine schnelle und einfache Methode hervorbringen, um in einem neuen *screening* oder nach Methoden der gerichteten Evolution für dieses Substrat spezifischere Stämme oder Mutanten zu identifizieren. Die PET-Dimer Lösung zur Herstellung trüber Agar-Platten wurde gemäß Kapitel 4.8.3 hergestellt (0,6 g PET-Dimer und 1 g Triton X100). Die Substrat-Lösung wurde mit auf 50°C abgekühlten Agar 1 zu 20 verdünnt, mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt,

gegossen und erstarren lassen. Anschließend wurden die Platten entweder sofort verwendet oder bei 4°C gelagert.

Vorraussetzung für die Etablierung eines Agarplattenassays ist die Unterscheidung von unterschiedlich großen Lysehöfen hervorgerufen durch unterschiedliche Konzentrationen an aktivem Enzym. Die Abhängigkeit des Lysehofdurchmessers von der Enzymkonzentration zeigt Abbildung 4.29. Neben der Indikation unterschiedlicher Enzymkonzentrationen stellt die Möglichkeit des mikrobiellen Bewuchses auf Indikatorplatten eine weitere wichtige Voraussetzung für eine direkte Identifizierung von besseren Stämmen oder Mutanten nach Methoden der gerichteten Evolution dar.

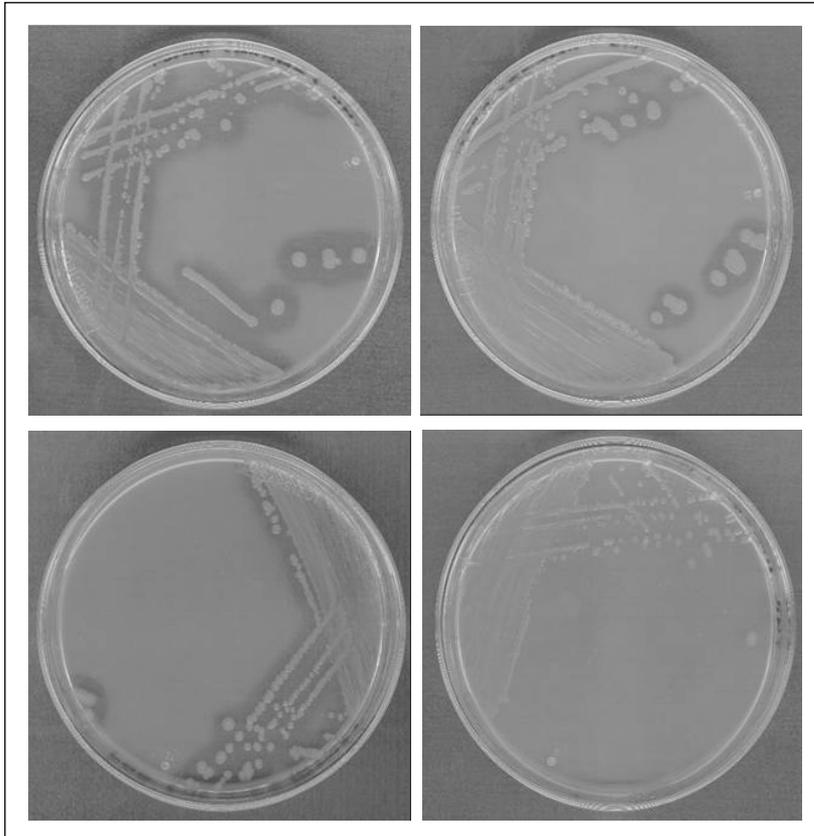


**Abb. 4.29: Abhängigkeit der Lysehofgröße von der eingesetzten Enzymkonzentration von *pNB-Est13*.** Von links oben nach rechts unten: 125 µg; 25 µg; 12,5 µg; 8 µg; 6 µg; 4 µg; 2,5 µg und 1,25 µg jeweils in einem Volumen von 10 µL für 17 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die untere Reihe besteht aus jeweils zwei Blindproben mit Wasser bzw. Puffer.

Die Funktionalität des Agarplatten-Assays wird in der Abbildung 4.30 dargestellt. Die unterschiedlich großen Lysehöfe geben die unter Kapitel 4.8.3 dargestellten Ergebnisse wieder. Die größte spezifische Aktivität zeigte *pNB-Est13*, die den deutlich größten Hof ausbildete. Die Esterasen *pNB-Est17* und *pNB-Est19* zeigten dagegen eine deutlich geringere Aktivität, was in Abbildung 4.30 in einem deutlich kleineren Lysehof resultiert. Obwohl die Ausbildung der Lysehöfe von der Lyse einzelner Zellen abhängt und daher von Kolonie zu Kolonie unterschiedlich ausfallen können, zeigten sich bei parallelen Mehrfachkultivierungen immer gleiche Lysehofgrößen. Demnach stellt der im Laufe der vorliegenden Arbeit entwickelte Indikatorplatten-Assay eine einfache Methode dar, neue oder verbesserte Produzenten oder verbesserte Enzyme zu identifizieren, z.B. durch Methoden der gerichteten Evolution verbesserte Mutanten.

Während der Bearbeitung dieses Manuskriptes wurde zusätzlich auf Basis des beschriebenen Agar-Platten-Assays ein mikrobiologisches *screening* durchgeführt. Dabei konnte innerhalb

kurzer Zeit mehrere Organismen isoliert werden, die aufgrund deutlicher Lysehof-Bildung eine Esterase oder Lipase von Interesse exprimieren (ohne Abbildung). Weiterführende Untersuchungen zur Isolierung und Identifizierung werden zurzeit bei der Henkel KGaA, Düsseldorf durchgeführt.

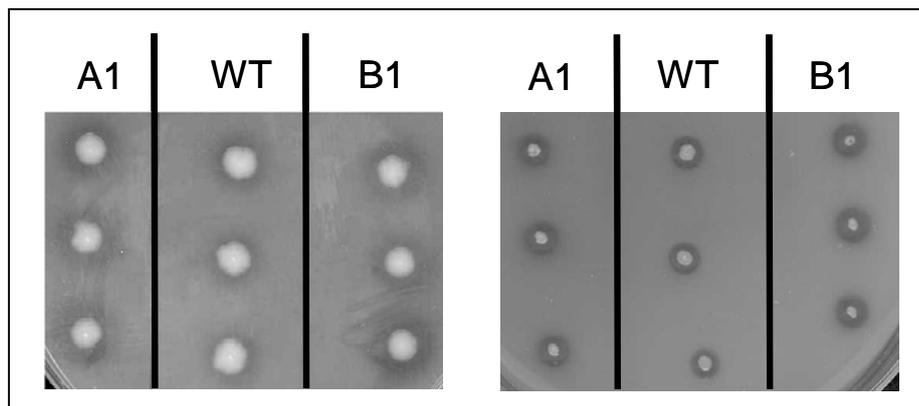


**Abb. 4.30: Agarplatten-Assay mit Bis-(*p*-methylbenzoesäure)-ethylenglykolester (PET-Dimer) als Substrat.** Transformierte *E. coli* B ER2566 - Zellen mit plasmidcodierter *para*-Nitrobenzyl-Esterase bilden deutliche Lysehöfe aus (oben links *pNB*-Est13, oben rechts *pNB*-Est19, links unten *pNB*-Est17; transformierte *E. coli* B ER2566 - Zellen mit Leervektor hingegen nicht; Inkubationszeit 40 Stunden bei 37°C.

#### 4.8.5 *ep*PCR der *pNB*-Est13

Die spezifische Aktivität der *pNB*-Est13 gegenüber PET-Dimer sollte durch *error prone* PCR (*ep*PCR) erhöht werden. Dazu wurde die *primer pNB13fwd* (Imp.) und *pNB13rev* (Imp.) genutzt, um mittels PCR das Esterase-Gen mit genomischer DNA als Matrize zu amplifizieren. Hierbei wurden die Bedingungen gewählt, die unter Kapitel 3.9.4 beschrieben wurden. Nach Reinigung der PCR-Produkte und Restriktion mit *NdeI* und *SapI* wurden die Fragmente in den ebenfalls mit diesen Restriktionsendonukleasen geschnittenen und dephosphorilierten pTYB1-Vektor ligiert und in *E. coli* B ER2566 - Zellen transformiert. Beim *screening* bildete der unter Kapitel 4.8.4 beschriebene Agarplatten-Assay die Basis für die Identifikation verbesserter Enzyme. Die Erstellung einer vergleichsweise kleinen *ep*PCR-Bank von ca. 6000 Klonen führte zu der Isolierung zweier Klone, die sowohl auf Tributyrin-

als auch auf PET-Dimer-Indikatorplatten einen deutlich größeren Lysehof im Verhältnis zur Koloniegröße ausbildeten (Abb. 4.31). Als Referenz auf den Agarplatten wurde die unveränderte Wildtyp-Esterase *pNB-Est13* inkubiert. Die jeweils durchgeführte „Dreifachbestimmung“ sollte mögliche falschpositive Klone identifizieren, die aufgrund besonders starker Zellyse einen größeren Lysehof ausbildeten. Die Quantifizierung der Aktivitätssteigerung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt, ist jedoch Teil weiterführender Arbeiten.



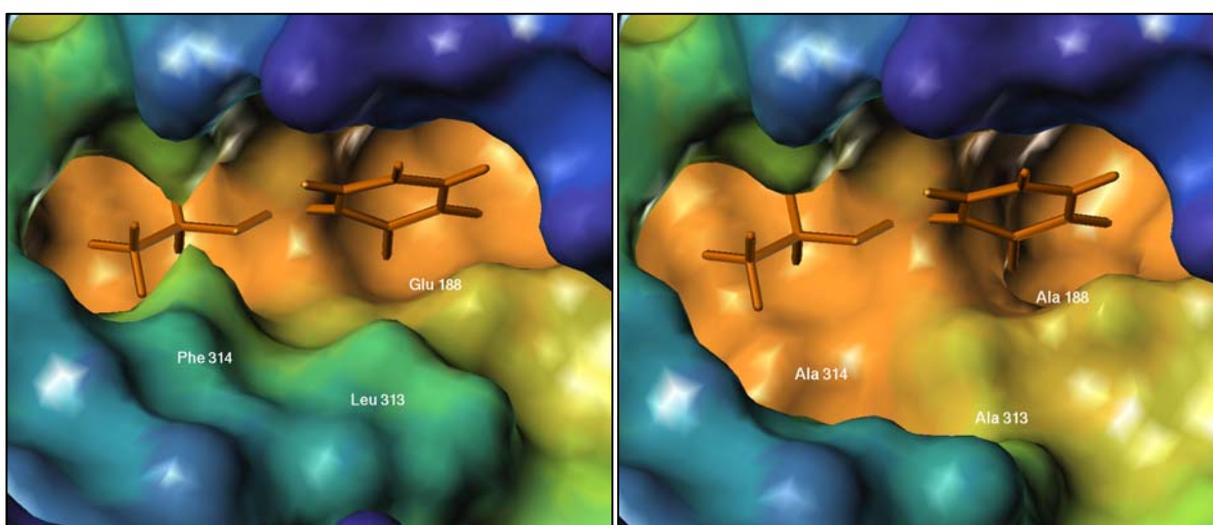
**Abb. 4.31:** Enzymaktivitäten von *ep*PCR-Mutanten der *pNB-Est13* (A1 bzw. B1) und der Wildtyp-Esterase (WT). Links: Agarplatte mit PET-Dimer nach 40 Stunden bei 37°C. Rechts: Agarplatte mit Tributyrin nach 16stündiger Inkubation bei 37°C.

**Mit Bis-(*p*-methyl-benzoessäure)-ethylenglykolester (PET-Dimer) konnte ein Substrat synthetisiert werden, welches die Grundlage eines *high-throughput-screening*-Systems zur schnellen Identifizierung potentieller PET-Esterasen bildete. Die Funktionalität dieses Systems konnte durch die Isolierung von zwei durch *error-prone* PCR hergestellten Enzym-Mutanten mit mutmaßlich erhöhter Aktivität nachgewiesen werden.**

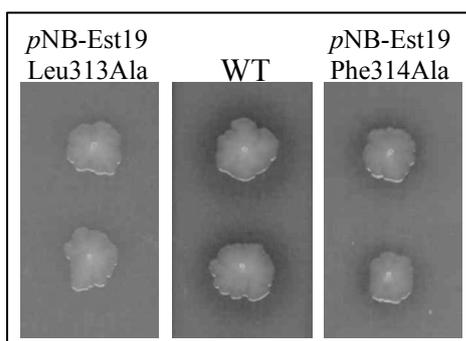
#### 4.8.6 Rationales Proteindesign

Die bekannte dreidimensionale Struktur der *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *Bacillus subtilis* und die hohe Aminosäure-Sequenz-Homologie der *pNB-Est19* zu dieser sollten genutzt werden, um die Moleküleigenschaften der *pNB-Est19* zu verbessern. Als Grundlage für die Modellierung diente die von SPILLER *et al.* (1999) aus röntgenkristallographischen Analysen hervorgegangene und publizierte dreidimensionale Struktur der *para*-Nitrobenzyl-Esterase (Protein Databse ID 1qe3). Die Vergrößerung des Zuganges zum katalytischen Zentrum durch Änderung der Primärstruktur könnte einen vereinfachten Zugang des Substrates zu der katalytisch aktiven Substratbindungstasche ermöglichen bzw. eine schnellere Freisetzung der

Hydrolyse-Produkte. Daher wurden wie in Abb. 4.32 dargestellt die Aminosäuren Phe314 und Leu313 jeweils gegen ein Alanin ausgetauscht (Kap. 3.9.2). Die Einzelmutationen wurden auf dem unter Kapitel 4.8.4 beschriebenen Agarplatten-Assay gegenüber PET-Dimer auf vergrößerte Aktivität untersucht. Da beide Einzelmutationen bereits deutliche Aktivitätsverluste aufwiesen (Abb. 4.33), wurde auf die Herstellung einer Ala313/Ala314 Doppel-Mutante verzichtet. Zusätzlich durchgeführte Aktivitätsmessungen der Einzelmutanten mit *para*-Nitrophenyl-Acetat als Substrat ergaben, dass die spezifische Aktivität der Mutante *pNB-Est19-Leu313Ala* nur noch 18% und die der Mutante *pNB-Est19-Phe314Ala* noch 28% des Wildtyps betrug.



**Abb. 4.32:** Darstellung des katalytischen Tasche der *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *B. subtilis* 168. Durch Austausch der Aminosäuren Phe 314 und Leu313 in der homologen Esterase *pNB-Est19* kann der Zugang zum katalytischen Zentrum vergrößert werden. Die jeweils durchgeführten Einzelmutationen wiesen jedoch deutliche Aktivitätsverluste auf. Zur Verdeutlichung der möglichen Lage eines Substrates wurde Ethylbenzoat zum Zeitpunkt der Esterolyse dargestellt. Für die Darstellung der Esterase wurde das Programm SYBYL verwendet.



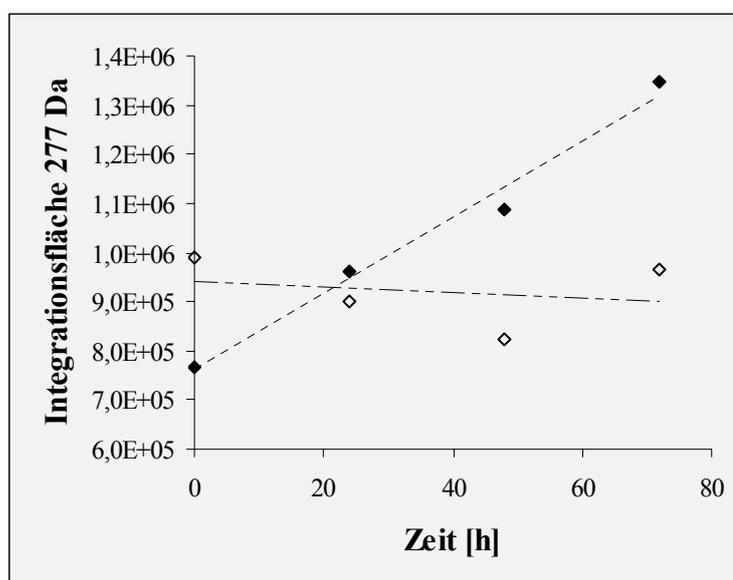
**Abb. 4.33:** Enzymaktivitäten von Mutanten die durch rationales Proteindesign erhalten wurden. Links: Mutante *pNB-Est19-Leu313Ala*; mitte: Wildtyp (WT) *pNB-Est13*; rechts: Mutante *pNB-Est19-Phe314Ala*. Beide veränderten Esterasen führten zu einer Verringerung der enzymatischen Aktivität visualisiert durch geringeren Durchmesser der Lysehöfe bzw. ohne Lysehof auf PET-Dimer-Platten.

#### 4.9 Enzymatische Hydrolyse von PET-Nanopartikeln durch *pNB-Est13*

Um eine ausreichend große Oberfläche für die enzymatische Hydrolyse von PET zu gewährleisten, wurden gemäß Kapitel 3.19 Nanopartikel hergestellt, die eine Größe von 50-

100 nm besaßen. Insgesamt 400 µL der Nanopartikel-Suspension (entsprach 3 mg) wurden mit einem Milliliter 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) versetzt und für 72 Stunden mit einer 100 µL Enzymlösung (*p*NB-Est13; 1,25 mg Enzym) inkubiert. Nach 0, 24, 48 und 72 Stunden wurden dem Ansatz 100 µL entnommen und in 500 µL 1,1,1,3,3,3,-Hexafluor-2-Propanol aufgenommen. Die erhaltenen Proben wurden anschließend mittels LC/MS (Kap. 3.23) vermessen.

Über den gesamten Reaktionsverlauf konnte ein tendenziell steigender Anteil der doppelt mit Ethylenglykol veresterten Terephthalsäure ( $m/z$  277 Da, Terephthalsäure-Diethylenglykolester) detektiert werden (Abb. 4.34). Der Blindwert zeigte im Vergleich einen breit schwankenden Bereich dieses Hydrolyseproduktes mit eher abnehmender Konzentration. Der deutlichste Unterschied konnte nach 72 Stunden der Inkubation ermittelt werden.



**Abb. 4.34: Enzymatische Hydrolyse von PET-Nanopartikeln durch *p*NB-Est13.** Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils zwei Messungen (Kap. 3.21). Die Graphik zeigt die ansteigende Konzentration der doppelt mit Ethylenglykol veresterten Terephthalsäure ( $m/z$  277; ♦), die bei den jeweils durchgeführten Blindproben (◇) nicht zu detektieren war.

**Die über den gesamten Reaktionsverlauf zunehmende Konzentration an Terephthalsäure-Diethylenglykolester bei der Inkubation von PET-Nanopartikeln mit *p*NB-Est13 lässt eine enzymatische Aktivität gegen dieses Substrat vermuten.**

## 5 Diskussion

Dialkylphthalate sind aufgrund enormer Produktionsmengen (LEISEWITZ, 1997), deren Zusatz zu Weich-PVC und anderen Polymeren und deren nicht-kovalenter Bindung in Kunststoffen (NILSSON, 1994) mittlerweile in der Natur ubiquitär verbreitet. Diese teilweise endokrin wirksamen Substanzen bildeten in den letzten 20 Jahren Grundlage vieler Publikationen. Neben der Auswirkung auf eukaryotische Organismen wurde eine Vielzahl an Mikroorganismen isoliert, die die Fähigkeit zur kompletten Mineralisierung der Phthalsäureester besitzen (Tab. 2.3). Grundlegende Untersuchungen zur enzymatischen Hydrolyse von Phthalsäure- und Terephthalsäureestern wurden bislang nur von wenigen Autoren detailliert beschrieben (AKITA *et al.*, 2001; MARUYAMA *et al.*, 2005; NISHIOKA *et al.*, 2006; KURANE *et al.*, 1984; KAYANO *et al.*, 1997; MENTLEIN & BUTTE, 1989). Daher war das vor Beginn dieser Arbeit definierte Ziel - aufbauend auf einem selektiven mikrobiologischen *screening* - die für eine Dialkylphthalat-Hydrolyse verantwortlichen Enzyme zu identifizieren und biochemisch zu charakterisieren. Darin inbegriffen war die Bestimmung der kinetischen Parameter wie die maximale Geschwindigkeit ( $v_{\max}$ ), die MICHAELIS-MENTEN-Konstante ( $k_M$ ), die katalytische Konstante ( $k_{\text{cat}}$ ) und die katalytische Effizienz ( $k_{\text{cat}}/k_M$ ) gegenüber verschiedenen kurzkettigen Dialkylphthalaten.

Zusätzlich sollte das mögliche Potential der Dialkylphthalat-Hydrolasen bei der enzymatischen Hydrolyse von Polyethylenterephthalat (PET) bewertet werden. Da die enzymatische Hydrolyse von PET sowohl für einen umweltbiotechnologischen Ansatz als auch für eine technische Nutzung als Waschmitteladditiv erwünschenswert ist, sollten grundlegende Arbeiten für eine Bearbeitung dieser Fragestellung durchgeführt werden. Darin inbegriffen war die Entwicklung eines *high-throughput-screening* auf Basis eines zu synthetisierenden Modellsubstrates und die geeignete Präparation von PET für die Durchführung enzymatischer Aktivitätstest.

### 5.1 Mikrobielles *screening* auf der Basis von Diethylphthalsäure

Das zu Beginn der vorliegenden Arbeit durchgeführte mikrobiologische *screening* auf Basis von Diethylphthalsäure (DEP) führte zur Isolierung von zwei Stämmen, die direkt aus Bodenproben aus unterschiedlichen Standorten isoliert wurden. Die Identifizierung beruhte auf der enzymatischen Hydrolyse der dem Agar beigesezten Diethylphthalsäure und den

daraus resultierenden Lysehöfen. Auf eine vielfach beschriebene Anreicherungskultur mit Diethylphthalsäure (oder anderen Dialkylphthalaten) als einziger Kohlenstoffquelle (CHATTERJEE & DUTTA, 2003; JACKSON *et al.*, 1996; NIAZI *et al.*, 2001; AKITA *et al.*, 2001; MARUYAMA *et al.*, 2004; NISHIOKA *et al.* 2006; KURANE *et al.*, 1984; Tab. 2.3) wurde verzichtet, um eine größere Diversität an potentiell geeigneten Mikroorganismen zu erhalten. Eine Anreicherungskultur schließt eine Metabolisierung des Substrates zwingend ein, so dass Mikroorganismen, die über entsprechende lipolytische Enzyme verfügen, aber zur kompletten Metabolisierung des Substrates nicht fähig sind, nicht detektiert werden können.

Durch RIBOPRINT-Analysen (BRUCE 1996, BRUCE 1995, WEBSTER *et al.* 1994) bei der DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH (DSMZ, Braunschweig) konnten die Isolate *Bacillus subtilis* bzw. *Bacillus licheniformis* zugeordnet werden.

Die geringe Haltbarkeit der Agarplatten (Kap. 3.10), die auf die Verdampfung des Diethylphthalates innerhalb von 48 Stunden zurückzuführen ist, könnte durch die Verwendung eines höhermolekularen Dialkylphthalat-Esters erhöht werden (z.B. Dibutylphthalat; KURANE *et al.*, 1984). Eine Verbesserung der Haltbarkeit und damit die Möglichkeit der längeren Nutzung der Agarplatten würden einen Einsatz auch für Genombanken (z.B. KARPUSHOVA *et al.*, 2005) und/oder Metagenomansätze (z.B. ELEND *et al.*, 2006) ermöglichen. Trotz der geringen Haltbarkeit konnte die Funktionalität des mit Diethylphthalsäure versetzten Agars durch die Isolierung von Mikroorganismen und die Identifizierung der für die Dialkylphthalat-Hydrolyse verantwortlichen Enzymproteine nachgewiesen (Kap. 5.2) werden.

## **5.2 Die Dialkylphthalat-Hydrolasen aus den Stämmen *B. subtilis* 17A1 und *B. licheniformis* 19C5 sind *para*-Nitrobenzyl-Esterasen**

Aus dem Bodenisolat *Bacillus subtilis* 17A1 wurde das für die Dialkylphthalat-Hydrolyse verantwortliche Enzymprotein biochemisch gereinigt. Die mit dem gereinigten Enzym durchgeführte MALDI-TOF-Analyse zeigte bei allen Peptidfragmenten eine Übereinstimmung mit einer *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *B. subtilis* 168 (KUNST *et al.*, 1997; Kap. 4.3). CHEN *et al.* (1995b) beschrieben eine sieben Schritte umfassende biochemische Reinigung der *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *B. subtilis* NRRL B8079, die sich nur in 11 Aminosäureresten von der *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *B. subtilis* 168 unterscheidet. Bei dieser Aufreinigung wurden insgesamt 3 mg Reinenzym gewonnen. Die in

der vorliegenden Arbeit dargestellte biochemische Reinigung der *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *B. subtilis* 17A1 stellt sich im direkten Vergleich insgesamt als weniger effektiv dar. Bei angenommener Übertragbarkeit des Reinigungsverfahrens von CHEN *et al.* (1995b) wäre eine Proteinmenge - bezogen auf den Gesamtproteingehalt im Rohextrakt - von 0,12 mg Reinezym zu erwarten gewesen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine Proteinmenge von ca. 300 ng gereinigt werden. Diese Menge an Reinezym reichte für die unter Kapitel 4.3 beschriebene massenspektrometrische Proteinanalytik aus.

Die Identifizierung des korrespondierenden Esterase-Gens wurde durch Erstellen einer Genombank erreicht. Neben einer Genombank für den Stamm *Bacillus subtilis* 17A1 wurde auch eine Genombank für das zweite Bodenisolat angefertigt (*Bacillus licheniformis* 19C5). Die Fragmentierung genomischer DNA, die Klonierung in Expressionsvektoren und die Kultivierung der Expressionsstämmen auf Indikatorplatten ist eine häufig zur Identifikation von lipolytischen Genen angewandte Methode (HASONA *et al.*, 2002; PETERSEN *et al.*, 2001; ALVAREZ-MACARIE *et al.*, 1999b; KARPUSHOVA *et al.*, 2005). Die Sequenzierung der genomischen Fragmente von esterolytisch aktiven Genombank-Klonen und die BLAST-*Search*-Analyse bestätigten den Befund der MALDI-TOF-Analyse des gereinigten Proteins: die offenen Leserasterahmen (ORFs) zeigten für *B. subtilis* 17A1 eine zu 98% und eine für *B. licheniformis* 19C5 eine zu 92% identische Aminosäuresequenz verglichen mit der *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *B. subtilis* 168. Die unterschiedlichen Aminosäuren befanden sich jeweils in Bereichen des Proteins, die nicht durch die massenspektrometrische Analyse nicht abgedeckt waren.

Die *para*-Nitrobenzyl-Esterase (*p*NB-Est; E.C. 3.1.1.1) aus *Bacillus subtilis* ist eine 489 Aminosäuren umfassende  $\alpha/\beta$ -Hydrolase (OLLIS *et al.*, 1992), die aus 13 zentralen  $\beta$ -Faltblättern und 15 flankierenden  $\alpha$ -Helices besteht (SPILLER *et al.*, 1999). Die katalytische Triade dieses Enzyms besteht aus den Aminosäuren Ser<sub>189</sub>, His<sub>399</sub> und Glu<sub>310</sub>. Das seltene Vorhandensein von Glutamat anstatt von Aspartat als Säurefunktion innerhalb der katalytischen Triade teilt die *para*-Nitrobenzyl-Esterase mit der Acetylcholin-Esterase (JAENICKE & BÖHM, 1998). Das nukleophile Serin ist bei der *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *B. subtilis* innerhalb des Pentapeptides G<sub>187</sub>-E<sub>188</sub>-S<sub>189</sub>-A<sub>190</sub>-G<sub>191</sub> lokalisiert. Die an der Ausbildung des „oxyanion hole“ beteiligten Aminosäuren konnten SPILLER *et al.* (1999) ebenfalls durch die Veröffentlichung der Kristallstruktur identifizieren: an der Ausbildung sind die Aminosäuren Ala<sub>107</sub> und Gly<sub>106</sub> beteiligt. Aufgrund der Größe von 54 kDa und der hohen Sequenzhomologie zur eukaryotischen Acetylcholin-Esterase und Darm- und Leber-

Carboxyl-Esterasen wird die *para*-Nitrobenzyl-Esterase der Familie VII der lipolytischen Gene zugeordnet (ARPIGNY & JÄGER, 1999).

Anhand der aus der Sequenzierung aktiver Genombank-Klone hervorgegangenen Daten wurden Primer abgeleitet, die Esterase-Gene amplifiziert (Schnittstellen *NdeI* und *SapI*) und in den Expressionsvektor pTYB1 kloniert. Für weiterführende biochemische Analysen wurden die *para*-Nitrobenzyl-Esterasen heterolog in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt (Kap. 5.4).

### 5.3 Die *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *Bacillus licheniformis* DSM13

Im Rahmen der Sequenzierung des Genoms des Typstammes *Bacillus licheniformis* DSM13 (VEITH *et al.*, 2004; Accession Number: AE017333) wurde ein Gen als *para*-Nitrobenzyl-Esterase annotiert (Accession Number AAU39577.1), zu dessen Genprodukt bisher keine biochemischen Daten vorlagen. Aufgrund dieser Annotation wurde die Esterase aus dem Typstamm *Bacillus licheniformis* DSM13 mit den in der vorliegenden Arbeit isolierten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen und der *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus dem Modellstamm *Bacillus subtilis* 168 verglichen. Dieser Vergleich auf Aminosäureebene zeigte, dass die *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *Bacillus licheniformis* DSM13 lediglich eine Sequenzidentität von 58-60% zu den anderen aufgeführten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen aufzeigte (Tab. 4.4). Da *pNB-Est13* ebenso wie die anderen untersuchten Esterasen die Fähigkeit besitzt Dialkylphthalate zu hydrolysieren (Kap. 4.6), wurde dieses Enzym ebenfalls in den experimentellen Teil dieser Arbeit aufgenommen.

Abgeleitet aus dem Sequenz-Alignment (Abb. 4.6) sind die katalytisch aktiven Aminosäuren aufgrund der Homologien zu den beiden anderen beschriebenen Esterasen *pNB-Est17* und *pNB-Est19* aller Wahrscheinlichkeit nach Ser<sub>187</sub>, His<sub>399</sub> und Glu<sub>308</sub>. Das katalytisch aktive Serin selbst ist demnach ebenso wie bei den Esterasen *pNB-Est17* und *pNB-Est19* im strikt konservierten Pentapeptid G<sub>185</sub>-E<sub>186</sub>-S<sub>187</sub>-A<sub>188</sub>-G<sub>189</sub> lokalisiert. Der letztendlich zu führende Beweis hierfür wurde in dieser Arbeit nicht erbracht. Der Austausch der katalytisch aktiven Aminosäuren und die daraus zu erwartenden Aktivitätsverluste würden die Beteiligung an der Hydrolysereaktion bestätigen (z.B. Eggert, 2001).

Anhand der bekannten Sequenzen der flankierenden Bereiche (VEITH *et al.*, 2004) der Esterase *pNB-Est13* konnten die Primer für eine Amplifizierung mittels PCR abgeleitet werden. Die eingefügten Restriktions-Schnittstellen (*NdeI* und *XhoI*) bildeten die Grundlage

für die Klonierung des mittels PCR amplifizierten Gens in den Expressionsvektor pET26b(+), dessen Expression und chromatographischer Reinigung der Esterase.

#### **5.4 Reinigung der *para*-Nitrobenzyl-Esterasen durch Affinitätschromatographie**

Die in die Expressionsvektoren klonierten Esterasen *pNB-Est17*, *pNB-Est19* (jeweils pTYB1-Vektor) und *pNB-Est13* (pET26b(+)-Vektor) wurden in *E. coli* transformiert und exprimiert. Von allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Esterasen wurden Fusionsproteine (Intein- bzw. Poly-Histidin-Tag) hergestellt, die durch Affinitätschromatographie in einem Einschnitt-Verfahren bis zur biochemischen Homogenität gereinigt werden konnten (Kap. 4.5.2). Da für alle im Rahmen dieser Arbeit subklonierten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen eine enzymatische Aktivität nach Affinitätschromatographie detektiert wurde, eigneten sich die so präparierten Enzyme ohne Einschränkungen für eine weitere enzymologische Charakterisierung.

#### **5.5 Biochemische Charakterisierung der *para*-Nitrobenzyl-Esterasen *pNB-Est17*, *pNB-Est19* und *pNB-Est13***

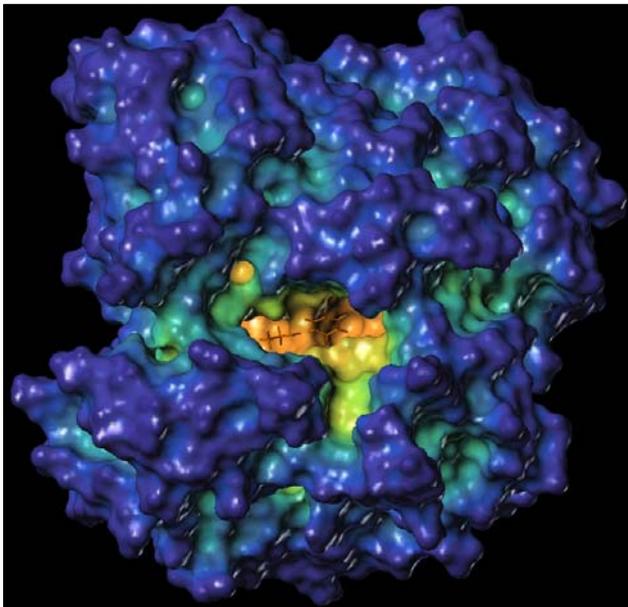
Im Rahmen der vergleichenden biochemischen Charakterisierung der *pNB-Est17*, *pNB-Est19* und *pNB-Est13* wurden die Substratspezifitäten mit Dialkylphthalaten mit unterschiedlicher Kettenlänge und Orientierung der Seitenketten als Substrat bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden separat und ausführlich in den Kapiteln 5.5.1 und 5.5.2 diskutiert.

Die esterolytische Aktivität der in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Esterasen wurde mit der von CHEN *et al.* (1995b) beschriebenen Methode mit *para*-Nitrophenyl-Acetat als Substrat bestimmt. Bei einem direkten Vergleich zeigt die von CHEN *et al.* (1995b) untersuchte *para*-Nitrobenzyl-Esterase eine mit 189 U/mg zum Teil erheblich größere spezifische Aktivität.

Für die Esterasen *pNB-Est17*, *pNB-Est19* und *pNB-Est13* wurde die Substratspezifität gegenüber *para*-Nitrophenyl-Estern unterschiedlicher Kettenlänge bestimmt. Dabei wiesen *pNB-Est17* und *pNB-Est19* trotz der hohen Homologie zueinander Unterschiede in der Kettenlänge der bevorzugten Substrate auf. *pNB-Est17* zeigte die höchste spezifische Aktivität bei *para*-Nitrophenyl-Butyrat wohingegen *pNB-Est19* und *pNB-Est13* die höchste spezifische Aktivität mit *para*-Nitrophenyl-Caproat aufwiesen. Diese Ergebnisse belegen eine Präferenz der untersuchten Esterasen gegenüber kurzkettigen Estersubstraten. Die Bevorzugung von kurzkettigen Estern als Substrat konnte für *pNB-Est13* durch Verwendung

von Triglyceriden und Methylestern unterschiedlicher Kettenlänge verifiziert werden. Bei den Methylestern wurde Methylcaproat (C6-Kette) am besten umgesetzt, wohingegen bei den untersuchten Triglyceriden das Tributyrin (C4-Kette) die höchste spezifische Aktivität der *p*NB-Est13 hervorbrachte. Die Hydrolyse von kurzkettigen *para*-Nitrophenyl-Estern, Triglyceriden und Methylestern ist ein Charakteristikum für Carboxyl-Esterasen und wurde für *Bacillus*-Esterasen (PRIM *et al.*, 2001; DRÖGE *et al.*, 2004, 2001; ATESLIER & METIN, 2006; KARPUSHOVA *et al.*, 2005; KAISER *et al.*, 2006; Tab. 2.2) und Esterasen anderer Gattungen (BERGER *et al.*, 1998; REITER *et al.*, 2000; SUGIHARA *et al.*, 1994; VIDEIRA *et al.*, 2003) vielfach beschrieben.

Mögliche Ursache für die Bevorzugung von kurzkettigen Estersubstraten könnten die sterische Hinderungen bei längererkettigen Substraten sein. Die in Abb. 5.1 dargestellte dreidimensionale Struktur der *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *Bacillus subtilis* (Protein Database ID 1qe3; SPILLER *et al.*, 1999) zeigt eine tief im Inneren des Enzyms liegende katalytische Tasche. Diese Tiefe lässt eine sterische Hinderung der Bindung langkettiger Substrate vermuten, so dass diese Substrate nicht hydrolysiert werden können.



**Abb. 5.1: Dreidimensionale Ansicht der *p*NB-Est aus *B. subtilis* (Protein Database ID 1qe3; SPILLER *et al.*, 1999).** Die Färbungen des Enzyms spiegeln die jeweilige Lage der Bereiche wider; blau: Oberfläche; gelb/orange: im Inneren des Enzyms. Zur Verdeutlichung der möglichen Lage eines Substrates wurde Ethylbenzoat zum Zeitpunkt der Esterolyse in die dreidimensionale Struktur des Enzyms modelliert. Für die Darstellung und die Modellierung der Esterase wurde das Programm SYBYL verwendet.

Für die *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus dem Stamm *B. licheniformis* DSM13 (*p*NB-Est13) wurde die höchste esterolytische Aktivität bei einer Temperatur von 50°C ermittelt. Diese optimale Temperatur für enzymatische Aktivität setzt sich zusammen aus der Überlagerung von Temperaturzunahme und damit Aktivitätserhöhung und gleichzeitiger thermischer Denaturierung. Das ermittelte Temperatur-Optimum stimmt mit der optimalen Wachstumsrate

für *B. licheniformis* DSM13 annähernd überein (51°C; WARTH, 1977) und deutet auf geringfügig thermophiles Verhalten hin. Im Vergleich zu den in Tab. 2.2 aufgeführten *Bacillus*-Esterasen konnte ein ähnliches Temperatur-Optimum bei CHEN *et al.* (1995b), KARPUSHOVA *et al.* (2005) und ALVAREZ-MACARIE *et al.* (1999b) gefunden werden. Deutlich höhere Temperatur-Optima zeigten die von ATESLIER & METIN (2006), MANCO *et al.* (1994), MATSUNAGA *et al.* (1974), HENKE & BORNSCHEUER (2002) und MOLINARI *et al.* (1996) beschriebenen Esterasen.

Der irreversible Einfluss thermischer Einwirkung auf die Enzymstruktur der *pNB-Est13* wurde durch Stabilitätsmessungen nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Bis zu einer Temperatur von 45°C konnte kein Aktivitätsverlust detektiert werden. Bei höheren Temperaturen konnte jeweils eine Restaktivität von 20-30% detektiert werden, die auch nach 15 bzw. 30 Minuten bei 100°C nur auf eine Restaktivität 20-25% sank. Eine vollständige Inaktivierung der Esterase wurde durch Inkubation mit Proteinase K erreicht (Abb. 4.12), so dass eine Autohydrolyse des Substrates als mögliche Fehlerquelle ausgeschlossen werden konnte. Grund für die ermittelten Restaktivitäten könnte eine unvollständige Rückfaltung der Polypeptidkette sein. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Beobachtung, dass nach einer denaturierenden SDS-PAGE und einstündiger Lagerung des Gels in einem Renaturierungspuffer eine esterolytische Aktivität detektierbar war (Ergebnisse nicht dargestellt).

Bei der Untersuchung der pH-abhängigen Temperaturstabilität erwies sich die *pNB-Est13* im alkalischen pH als temperaturstabiler als bei neutralen pH-Werten. Da der pH-Wert den Ladungszustand ionisierbarer Seitenketten beeinflusst, könnte dies ein Grund für eine Stabilisierung der Enzymstruktur durch ionische Wechselwirkungen sein. Entgegengesetztes gilt für die Beobachtung, dass *pNB-Est13* bei pH-Wert von 5 und Temperaturen ab 50°C *pNB-Est13* präzipitiert. Der theoretisch ermittelte isoelektrische Punkt der *pNB-Est13* liegt bei 4,7. Da am isoelektrischen Punkt die Löslichkeit eines Proteins bedingt durch eine Nettoladung von Null am geringsten ist und weil die gegenseitige Abstoßung der Enzyme dann sehr gering ist, tendieren Proteine zur Aggregation und fallen aus.

Für *pNB-Est13* konnte ein breiter pH-Bereich detektiert werden, in dem das Enzymprotein höchste enzymatische Aktivität aufwies. Für die meisten bereits beschriebenen Esterasen aus *Bacillus* sp. konnte bisher ein bestimmter pH-Wert als Optimum der Aktivität gefunden werden. Ausnahmen bilden dabei die von PRIM *et al.* (2001) charakterisierte Esterase (pH 6-9,5; Tab. 2.2) und die in der vorliegenden Arbeit dargestellte Esterase *pNB-Est13* (pH 7-10

bzw. 10,5; Kap. 4.7.4). Die Untersuchungen zur pH-Stabilität deuteten auf eine gleich bleibende Stabilität bei den pH-Werten von 6-9 hin.

Bei den Untersuchungen des Einflusses von Metallsalzen und Detergenzien mit *p*NB-Est13 führten  $Mn^{2+}$  (ca. 10%) und Tween 20 (ca. 23%) zu einer geringen Erhöhung der enzymatischen Aktivität.  $Ca^{2+}$ -Ionen, welche bei KAISER *et al.* (2006) zu einer Erhöhung der enzymatischen Aktivität führten und bei bakteriellen Lipasen stabilisierenden Effekte (*Pseudomonas aeruginosa*; NARDINI *et al.*, 2000) ausüben, zeigten keinen Einfluss. Die ausgehend von der Aminosäure-Sequenz am höchsten homologe und biochemisch charakterisierte Esterase aus *Bacillus* sp. BP-7 (PRIM *et al.*, 2001) zeigte starke inhibitorische Einflüsse durch  $Zn^{2+}$  und  $Ag^+$ , wie sie für die *p*NB-Est13 dargestellt wurden (Kap. 4.7.9). Zusätzlich scheinen beide Esterasen leicht durch  $Mn^{2+}$ -Ionen aktiviert zu werden. Die von PRIM *et al.* (2001) untersuchte Esterase zeigte jedoch auch bei fast allen Metallsalzen eine Aktivitätssteigerung von 14-39%, wohingegen *p*NB-Est13 von den meisten getesteten Metallsalzen unbeeinflusst blieb.

SDS führte nach Einwirkung auf die *p*NB-Est13 innerhalb des biochemischen Assays zu einer vollständigen Inhibierung der enzymatischen Aktivität. Durch Renaturierung der Esterase im SDS-PAGE-Gel konnte diese Inhibierung reversibel gestaltet werden (s.o.). Die Erhöhung der enzymatischen Aktivität nach Zusatz von Tween 20 könnte auf eine veränderte Beweglichkeit des Enzyms zurückzuführen sein.

### **5.5.1 Die untersuchten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen zeigen gegenüber Dimethylphthalaten unterschiedliche Substratspezifitäten**

Ein zentraler Teil der biochemischen Charakterisierung bestand in der Bestimmung kinetischer Parameter der untersuchten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen gegenüber unterschiedlichen Dialkylphthalaten als Substrat. Der Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Daten ist aufgrund ungleicher Bestimmungsmethoden für die enzymatische Aktivität jedoch nur bedingt möglich. KAYANO *et al.* (1997) verwendeten gaschromatographische Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivität, wohingegen AKITA *et al.* (2001) einen HPLC-basierten Assay einsetzten. Neben der Bestimmung der enzymatischen Reaktionsprodukte durch Gaschromatographie bzw. HPLC wurden bei KURANE *et al.* (1984) und MENTLEIN & BUTTE (1989) die Enzymaktivitäten wie in der vorliegenden Arbeit mittels Titration bestimmt. Die titrimetrische Messmethode hat den Vorteil eines geringeren apparativen Aufwandes. Als nachteilig sei die geringere Sensitivität der titrimetrischen

Messmethoden genannt, bei der vergleichsweise große Mengen an Reinezym einzusetzen sind.

Der Vergleich der unterschiedlichen Orientierungen der funktionellen Methyl-Seitenketten durch eine Dialkylphthalat-Hydrolase wurde bereits durch KURANE *et al.* (1984) beschrieben. Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass bei Dimethylphthalat (DMP) als Substrat eine höhere Aktivität durch die Lipase aus *Nocardia erythropolis* detektiert wurde als bei Dimethylisophthalat (DMIP). Gegenüber Dimethylterephthalat (DMT) zeigte diese Lipase dagegen keine Aktivität. Die Hydrolase aus *Thermobifida fusca* (ehemals *Thermomonospora fusca*) zeigte im Vergleich von *para*- und *ortho*-orientierten Seitenketten eine höhere Aktivität bei Estern der Terephthalsäure (DECKWER *et al.*, 2001). Dimethylisophthalsäure wurde hierbei nicht berücksichtigt.

Die in dieser Arbeit charakterisierten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen zeigten gegenüber allen eingesetzten Dimethylphthalaten (*ortho*-, *meta*-, und *para*-Orientierung) eine enzymatische Aktivität. Dabei wurde die höchste spezifische Aktivität bei *pNB-Est17* bei Dimethylterephthalat (DMT) detektiert und bei *pNB-Est19* gegenüber Dimethylterephthalat (DMT) und Dimethylphthalat (DMP). Für beide Enzyme gilt, dass die geringste Aktivität bei Dimethylisophthalat (DMIP) gemessen wurde. Die *para*-Nitrobenzyl-Esterase aus *B. licheniformis* DSM13 zeigte ein entgegengesetztes Verhalten: die Präferenz lag deutlich auf Seiten des Dimethylisophthalat (DMIP) gefolgt Dimethylphthalat (DMP) und Dimethylterephthalat (DMT). Verglichen mit der von AKITA *et al.* (2001) ermittelten spezifischen Aktivität der Dialkylphthalat-Hydrolase aus *Micrococcus* sp. YGJ1 gegenüber Dimethylphthalat (15,9 U/mg) zeigen *pNB-Est17* (14,09U/mg) und *pNB-Est19* (15,76 U/mg) einen ähnlich hohen Wert. *pNB-Est13* zeigt demgegenüber eine geringere Aktivität (9,11 U/mg). Die aus der Rattenleber stammenden und von MENTLEIN und BUTTE (1989) untersuchten Esterasen wiesen gegenüber Dimethylphthalat eine spezifische Aktivität von 4,96 bzw. 5,41 U/mg auf und haben demnach auch die geringsten Aktivitäten aller bisher beschriebenen Esterasen gegenüber diesem Substrat.

Der Zerfall des Substrat-Enzym-Komplexes über das Acyl-Enzym zur Säure und freien Enzym wird im vereinfachten Fall durch die Wechselzahl (*turnover number*,  $k_{cat}$ ) beschrieben. Bei vergleichbar niedrigen  $k_M$ -Werten der untersuchten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen mit Dimethylisophthalat (DMIP) als Substrat, muss - aufgrund der viel größeren spezifischen Aktivität - die Wechselzahl der *pNB-Est13* deutlich größer sein als die der *pNB-Est17* bzw. *pNB-Est19*. Dieser Zusammenhang konnte nachgewiesen werden und spiegelt sich auch in dem höchsten Werten der katalytischen Effizienz wider.

Die jeweils höchsten  $k_M$ -Werte wurden bei Dimethylphthalat als Substrat erhalten, was auf eine mögliche sterische Hinderungen beim Eintritt des Substrates in die Substratbindungstasche zurückzuführen sein könnte. Im Gegensatz dazu ermittelten MENTLEIN und BUTTE (1989) mit 0,95 bzw. 1,92 mM und AKITA *et al.* (2001) mit 1,85 mM sehr viel geringere Affinitäten zum katalytischen Zentrum.

Diese Arbeit stellt den ersten Vergleich der enzymatischen Aktivität von Esterasen gegenüber Dimethylphthalsäureestern mit unterschiedlicher Orientierung der Seitenketten als Substrat dar, bei dem alle Substrate hydrolysiert werden. Aufgrund fehlender Daten in der Literatur können die Werte für die katalytische Konstante ( $k_{cat}$ ) und der katalytischen Effizienz ( $k_{cat}/k_M$ ) nur unter den in dieser Arbeit beschriebenen Enzymen verglichen werden (Kap. 4.7.7.3).

### 5.5.2 Mit zunehmender Kettenlänge der Phthalsäureester sinkt der $k_M$ -Wert

Die Kettenlängenspezifität gegenüber Phthalsäureestern ist bisher genauer beschrieben worden als der Einfluss der Orientierung der Seitenketten. So zeigten KURANE *et al.* (1984), dass mit zunehmender Kettenlänge die spezifische Aktivität der Hydrolase aus *Nocardia erythropolis* ansteigt. Gleiches Verhalten erhielten AKITA *et al.* (2001): die spezifische Aktivität der *Micrococcus* sp. YGJ1 - Esterase stieg von Dimethylphthalat (15,9 U/mg) über Diethylphthalat (26,8 U/mg) auf Dibutylphthalat (39 U/mg). Den Untersuchungen von KAYANO *et al.* (1997) zufolge konnte zwischen Diethylphthalat (DEP; 19,8 U/mg) und Dibutylphthalat (DBP; 19,5 U/mg) nur ein geringer Aktivitätsunterschied gemessen werden. Für die Esterase „pI 5,6“ konnte bei zunehmender Kettenlänge der Phthalsäureester eine abnehmende spezifische Aktivität detektiert werden (MENTLEIN und BUTTE, 1989). Die in der gleichen Arbeit gegenüber Phthalsäureestern charakterisierte Esterase „pI 6.2/6.4“ hingegen zeigte eine Aktivitätszunahme von Dimethyl- zu Diethylphthalat und eine wieder abnehmende Aktivität zu Dibutylphthalat. Für die Darstellung der spezifischen Aktivitäten in Abbildung 4.22 wurde eine Übertragbarkeit der unterschiedlichen Bestimmungsmethoden für die enzymatischen Aktivitäten angenommen (Kap. 5.5.1). Demnach besitzen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Esterasen pNB-Est17 und pNB-Est19 die höchste bisher beschriebene spezifische Aktivität gegenüber Dibutylphthalat. Die Verringerung der spezifischen Aktivität bei Diethylphthalat und die starke Erhöhung der spezifischen Aktivität bei Dibutylphthalat als Substrat (pNB-Est17 und pNB-Est19) stellte einen Verlauf dar, der bei den bisher in der Literatur beschriebenen Enzymen nicht detektiert wurde. Die Abnahme der

spezifischen Aktivitäten mit zunehmender Kettenlänge der Phthalsäureester wurde in der vorliegenden Arbeit bei der *p*NB-Est13 detektiert. Dieser Verlauf deckt sich mit den von MENTLEIN und BUTTE (1989) für die Esterase „pI 5,6“ ermittelten Werten (Abb. 4.22).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen konnte eine Abnahme der  $k_M$ -Werte mit zunehmender Kettenlänge nachgewiesen werden (Tab. 4.10 bis Tab. 4.12). Für alle bisher in der Literatur beschriebenen Dialkylphthalat-Hydrolasen wurden die gleichen Beobachtungen gemacht. Ein möglicher Grund für die Zunahme der Affinität des Substrates zum Enzym könnte in hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Phthalsäure-Seitenketten und den Aminosäuren der Substrat-Bindungstasche liegen.

### **5.5.3 Hydrolyseprodukt nach Inkubation der *p*NB-Esterasen mit Dialkylphthalaten ist jeweils der korrespondierende Monoester**

Im Rahmen der biochemischen Charakterisierung der *para*-Nitrobenzyl-Esterasen wurden die bei der enzymatischen Hydrolyse von Phthalsäure-, Isophthalsäure- und Terephthalsäureester entstehenden Reaktionsprodukte mittels GC/MS identifiziert. Die Identifizierung erfolgte durch direkten Vergleich der erhaltenen Masse/Ladungs-Spektren mit der WILEY-Datenbank. Anhand dieser Analysen konnte gezeigt werden, dass die eingesetzten Dialkylphthalate durch die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen *para*-Nitrobenzyl-Esterasen zum jeweils korrespondierenden Monoester hydrolysiert wurden. Zu den gleichen Ergebnissen kamen MENTLEIN und BUTTE (1989) mit gereinigten Carboxyl-Esterasen aus Menschen- und Rattenlebern und AKITA *et al.* (2001) mit einer Dialkylphthalat-Hydrolase aus *Micrococcus* YGJ1. Nach MARUYAMA *et al.* (2005) ist der Grund für die Bildung des Monoesters bei Phthalsäureestern in der unmittelbaren Nähe der beiden Estergruppen zu suchen. Demnach würde das durch die Hydrolyse der ersten Esterfunktion entstehende Carboxylat-Ion durch elektrostatische Abstoßung mit dem nukleophilen Serin der katalytischen Triade eine weitere Hydrolyse zur freien Dicarbonsäure verhindern.

Es konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass auch die Hydrolyse von Dimethyl- und Diethylterephthalsäure nur zu dem jeweiligen Monoester als Reaktionsprodukt führte. In Falle der Terephthalsäureester liegt das entstehende Carboxylat-Ion nicht mehr in unmittelbarer Nähe der zu hydrolysierenden Estergruppe, sondern wird durch das aromatische System von diesem getrennt. Daher muss angenommen werden, dass ein direkter Einfluss des nukleophilen Serins vermutlich nicht die Ursache der Monoesterbildung ist, sondern andere Aminosäurereste im Bereich der Substrat-Bindungstasche. Dass geladene Ester eher schlechte

Substrate für Carboxyl-Esterasen sind, konnte bereits durch MENTLEIN *et al.* (1984) und durch HEYMANN (1980) gezeigt werden. Die Vermutung, dass der neben dem nukleophilen Serin befindliche Glutamarest (Glu<sub>188</sub>) aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen zur Bildung des Monoesters führt, konnte nicht bewiesen werden. Der Austausch von Glu<sub>188</sub> gegen Ala<sub>188</sub> führte zu einer fast kompletten Inaktivierung des Enzyms (Ergebnisse nicht dargestellt). Möglicherweise sorgt eine negative Ladung innerhalb des katalytischen Zentrums für eine elektrostatische Abstoßung des gebildeten Carboxylat-Ions, so dass das Enzym möglichst schnell für eine neue Hydrolyse-Reaktion zur Verfügung steht. Nach dieser Vermutung ist die fast komplette Inaktivierung des Enzyms mit dem Aminosäure-Austausch an Position 188 möglicherweise darauf zurückzuführen, dass das hydrolysierte Substrat in der Substratbindungstasche verbleibt. Zudem besteht die Möglichkeit, dass ein Austausch einer Aminosäure im Bereich der Bindungstasche aufgrund einer veränderten Tertiärstruktur zur Inaktivierung führt. Diese Vermutung wurde durch die Ergebnisse beim rationalen Protein-Design verstärkt: die durchgeführten Aminosäure-Austausche führten jeweils zu einer verringerten enzymatischen Aktivität (4.8.6).

Durch MARUYAMA *et al.* (2005) und NISHIOKA *et al.* (2006) konnten zwei Esterasen beschrieben werden, die eine enzymatische Aktivität gegenüber Monoalkylphthalaten aufwiesen, d.h. diese Esterasen sind fähig, geladene Substrate zu hydrolysieren, zeigen aber keine Aktivität gegenüber ungeladenen Dialkylphthalaten. Die Extraktion und die Methylierung der Reaktionsprodukte nach Inkubation einer gereinigten Lipase aus *Nocardia erythropolis* mit Diethylhexylphthalat führte zu Dimethylphthalat (DMP; KURANE *et al.* (1984). Demnach wurden bei der Hydrolyse beide möglichen Estergruppen gespalten, was wiederum zu der Überlegung führt, dass sowohl ungeladene Dialkylphthalate als auch geladene Monoalkylphthalate als Substrate akzeptiert wurden.

## 5.6 PET-Dimer als neues Modellsubstrat

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Substrat (Bis-(*p*-methylbenzoesäure)-ethylenglykolester) synthetisiert, welches als Modellester für eine zukünftige Bearbeitung der enzymatischen Polyethylterephthalat-Hydrolyse (PET) genutzt werden könnte. Dieses Substrat wurde mittels <sup>1</sup>H-NMR sowie Schmelztemperaturanalyse identifiziert. Verglichen mit den in der Literatur beschriebenen Modellestern bietet das PET-Dimer einige Vorteile: so kann das PET-Dimer in einem einzigen Syntheseschritt schnell und in großer Reinheit hergestellt werden. Das von FISCHER-COLBRIE *et al.* (2004) beschriebene PET-Trimer hingegen wird in einem

---

zwei Schritte umfassenden Verfahren synthetisiert. Das cyclische PET-Trimer, ein nicht erwünschtes Beiprodukt bei der Synthese von PET-Fasern muss aufwendig gereinigt werden. Die von MARTEN *et al.* (2003) vorgestellten Modellester hingegen weisen einen zu großen Abstand (C4-Kette) zwischen den aromatischen Systemen auf (Kap. 8.7).

Alle bisher in der Literatur beschriebenen Modellester wurden entweder zur Isolierung von Mikroorganismen innerhalb von Anreicherungskulturen eingesetzt oder dienten als Substrat zur vergleichenden Untersuchung von Enzymen innerhalb von biochemischen Aktivitätsmessungen. Mit dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Modells substrat konnte ein *high-throughput-screening*-System entwickelt und etabliert werden, welches esterolytische Aktivität durch die Bildung von Klärungszonen im Substrat-getrübten Agar anzeigt. Ein analoges Prinzip wurde bereits für lipolytische Enzyme mit dem Substrat Tributyrin (KOK *et al.*, 1993) und für proteolytische Enzyme mit Casein (Magermilchpulver) als Substrat (HORIKOSHI, 1999) beschrieben. Gelten Tributyrin und Casein als allgemeine Substrate für Esterasen/Lipasen bzw. Proteasen stellt das PET-Dimer und die daraus erstellten Agarplatten ein neues *screening*-System dar, welches zugeschnitten auf die speziellen Anforderungen eines *screenings* für PET-hydrolysierende Enzyme ist.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Methode zur Einbindung des PET-Dimers in eine Agarmatrix ermöglicht ein schnelles und effektives mikrobiologisches *screening*, welches während der Bearbeitung dieses Manuskriptes genutzt wurde, um einige Mikroorganismen (Bakterien und Pilze) mit potentiellen PET-Esterasen zu isolieren. Auf Grundlage dieses Agarplatten-Assays können nach erfolgreicher Isolierung von potentiell tauglichen Organismen Genombanken angelegt und aktive Klone isoliert werden.

Ein weiterer Nutzen des *high-throughput-screening*-Systems bestand in der schnellen Identifizierung von Enzymen mit verbesserten Eigenschaften gegenüber dem PET-Dimer als Substrat. Die prinzipielle Funktionalität des PET-Dimer-Agarplatten-Assays als Grundlage für die Identifizierung verbesserter Enzyme konnte durch die Isolierung zweier Mutanten mit deutlich größeren Lysehöfen bewiesen werden (4.8.5). Auch die im Kapitel 2.2.3 dargelegten Methoden bieten die Möglichkeit die Aktivität der untersuchten Esterasen gegenüber PET-Dimer zu erhöhen.

Aufgrund ihrer Homologie zueinander bieten die in der vorliegenden Arbeit isolierten und charakterisierten *para*-Nitrobenzyl-Esterasen die Möglichkeit, in weiterführenden Arbeiten durch homologieabhängige rekombinative Methoden verbessert zu werden. Dafür stehen eine Vielzahl an bereits beschriebenen Methoden zur Verfügung: u.a. *DNA-Shuffling* (STEMMER, 1994; a, b), *Family-Shuffling* (CRAMERI *et al.*, 1998), *Mutagenic and Unidirectional*

---

*Reassembly* (MURA; SONG *et al.*, 2002), *Assembly of Designed Oligonucleotides* (ADO; ZHA *et al.*, 2003), *Recombined Extension on Truncated Templates* (RETT; LEE *et al.*, 2003).

Der apparative Aufwand zur Durchführung des *high-throughput-screening* auf PET-Dimer-Basis ist als gering einzustufen und im Vergleich mit dem Agarplatten-Assay mit Diethylphthalsäure (DEP, Kap. 3.10) zeigten die PET-Dimer-Platten eine deutlich längere Haltbarkeit (bis zu drei Monate).

## 5.7 Enzymatische Hydrolyse von PET-Nanopartikeln

Zielsetzung bei der Entwicklung von Kunststoffen war die möglichst hohe Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen und herausragende mechanische und thermische Eigenschaften (WELZEL *et al.*, 2002). Polyethylenterephthalat (PET) besitzt diese Materialeigenschaften, die in einer intensiven Nutzung als Verpackungsmittel resultieren. Die nahezu unbegrenzte Haltbarkeit dieses Werkstoffes vor dem Hintergrund steigender Abfallproblematiken führte zu einer intensiven Forschung im Bereich der biologisch abbaubaren Polymerwerkstoffe, die als alternative Verpackungsmittel einsetzbar scheinen. Zu diesen biologisch abbaubaren Polymerwerkstoffen zählen nach WITT *et al.* (1999) jene, die auf Basis nachwachsender Rohstoffe hergestellt werden können (z.B. Polyhydroxybutyrat, Polymilchsäure) und jene, die auf fossiler Basis erzeugt werden (z.B. Polycaprolacton, Polybutylensuccinat, aliphatisch-aromatische Co-Polyester). Für Polymilchsäure und Polyhydroxybutyrat konnten bereits mehrere Enzyme mit einer hydrolytischen Aktivität charakterisiert werden (z.B. HOSHINO & ISONO, 2002; TAKANASHI & SAITO, 2006). Gleiches gilt für Polycaprolacton und Polybutylensuccinat (SANCHEZ *et al.*, 2000) und aliphatisch-aromatische Co-Polyester (z.B. Übersicht MÜLLER *et al.*, 2001).

Nach WITT *et al.* (1999) hat der Anteil an Terephthalsäure in Co-Polyestern einen wesentlichen Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit der Polyester, was im letzten Jahrzehnt zu der Überzeugung führte, dass Polyethylenterephthalat (PET) gegenüber mikrobiellem bzw. enzymatischem Abbau nahezu resistent ist MÜLLER *et al.* (2001). Aktuelle Arbeiten (MÜLLER *et al.*, 2005, 2006; YOON *et al.*, 2002; MCCLOSKEY & JUMP, 2005; FISCHER-COLBRIE *et al.*, 2004; ALISH-MARK *et al.*, 2006; VERTOMMEN *et al.*, 2005; KLEEBERG *et al.*, 2005) zeigten, dass eine enzymatische Modifikation von PET-Materialien und PET-Fasern möglich ist. Anhand der vorliegenden Untersuchungen ergibt sich die Möglichkeit des technischen Einsatzes von PET-Hydrolasen im Bereich Textil- und Waschmittelindustrie. Dabei sind die hoch spezifischen und nicht-destruktiven Modifikationen der Faseroberfläche durch Enzyme

bei milden Reaktionsbedingungen als Vorteil gegenüber chemischen Verfahren zu nennen (GÜBITZ & PAULO, 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte durch die nachgewiesene Konzentrationszunahme an Terephthalsäure-Diethylenglykolester ein Hinweis auf eine enzymatische Hydrolyse (*pNB-Est13*) von PET-Nanopartikeln gegeben werden (Kap. 4.9). Aufgrund der in Kapitel 5.5.3 diskutierten Limitierung dieser Esterase bei der Hydrolyse von geladenen Substraten ergibt sich an einer PET-Oberfläche nur eine begrenzte enzymatische Aktivität. Ob diese Limitierung einer Nutzung der charakterisierten Esterase (*pNB-Est13*) in Waschmitteln entgegen steht, ist Gegenstand weiterführender Untersuchungen innerhalb der Enzymtechnologie der Henkel KGaA, Düsseldorf. Ergänzend wäre ein kombinierter Einsatz mit Dialkyl- und Monoalkylphthalat-Hydrolasen (MARUYAMA *et al.*, 2005; NISHIOKA *et al.*, 2006) denkbar, um eine mögliche Limitierungen bezüglich der Ladung zu minimieren. Ein weiterer Ansatz zur Isolierung und Identifizierung von Organismen mit potentiellen PET-Esterasen wird durch das unter Kapitel 5.6 beschriebene *high-throughput-screening*-System verfolgt. Da bisher die enzymatische Hydrolyse von PET nur von Lipasen und Cutinasen beschrieben wurde (FISCHER-COLBRIE *et al.*, 2004; MCCLOSKEY & JUMP, 2005; ALISH-MARK *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2005; VERTOMMEN *et al.*, 2005) wird im Weiteren verstärkt nach solchen Enzymen *gescreent*.

## 5.8 Sekretion der *pNB-Est19* durch *Bacillus subtilis* TEB1030

Aufgrund hoher Sekretionsleistungen und dem daraus resultierenden geringeren Aufwand im *down-stream-processing* (SIMONEN & PALVA, 1993; WONG, 1995), findet die Gattung der *Bacillaceae* häufig Verwendung in der technischen Produktion von Enzymen (z.B. Proteasen; MAURER, 2004). *B. subtilis* ist dabei von besonderem Interesse, da neben der Entwicklung zum Modellstamm für Gram-positive Organismen auch die Veröffentlichung der kompletten Genomsequenz im Jahre 1997 (KUNST *et al.*) den Stamm molekulargenetisch zugänglich gemacht hat.

Für die Sekretion von Proteinen stehen *B. subtilis* mindestens vier Exportwege zur Verfügung. Den mit Abstand wichtigsten Proteinexportweg stellt das Sec-System (*secretory pathway*) dar. Zusätzlich verfügt *B. subtilis* über mindestens drei weitere Sec-unabhängige Exportwege zu denen das Com-System (*competence development*), das ABC-Transportsystem (ATP-binding cassette) und der Tat-Weg (*twin-arginine translocation*) zählt (TJAMLSMA *et al.*, 2004). Zur Sekretion bestimmte Proteine werden als Präproteine mit einer N-terminalen

Signalsequenz synthetisiert, die den jeweiligen Exportweg bestimmt. Für die extrazelluläre Lipase A aus *B. subtilis* 168 konnte durch JONGBLOED *et al.* (2002) die Sekretion über das Sec-System nachweisen. Die Signalsequenz der Lipase A wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet, um die Sekretierbarkeit der *pNB-Est19* zu untersuchen.

Durch die Verwendung des Lipase A und Lipase B defizienten Stammes *B. subtilis* TEB1030 (EGGERT *et al.*, 2003) sollte die esterolytische Hintergrundaktivität minimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die im Überstand detektierte esterolytische Aktivität im Vergleich zu der parallel durchgeführten Kultivierung mit Leervektor erhöht war. So konnte eine enzymatische Hydrolyse von Diethylterephthalat (DET) durch die Bildung des Monoesters nur nach Inkubation mit Überstand aus den Kultivierungen nachgewiesen werden, bei denen die transformierten Zellen die plasmidcodierte Esterase *pNB-Est19* trugen (Kap. 4.7.11). Die Deletion eines für den Sec-Exportweg essentiellen Proteins oder die Natrium-Azid vermittelte Inhibierung der SecA ATPase Aktivität (NAKANE *et al.*, 1995) könnte im Falle stark gesunkener Sekretionsleistung den Sec-vermittelten Export aus der Zelle beweisen. Es steht noch zu prüfen, ob die sekretierte Esterase korrekt in die vollständige dreidimensionale Struktur gefaltet ist. Eine chromatographische Reinigung der sekretierten Esterase und der Vergleich der spezifischen Aktivitäten gegenüber beispielsweise *para*-Nitrophenyl-Acetat könnten Hinweise auf die vollständige Faltung bzw. Aktivierung des Enzymproteins geben. Des Weiteren könnte eine Erhöhung der Sekretionsleistung durch Veränderungen innerhalb der Signalsequenz erhalten werden (BROCKMEIER *et al.*, 2006b) oder durch die Überexpression von Proteinen, die am Sec-Exportweg beteiligt sind. So konnten durch VAN DIJL *et al.* (1992) und VITIKAINEN *et al.* (2001) durch die Überexpression der Signalpeptidasen SipS und SipT Ausbeutesteigerungen erzielt werden.

Das in Kapitel 4.8 dargestellte und in Kapitel 5.6 diskutierte *high throughput screening*-System könnte beim Nachweis der vollen Enzymaktivität nach der Sekretion für die Methoden der gerichteten Evolution zur Verfügung stehen. Dabei wäre von Vorteil, dass die Detektion von Lysehöfen nicht mehr von der Lyse von Zellen abhängt, sondern durch die Sekretion größtenteils von der reinen enzymatischen Aktivität.

## 6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden drei *para*-Nitrobenzyl-Esterase mit hydrolytischer Aktivität an Dialkylphthalaten biochemisch charakterisiert. Dabei wurden neben Dimethyl-, Diethyl- und Dibutylphthalsäure auch Dimethylisophthalsäure, Dimethyl- und Diethylterephthalsäure als Substrate verwendet. Untersuchungen an länger-kettigen unverzweigten (z.B. Dihexyl- und Dioctylphthalsäure) und verzweigten Seitenketten (z.B. Diethylhexylphthalsäure) könnten die hydrolytischen Grenzen der Esterasen analog zu Triglyceriden und *para*-Nitrophenyl-Estern aufklären. Phthalsäureester mit unterschiedlichen Seitenketten (z.B. Butylbenzylphthalsäure) würden im Falle der enzymatischen Hydrolyse Rückschlüsse über bevorzugte „Schnittstellen“ erlauben.

Das Substratspektrum der untersuchten Esterasen könnte durch Messungen mit Vinyl- bzw. Isopropylglycerolester und weiteren Estern erweitert werden. Die aktuell häufig untersuchten Eigenschaften von Esterasen und Lipasen zur Stabilität und Estersynthese in organischen Lösungsmitteln und die mögliche Herstellung enantiomerenreiner Verbindungen würde beim Nachweis die potentielle technische Nutzbarkeit bewertbar machen.

Kenntnisse über die Faltung der Polypeptidkette und über die Funktion auf molekularer Ebene der *p*NB-Est13 würde die Auflösung der dreidimensionalen Struktur mit röntgenkristallographischen Analysemethoden erbringen. Anhand der dreidimensionalen Struktur könnten Ansätze zum rationalen Proteindesign verfolgt werden.

Die bei der *ep*PCR erzeugten und aufgrund größerer Lysehöfe im Vergleich zum Wildtypenzym (*p*NB-Est13) isolierten Mutanten müssen sequenziert und die Position der Aminosäureaustausche identifiziert werden. Die vermutete Aktivitätssteigerung muss anschließend experimentell verifiziert werden. Auf Basis der in den Kapiteln 2.2.3 und 5.6 erwähnten Methoden der gerichteten Evolution besteht die Möglichkeit, weitere Mutanten mit erhöhter spezifischer Aktivität gegenüber dem PET-Dimer zu erzeugen. Weiterführende Untersuchungen an Esterasen (bzw. durch Methoden der gerichteten Evolution verbesserten Esterasen) und Lipasen mit PET-Nanopartikeln als Substrat und der analytischen Identifizierung von Hydrolyseprodukten werden angestrebt, ebenso die Evaluierung der Leistung dieser Enzyme als Waschmitteladditiv.

Für einen potentiellen Einsatz der in Rahmen dieser Arbeit untersuchten Esterasen in Waschmitteln müssen anwendungsbezogene Test innerhalb einer Waschmittelmatrix durchgeführt werden. Die enzymatische Aktivität sollte in Anwesenheit von Stabilisatoren, Bleichmitteln und proteolytischer Einwirkung hinreichend stabil sein. Diese Eigenschaften

und auch die mögliche Reduktion von *pilling*-Strukturen, eine *soil-release*-Wirkung und / oder eine Hydrophilisierung der PET-Faseroberfläche sind im Rahmen weiterführender Arbeiten bei der Henkel KGaA, Düsseldorf geplant.

---

## 7 Literaturverzeichnis

**Airaksinen A., Hovi T., (1989).** Modified base compositions at degenerate positions of a mutagenic oligonucleotide enhance randomness in site-saturation mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 26(2): 576-581.

**Akita K., Naitou C., Maruyama K., (2001).** Purification and characterization of an esterase from *Micrococcus* sp. YGJ1 hydrolyzing phthalate esters. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65(7): 1680-1683.

**Alisch-Mark M., Herrmann A., Zimmermann W., (2006).** Increase of the hydrophilicity of polyethylene terephthalate fibres by hydrolases from *Thermomonospora fusca* and *Fusarium solani* f. sp. *pisii*. *Biotechnol. Lett.* 28(10): 681-685.

**Alvarez-Macarie E., Augier-Magro V., Guzzo J., Baratti J., (1999a).** Molecular characterization of the gene encoding an esterase from *Bacillus licheniformis* sharing significant similarities with lipases. *Biotechnol. Lett.* 21(4): 313-319.

**Alvarez-Macarie E., Augier-Magro V., Baratti J., (1999b).** Characterization of a thermostable esterase activity from the moderate thermophile *Bacillus licheniformis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(11): 1865-1870.

**Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H., (1995).** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59(1): 143-169.

**Anagnostopoulos C., Spizizen J., (1961).** Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 81: 741-746.

**Arnold F.H., (2001).** Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature* 409(6817): 253-257.

**Arpigny J.L., Jaeger K.-E., (1999).** Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343(1): 177-183.

**Ash C., Farrow J.A.E., Wallbanks S., Collins D., (1991).** Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* 13(4): 202-206.

**Asther M., Haon M., Roussos S., Record E., Delattre M., Lesage-Meessen L., Labat M., Asther M., (2002).** Feruloyl esterase from *Aspergillus niger*: a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. *Process. Biochem.* 38(5): 685-691.

**Ateslier Z.B.B., Metin K., (2006).** Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic *Bacillus* sp.. *Enzyme Microb. Technol.* 38(5): 628-635.

**Benjamin S., Pandey A., (1998).** *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast* 14(12): 1069-1087.

- Bente Konggaard Andersen L., Kim Borch. K.K., Masanobu Abo C.-K., Bo Damgaard, L., (1999).** Method of treating polyester fabrics. US Patent 5997584.
- Berger R., Hoffmann M., Keller U., (1998).** Molecular analysis of a gene encoding a cell-bound esterase from *Streptomyces chrysomallus*. J. Bacteriol. 180(23): 6369-6399.
- Biely P., (2003).** Xylanolytic enzymes. In: Whitaker J.R., Voragen A.G.J., Wong D.W.S. (Hrsg.), Handbook of Food Enzymology. Marcel Dekker, New York and Basel, 879-915.
- Birnboim H., Doly J., (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7(6): 1513-1523.
- Blackman R.L., Spence J.M., Field L.M., Devonshire A.L., (1995).** Chromosomal location of the amplified esterase genes conferring resistance to insecticides in *Mycus persicae* (Homoptera: Aphidae). Heredity 75(3): 297-302.
- Bornscheuer U.T., Altenbuchner J., Meyer H.H., (1999).** Directed evolution of an esterase: screening of enzyme libraries based on pH-indicators and a growth assay. Bioorg. Med. Chem. 7(10): 2169-2173.
- Bornscheuer U.T., (2002).** Microbial carboxyl esterases: classification, properties and applications in biocatalysis. FEMS Microbiol. Rev. 26(1): 93-81.
- Brockmeier U., Wendorff M., Eggert T., (2006a).** Versatile expression and secretion vectors for *Bacillus subtilis*. Curr. Microbiol. 52(2): 143-148.
- Brockmeier U., Caspers M., Freudl R., Jockwer A., Noll T., Eggert T., (2006b).** Systematic screening of all signal peptides from *Bacillus subtilis*: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria. J. Mol. Biol. 362(3): 393-402.
- Bruce J.L., (1996).** Automated system rapidly identifies and characterizes microorganisms in food. Food Technol. 50(1): 77-81.
- Bruce J.L., Hubner R.J., Cole E.M., McDowell C.I., Webster J.A., (1995).** Sets of EcoRI fragments containing ribosomal RNA sequences are conserved among different strains of *Listeria monocytogenes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(11): 5229-5233.
- Brzozowski A.M., Derewenda U., Derewenda Z.S., Dodson G.G., Lawson D.M., Turkenburg J.P., Bjorkling F., Huge-Jensen B., Patkar S.A., Thim L., (1991).** A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. Nature 351(6326): 491-494.
- Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M., (1987).** XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with betagalactosidase selection. BioTechniques 5: 376-378.
- Cadwell R.C., Joyce G.F., (1992).** Randomization of genes by PCR mutagenesis. PCR Methods Appl. 2(1): 28-33.

- Calero-Rueda O., Plou F.J., Ballesteros A., Martinez A.T., Martinez M.J., (2002).** Production, isolation and characterization of a sterol esterase from *Ophiostoma piceae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1599(1-2): 28-35.
- Calero-Rueda O., Gutierrez A., Del Rio J.C., Prieto A., Plou F., Ballesteros A., Martinez A.T., Martinez M.J., (2004).** Hydrolysis of sterol esters by an esterase from *Ophiostoma piceae*: Application to pitch control in pulping of Eucalyptus globulus wood. *Int. J. Biotechnol.* 6(4): 367-375.
- Cambillau C., van Tilbeurgh H., (1993).** Structure of hydrolases: lipases and cellulases. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 3(6): 885-895.
- Cartwright C.D., Owen S.A., Thompson I.P., Burns R.G., (2000).** Biodegradation of diethyl phthalate in soil by a novel pathway. *FEMS Microbiol. Lett.* 186(1): 27-34.
- Castro G.R., Stettler A.O., Ferrero MA., Siñeriz F., (1992).** Selection of an extracellular esterase-producing microorganism. *J. Indust. Microbiol.* 10(3-4): 165-168.
- Chang H.-K., Zylstra G.J., (1998).** Novel organization of the genes for phthalate degradation from *Burkholderia cepacia* DBO1. *J. Bacteriol.* 180(24): 6529-6537.
- Chatterjee S., Dutta T.K., (2003).** Metabolism of butyl benzyl phthalate by *Gordonia* sp. Strain MTCC 4818. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309(1): 36-43.
- Chen J., Fales S.L., Varga G.A., Royse D.J., (1995a).** Biodegradation of cell wall components of maize stover colonize by white rot fungi and resulting impact on *in vitro* digestibility. *J. Sci. Food Agric.* 68(1): 91-98.
- Chen Y.-R., Usui S., Queener S.W., Yu C.-A., (1995b).** Purification and properties of a *p*-nitrobenzyl esterase from *Bacillus subtilis*. *J. Ind. Microbiol.* 15(1): 10-18.
- Chen-Goodspeed M., Sorgorb M.A., Wu F., Raushel F.M., (2001).** Enhancement, relaxation, and reversal of the stereoselectivity for phosphotriesterase by rational evolution of active site residues. *Biochemistry* 40(5): 1332-1339.
- Choi Y.J., Lee B.H., (2001).** Culture conditions for the production of esterase from *Lactobacillus casei* CL 96. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 24(1): 59-63.
- Choi Y.J., Miguez C.B., Lee B.H., (2004).** Characterization and heterologous gene expression of a novel esterase from *Lactobacillus casei* CL96. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(6): 3213-3221.
- Chong S., Mersha F.B., Comb D.G., Scott M.E., Landry D., Vence L.M., Perler F.B., Benner J., Kucera R.B., Hirvonen C.A., Pelletier J.J., Paulus H., Xu M.-Q., (1997).** Single-column purification of free recombinant proteins using self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene* 192(2): 277-281.
- Chong S., Montello G.E., Zhang A., Cantor E.J., Liao W., Xu M.-Q., Benner J., (1998).** Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step. *Nucleic Acids Res.* 26(22): 5109-5115.

- Chopra S., Ranganathan A., (2003).** Protein evolution by “codon shuffling”: a novel method for generating highly variant mutant libraries by assembly of hexamer DNA duplexes. *Chem. Biol.* 10(10): 917-926.
- Cimecioglu A.I., Zeronian S.H., Alger K.W., Collins M.J., (1986).** Properties of oligomers present in poly(ethylene terephthalate). *J. Appl. Polym. Sci.* 32(4): 4719-4733.
- Clark L., Carbon J., (1976).** A colony bank containing synthetic *ColE1* hybrids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9: 91-99.
- Close J.-A., Nielsen P.A., (1976).** Resistance of a strain of *Pseudomonas cepacia* to esters of *p*-hydroxybenzoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 31(5): 718-722.
- Cramer A., Stemmer W.P.C., (1995).** Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of mutant and wild-type sequences. *BioTechniques* 18(2): 194-196.
- Cramer A., Raillard S.-A., Bermudez E., Stemmer W.P.C., (1998).** DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* 391(6664): 288-291.
- Deckwer W.-D., Müller R.-J., Kleeberg I., van den Heuvel J., (2001).** Enzyme which cleaves ester groups and which is derived from *Thermomonospora fusca*. Patentschrift WO01/23581.
- Deguire S., Brisse F., (1988).** The effect of substitution on the conformation in *para*-substituted ethylene glycol dibenzoate molecules. *Can. J. Chem.* 66: 2545-2552.
- Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W., (1988).** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16(13): 6127-6145.
- Dröge M.J., Bos R., Quax W.J., (2001).** Paralogous gene analysis reveals a highly enantioselective 1,2-O-isopropylidenglycerol capraylate esterase of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 268(11): 3332-3338.
- Dröge M.J., Bos., Boesrma Y.L., Quax W.J., (2004).** Comparison and functional characterization of three homologous intracellular carboxylesterases of *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Catal., B. Enzym.* 32(5-6): 261-270.
- Duty S.M., Singh N.P., Silva M.J., Barr D.B., Brock J.W., Ryan L., Herick R.F., Christiani D.C., Hauser R., (2003).** The relationship between environmental exposure to phthalates and DNA damage in human sperm using neutral comet assay. *Environ. Health Perspect.* 111(9): 1164-1169.
- Eaton R.W., Ribbons D.W., (1982).** Metabolism of Dibutylphthalate by *Micrococcus* sp. Strain 12B. *J. Bacteriol.* 151(1): 48-57.
- Eaton R.W., (2001).** Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B. *J. Bacteriol.* 183(12): 3689-3703.
- Eckert K.A., Kunkel T.A., (1990).** High fidelity DNA synthesis by *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 18(13): 3739-3744.

**Eggert T., (2001).** Die lipolytischen Enzyme LipA und LipB von *Bacillus subtilis*: Charakterisierung und Optimierung mit gerichteter Evolution. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum

**Eggert T., Brockmeier U., Dröge M.J., Quax W.J., Jaeger K.-E., (2003).** Extracellular lipases from *Bacillus subtilis*: Regulation of gene expression and enzyme activity by amino acid supply and external pH. FEMS Microbiol. Lett. 225(2): 319-324.

**Eggert T., Pencreac'h G., Douchet I., Verger R., Jaeger K.-E., (2000).** A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase. Eur. J. Biochem. 267(27): 6459-6469.

**Egorova K., Antranikian G., Buchholz S., Verseck S., Trauthwein H., Na'amnieh S., (2003).** Extremophile Amidasen für die enantioselektive Synthese von Amino- und Carbonsäuren. Transkript Sonderband 2003: 54-55.

**Elend C., Schmeisser C., Leggewie C., Babiak P., Carballeira J.D., Steele H.L., Reymond J.-L., Jaeger K.-E., Streit W.R., (2006).** Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. Appl. Environ. Microbiol. 72(5): 3637-3645.

**Engelhardt A., (2003).** The fiber year 2002, The Saurer Group Winterthur, Schweiz.

**Enzyme Nomenclature, (1992).** (Hrsg.: International Union of Biochemistry and Molecular Biology), Academic Press, New York.

**Faulds C.B., Mandalari G., LoCurto R., Bisignano G., Waldron K.W., (2004).** Arabinoxylan and mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's spent grain and wheat bran by feruloyl esterases and glycosyl hydrolases from *Humicola insolens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64(5): 644-650.

**Fernandez L., Beerthuyzen M.M., Brown J., Siezen R.J., Coolbear T., Holland R., Kuipers O.P., (2000).** Cloning, characterization, controlled overexpression, and inactivation of the major tributyrin esterase gene of *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 66(4): 1360-1368.

**Fernandez J., Mohedano A.F., Fernandez-Garcia E., Medina M., Nunez M., (2004).** Purification and characterization of an extracellular tributyrin esterase produced by a cheese isolate, *Micrococcus* sp. INIA 528. Int. Dairy J. 14(2): 135-142.

**Festel G., Knöll J., Götz H., Zinke H., (2004).** Der Einfluß der Biotechnologie auf Produktionsverfahren in der chemischen Industrie. Chemie Ingenieur Technik 76(3): 307-312.

**Figueroa Y., Hinks D., Montero G., (2006).** A heterogeneous kinetic model for the cutinase-catalysed hydrolysis of cyclo-tris-ethylene terephthalate. Biotechnol. Prog. 22(4): 1209-1214.

**Finer Y., Jaffer F., Santerre J.P., (2004).** Mutual influence of cholesterol esterase and pseudocholinesterase on the biodegradation of dental composites. Biomaterials 25(10): 1787-1793.

- Fischer-Colbrie G., Heumann S., Liebminger S., Almansa E., Cavaco-Paulo A., Gübitz G.M., (2004).** New enzymes with potential for PET surface modification. *Biokat. Biotransform.* 22(5/6): 341-346.
- Franken S.M., Rozeboom H.J., Kalk K.H., Dijkstra B.W., (1991).** Crystal structure of haloalkane dehalogenase: an enzyme to detoxify halogenated alkanes. *EMBO J.* 10(6): 1297-1302.
- Ganji S.H., Karigar C.S., Pujar B.G., (1995).** Metabolism of dimethylterephthalate by *Aspergillus niger*. *Biodegradation* 6(1): 61-66.
- Gangolli S.D., (1982).** Testicular effects of phthalate esters. *Environ. Health Perspect.* 45: 77-84.
- Georgescu R., Bandara G., Sun L., (2003).** Saturation mutagenesis. In: Directed evolution library creation. *Methods and protocols.* Arnold, F.H., Georgiou, G. (Hrsg.) Humana Press, New Jersey.
- Ghosh D., Erman M., Duax W.L., (1991).** Crystallization and preliminary diffraction analysis of cholesterol esterase from *Candida cylindracea*. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 38: 663-666.
- Giuliani S., Piana C., Setti L., Hochkoeppler A., Pifferi P.G., Williamson G., Faulds C.B., (2001).** Synthesis of pentylferulate by a feruloyl esterase from *Aspergillus niger* using water-in-oil microemulsions. *Biotechnol. Lett.* 23(4): 325-330.
- Gouda M.K., Kleeberg I., van der Heuvel J., Müller R.-J., Deckwer W.-D., (2002).** Production of a polyester degrading extracellular hydrolase from *Thermomonospora fusca*. *Biotechnol. Prog.* 18(5): 927-934.
- Gübitz G.M., Paulo A.C., (2003).** New substrates for reliable enzymes: enzymatic modification of polymers. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14(6): 577-582.
- Gülden M., Turan A., Seibert H., (1997).** Substanzen mit endokriner Wirkung in Oberflächengewässern. Forschungsbericht 10204279. UBA Texte 46/97.
- Graf E., (1992).** Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Rad. Biol. Med.* 13(4): 435-448.
- Grassin C., Fauquembergue P., (1996).** Fruit juices. In: Godfrey T., West S. (Hrsg.), *Industrial Enzymology.* Macmillan, New York, 225-264.
- Greener A., Callahan M., Jerpseth B., (1996).** An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain. In: *In vitro* mutagenesis protocols. Trower, M.K. (Ed.) Humana Press, New Jersey.
- Habe H., Miyakoshi M., Chung J., Kasuga K., Yoshida T., Nojiri H., Omori T., (2003).** Phthalate catabolic gene cluster is linked to the angular dioxygenase gene in *Terrabacter* sp. strain DBF63. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61(1): 44-54.
- Hall T.A., (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

- Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., Clardy J., Goodman R.M., (1998).** Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5(10): R245-R249.
- Harwood C.R., Cutting S.M., (1990).** Molecular biological methods for *Bacillus*. Wiley 1990; Methode 3.5, Seite 145.
- Hasan F., Shah A.A., Hameed A., (2006).** Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 39(2): 235-251.
- Hasona A., York S.W., Yomano L.P., Ingram L.O., Shanmugam K.T., (2002).** Decreasing the level of ethyl acetate in ethanolic fermentation broths of *Escherichia coli* KO11 by expression of a *Pseudomonas putida estZ* esterase. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(6): 2651-2659.
- Hatzakis N.S., Daphnomili D., Smonou L., (2003).** Ferulic acid esterase from *Humicola insolens* catalyses enantioselective transesterification of secondary alcohols. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 21(4-6): 309-311.
- Heim H.C., Poe C.P., (1944).** Preparation of some glycol benzoates. *J. Org. Chem.* 9(4): 299-301.
- Henke E., Bornscheuer U.T., (1999).** Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens*. Random mutagenesis by error-prone PCR of a mutator strain and identification of mutants showing enhanced enantioselectivity by a resorufin-based fluorescence assay. *Biol. Chem.* 380(7-8): 1029-1033.
- Henke E., Bornscheuer U.T., (2002).** Esterases from *Bacillus subtilis* and *B. stearothermophilus* share high sequence homology but differ substantially in their properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60(3): 320-326.
- Heukeshoven J., Dernick R., (1986).** Färbemethoden für Elektrophorese-Gele. Information Fa. PHARMACIA: SD RE-066.
- Heymann E., (1980).** Carboxylesterases and amidases. In: *Enzymatic Basis of Detoxification*, Vol. II (Hrsg. Jacoby W.B.), Academic Press, New York, 291-324.
- Higerd T.B., Spizizen J., (1973).** Isolation of two acetyl esterases from extracts of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 114(3): 1184-1192.
- Hippe W., Watzl A., Hagen W., (1961).** Continuous process for production of a polyethylene terephthalate condensate. US Patent 2973341.
- Hjorth A., Carriere F., Cudrey C., Wöldike H., Boel E., Lawson D.M., Ferrato F., Cambillau C., Dodson G.G., Thim L., Verger R., (1993).** A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in the guinea pig (phospho)lipase. *Biochemistry* 32(18): 4702-4707.
- Horikoshi K., (1999).** Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(4): 735-750.

- Horne I., Harcourt R.L., Tara D., Sutherland, Russel R.J., Oakeshott J.G., (2002).** Isolation of *Pseudomonas monteilli* strain with a novel phosphotriesterase. FEMS Microbiol. Lett. 206(1): 51-55.
- Horsman G.P., Liu A.M.F., Henke E., Bornscheuer U.T., Kazlauskas R.J., (2003).** Mutations in distant residues moderately increase the enantioselectivity of *Pseudomonas fluorescens* esterase towards methyl-3-bromo-2-methylpropanoate and ethyl-3-phenylbutyrate. Chem. Eur. J. 9(9): 1933-1939.
- Hoshino A., Isono Y., (2002).** Degradation of aliphatic polyester films by commercially available lipases with special reference to rapid and complete degradation of poly (L-lactide) film by lipase PL derived from *Alcaligenes* sp.. *Biodegradation* 13(2): 141-147.
- Howard G.T., Crother B., Vicknair J., (2001).** Cloning, nucleotide, sequencing and characterization of a polyurethanase gene (*pueB*) from *Pseudomonas chlororaphis*. Int. Biodeterior. Biodegrad. 47(3): 141-149.
- Howard R.L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E.L., Howard S., (2003).** Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. Afr. J. Biotechnol. 2(12): 602-619.
- Hughes M.D., Nagel D.A., Santos A.F., Sutherland A.J., Hine A.F., (2003).** Removing the redundancy from randomized gene libraries. J. Mol. Biol. 331(5): 973-979.
- Hult K., Berglund P., (2003).** Engineered enzymes for improved organic synthesis. Curr. Opin. Biotechnol. 14(4): 395-400.
- IUBMB, International Union of Biochemistry and Molecular Biology, (1992).** Enzyme Nomenclature, Academic Press Inc., San Diego, USA.
- Jackson M.A., Labeda D.P., Becker L.A., (1996).** Isolation for bacteria and fungi for the hydrolysis of phthalate and terephthalate esters. J. Ind. Microbiol. 16(5): 301-304.
- James G.T., (1978).** Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. Anal. Biochem. 86(2): 574-579.
- Janes L.E., Löwendahl A.C., Kazlauskas R.J., (1998).** Quantitative screening of hydrolase libraries using pH-indicators: identifying active and enantioselective hydrolases. Chem. Eur. J. 4(11): 2324-2331.
- Jaeger K.-E., Ransac S., Koch H.B., Ferrato F., Dijkstra B.W., (1993).** Topological characterization and modelling of the 3D structure of the lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. FEBS Lett. 332(1-2): 143-149.
- Jaeger K.-E., Ransac S., Dijkstra B.W., Colson C., van Heuvel M., Misset O., (1994).** Bacterial lipases. FEMS Microbiol. Rev. 15(1): 29-63.
- Jaeger K.-E., Reetz M.T., (1998).** Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends Biotechnol. 16(9): 396-403.

**Jaeger K.-E., Dijkstra B.W., Reetz M.T., (1999).** Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 315-351.

**Jaenicke R., Böhm G., (1998).** The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8(6): 738-748.

**Jepsen K.F., Abildtrup A., Larsen S.T., (2004).** Monophthalates promote IL-6 and IL-8 production in the human epithelial cell line A549. *Toxicol. In vitro* 18(3): 265-269.

**Jobling S., Reynolds T., White R., Parker M.G., Sumpter J.P., (1995).** A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizer, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.* 103(6): 582-587.

**Jongbloed J.D.H., Antelmann H., Hecker M., Nijland R., Pries F., Koski P., Quax W. J., Bron S., van Dijl J. M., Braun P. G., (2002).** Selective contribution of the twin-arginine translocation pathway to protein secretion in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 277(46): 44068-44078.

**Kaiser P., Raina C., Parshad R., Johri S., Verma V., Andrabi K.I., Qazi G.N., (2006).** A novel esterase from *Bacillus subtilis* (RRL 1789): Purification and characterization of the enzyme. *Protein Expr. Purif.* 45(2): 262-268.

**Karegoudar T.B., Pujar B.G., (1984).** Metabolism of diethylphthalate by soil bacterium. *Curr. Microbiol.* 11(6): 321-324.

**Karpushova A., Brümer F., Barth S., Lange S., Schmid R.T., (2005).** Cloning, recombinant expression and biochemical characterization of novel esterases from *Bacillus* sp. Associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67(1): 59-69.

**Kayano Y., Watanabe K., Matsunaga T., Yamamoto I., Yoshimura H., (1997).** Involvement of a novel mouse hepatic microsomal esterase, ES46,5K, in the hydrolysis of phthalate esters. *Bio. Pharm. Bull.* 20(7): 749-751.

**Kazlauskas R.J., (1994).** Elucidating structure mechanism relationship in lipase: prospects for predicting and engineering catalytic properties. *Trends Biotechnol.* 12(11): 464-472 [Erratum (1995) *Trends Biotechnol.* 13(5): 195].

**Khalameyzer V., Fischer I., Bornscheuer U.T., Altenbuchner J., (1998).** Screening, nucleotide sequence, and biochemical characterization of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* with high activity towards lactones. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(2): 477-482.

**Ki H.C., Park O., (2001).** Synthesis, characterization and biodegradability of the biodegradable aliphatic-aromatic random copolyester. *Polymer* 42(5): 1849-1861.

**Kim G.J., Choi G.S., Kim J.Y., Lee J.B., Jo D.H., Ryu Y.W., (2002, a).** Screening, production and properties of a stereo specific esterase from *Pseudomonas* species-34 with high selectivity to (S)-ketoprofen ethyl ester. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 17(1): 29-38.

- Kim Y.H., Cha C.J., Cerniglia C.E., (2002, b).** Purification and characterization of an erythromycin resistant *Pseudomonas* sp. GD 100. FEMS Microbiol. Lett. 210(2): 239-244.
- Kim D.Y., Rhee Y.H., (2003).** Biodegradation of microbial and synthetic polyesters by fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61(4): 300-308.
- Kim H.K., Na H.S., Park M.S., Oh T.K., Lee T.S., (2004).** Occurrence of ofloxacin ester hydrolyzing esterase from *Bacillus niacini* EM001. J. Mol. Catal., B Enzym. 27(4): 237-241.
- Kleeberg I., Welzel K., van den Heuvel J., Müller R.J., Deckwer W.D., (2005).** Characterization of a new extracellular hydrolase from *Thermobifida fusca* degrading aliphatic-aromatic copolyesters. Biomacromolecules 6(1): 262-270.
- Kok R.G., Christoffels V.M., Vosman B., Hellingwerf K.J., (1993).** Growth-phase dependent expression of the lipolytic system of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: cloning of a gene encoding one of the esterases. J. Gen. Microbiol. 139(19): 2329-2342.
- Kolattukudy P.E., Purdy R.E., Maiti I.B., (1981).** Cutinases from fungi and pollen. Methods Enzymol. 71: 652-664.
- Kontkanen H., Tenkanen M., Fagerstrom R., Reinikainen T., (2004).** Characterization of steryl esterase activities in commercial lipase preparations. J. Biotechnol. 108: 51-59.
- Koslowski H.J., (1997).** Chemiefaser-Lexikon. Deutscher Fachverlag.
- Kroon P.A., Williamson G., Fish N.M., Archer D.B., Belshaw N.J., (2000).** A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module. Eur. J. Biochem. 267(23): 6740-6752.
- Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A.M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M.G., Bessières P., Bolotin A., Borchert S., Borriss R., Boursier L., Brans A., Braun M., Brignell S.C., Bron S., Brouillet S., Bruschi C.V., Caldwell B., Capuano V., Carter N.M., Choi S.-K., Codani J.-J., Connerton I.F., Cummings N.J., Daniel R.A., Denizot F., Devine K.M., Dusterhöft A., Ehrlich S.D., Emmerson P.T., Entian K.D., Errington J., Fabret C., Ferrari E., Foulger D., Fritz C., Fujita M., Fujita Y., Fuma S., Galizzi A., Galleron N., Ghim S.-Y., Glaser P., Goffeau A., Golightly E.J., Grandi G., Guiseppi G., Guy B.J., Haga K., Haiech J., Harwood C.R., Hénaut A., Hilbert H., Holsappel S., Hosono S., Hullo M.-F., Itaya M., Jones L., Joris B., Karamata D., Kasahara Y., Klaerr-Blanchard M., Klein C., Kobayashi Y., Koetter P., Koningstein G., Krogh S., Kumano M., Kurita K., Lapidus A., Lardinois S., Lauber J., Lazarevic V., Lee S.-M., Levine A., Liu H., Masuda S., Mauël C., Médigue C., Medina N., Mellado R.P., Mizuno M., Moestl D., Nakai S., Noback M., Noone D., O'reilly M., Ogawa K., Ogiwara A., Oudega B., Park S.-H., Parro V., Pohl T.M., Portetelle D., Porwollik S., Prescott A.M., Presecan E., Pujic P., Purnelle B., Rapoport G., Rey M., Reynolds S., Rieger M., Rivolta C., Rocha E., Roche B., Rose M., Sadaie Y., Sato T., Scanlan E., Schleich S., Schroeter R., Scoffone F., Sekiguchi J., Sekowska A., Seror S.J., Serror P., Shin B.-S., Soldo B., Sorokin A., Tacconi E., Takagi T., Takahashi H., Takamaru K., Takeuchi M., Tamakoshi A., Tanaka T., Terpstra P., Tognoni A., Tosato V., Uchiyama S., Vandenbol M., Vannier F., Vassarotti A., Viari A., Wambutt R., Wedler E., Wedler H., Weitzenegger T., Winters P., Wipat A., Yamamoto H., Yamane K., Yasumoto K., Yata K., Yoshida K., Yoshikawa**

- H.-F., Zumstein, E., Yoshikawa H., Danchin A., (1997).** The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390(6657): 249-256.
- Kurane R., Suzuki T., Fukuoka S., (1984).** Purification and some properties of a phthalate ester hydrolyzing enzyme from *Nocardia erythropolis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20(6): 378-383.
- Laemmli U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259): 680-685.
- Lange S., Musidlovska A., Schmidt-Dannert C., Schmitt J., Bornscheuer U.T., (2001).** Cloning, functional expression, and characterization of recombinant pig liver esterase. *Chembiochem.* 2(7-8): 576-582.
- Larsen S.T., Hansen J.S., Thygesen P., Bergtrup M., Poulsen O.M., Nielsen G.D., (2001).** Adjuvant and immuno-suppressive effect of six monophthalates in a subcutaneous injection model with BALB/c mice. *Toxicology* 169(1): 37-51.
- Larsen S.T., Lund R.M., Thygesen P., Poulsen O.M., Nielsen G.D., (2003).** Investigation of the adjuvant and immuno-suppressive effects of benzyl butyl phthalate, phthalic acid and benzyl alcohol in a murine injection model. *Food Chem. Toxicol.* 41(3): 439-446.
- Lee S.H., Ryu E.J., Kang M.J., Wang E.-S., Piao Z., Choi Y.J., Jung K.H., Jeon J.Y.J., Shin Y.C., (2003).** A new approach to directed gene evolution by recombined extension on truncated templates (RETT). *J. Mol. Catal. B Enzym* 26(3-6): 119-129.
- Lee S.W., Won K., Lim H.K., Kim J.C., Choi G.J., Cho K.Y., (2004).** Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65(6): 720-726.
- Leisewitz A., (1997).** Stoffströme wichtiger hormonell wirkender Substanzen. UBA-Projekt Nr. 10601076. Im Auftrag des Umweltbundesamtes.
- Lesuisse E., Schanck K., Colson C., (1993).** Purification and preliminary characterization of extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extreme basic pH tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* 216(1): 155-160.
- Li J., Gu J.-D., Pan L., (2005).** Transformation of dimethyl phthalate, dimethyl isophthalate and dimethylterephthalate by *Rhodococcus ruber* Sa and modelling the processes using the modified Gompertz model. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 55(3): 223-232.
- Li J., Gu J.-D., (2005).** Biodegradation of dimethyl terephthalate by *Pasteurella multocida* Sa follows an alternative biochemical pathway. *Ecotoxicology* 15(4): 391-397.
- Liao D.I., Remington S.J., (1990).** Structure of wheat serine carboxypeptidase II at 3.5 Å resolution. A new class of serine proteinase. *J. Biol. Chem.* 265(12): 6528-6231.
- Lin T.S., Kolattukudy P.E., (1978).** Induction of a biopolyester hydrolase (cutinase) by low levels of cutin monomers in *Fusarium solani* f. sp. *pisii*. *J. Bacteriol.* 133(2): 942-951.

- Lomolino G., Rizzi C., Spettoli P., Curioni A., Lante A., (2003).** Cell vitality and esterase activity of *Saccharomyces cerevisiae* is affected by increasing calcium concentration. *Agro Food Industry Hi-Tech* 14(6): 32-35.
- Lopez-Cervantes J., Sanchez-Machado D.I., Simal-Lozano J., Paseiro-Loada P., (2003).** Migration of ethylene terephthalate oligomers from roasting bags into olive oil. *Chromatographia* 58(5): 321-326.
- Maat J., Roza M., Verbakel J., Stam H., Da Silra M.J.S., Egmond M.R., Hagemans M.L.D., Van Garcom R.F.M., Hessing J.G.M., Van Derhondel C.A.M.J.J., Van Rotterdam C., (1992).** Xylanases and their applications in bakery. In: Visser, J., Beldman, G., Van Somerren, M.A.K., Voragen, A.G.J. (Hrsg.), *Xylan and Xylanases*. Elsevier, Amsterdam, 349-360.
- Manco G., Di Gennaro S., De Rosa M., Rosso M., (1994).** Purification and characterization of a thermostable carboxylesterase from the thermoacidophilic eubacterium *Bacillus acidocaldarius*. *Eur. J. Biochem.* 211(3): 965-972.
- Maqbool Q.-u.-A., Johri S., Rasool S., Riyaz-ul-Hassan S., Verma V., Nargotra A., Koul S., Qazi G.N., (2006).** Molecular cloning of carboxylesterase gene and biochemical characterization of encoded protein from *Bacillus subtilis* (RRL BB1). *J. Biotechnol.* 125(1): 1-10.
- Marrs B., Delagrave S., Murphy D., (1999).** Novel approaches for discovering industrial enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2(3): 241-245
- Marten E., Müller R.-J., Deckwer W.-D., (2003).** Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. *Polym. Degrad. Stab.* 80(3): 485-501.
- Martinez C., Nicolas A., van Tilbeurgh H., Egloff M.P., Cudrey C., Verger R., Cambillau C., (1994).** Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole. *Biochem.* 33(1): 83-89.
- Maruyama K., Akita K., Naitou C., Yoshida M., Kitamura T., (2005).** Purification and characterization of an esterase hydrolyzing monoalkyl phthalates from *Micrococcus* sp. YGJ1. *J. Biochem.* 137(1): 27-32.
- Matsunaga A., Koyama N., Nosoh Y., (1974).** Purification and properties of esterase from *Bacillus stearothermophilus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 160(2): 504-513.
- Maurer, K.-H., (2004).** Detergent proteases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15(4): 330-334.
- McCloskey S.G., Jump J.M., (2005).** Bio-polishing of polyester and polyester/cotton fabric. *Text. Res. J.* 75(6): 480-484.
- McQueen D.A.R., Schottel, J.L., (1987).** Purification and characterization of a novel extracellular esterase from pathogenic *Streptomyces scabies* that is induced by zinc. *J. Bacteriol.* 169(5): 1967-1971.

- Meghji K., Ward O.P., Araujo A., (1990).** Production, purification, and properties of extracellular carboxyl esterases from *Bacillus subtilis* NRRL 365. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(12): 3735-3740.
- Mentlein R., Suttrop M., Heymann E., (1984).** Specificity of purified monoacylglycerol lipase, palmitoyl-CoA hydrolase palmitoyl-carnitine hydrolase, and non-specific carboxylesterase from rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 228(1): 230-246.
- Mentlein R., Butte W., (1989).** Hydrolysis of phthalate esters by purified rat and human liver carboxylesterases. *Biochem. Pharmacol.* 38(18): 3126-3128.
- Miller C.A., (2000).** Advances in enzyme discovery technology: capturing diversity. *Inform.* 11(5): 489-495.
- Molinari F., Brenna O., Valenti M., Aragozzini F., (1996).** Isolation of a novel carboxylesterase from *Bacillus coagulans* with high enantioselectivity toward racemic esters of 1,2-O-isopropylidenediglycerol. *Enzyme Microb. Technol.* 19(7): 551-556.
- Moore J.C., Arnold F.H., (1996).** Directed Evolution of a *para*-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. *Nat. Biotechnol.* 14(4): 458-467.
- Moreno M.R., Smith J.F., Smith R.V., (1985).** Silver staining of proteins in polyacrylamid gels: Increased sensitivity through a combined Coomassie blue-silver stain procedure. *Anal. Biochem.* 151(2): 466-470.
- Moriyoshi K., Ohmoto T., Ohe T., Sakai K., (1999).** Purification and characterization of an esterase involved in cellulose acetate degradation by *Neisseria sicca* Sb. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(10): 1708-1713.
- Moriyoshi K., Ohmoto T., Ohe T., Sakai K., (2003).** Role of endo-1,4- $\beta$ -glucanases from *Neisseria sicca* Sb in synergistic degradation of cellulose acetate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67(2): 250-257.
- Mugford P.F., Lait S.M., Keay B.A., Kazlauskas R.J., (2004).** Enantiocomplementary enzymatic resolution of the chiral auxiliary: *cis,cis*-6-(2,2-dimethylpropan-amido)spiro[4.4]nonan-1-ol and the molecular basis for the high enantioselectivity of subtilisin Carlsberg. *Chembiochem.* 5(7): 980-987.
- Müller R.-J., Kleeberg I., Witt U., Deckwer W.-D., (2001).** Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. *J. Biotechnol.* 86(2): 87-95.
- Müller R.-J., Schrader H., Profe J., Dresler K., Deckwer W.-D., (2005).** Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate): rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*. *Macromol. Rapid Commun.* 26: 1400-1405.
- Müller R.-J., (2006).** Biological degradation of synthetic polyesters - enzymes as potential catalysis for polyester recycling. *Process Biochem.* 41(10): 2124-2128.
- Murakami H., Hohsaka T., Sisido M., (2002).** Random insertion and deletion of arbitrary number of bases for codon-based random mutation of DNAs. *Nat. Biochechnol.* 20(1): 76-81.

- Musidlowska-Persson A., Bornscheuer U.T., (2003).** Recombinant porcine intestinal carboxylesterase: cloning from the pig liver esterase gene by site-directed mutagenesis, functional expression and characterization. *Prot. Eng.* 16(12): 1139-1145.
- Nagata M., Kiyotsukuri T., Minami S., Tsutsumi N., Sakai W., (1997).** Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate) copolymers with aliphatic dicarboxylic acids and/or poly(ethylene glycol). *Eur. Polym. J.* 33(10-12): 1701-1705.
- Nakane A., Takamatsu H., Oguro A., Sadaie Y., Nakamura K., Yamane K., (1995).** Acquisition of azide-resistance by elevated SecA ATPase activity confers azide-resistance upon cell growth and protein translocation in *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* 141(1): 113-121.
- Nardini M., Dijkstra B.W., (1999).**  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 9(6): 732-737.
- Nardini M., Lang D.A., Liebeton K., Jaeger K.-E., Dijkstra B.W., (2000).** Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J. Biol. Chem.* 275(40): 31219-31225.
- Ness J.E., Del Cardayre S.B., Minshull J., Stemmer W.P., (2000).** Molecular breeding: the natural approach to protein design. *Adv. Protein Chem.* 55: 261-92.
- Niazi J.H., Prasad D.T., Karegoudar T.B., (2001).** Initial degradation of dimethylphthalate by esterases from *Bacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 196(2): 201-205.
- Nilsson C., (1994).** Phthalic acid esters used as plastic additives - comparison of toxicological effects. Swedish National Chemicals Inspectorate, Solna.
- Nishimura M., Inouye S., (2000).** Inhibitory effects of carbohydrates on cholesterol esterase biosynthesis in *Streptomyces lavendulae* H646-SY2. *J. Biosci. Bioeng.* 90(5): 564-566.
- Nishioka T., Iwata M., Imaoka T., Mutoh M., Egashira Y., Nishiyama T., Shin T., Fujii T., (2006).** A mono-2-ethylhexyl phthalate hydrolase from a *Gordonia* sp. that is able to dissimilate di-2-ethylhexyl phthalate. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(4): 2394-2399.
- Noble M.E.M., Cleasby A., Johnson L.N., Egmond M.R., Frenken L.G.J., (1993).** The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett.* 331(1-2): 123-128.
- Nomura Y., Nakagawa M., Ogawa N., Harashima S., Oshima, Y., (1992).** Genes in PHT plasmid encoding the initial degradation pathway of phthalate in *Pseudomonas putida*. *J. Ferment. Bioeng.* 74(6): 333-344.
- Ollis D.L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S.M., Harel M., Remington S.J., Silman I., Schrag J., Sussman J.L., Verschueren K.H.G., Goldman A., (1992).** The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Eng.* 5(3): 197-211.
- Owusu R.K., Cowan D.A., (1991).** Isolation and partial characterization of a novel thermostable carboxylesterase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme Microb. Technol.* 13(2): 158-163.

- Panda T., Gowrishankar B.S., (2005).** Production and applications of esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67(2): 160-169.
- Pathak D., Ollis D., (1990).** Refined structure of diene lactone hydrolase at 1.8 Å. *J. Mol. Biol.* 214(2): 497-525.
- Patil N.K., Kundapur R., Shouche Y.S., Karegoudar T.B., (2006).** Degradation of plasticizer di-n-butylphthalate by *Delftia* sp. TBKNP-05. *Curr. Microbiol* 52(5): 369-374.
- Petersen E.I, Valinger G., Sölkner B., Stubenrauch G., Schwab H., (2001).** A novel esterase from *Burkholderia gladioli* which shows high deacetylation activity on cephalosporins is related to  $\beta$ -lactamases and DD-peptidases. *J. Biotechnol.* 89(1): 11-25.
- Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage, G., (1975).** Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258(5536): 598-599.
- Powell K.A., Ramer S.W., del Cardayré S.B., Stemmer W.P.C., Tobin M.B., Longchamp P.F., Huisman G.W., (2001).** Gerichtete Evolution und Biokatalyse. *Angew. Chem.* 113(21): 4068-4080.
- Prim N., Blanco A., Martinez J., Pastor F.I.J., Diaz P., (2000).** *estA*, a gene coding for a cell-bound esterase from *Paenibacillus* sp. BP-23, is a new member of the bacterial subclass of type B carboxylesterases. *Res. Microbiol.* 151(4): 303-312.
- Prim N., Pastor F.I.J., Diaz P., (2001).** Cloning and characterization of a bacterial cell-bound type B carboxylesterase from *Bacillus* sp. BP-7. *Curr. Microbiol.* 42(4): 237-240.
- Pringle D., Dickstein R., (2004).** Purification of ENOD8 proteins from *Medicago sativa* root nodules and their characterization as esterases. *Plant Physiol. Biochem.* 42(1): 73-79.
- Prouty W.F., Godberg A.L., (1972).** Effects of protease inhibitors on protein breakdown in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274(19): 3341-3352.
- Quax W.J., Broekhuizen C.P., (1994).** Development of a new *Bacillus* carboxyl esterase for the use in the resolution of chiral drugs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41(4): 425-431.
- Quyen D.T., Dao T.T., Nguyen S.L.T., (2006).** A novel esterase from *Ralstonia* sp. M1: Gene cloning, sequencing, high-level expression and characterization. *Protein Expr. Purif.* Epub ahead of print.
- Raymer G., Wilard J.M.A., Schottel J.L., (1990).** Cloning, sequencing, and regulation of expression of an extracellular esterase gene from the plant pathogen *Streptomyces scabies*. *J. Bacteriol* 172(12): 7020-7026.
- Record E., Aster M., Sigoillot C., Pages S., Punt P.J., Delattre M., Haon M., Van Den Hondel C.A., Sigoillot J.C., Lesage-Meessen L., (2003).** Overproduction of the *Aspergillus niger* feruloyl esterase for pulp bleaching application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62(4): 349-355.
- Reetz M.T., (2002).** Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6(2): 145-150.

- Reetz M.T., (2004).** Controlling the enantioselectivity of enzymes by directed evolution: practical and theoretical ramifications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(16): 5716-5722.
- Reiter B., Glieder A., Talker D., Schwab H., (2000).** Cloning and characterization of *EstC* from *Burgholderia gladioli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54(6): 778-785.
- Rhee J.K., Ahn D.G., Kim Y.G., Oh J.W., (2005).** New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(2): 817-825.
- Rotticci D., Rotticci-Mulder J.C., Denman S., Norin T., Hult K., (2001).** Improved enantioselectivity of a lipase by rational protein engineering. *ChemBioChem.* 2: 766-770.
- Ruttloff H., (1994).** Hrsg.: Industrielle Enzyme. Hamburg: Behr's Verlag.
- Ruttloff H., Proll J., Leuchtenberger A., (1997):** Lebensmittelbiotechnologie und Ernährung. Probleme und Lösungsansätze. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839): 487-491.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., (1989).** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez J.G., Tsuchii A., Tokiwa Y., (2000).** Degradation of polycaprolactone at 50°C by thermotolerant *Aspergillus* sp.. *Biotechnol. Lett.* 22(10): 849-853.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74(12): 5463-5467.
- Sarda L., Desnuelle P., (1958).** Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochim. Biophys. Acta* 30(3): 513-521.
- Saulnier L., Thibault J.-F., (1999).** Ferulic acid and diferulic acid as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *J. Sci. Food. Agric.* 79(3): 396-402.
- Schallmeyer M., Singh A., Ward O.P., (2004).** Development in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50(1): 1-17.
- Schmidt M., Hasenpusch D., Kähler M., Kirchner U., Wiggenhorn K., Langel W., Bornscheuer U.T., (2006).** Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* yields a mutant with excellent enantioselectivity and activity for the kinetic resolution of a chiral building block. *ChemBiochem* 7(5): 805-809.
- Schrag J.D., Li Y.G., Wu S., Cygler M., (1991).** Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* 351(6329): 761-764.
- Schrag J.D., Li Y., Cygler M., Lang D., Burgdorf T., Hecht H.J., Schmid R., Schomburg D., Rydel T.J., Oliver J.D., Strickland L.C., Dunaway C.M., Larson S.B., Day J., Mc-**

- Pherson A., (1997).** The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure* 5(2): 187-202.
- Shao W., Wiegel J., (1995).** Purification and characterization of two thermostable acetyl xylan esterases from *Thermoanaerobacterium* sp. Strain JW/SL-Y485. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(2): 729-733.
- Shen D., Xu J.H., Wu H.Y., Liu Y.Y., (2002).** Significantly improved esterase activity of *Trichosporun brassicae* cells for ketoprofen resolution by 2-propanol treatment. *J. Mol. Catal. B* 18(4-6): 219-224.
- Shuman S., (1994).** Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using *Vaccinia* DNA Topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 269(51): 32678-32684.
- Silva C.M., Carneiro F., O'Neill A., Fonseca L.P., Cabral J.S.M., Gübitz G., Cavaco-Paulo A., (2005).** Cutinase - a new tool for biomodification of synthetic fibres. *J. Polym. Sci. [A1]* 43(11): 2448-2450.
- Simonen M., Palva I., (1993)** Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol. Rev.* 57(1): 109-137.
- Sivamurthy K., Swamy B.M., Pujar B.G., (1991).** Transformation of dimethylterephthalate by the fungus *Sclerotium rolfsii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 79(1): 37-40.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goecke N.M., Olson B.J., Klenk A.C., (1985).** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150(1): 76-85.
- Sokoloski A.G., Chidester C.G., Honeywell, G.E., (1962).** The hydrolysis of methyl *p*-hydroxybenzoate by *Cladosporium resinae*. *Dev. Ind. Microbiol.* 3: 179-187.
- Song J.K., Chung B., Oh Y.K., Rhee J.S., (2002).** Construction of DNA-shuffled and incrementally truncated libraries by a mutagenic and unidirectional reassembly method: changing from a substrate specificity of phospholipase to that of a lipase. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(12): 6146-6151.
- Spiller B., Gershenson A., Arnold F.H., Stevens R.C., (1999).** A structural view of evolutionary divergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(22): 12305-12310.
- Staples C.A., Peterson D.R., Parkerton T.F., Adams W.J., (1997).** The environmental fate of phthalate esters: a literature review. *Chemosphere* 35(4): 667-749.
- Staubmann R., Ncube I., Gübitz G.M., Steiner W., Read J.S., (1999).** Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. Seeds. *J. Biotechnol.* 75(2-3): 117-126.
- Stemmer W.P.C., (1994a).** DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(22): 10747-10751.
- Stemmer W.P.C., (1994b).** Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* 370(6488): 389-391.

- Studier F.W., Moffat B.A., (1986).** Use of bacteriophage T7-RNA-Polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189(1): 113-130.
- Suemitsu R., Horiuchi K., Yanagawase S., Okamatsu T., (1990).** Biotransformation activity of *Pseudomonas cepacia* on *p*-hydroxybenzoates and benzalkonium chloride. *J. Antibact. Antifung. Agents* 18(12): 579-582.
- Sugihara A., Shimada Y., Nagao T., Iizumi T., Nakamura K., Fukase T., Tominaga Y., (1994).** Purification and characterization of a carboxylesterase from *Pseudomonas* sp. KW1-56. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58(4): 752-755.
- Sussman J.L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman I., (1991).** Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 253(5022): 872-879.
- Takanashi M., Saito T., (2006).** Characterization of two 3-hydroxybutyrate dehydrogenases in poly (3-hydroxybutyrate)-degradable bacterium, *Ralstonia pickettii* T1. *J. Biosci. Bioeng.* 101(6): 501-507.
- Taniguchi I., Nakano S., Nakamura T., El-Salmawy A., Miyamoto M., Kimura Y., (2002).** Mechanism of enzymatic hydrolysis of poly(butylene succinate) and poly(butylene succinate-co-L-lactate) with a lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Macromol. Biosci.* 2: 447-455.
- Thirstrup K., Verger R., Carriere F., (1994).** Evidence for a pancreatic lipase subfamily with new kinetic properties. *Biochemistry* 33(10): 2748-2756.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22): 4673-4680.
- Tindall K.R., Kunkel T.A., (1988).** Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 27(16): 6008-6013.
- Tjalsma H., Antelmann H., Jongbloed J.D.H., Braun P.G., Darmon E., Dorenbos R., Dubois J.-Y.F., Westers H., Zanen G., Quax W.J., Kuipers O.P., Bron S., Hecker M., van Dijk J.M., (2004).** Proteomics of Protein Secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the "Secrets" of the Secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68(2): 207-233.
- Topakas E., Kalogeris E., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P., (2003).** Production and partial characterization of feruloyl esterase by *Sporotrichum thermophile* in solid-state fermentation. *Process Biochem.* 38(11): 1539-1543.
- Topakas E., Stamatis H., Biely P., Christakopoulos P., (2004).** Purification and characterization of a type B feruloyl esterase (StFAEA) from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63(6): 686-690.
- Topakas E., Vafiadi C., Stamatis H., Christakopoulos P., (2005).** *Sporotrichum thermophile* type C feruloyl esterase (StFaeC): purification, characterization, and its use for phenolic acid (sugar) ester synthesis. *Enzyme and Microbial Technology* 36(5-6): 729-736.

- Tserovska L., Dimkov R., (2002).** Dimethylterephthalate catabolism by *Pseudomonas* sp.. J. Culture Collections 3: 33-37.
- Ulber R., Soyez K., (2004).** 5000 Jahre Biotechnologie. Chem. Unserer Zeit 38(3): 172-180.
- Uppenberg J., Hansen M.T., Patkar S., Jones T.A., (1994).** The sequence, crystal structure determination and refinement of the two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. Structure 2(4): 293-308.
- Valkova N., Lépine F., Valeanu L., Dupont M., Labrie L., Bisailon J.-G., Beaudet R., Shareck F., Villemur R., (2001).** Hydrolysis of 4-hydroxybenzoic acid esters (parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant *Enterobacter cloacae* strain EM. Appl. Environ. Microbiol. 67(6): 2404- 2409.
- Valkova N., Lépine F., Bollet C., Dupont M., Villemur R., (2002).** *prbA*, a gene coding for an esterase hydrolyzing parabens in *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter gergoviae* Strains. J. Bacteriol. 184(18): 5011-5017.
- Vamsee-Krishna C., Mohan Y., Phale P.S., (2006).** Biodegradation of phthalate isomers by *Pseudomonas aeruginosa* PP4, *Pseudomonas* sp. PPD und *Acinetobacter lwoffii* IPS4. Appl. Microbiol. Biotechnol. [Epub ahead of print].
- van der Haar B., Walter S., Schwäpenheuer S., Schrempf H., (1997).** A novel fusidic acid resistance gene from *Streptomyces lividans* 66 encodes a highly specific esterase. Microbiology 143(3): 867-874.
- van Dijl J.M., de Jong A., Vehmaanperä J., Venema G., Bron S., (1992).** Signal peptidase I of *Bacillus subtilis*: patterns of conserved amino acids in prokaryotic and eukaryotic type I signal peptidases. EMBO J. 11(8): 2819-2828.
- van Pouderooyen G., Eggert T., Jaeger K.-E., Dijkstra B.W., (2001).** The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold enzyme. J. Mol. Biol. 309(1): 215-226.
- Veith B., Herzberg C., Steckel S., Feesche J., Maurer K.-H., Ehrenreich P., Baeumer S., Henne A., Liesegang H., Merkl R., Ehrenreich A., Gottschalk G., (2004).** The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 7(4): 204-211.
- Vertommen M.A.M.E., Nierstrasz V.A., van der Veer M., Warmoeskerken M.M.C.G., (2005).** Enzymatic surface modification of poly(ethylene terephthalate). J. Biotechnol. 120(4): 376-386.
- Videira P.A., Fialho A.M., Marques A.R., Coutinho P.M., Sá-Correia I., (2003).** Cloning and sequence analysis of the *ces10* gene encoding a *Sphingomonas paucimobilis* esterase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61(5-6): 517-522.
- Vitikainen M., Pummi T., Airaksinen U., Wahlström E., Wu H., Sarvas M., Kontinen V.P., (2001).** Quantitation of the capacity of the secretion apparatus and requirement for PrsA in growth and secretion of  $\alpha$ -Amylase in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 183(6): 1881-1890.

- Wackett L.P., (2004).** Novel biocatalysts by database mining. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15(4): 280-284.
- Wang Y., Fan Y., Gu J.-D., (2003).** Aerobic degradation of phthalic acid by *Comamonas acidovorans* Fy-1 and dimethyl phthalate ester by two reconstituted consortia from sewage sludge at high concentrations. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19(8): 811-815.
- Wang X., Geng X., Egashira Y., Sanada H., (2004).** Purification and characterization of a feruloyl esterase from the intestinal bacterium *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(4): 2367-2372.
- Warth A.D., (1977).** Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of *Bacillus* species. *J. Bacteriol.* 134(3): 699-705.
- Weber K., Osborn M., (1969).** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244(16): 4406-4412.
- Webster J.A., Bannermann T.L., Hubner R.J., Ballard D.N., Cole E.M., Bruce J.L., Fiedler F., Schubert K., Kloos W.E., (1994).** Identification of the *Staphylococcus sciuri* species group with EcoRI fragments containing rRNA sequences and description of *Staphylococcus vitulus* sp. nov.. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44(3): 454-460.
- Wei Y., Swenson L., Kneusel R.E., Matern U., Derewenda Z.S., (1996).** Crystallization of a novel esterase which inactivates the macrolide toxin brefeldin A. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 52: 1194-1195.
- Welzel K., Müller R.-J., Deckwer W.-D., (2002).** Enzymatischer Abbau von Polyester-Nanopartikeln. *Chemie Ingenieur Technik* 74(10): 1496-1500.
- Winkler U.K., Stuckmann M., (1979).** Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 138(3): 663-670.
- Witt U., Yamamoto M., Seeliger U., Müller R.-J., Warzelhan V., (1999).** Biologisch abbaubare Polymerwerkstoffe - nicht die Rohstoffquelle, sondern die chemische Struktur entscheidet über die Abbaubarkeit. *Angew. Chem.* 111(10): 1540-1544.
- Wong S.L., (1995).** Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6(5): 517-522.
- Xu X.R., Li H.B., Gu J.-D., (2005).** Biodegradation of an endocrine disrupting chemical di-n-butyl phthalate ester by *Pseudomonas fluorescens* B-1. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 55(1): 9-15.
- Yanish-Perron C., Vieira J., Messing J., (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33(1): 103-109.
- Yoon M.-Y., Kellis J., Poulou A.J., (2002).** Enzymatic modification of polyester. *AATCC Rev.* 2(6): 33-36.

**Young F.E., Spizizen J., (1961).** Physiological and genetic factors affecting transformation of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 81: 823-829.

**Zedan H.H., Serry F.M., (1984).** Metabolism of esters of *p*-hydroxybenzoic acid by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Egypt. J. Microbiol. 19: 41-54.

**Zeronian S.H., Collins M.J., (1989).** Surface modification of polyester by alkaline treatments. Textile Prog. 20(2): 1-34.

**Zha D., Eipper A., Reetz M.T., (2003).** Assembly of designed oligonucleotides as an efficient method for gene recombination: a new tool in directed evolution. ChemBioChem. 4(1): 34-39.

**Zhou Y.H., Zhang X.P., Ebright R.H., (1991).** Random mutagenesis of gene-sized DNA molecules by use of PCR with *Taq* DNA polymerase. Nucleic Acids Res. 19(21): 6052.

**Zock J., Cantwell C., Swartling J., Hodges R., Pohl T., Sutton K., Rosteck Jr. P., McGilvray D., Queener S., (1994).** The *Bacillus subtilis* *pnb A* gene encoding *p*-nitrobenzyl esterase: cloning, sequence and high-level expression in *Escherichia coli*. Gene 151(1-2): 37-43.

## 8 Anhang

### 8.1 DNA-Sequenz des *inserts* vom isolierten Genombank-Klon 17A1-A8

Der codierende Bereich der *para*-Nitrobenzyl-Esterase *pNB-Est17* ist unterstrichen.

```

1 aaggagatatacatatgaaatacctgctggttgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgccag
71 ttgcaatggccatggatatccgaattaattcagatcctggacggcaacgcttgataattccgattcattt
141 tcaactgctggtaaccacttttcttccagcgaggaagccgattcagataggtgcaatcccgcttaactt
211 cttccatcaaagcagtgcttttataatcgattggaacgctgctgctataactgaagatttcgctggatg
281 actgagattcgagtttcttaccgctgattcatgaaccagcactggtcgacgcctggttaggtcggt
351 gaaatgaccttaaatgacacaaaaccataataaggggtgacgcccattgtgatgagcagaatcagcaga
421 atctgtgctgacaatcgcatataattctttgaaactcatattctcatgtattcatagccttcagc
491 cttcccgccgctggcttcccgcccttctgttaatgattggattataaaaagaaaagcttatttata
561 aaaattgcaaaaatagccaataagttctctttagagaacaaaatcatgatttctcctaatttactgcac
631 ttccttattatttttaaattttataaagaacgaaaaatccttataatgaacaaaataacgacaggaata
701 gaggagaatttcatattatgattggaagaattatccgcttgtaccgtaaaaagaaaagcttattctata
771 tcagctggctgttgagtcaggcgtatccaaactctatttaagcaagattgaaagagcgttcacacgaat
841 cgcctcgttcaatttttaaaaaaagttctgcccactggaagttgaattaacagaattatttgacgcag
911 aaacaatgatgtatgaaaaaatcagcggcggtgaaagaagaatggcgcgtacatttagtgcaagcgtaca
981 agccgggatggaaaaggaagaattgttcaactttacgaacaggctaaagaaagaacagcctgaaactgcc
1051 tcttaccgcaaccgcaaactgacggaatccaatatagaagaatgaaagcgcgtgatggcgggaagcaagag
1121 aatcggtctgactgtccatgaagtcaaatccttttaaaaaacaatgggaagatgatgatcggttaaggg
1191 ctaacgcttcgcatctatagggtaaatctggttataatgggggaaaaagggagagaacacaatgactcatc
1261 aaatagtaacgactcaatacggcaaaagtaaaaggcacaacggaaaaacggcgtacataagtggaagcat
1331 ccctatgccaagccgctgtcggacaatggcgttttaagcacctgagccgctgaagtgtgggaagat
1401 gtccttgatgccacagcgtacggccctatttgcccgcagcgtctgatttgcctctcactgctgatacag
1471 agctgccccgccagtcgaggatgcttgtatgtcaatgtatttgcgctgacaccccaagtcaaaatct
1541 tcctgtcatggtgtggattcacggaggcgttttatcttggagcgggcagtgagccattgtatgacgga
1611 tcaaaaacttgcggcacagggagaagtcatgtcgttacattgaactatcggctggggcgtttggctttt
1681 tgacttgtctcgtttgatgaggcgtattccgataacctgggcttttagacaagccgcgcactgaa
1751 atgggtgcgggagaatatttcagcgtttggcgttgatcccgataacgtaacagatattggagaatccgcc
1821 ggcgggatgagcattgcccgcgttctcgctatgctcgggcaaaaaggcctgttccagaaagcaatcatgg
1891 aaagcggcgttctcgaacgatgacgaaagaacaagcggcgagcacctcggcagcctttttacaggtcct
1961 tgggattaacgagggccaattggataaattgcatacgggttctcgcagaagatttgcataaagcggctgat
2031 cagcttcggattgcagaaaaagaaaaatcttccagctgttctccagcccgccttgatccaaaaacgc
2101 tgctgctgaaccagaaaaagcgtatctcagaagggcgtgcttccggcattcctctatgattggaacaac
2171 ccgtgatgaaggatatttatttttacccccggatcagacggttcatctcaggaaacgcttgatgcagca
2241 ctcgagtatttactagggaaagcgcgtggcagagaagaagctgcccgtttgtatccgcttctcggaaagcc
2311 aaattcatatgatgactgatttatttttggcgcctcgcctatgcatccgcacagctctcatta
2381 cgccctgtctggatgtacaggtcgtatggcaccgaagaagcgcctgacaataaagcgtttcacgca
2451 ttagagcttcttttgtcttggaaatctggacggattggaacgaatggcaaaagcggagattacggatg
2521 aggtgaaacagcttctcacacgatacaatcagcgtggatcacgttcgctaaaacaggaaacccaagcac
2591 cgaagctgtgaattggccgacgtatcatgagaacagagagacgctgatttagattcagagattacg
2661 atcgaaaacgatcccgaatctgaaaaaaggcagaagctattcccttcaaaaggagaataaataatggggaa
2731 aacaggatacattggtgctgccattgttgtggcagcttgatcattattttgtcggcgtggatgttta
2801 cgggacacagctctattaccagcctatgcccgtggactggcatcactgttttcacgggaattgtgatgg
2871 ttcccgcatactcagcaaaaagaaaaccggaaaagagaagtaattctctttccgggtttttatggtt
2941 attataatcttcccgcgcaatctcgtctgctattccctcataaggagccttcgaaatcacttctcgtt
3011 gtcgactccttcatttttcagaaatgtaatttccgcaaatcaggtacaacgattttggatcagtttca
3081 tatttttcgcggttcttccatcaaatcaatggtcatttttgtagcaaacgtaatttcagatggtt
3151 catgccaccatttcgggaagaaaataatgcctgcatgcgtttttcatttggcataaaagttaaagtaaac
3221 atccgtgccagtcggctctgtccaagacactttatatacgccttctgtcagtttgacaatattcacttcc
3291 tgatcccgaaccagcgtccggcaaccattccgctatgaattctataatcaattgtatggctatttttaa
3361 tataaatctcgtattcccagcgttttcatacgtataaatcatgtggcttccgataaagttttccattt
3431 tcacactctccttagtcttttactgcaacttcataaatgtctagtgcgaacgtaatcaggggttctttctgc
3501 ggaaccgataaacaagcggctcatggagccattgatagactttactgctgctttcaaacgtcggtagcgt
3571 cgaaaataaacatgctccggatccgaattcagctcgcgcagcaagcttgcggccgcaactcgagaccac
3641 caccaccaccactgagatccggctgctaacaagccc

```

## 8.2 DNA-Sequenz des *inserts* vom isolierten Genombank-Klon 19C5-A4

Der codierende Bereich der *para*-Nitrobenzyl-Esterase *pNB-Est19* ist unterstrichen.

```

1  gggctttgtagcagccggatctcagtggtggtggtggtggtgctcgagtggggccgcaagcttgtcgac
71  ggagctcgaattcggatcggcgtcttttgcaccgtctcactgagtgagcattcccgaccagcacatttg
141  tcagcccgggttacattctcaacctgaaatgtctgatgtgatggtcggcttctttaaactcggcatccaccag
211  cagcactttcttttcttctgctgctgtgcaaagacagccgcaagattcgctgcaactgaaacgatttacctca
281  ccaggcacagaggaggtgacgaggatagaccgcaagttggtctggacggatgaaaactcaatgtttgtcc
351  gaatggtgcggtatgttccgcaacaattgatgtgtgtgtaaaacggatatttgagccaaacctcgct
421  tgctttctttttctaaagaccactcgcttctactccccgaaatgtttatcccgcgattccgccttttt
491  ggacatcagggacggagcctaagcatggcaatccggttctctcgctgagctgcccgtgcttttgcacgt
561  atcatcgagaaaatgcagaaaaaatgccagtgtaatgccgcccattgacagcagcgcgcaaaagccatgacc
631  agatttctcatccggccggcttgatcattgggcttccagaagccttcgcctctgataaaaatgacagc
701  ctgtacattcattcttctacttcttttcaaactgttctactaatgtgttcgcaatctcagccgc
771  tatcgccggatcgtggtcctgaacggctacggtgataatctctgatcattttcactgctggtaactact
841  tttcctttcagcaggaagccgattcagaaagatgcaattccgccttgacctctccatcaaggcagtg
911  ttttcataatcgattggaacgtgctgctgactgaagatttcgctggatgctactgagattcgagtttc
981  ttcacgctgattcatgaaccagcacttgcctgcagccttgataagtccggtgaaatgaccttaattgc
1051  acaaaagccgtaataaggggtgacgcccattgctgagagcagaatcagcagcaatctgtctgcaaatcg
1121  catataattctttaaactcatattctcattcatgtgttcatagccttcagccttcccgggctggtctc
1191  ccgcccctttctgttaatgatggattataaaagaaaactttatttttaaaaatgcaaaataagcc
1261  aataagttctcttagagaacaaaatcatgttttctcttatttactgcacttccctattattttaaa
1331  tttataaagaacgaataatccttataatgaacaaaataacgacaggaatagaggagaatttcataatca
1401  tgattggaagaattatccggtttgtaccgtaaaagaaaaggctattctattaatcagctggctgtggagtc
1471  aggagtatctaaatcctatttaagcaagattgaaagagcgttccatacgaatccatccctatgccaaacct
1541  aagaaaatccgctacactggcaagttgaattaaaccaattattcgacgcagaaacaatgatgtatgaa
1611  aaaatcagcggcagtgagaagaatggcgcgtgcatctgtgcaagcggccaagccggaatggaaaagg
1681  aagagttgttctctttacgaacataactaaagaaagacagcctgaaatggcttcccacgcaaccgcaa
1751  actgacggaatccaatataagaagaatggaaagcgtgatggcagaaagcaagagaaatcggcttaaccgctc
1821  caggaagtcaagtccttttcaaacgatgggaagatagattttggctaagggtaaacgttcgcatctgc
1891  agactaaatctgtttataatgggggaaaaagggagagagtgcatgctcataaaacagtaacaactcaa
1961  tacggcaaaagtaaaaggcacaacagaaaacggcgtacataaatggaaagccatccctatgccaaacctc
2031 ctgtcggggcattgctgttttaagcaccggaacctcctgaagcgtgggagaacgaaactggacgcaacagc
2101 atcggctctatttgccgcagccgtctgatttgctgctactttcgtatactgagctgcccgcagctct
2171 gaggattgcttgatataatgatatttgccgctgatactccaagtcaaaacctgcctgctcatggatgga
2241 ttcacggcggcgctttttatcttggagcgggcagtgagccattatagatgggtcaagacttgcggcgca
2311 gggagaagtcatgtcgttacactgaattatcgtctggggcgtttggatttttacattgtctcgttt
2381 gaagagcgtattccgataaccttgggcttttggaccaagcctgcaagcagcagcagcagcagcagcagc
2451 tctcagcatttggcggatccggataacgtaacagatatttggagaatcagcagcagcagcagcagcagc
2521 cgcgctgctcgcaatgcctgcccgaaggcctgttccagaaagcaatcatggaaagtggcgttccaga
2591 acgatgacaaaagaaaagcggctagcaccgcccagccttttagaggtccttgggattgacgagagcc
2661 aatggacaggttgcatactgtatctgcccgaagatttgcttaaagcggccgatcagcttcggaaagcaga
2731 aatgaaaatctcttccagctgttctccagcccgccttgatccgaaaacgctgctgctgaaccagaa
2801 aaagcgtcgcagaggggtgctgctgcccgcattccgctgttaatcggaacaaaccgcatgaaggatatt
2871 tattttccaccggactcagacgttcatctcaggaacggttgatgcccgcgcttctgattttattagg
2941 gcagccgctggcagagaaagccgcccgatctgtatccgcttccgctggaaagccaaattcatatgatgact
3011 gatttgttattttggcgcggccgctcgctgtgctccgcacagctccattacgcgctgctggtggt
3081 accgattcgattggcactctgataagccgcccgtataataaagcgtttcacgcattagagcttccctttgt
3151 ttcggaaatctggacgggttagaacggatggcaaaagcagagattacggatgaagtgaaacagctctct
3221 cacaccatacaatcagcatggatcacgttcgccaaaacagggaaaccaagcactgaagatgtaaaatggc
3291 cgcgctatcatgaggaaacaagagagcgtgattttaaattcagagattgagatgaaaacgaccctga
3361 agctgaaaaaaaggcagaaactattcccttcacaaggagaaataaacatggggaaaacagggatgcattggtg
3431 ctgtcatcgttgtggcagcttgtcttatcattttgtcagcagtggtgttttacgggacaccgcctattac
3501 cagcccatccgctggactggaatcactgttttccggggaatgtgatggttcccgaatatacagcat
3571 aaagaaaaccgggaaagagaagtaattctcttccgggtttttgtttttacagtttcccgcgcca
3641 atcgtctgtcattccttcataaggagcttccgaaatcacttcttcatgtcggctccctcatttttca
3711 gaaatgtaatctccgaaattcaggtacaacgattttgggtatgtttcatattttcgcggtgattcttt
3781 catcagatcaatgtggtcatttttgatagcagactgtaatttcaggatgttccatgcccacttttgggaag
3851 aaaataatgcccgtgcatgctttttcattcggcataaagttaaagaaacatctgtccctgctcggctctg
3921 tccaagacactttatatacgccttctgtcagtttgacaatattaacttctgatccgaatattccgat
3991 atccatggccatcgcggctgggcagcagagagcagcagaccagcagcagcggctcggcagcaggtattc
4061 atattgtatatctccttcttaaagttaaacaaaattatt

```

### 8.3 Aminosäuresequenzen der untersuchten Esterasen aus den Stämmen *B. subtilis* 17A1, *B. licheniformis* 19C5 und *B. licheniformis* DSM13

#### *B. subtilis* 17A1 pNB-Est17:

```

1 MTHQIVTTQY GKVKGTTENG VHKWKGIPYA KPPVGQWRFK APEPPEVWED VLDATEYGPV
61 CPQPSDLLSL SYTELPRQSE DCLYVNVFAP DTSPQNLPVM VWHGGAFYFL GAGSEPLYDG
121 SKLAAQGEVI VVTLNYRLGP FGFLHLSSFD EAYSDNLGLL DQAAALKWVR ENISAFGGDP
181 DNVTVFGESA GGMSIAALLA MPAAKGLFQK AIMESGASRT MTKEQAASTS AAFLQVLGIN
241 EGQLDKLHTV SAEDLLKAAD QLRIAEKENI FQLFFQPALD PKTLPAPPEK AISEGAASGI
301 PLLIGTTRDE GYLFFTPDSD VHSQETLDAA LEYLLGKPLA EKAADLYPRS LESQIHMMTD
361 LLFWRPAVAY ASAQSHYAPV WMYRFDWHPK KPPYNKAFHA LELPFVFGNL DGLERMAKAE
421 ITDEVKQLSH TIQSAWITFA KTGNPSTEAV NWPTYHEETR ETLILDSEIT IENDPESEKR
481 QKLFPSKGE

```

#### *B. licheniformis* 19C5 pNB-Est19:

```

1 MSHKTVTTQY GKVKGTTENG VHKWKGIPYA KPPVGPLRFK APEPPEAWEN ELDATEYGSI
61 CPQPSDLLSL SYTELPRQSE DCLYINVFAP DTSPQNLPVM VWHGGAFYFL GAGSEPLYDG
121 SRLAAQGEVI VVTLNYRLGP FGFLHLSSFE ETYSNDNLGLL DQAAALKWVR DNISAFGGDP
181 DNVTVFGESA GGMSIAALLA MPAAKGLFQK AIMESGASRT MTKEKAASTA AAFLEVLGID
241 ESQDLRLHTV SAEDLLKAAD QLRKAENENL FQLFFQPALD PKTLPAPPEK AIAEGAAAGI
301 PLLIGTNRDE GYLFFTPDSD VHSQETFDAA LVYLLGQPLA EKAADLYPRS LESQIHMMTD
361 LLFWRPAVAC ASAQSHYAPV WMYRFDWHSD KPPYNKAFHA LELPFVFGNL DGLERMAKAE
421 ITDEVKQLSH TIQSAWITFA KTGNPSTEDV KWPAYHEETR ETLILNSEIA IENDPEAEKR
481 QKLFPSQGE

```

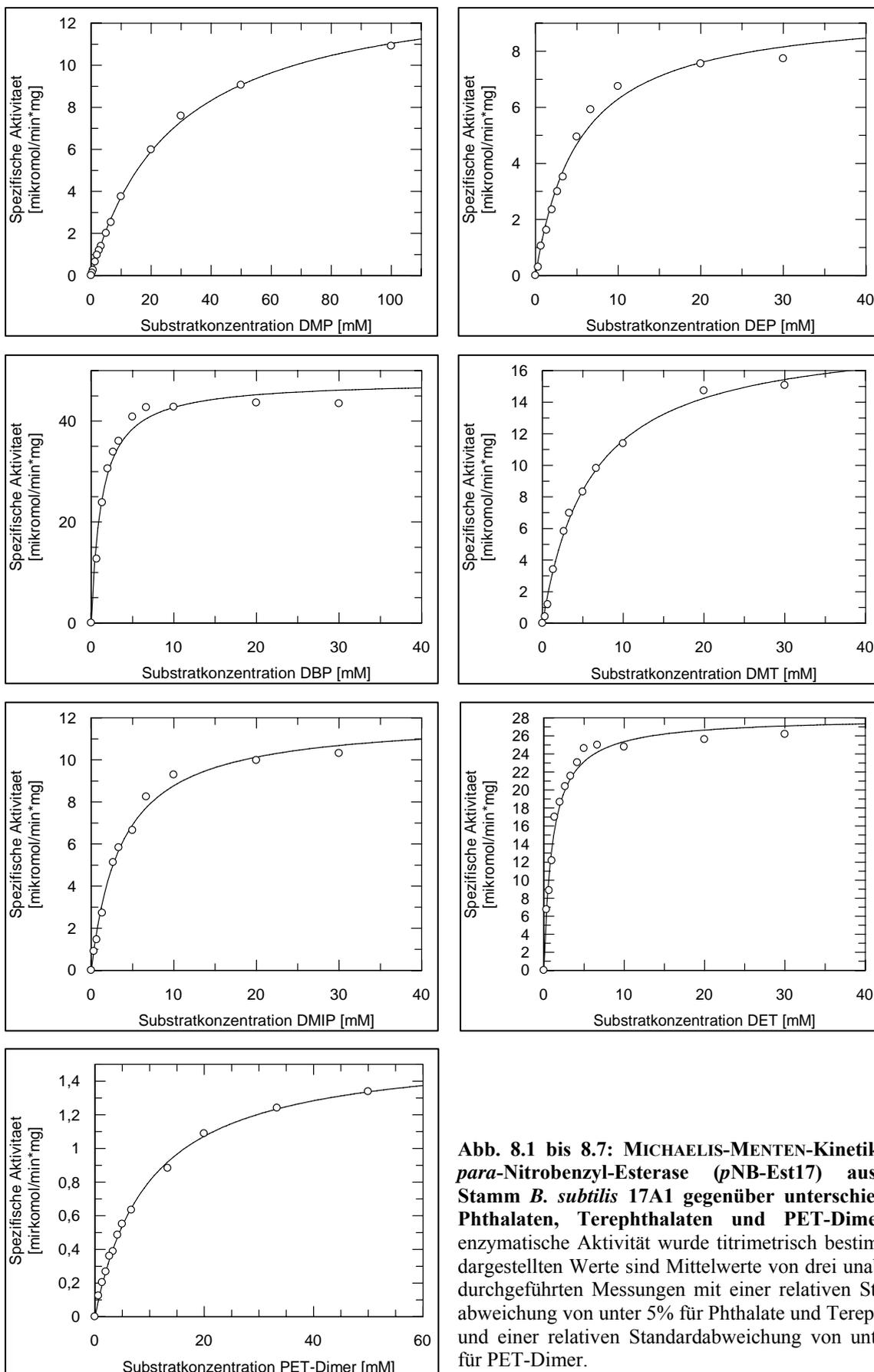
#### *B. licheniformis* DSM13 pNB-Est13:

```

1 MYDTTVEVTRF GKLKGRAENG VRIFKGVPIYA KPPVGDLRFR EPQRMEAWEG ELDAFQFGPV
61 CPQPDGVLPE SAGVQKSEDC LYLNVAPEE ADGDLPMVMW IHGGAFYRGA GSEPLYDGTQ
121 LAKQKGKIVV TINYRLGPPG FLHLSSIDDS YSSNLGLLDQ IAALWVKDN IAFFGGDRHH
181 ITVFGESAGS MSIASLLAMP KAKGLFQQAI MESGASATMS DKLAKAAAER FLRILDIDHH
241 HLERLHDVSD QELLEAADQL RTLMGENIFE LIFLPALDEK TLPLKPEVAV AKGAAKEINL
301 LIGTNRDEGV LFFPSDSL DL PESKINEILE EYMGKEAAEA ASSLYPRSLE GHVDMMTDLI
361 FWHPSVVFAS AQSRYASVFM YRFDWHADSE QPPFNKAAHG LEIPFVFGNM DILEQLTGTK
421 AGEAAQLLAE QIQAAWVSFA RSGNPSTDDV SWPDYDEDSR KTLIFDQEVA VESDPYSDKR
481 KMLTAPNPQI

```

## 8.4 MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken der *p*NB-Est17



**Abb. 8.1 bis 8.7: MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken der *para*-Nitrobenzyl-Esterase (*p*NB-Est17) aus dem Stamm *B. subtilis* 17A1 gegenüber unterschiedlichen Phthalaten, Terephthalaten und PET-Dimer. Die enzymatische Aktivität wurde titrimetrisch bestimmt; die dargestellten Werte sind Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Messungen mit einer relativen Standardabweichung von unter 5% für Phthalate und Terephthalate und einer relativen Standardabweichung von unter 10% für PET-Dimer.**

## 8.5 MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken der *p*NB-Est19

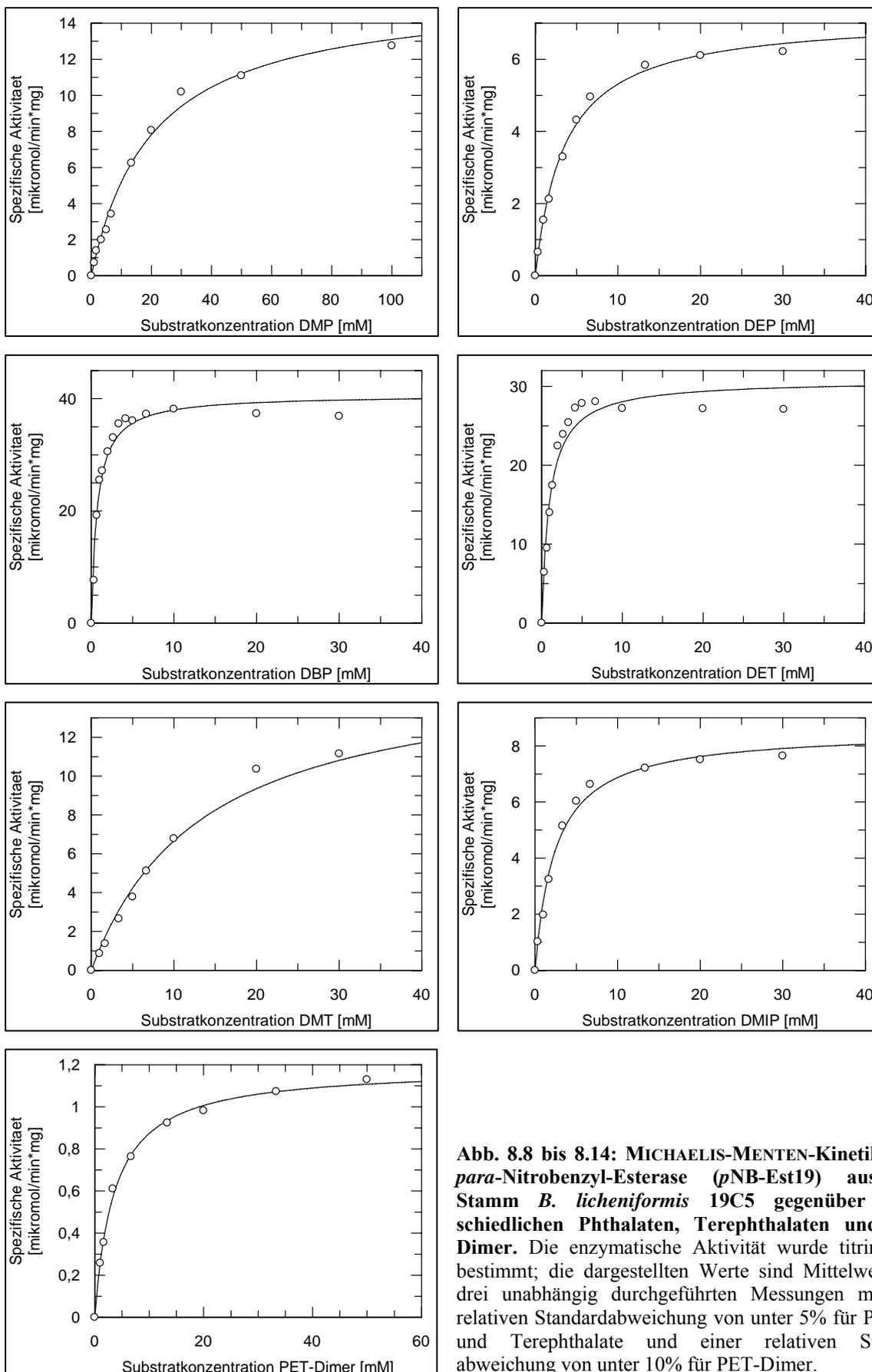


Abb. 8.8 bis 8.14: MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken der *para*-Nitrobenzyl-Esterase (*p*NB-Est19) aus dem Stamm *B. licheniformis* 19C5 gegenüber unterschiedlichen Phthalaten, Terephthalaten und PET-Dimer. Die enzymatische Aktivität wurde titrimetrisch bestimmt; die dargestellten Werte sind Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Messungen mit einer relativen Standardabweichung von unter 5% für Phthalate und Terephthalate und einer relativen Standardabweichung von unter 10% für PET-Dimer.

## 8.6 MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken der *p*NB-Est13

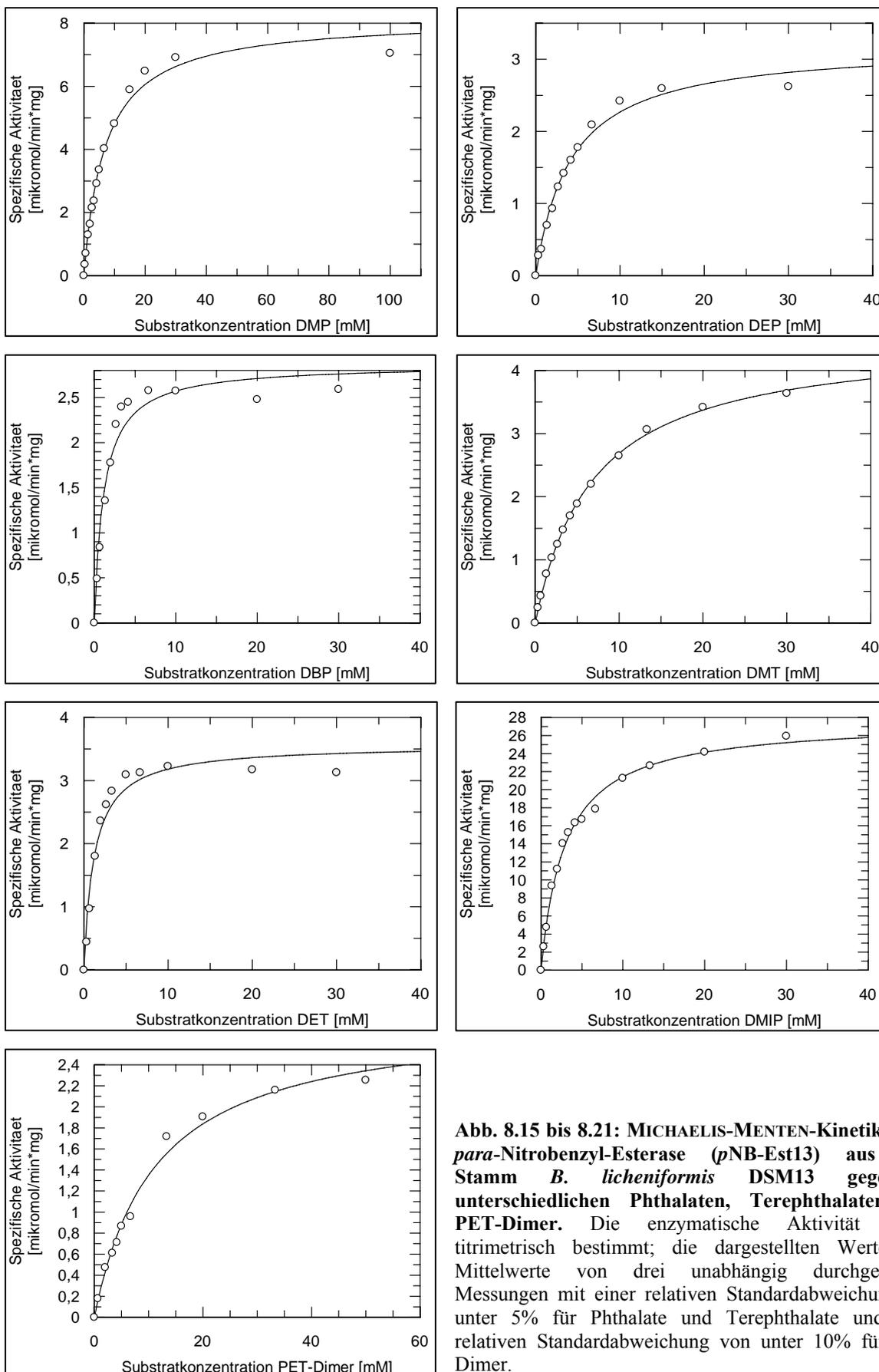
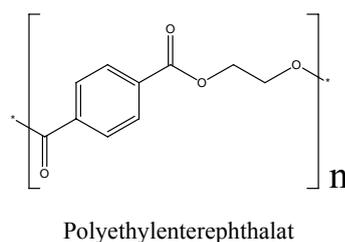
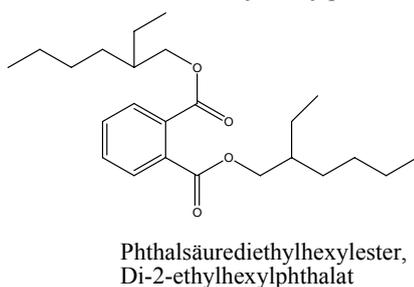
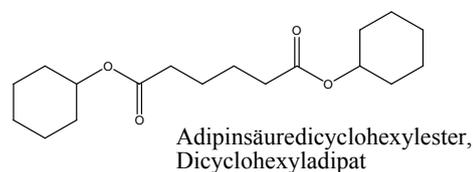
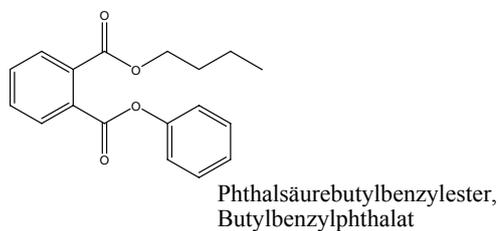
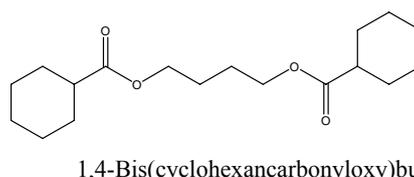
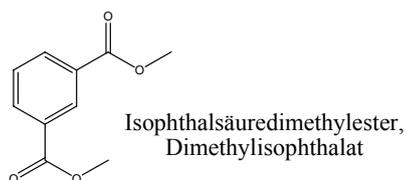
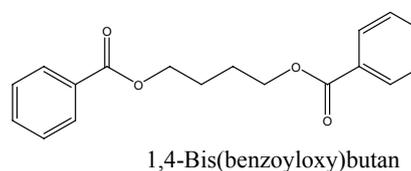
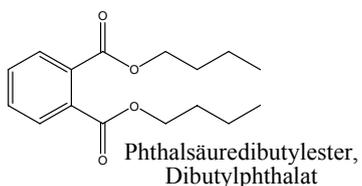
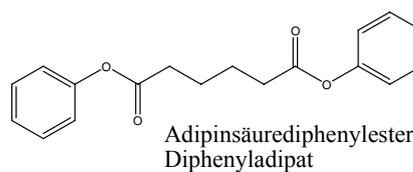
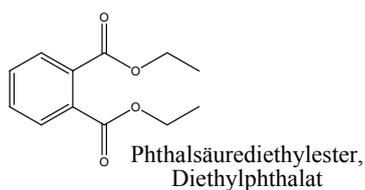
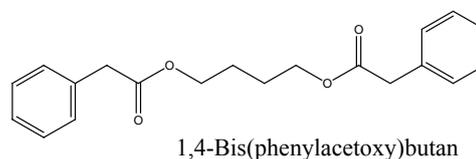
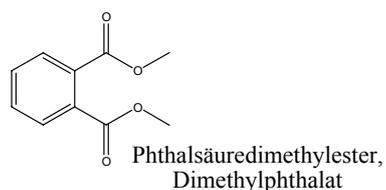
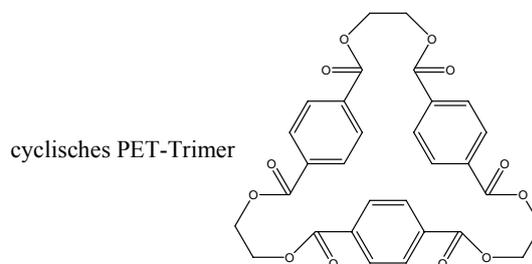
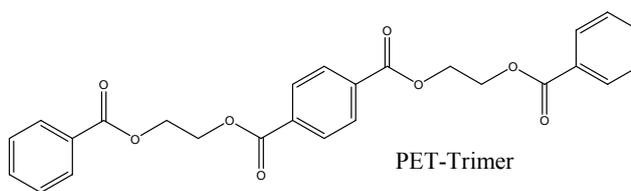
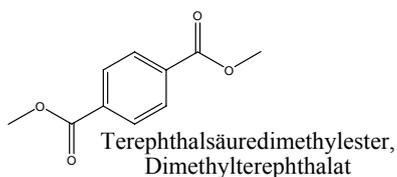


Abb. 8.15 bis 8.21: MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken der *para*-Nitrobenzyl-Esterase (*p*NB-Est13) aus dem Stamm *B. licheniformis* DSM13 gegenüber unterschiedlichen Phthalaten, Terephthalaten und PET-Dimer. Die enzymatische Aktivität wurde titrimetrisch bestimmt; die dargestellten Werte sind Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Messungen mit einer relativen Standardabweichung von unter 5% für Phthalate und Terephthalate und einer relativen Standardabweichung von unter 10% für PET-Dimer.

## 8.7 Strukturformeln Phthal- bzw. Terephthalsäureester und Modellester



## Lebenslauf

Name: André Pütz

Geburtsdatum: 01.04.1977

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung: 1983-1987 Grundschule „Am Sonnenberg“ in Salzgitter  
1987-1989 Orientierungsstufe „Am Sonnenberg“ in Salzgitter  
1989-1996 „Kranich“-Gymnasium in Salzgitter,  
Abitur: 24.05.1996

Wehrdienst: Juli 1996 - August 1997 Zivildienst „Lebenshilfe für das behinderte Kind e.V.“ in Salzgitter-Gebhardshagen

Wissenschaftliche Ausbildung:

Dipl. Biotechnologie WS 1997/1998 - SS 2003  
Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
Vordiplom: 21.12.1999; Diplom: 13.06.2003

August 2001 - Oktober 2001

Studienarbeit im Institut für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Braunschweig unter der Anleitung von Prof. Dr. Ing. Dietmar C. Hempel mit dem Titel: „Stofftransport und Substratumsatz in Biofilmsystemen unter wechselnden hydrodynamischen Bedingungen“.

Oktober 2002 - Mai 2003

Diplomarbeit in der Abteilung Enzymtechnologie der Henkel KGaA Düsseldorf unter der Anleitung durch Prof. Dr. Wolf-Dieter Deckwer mit dem Titel: „Physiologische Untersuchungen zur Optimierung der Enzymproduktion bei *Bacillus licheniformis*“.

Seit August 2003

Doktorarbeit in der Abteilung Enzymtechnologie der Henkel KGaA Düsseldorf / Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Anleitung von Prof. Dr. Karl-Erich Jäger mit dem Titel: „Isolierung, Identifizierung und biochemische Charakterisierung Dialkylphthalat spaltender Esterasen“

Praktika und Arbeitskreise:

WS 1999/2000 - SS 2001: Teilnahme am „Arbeitskreis Umweltbiotechnologie“ im Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Braunschweig mit Schwerpunkten: „Innovative Aspekte der Müllvorbehandlung“ und „Neue Verfahren der *in-situ* Bioremediation“.

August 2000 - März 2001: Studentische Hilfskraft im Institut für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Braunschweig im Bereich der Biofilm-Grundlagenforschung.

August 2002 - September 2002: Praktikum bei der Henkel KGaA Düsseldorf im Bereich der fermentativen Enzymgewinnung im Labormaßstab.

Juni 2003 - Juli 2003: Praktikum bei der Henkel KGaA Düsseldorf: Verfassen einer Betriebsanweisung für Kleinlaborfermenter

---

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch keiner Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 20.11.2006

(André Pütz)