3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen: Neue Enzyme für die Synthese chiraler Alkohole

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Julia Schümers aus Krefeld

Dezember 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. W. Hummel Korreferent: Prof. Dr. J. Jose

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2002 bis November 2006 am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Prof. Dr. W. Hummel durchgeführt.

Ein Teil dieser Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung sowie der Firma Degussa unterstützt.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1 Enzyme in der Biokatalyse	1
2 Screening auf neue Enzyme	1
3 Enzymatische Produktion chiraler Alkohole mittels Alkoholdehydrogenasen	2
4 Cofaktorregenerierung	4
4.1 Cofaktorregenerierung über Ganzzellbiokatalysatoren	6
4.2 Chirale Alkohole als Bausteine pharmazeutischer Wirkstoffe	8
Problemstellung und Zielsetzung	11
Material und Methoden	13
1 Material	13
1.1 Geräte	13
1.2 Chemikalien	14
1.3 Vektoren	14
1.4 Mikroorganismen	14
2 Mikrobiologische Methoden	15
2.1 Anzucht und Medien	15
2.2 Expression von Genen	16
2.3 Stammhaltung von Bakterienstämmen	16
3 Molekularbiologische Methoden	17
3.1 Präparation von DNA	17
3.1.1 Präparation genomischer DNA	17
3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA	18
3.2 Restriktion von DNA	18
3.3 Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA	18
3.4 Ligation von DNA	18
3.5 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	18
3.6 Transformation	18
3.7 Sequenzierung von DNA	19
3.8 Auftrennung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese	19
3.9 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	19
3.10 Primersynthese	20
3.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
3.12 Isolierung von Genen mittels GenomeWalker [™] Universal Kit (Clontech)	1 22
3.13 Erstellung einer Genbank in <i>E. coli</i>	23
3.14 Klonierung der Plasmide für die Coexpression zweier Gene in	• •
Cofaktorregenerierungssystemen	23
4 Biochemische Methoden	
4.1 Herstellung eines zellfreien Rohextrakts	
4.1.1 Zellaufschluss mittels Schwingmühle	
4.1.2 Zellaufschluss mittels Desintegrator S	
4.1.3 Zellautschluss mittels Ultraschall	
4.2 Bestimmung des Proteingehalts	
4.3 Bestimmung von Enzymaktivitäten	
4.3.1 Aktivitätstest im Photometer	
4.4 Bestimmung von Temperatur- und pH-Optimum eines Enzyms	
4.5 Bestimmung der Ammoniumsultat-Toleranz eines Enzyms	
4.6 Chromatographische Methoden für die Proteinaufreinigung	
4.6.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie	
4.6.2 Anionenaustauschchromatographie	29

	4.6.3	Hydroxylapatitchromatographie	29
	4.6.4	Gelfiltration	29
	4.6.5	Bestimmung des Molekulargewichts mittels Gelfiltration	29
4.	7 I	Konzentrieren, Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen	31
4.	8 /	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE	31
4.	9 V	Western Blot mittels NuPAGE Western Transfer	31
4.	10 l	Färbung von Proteinen in SDS-Gelen und auf Membranen	31
	4.10.	Coomassiefärbung von Proteinen in SDS-Gelen	31
	4.10.2	2 Silberfärbung von Proteinen in SDS-Gelen	31
	4.10.3	3 Amidoschwarzfärbung von Proteinen auf PVDF-Membranen	32
4.	11 l	Keton- und Alkoholanalytik mittels Gaschromatographie	32
	4.11.1	8-Chlor-6-oxooctansäureethylester- / 8-Chlor-	
	6-hyd	Iroxyoctansäureethylester-Analytik	32
	4.11.2	2 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester- / 2-Hydroxy-	
	4-phe	nylbutansäureethylester-Analytik	33
	4.11.3	3 2-Octanon- / 2-Octanol-Analytik	33
4.	12 I	Probenvorbereitung für die Analyse im Gaschromatographen	33
4.	13 I	Reduktion von Ketonen mittels zellfreier Systeme	33
4.	14 I	Reduktion von 8-Chlor-6-oxooctansäureethylester mittels Wildstammzell-	
Ro	ohextr	akt	34
4.	15 I	Reduktion von 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mittels	
Ga	anzzel	Ibiokatalysatoren ohne Cofaktorregenerierung	35
4.	16 I	Reduktion von 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mittels	
Ga	anzzel	lbiokatalysatoren mit enzymgekoppelter Cofaktorregenerierung	36
	4.16.1	Biotransformation mittels E. coli BL21(DE3) mit pGDH-NGADH	36
	4.16.2	2 Biotransformation mittels E. coli BL21(DE3) mit pMAE-NGADH	37
	4.16.3	Biotransformation mittels E. coli BL21(DE3) mit pL-LDH-NGADH	37
	4.16.4	Biotransformation mittels <i>E. coli</i> BL21(DE3) mit pFDH-NGADH bzw.	
	mit pl	NGADH-FDH	37
5	Scree	ning nach neuen Alkoholdehydrogenasen	38
5.	1 /	Aktivitätsbasiertes Screening	38
	5.1.1	Screening von Wildtyp-Stämmen mittels Analytik in Photometer und	
	Gasch	nromatograph	38
	5.1.2	Screening von Genbanken in rekombinanten E. coli-Stämmen mittels	
	Form	azantest	39
5.2	2 5	Sequenzbasiertes Screening	39
	5.2.1	Recherche in Datenbanken mittels BLAST	39
Ergebn	isse		41
1	Aktiv	itätsbasiertes Screening von Wildtypstämmen	41
2	3-Hye	droxyacyl-CoA-Dehydrogenase (HADH) aus Nocardia globerula	42
2.	1 (Charakterisierung der Wildtyp-NGADH	42
	2.1.1	Wachstumskurve von Nocardia globerula im Vergleich zur	
	Enzy	maktivität	42
	2.1.2	Temperaturoptimum	43
	2.1.3	pH-Optimum	44
	2.1.4	Molekulargewicht	45
2.2	2 /	Aufreinigung der NGADH aus dem Wildstamm	45
	2.2.1	Bestimmung der Ammoniumsulfat-Toleranz	45
	2.2.2	Aufreinigung mittels chromatographischer Verfahren	46
2.	3 I	Blot und N-terminale Ansequenzierung	48
2.4	4 /	Aufklärung der kompletten NGADH-Gensequenz	49

	2.4.1	Datenbank-Vergleich des N-Terminus	49
	2.4.2	Entwicklung spezifischer Primer anhand der BLAST-Ergebnisse	51
2.4.3 Aufklärung der kompletten Gensequenz mittels GenomeWalker ^{TI}		Aufklärung der kompletten Gensequenz mittels GenomeWalker TM	
	Universa	al Kit	51
	2.4.4	Rekombinante Überexpression der NGADH	52
	2.5 Cha	arakterisierung der rec-NGADH	53
	2.5.1	Expressionsoptimierung	53
	2.5.2	Aufreinigung der rekombinanten NGADH	55
	2.5.3	Cofaktorspezifität der NGADH	56
	2.5.4	Temperaturoptimum	57
	2.5.5	pH-Optimum	57
	2.5.6	Molekulargewicht	58
	2.5.7	Substratspektrum	59
	2.5.8	Enantioselektivität	62
	2.5.9	Kinetische Konstanten der rec-NGADH	63
	2.6 Bio	transformation mit NGADH im zellfreien System	63
	2.7 Ein	satz von pNGADH in E. coli BL21(DE3) als Ganzzellbiokatalysator	64
	2.8 Ent	wicklung von Ganzzellbiokatalysatoren mit	
	Cofaktorre	generierungssystemen	67
	2.8.1	L-LDH aus B. subtilis als cofaktorregenerierendes Enzym	67
	2.8.2	Vergleich mit den Eigenschaften der WT-L-LDH	71
	2.8.3	Cofaktorregenerierung mittels Glucosedehydrogenase (GDH)	72
	2.8.4	Cofaktorregenerierung mittels Malic Enzyme (MAE)	75
	2.8.5	Cofaktorregenerierung mittels L-Lactatdehydrogenase (L-LDH)	77
	2.8.6	Cofaktorregenerierung mittels Formiatdehydrogenase (FDH)	81
3	HADH a	nus Brevibacterium iodinum	86
	3.1 Cha	arakterisierung der Wildtyp-BIADH	86
	3.1.1	Temperaturoptimum	86
	3.1.2	pH-Optimum	87
	3.1.3	Molekulargewicht	87
	3.2 Chi	omatographische Aufreinigung aus dem Wildstamm	87
	3.3 Blo	t und N-terminale Ansequenzierung	89
	3.4 Aut	fklärung der Gensequenz	89
	3.4.1	Datenbankvergleich mittels BLAST	89
	3.4.2	Amplifikation eines Teilstücks von <i>biadh</i>	90
	3.4.3	Aufklärung der kompletten <i>biadh</i> -Sequenz mittels GenomeWalker TM	1
	Universa	al Kit	90
	3.5 Rek	combinante Uberexpression der BIADH	90
	3.6 Cha	arakterisierung der BIADH	91
	3.6.1	Expressionsoptimierung	91
	3.6.2	Aufreinigung der rekombinanten BIADH	93
	3.6.3	Cofaktorspezifität der BIADH	94
	3.6.4	Temperaturoptimum	94
	3.6.5	pH-Optimum	95
	3.6.6	Molekulargewicht	96
	3.6.7	Substratspektrum	
	3.6.8	Enantioselektivität	100
	3.6.9	Kinetische Konstanten der BIADH	100
٨	5./ B10	transformation mit BIADH im zellfreien System	101
4	Genbank	c-Screening von Gordonia amarae	103
	4.1 Her	stellung einer Genbank von Gordonia amarae in E. coli	103

	10 0		102
	4.2 S	creening der Genbank mittels aktivitätsbasierter Screeningmethoden	103
	4.3	Jberexpression der GAADH	104
	4.4 (Charakterisierung der GAADH	105
	4.4.1	Aufreinigung der rekombinanten GAADH	108
	4.4.2	Cofaktorspezifität der GAADH	109
	4.4.3	Temperaturoptimum	109
	4.4.4	pH-Optimum	109
	4.4.5	Molekulargewicht	110
	4.4.6	Substratspektrum	110
	4.4.7	Enantioselektivität	111
	4.4.8	Kinetische Konstanten der GAADH	112
	4.5 E	Biotransformation mit GAADH im zellfreien System	112
5	Seque	nzbasiertes Screening	114
	5.1 I	Datenbank-Recherche mittels BLAST	114
	5.2 H	HADH aus Deinococcus radiodurans	114
	5.2.1	Rekombinante Überexpression der verschiedenen Varianten der put-	-
	DRAI	DH 116	
	5.2.2	Charakterisierung der DRADH	118
	5.2.3	Biotransformation mit DRADH im zellfreien System	127
	5.3 S	Sequenzbasiertes Screening mittels sequenzspezifischer Primer	130
	5.3.1	Alignment von HADHs zur Entwicklung von HADH-spezifischen	
	Prime	rn 130	
	5.3.2	Einsatz der HADH-spezifischen Primer zur Amplifikation von HAD)H-
	Fragn	nenten	132
6	Einor	dnung der gefundenen HADHs in den Zellstoffwechsel	133
	6.1 V	Vachstum auf Fettsäuren	133
Disł	kussion u	nd Ausblick	135
1	Entde	ckung neuer 3-Hvdroxvacvl-CoA-Dehvdrogenasen	135
	1.1 V	Vergleich der Eigenschaften der neu gefundenen Enzyme	
	1.2 V	/ergleich mit bisher bekannten bakteriellen 3-Hydroxyacyl-CoA-	
	Dehvdro	ogenasen	138
	13 F	Einordnung der neu gefundenen Enzyme in den Zellstoffwechsel	140
2	Ganzz	zellbiokatalysatoren mit Cofaktorregenerierungssystemen	144
2	21 V	/ergleich von biochemischen Figenschaften der	
	Ganzzel	lbiotransformationssysteme	144
		/ergleich der Ganzzellhiotransformationen ohne Cofaktorregenerierung	147
	2.2 (Gegenüberstellung der einzelnen Cofaktorregenerierungssysteme	1/10
	2.3 (2.4	Auswirkung des Zusatzes von Cofaktor bei Ganzzellbiotransformationen	147
	2.7 I 2.5 V	Vergleich der Ganzzellhiotransformationen mit und ohne	132
	2.5 Cofaktor	rragenerierung	153
7110	CUIAKIU		155
Anh	anninenta	ssung	137
AIIII 1	Drimo	*	105
1		1 Drimar für das Can naadh	105
	I.I F	Drimor zur Covinnung von Seguenzinformationen von nag dle	105
	1.1.1	Primer Zur Gewinnung von Sequenzinformationen von ngadh	103
	1.1.2	Primer für die Vlagigering in pTT 21 (1)	103
	1.1.5	Primer für des Con l: 1	164
	1.2 F	Timer Iur das Gen <i>bladh</i>	164
	1.2.1	Primer für das Genome Walker ^{IM} Universal Kit	164
	1.2.2	Primer für die Klonierung in pET-21a(+)	165

	1.3	Primer zur Amplifikation des L-LDH-Gens aus Bacillus subtilis in Me	CS1 von
	pETD	Jet-1	165
	1.4	Primer zur Klonierung von ngadh, gdh, mae und fdh in die	
	Cofakt	orregenerierungskonstrukte	165
	1.4.	1 Primer zur Klonierung von <i>ngadh</i> in MCS1	165
	1.4.	2 Primer zur Klonierung von <i>ngadh</i> in MCS2	165
	1.4.	3 Primer zur Klonierung von <i>gdh</i> in MCS1	166
	1.4.	4 Primer zur Klonierung von <i>mae</i> in MCS1	166
	1.4.	5 Primer zur Klonierung von <i>fdh</i> in MCS1	166
	1.4.	6 Primer zur Klonierung von <i>fdh</i> in MCS2	166
	1.5	Primer zur Klonierung von gaadh	
	1.6	Primer zur Klonierung von put-dradh	
	1.7	Primer für das sequenzbasierte Screening auf 3-Hydroxyacyl-CoA-	
	Dehyd	rogenasen	168
2	Seq	uenzen	169
	2.1	Gensequenz von ngadh	169
	2.2	Proteinsequenz der NGADH	169
	2.3	Gensequenz von <i>biadh</i>	169
	2.4	Proteinsequenz der BIADH	
	2.5	Gensequenz von gaadh	
	2.6	Proteinsequenz der GAADH	171
	2.7	Gensequenz von <i>dradh</i>	171
	2.8	Proteinsequenz der DRADH	

Verwendete Abkürzungen

A. dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ADH	Alkoholdehydrogenase
Akt.	Aktivität
BIADH	Alkoholdehydrogenase aus Brevibacterium iodinum
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
Da bzw. kDa	Dalton bzw. Kilodalton
DRADH	Alkoholdehydrogenase aus Deinococcus radiodurans
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ee	Enantiomerenüberschuss (enantiomeric excess)
FDH	Formiatdehydrogenase
G-6-PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAADH	Alkoholdehydrogenase aus Gordonia amarae
GC	Gaschromatograph(ie)
GDH	Glucosedehydrogenase
HADH	3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
IPTG	Isopropylthiogalactosid
KPi	Kaliumphosphat
LB-Medium	Medium nach Luria und Bertani
LBamp-Medium	Luria Bertani-Medium mit 100 mg/l Ampicillin
LBkan-Medium	Luria Bertani-Medium mit 50 mg/l Kanamycin
L-LDH	L-Lactatdehydrogenase
М	Mol bzw. molar
MAE	decarboxylierende Malatdehydrogenase, Malic Enzyme
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mM	millimolar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte Form)

NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
NGADH	Alkoholdehydrogenase aus Nocardia globerula
nm	Nanometer
OD_X	optische Dichte bei X nm
ori	Origin (Replikationsstartpunkt)
Р	Promotor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Regsystem	Regenerierungssystem
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
spez.	spezifisch(e)
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEA	Triethanolamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
VM	Vollmedium
WT	Wildtyp
ZFM	Zellfeuchtmasse

Einleitung

1 Enzyme in der Biokatalyse

Enzyme sind Proteine, die als Katalysatoren spezifischer Reaktionen dienen, und in jeder Zelle vorkommen. Von Enzymen katalysierte Reaktionen zeigen im Allgemeinen hohe Substratspezifität und Enantioselektivität bei physiologischen pH- und Temperaturbedingungen ^[1]. Diese Eigenschaften führen dazu, dass Enzyme als Biokatalysatoren auch in der chemischen Industrie immer mehr eingesetzt werden ^[2]. Die Einsatzgebiete sind weit gefächert und reichen von Lebensmittelindustrie und Getränkeindustrie ^[3] über die pharmazeutische bis zur agrochemischen Industrie ^[4]. Enzymatisch produziert werden in der Lebensmittelindustrie beispielsweise Geschmacks- und Aromastoffe ^[5]. In der pharmazeutischen und agrochemischen Industrie ist die Chiralität der Produkte der Schlüsselfaktor für den Einsatz von Enzymen. Chirale Bausteine werden unter anderem in Arzneimitteln gegen Krebs ^[6], Viren ^[7], hohen Blutdruck ^[8], hohen Cholesterinspiegel^[9], Thrombosen ^[10], Angina ^[11], Diabetes^[11], Magen-Darm-Krankheiten^[11] und Alzheimer ^[12] eingesetzt.

Bei der Anwendung von Enzymen in der Produktion chiraler Bausteine besteht oft die Einschränkung, dass das industriell verwendete Substrat eine nicht-natürliche Verbindung ist, die im normalen Zellstoffwechsel nicht vorkommt. Deshalb ist oft kein passendes Enzym bekannt, das die gewünschte asymmetrische Reduktion katalysiert. Die beste Methode, ein geeignetes Enzym zu finden, ist das Screening einer großen Zahl von Mikroorganismen, Enzymen oder Enzymvarianten^[13].

2 Screening auf neue Enzyme

Beim Screening auf neue Enzyme kann zwischen Selektion und Detektion unterschieden werden. Selektion bedeutet in diesem Zusammenhang, dass Mikroorganismen mit geeigneter katalytischer Aktivität auf einem bestimmten Medium einen Wachstumsvorteil haben ^[14]. Zum Beispiel kann hier das gewünschte Substrat als einzige Kohlenstoffquelle verwendet werden. Außerdem kann in Komplementationsanalysen Medium eingesetzt werden, dem ein essentieller Bestandteil fehlt ^[15].

Die Detektion von Enzymaktivität erfolgt zum Beispiel über die mit der Enzymreaktion gekoppelte Produktion eines farbigen Produkts ^[16], den Verbrauch von Cofaktoren ^[17] oder den Einsatz von geeigneten Analysegeräten wie Gaschromatograph ^[18], High Performance

Liquid Chromatography oder Kapillarelektrophorese^[19], mit denen das Reaktionsprodukt nachgewiesen werden kann^[20].

Das Screening von Genbanken in *E. coli* bzw. das Screening von rekombinanten Enzymvarianten, z. B. nach gerichteter Evolution, erfolgt am einfachsten auf Agarplatten ^[21]. Dabei können Zellwachstum und Nachweisreaktion parallel oder nacheinander stattfinden. Ein Beispiel, bei dem Wachstum und Aktivitätsnachweis gleichzeitig ablaufen, ist der Nachweis von Lipase-Aktivtät auf Tributyrin-Platten ^[22] oder auch der Nachweis der Produktion von Ketonen, z.B. durch Alkoholdehydrogenasen, auf Pararosanilin-Platten ^[23], ^[24]. Eine Entkopplung von Wachstum auf Agarplatten und Nachweisreaktion findet beim Formazantest statt, mit dem die Aktivität eines NAD-abhängigen Enzyms, wie z. B. einer Fomiatdehydrogenase, über die Produktion von NADH nachgewiesen werden kann ^[25].

Genbanken einzelner Organismen und mittels gerichteter Evolution erhaltene Banken verschiedener Varianten bestehen oft aus mehreren zehntausend Klonen ^[26]. Um bei geringen Zeit- und Arbeitsaufwand möglichst viele solcher Klone zu screenen, ist es notwendig, ein High-Throughput-Screeningverfahren anzuwenden ^[27]. Das bedeutet, dass eine Methode eingesetzt werden muss, bei der möglichst viele Klone gleichzeitig gescreent werden können. Hier bieten sich vor allem Assays auf Agarplatten an ^[28]. Weiterhin kann das Screening auch automatisiert durchgeführt werden. Hier kommen z. B. zunächst Pickroboter zum Einsatz, die die gewünschten Klone in Mikrotiterplatten überführen. Anschließend wird ein automatisierter, meist photometrischer Test im Mikrotiterplatten-Maßstab durchgeführt ^[29].

Die mittels Screening gefundenen Enzyme können, wie bereits erwähnt, in der Produktion chiraler Bausteine eingesetzt werden. Hierbei spielen besonders chirale Alkohole eine große Rolle.

3 Enzymatische Produktion chiraler Alkohole mittels Alkoholdehydrogenasen

Chirale Alkohole können unter Verwendung von Alkoholdehydrogenasen (ADHs) aus prochiralen Ketonen hergestellt werden ^[30]. Alkoholdehydrogenasen gehören zur Gruppe der Oxidoreduktasen und sind meist abhängig von den Cofaktoren NAD oder NADP. Diese Enzyme lassen sich je nach Länge der Aminosäurekette pro Untereinheit in die drei Gruppen short-chain, medium-chain und long-chain Alkoholdehydrogenasen einteilen. Dabei weisen die short-chain ADHs ca. 250 Aminosäuren pro Untereinheit auf, medium-

chain ADHs tragen ca. 350 und long-chain ADHs ca. 385 Aminosäuren. Short-chain ADHs sind in der Regel nicht von Metallionen abhängig. Medium-chain ADHs benötigen oft Zinkionen, um katalytisch aktiv sein zu können, und long-chain ADHs sind meist eisenabhängig^[31], ^[32], ^[33]. Abbildung 1 zeigt eine typische ADH-katalysierte Reaktion.

$$\begin{array}{c} O \\ R_1 \\ R_2 \end{array} + NAD(P)H \end{array} \xrightarrow{ADH} OH \\ R_1 \\ R_1 \\ R_2 \end{array} + NAD(P)$$

Abbildung 1: ADH-katalysierte Reduktion eines Ketons.

Einige Alkoholdehydrogenasen können enantioselektiv (*R*)-Alkohole produzieren, wie beispielsweise die Mg^{2+} -abhängige short-chain ADH aus *Lactobacillus kefir*, und werden dann als (*R*)-ADHs bezeichnet. Andere sind (*S*)-spezifisch, wie zum Beispiel die Zn²⁺-abhängige medium-chain ADH aus *Rhodococcus erythropolis* ^[34] und werden demzufolge (*S*)-ADHs genannt. Weitere ADHs, wie die sehr hitzestabile ADH aus *Thermoanaerobium brockii*, sind in ihrer Enantioselektivität davon abhängig, welche Seitenkette des Substrats größer und welche kleiner ist. Diese Enzyme besitzen eine kleine Tasche für die kleinere Seitenkette des Substrats und eine größere Tasche für die größere Seitenkette des Substrats. Bei der Reduktion von 2-Butanon ist beispielsweise die Ethylgruppe die größere Seitenkette, es wird zu (*R*)-2-Butanol reduziert. Dient jedoch andererseits 3-Heptanon als Substrat, ist die Ethyl-Seitenkette der kleinere Rest und das Substrat wird zum korrespondierenden (*S*)-Alkohol reduziert ^[35].

Für den Einsatz in Biotransformationen können gereinigte Alkoholdehydrogenasen oder ganze Zellen, die Alkoholdehydrogenasen exprimieren, genutzt werden. Die Verwendung von ganzen Zellen hat dabei den Vorteil, dass komplizierte und zeitintensive Verfahren für die Reinigung der ADH entfallen ^[36]. Ein Nachteil ist, dass in Wildtypzellen der Anteil der ADH am Gesamtprotein nicht sehr hoch ist. Zusätzlich ist es möglich, dass Wildtypzellen viele verschiedene ADHs exprimieren, wie dies z. B. bei *Saccharomyces cerevisiae* der Fall ist ^[37], ^[38]. Die Verwendung solcher Zellen in der Reduktion prochiraler Ketone führt oft zu schlechten *ee*-Werten des Produkts, da die verschiedenen ADHs unterschiedliche Enantiomere des Alkohols produzieren ^[39-41]. Diese Nachteile können durch die heterologe Expression einer ADH in *E. coli* umgangen werden.

Wie unter Punkt 3 erwähnt, ist die durch ADH-katalysierte Reduktion von Ketonen meist abhängig vom Cofaktor NAD(P)H. Auch weitere, industriell einsetzbare Dehydrogenasen wie z. B. Leucindehydrogenasen ^[42] sind NAD(P)H abhängig. Um eine effiziente Umsetzung durch eine NAD(P)H-abhängige Dehydrogenase zu gewährleisten, muss der Cofaktor entweder stöchiometrisch zugesetzt oder regeneriert werden ^[43].

4 Cofaktorregenerierung

Der stöchiometrische Zusatz von reduziertem Cofaktor in der Synthese chiraler Bausteine durch Cofaktor-abhängige Enzyme ist eine sehr kostenintensive Methode (siehe Tabelle 1). Deshalb ist die Regenerierung des Cofaktors von Vorteil^[44].

Tabelle 1: Preis für Nicotinamid-Cofaktoren (Biomol GmbH, 2006).

Cofaktor	Preis / g [€]
NAD	19
NADH	58
NADP	175
NADPH	439

Bei der Reduktion eines prochiralen Ketons durch eine Alkoholdehydrogenase kann die Regenerierung des Cofaktors durch das gleiche Enzym erfolgen, wie die Reduktion des eigentlichen Substrats ^[45; 46]. Zu diesem Zweck muss ein kostengünstiger Alkohol als zweites Substrat zugesetzt werden. Dieser Alkohol muss entweder gut in der wässrigen Phase löslich sein oder es muss eine zweite, organische Phase im Reaktionsansatz enthalten sein ^[47]. Wird eine zweite, organische Phase eingesetzt, muss darauf geachtet werden, dass das eingesetzte Enzym nicht durch die organische Phase inaktiviert wird ^[48; 49]. Für Alkoholdehydrogenasen, die die Oxidation von Isopropanol katalysieren können, ist dieses ein geeignetes Substrat für die Regenerierung des Cofaktors ^[50-52]. Die zugehörige Reaktionsgleichung ist in Abbildung 2 dargestellt.



Abbildung 2: Gleichzeitige Reduktion eines Ketons und Cofaktorregenerierung durch eine ADH; Substrat für die Cofaktorregenerierung ist hier Isopropanol.

Eine weitere Möglichkeit ist die Cofaktorregenerierung durch ein zusätzlich beigefügtes Enzym. Für die Regenerierung von NADPH wurde bereits der Einsatz der Glucosedehydrogenase (GDH) aus *Bacillus subtilis*^[53], des Malic Enzyme (MAE) aus *Escherichia coli*^[54], der Isocitratdehydrogenase (IDH) aus *B. subtilis*^[55], sowie der Einsatz eines Systems aus Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* und Transhydrogenase (PNT) aus *E. coli* durchgeführt^[55].

Zur Regenerierung von NADH wurde seit 1980 bereits sehr oft erfolgreich die FDH aus *C. boidinii* ^[56; 57] eingesetzt. Zudem ist die Anwendung der GDH aus verschiedenen anderen *Bacillus*-Stämmen ^[58] und die Anwendung des Malic Enzyme aus *E. coli* ^[59] bekannt. Weiterhin kann die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides* für die Regenerierung von NAD(P)H eingesetzt werden ^[60]. Die verschiedenen Systeme sind in Abbildung 3 graphisch dargestellt.



Abbildung 3: Regenerierung des von der ADH benötigten Cofaktors NAD(P)H mittels verschiedener Systeme.

Die Biotransformation mittels ADH und die Regenerierung des benötigten Cofaktors kann, wie bereits oben erwähnt, unter Einsatz von aufgereinigten Enzymen im zellfreien System ablaufen, aber auch in rekombinanten *E. coli*-Stämmen^[61]. Hier können *E. coli*-Stämme eingesetzt werden, die nicht nur die ADH, sondern auch das cofaktorregenerierende Enzym exprimieren^[62]. Bei Umsetzung im zellfreien System besteht zum einen der Nachteil, dass Cofaktor zugesetzt werden muss, während in Ganzzellbiokatalysatoren der bereits in den Zellen vorhandene Cofaktor genutzt werden kann^[43]. Zum anderen müssen in zellfreien Biotransformationen eingesetzte Enzyme aufwendig isoliert und aufgearbeitet werden, was bei der Verwendung ganzer Zellen entfällt^[63].

4.1 Cofaktorregenerierung über Ganzzellbiokatalysatoren

Rekombinante *E. coli*-Zellen, die eine Dehydrogenase und ein cofaktorregenerierendes Enzym coexprimieren, können als Ganzzellbiokatalysatoren in der Produktion chiraler Produkte verwendet werden ^[64]. Die Coexpression der Dehydrogenase mit dem cofaktorregenerierenden Enzym hat den Vorteil, dass beide Enzyme auf engem Raum nebeneinander vorliegen und so ein schneller Transfer des Cofaktors gewährleistet ist. Die Überexpression in *E. coli* bewirkt außerdem meist höhere spezifische Aktivitäten der einzelnen Enzyme als in den jeweiligen Wildtypzellen. Ein weiterer Vorteil ist, dass der zellinterne Cofaktor genutzt werden kann ^[65]. Verschiedene Ganzzellsysteme, die auf rekombinanten *E. coli*-Zellen basieren, sind bereits beschrieben (Tabelle 2).

Produktionsenzym	cofaktorregenerierendes Enzym	Cofaktor	Literatur
Aldehyd-Reduktase	Glucose Dehydrogenase		[66; 67]
aus Sporobolomyces salminocolor	aus Bacillus megaterium	NADPH	[,]
short-chain Dehydrogenase	Glucose Dehydrogenase	NADDU	[68; 69]
aus Candida magnoliae	aus Bacillus megaterium	NADPH	
Leucindehydrogenase	Formiatdehydrogenase	NADH	[65]
aus Bacillus sphaericus	aus Candida boidinii	NADII	
Phenylalanindehydrogenase	Formiatdehydrogenase	марн	[65]
aus Bacillus sphaericus	aus Candida boidinii	NADII	
Alanindehydrogenase	Formiatdehydrogenase	NADH	[65]
aus Bacillus stearothermophilus	aus Candida boidinii	NADII	
Morphindehydrogenase,	Pyridin Nucleotid Transhydrogenase	ΝΑΠΡ	
Morphinonreduktase	aus Pseudomonas fluorescens	NADI,	[70]
aus Pseudomonas sp.	aus i seudomontas fiuorescens	NADII	
Alkoholdehydrogenase	Pyridin Nucleotid Transhydrogenase		56.43
aus Lactobacillus kefir	aus E. coli, Formiatdehydrogenase	NADPH	[64]
	aus Candida boidinii		
Alkoholdehydrogenase	Malic Enzyme aus <i>E_coli</i>	NADPH	[55]
aus Lactobacillus kefir	Walle Elizylile dus E. con		
Alkoholdehydrogenase	Isocitratdehydrogenase	NADPH	[55]
aus Lactobacillus kefir	aus Bacillus subtilis	TUIDI II	
Alkoholdehydrogenase	Glucosedehydrogenase	NADPH	[55]
aus Lactobacillus kefir	aus Bacillus subtilis		
Alkoholdehydrogenase	Formiatdehydrogenase	NADPH	[71]
aus Lactobacillus kefir	aus Candida boidinii		
Ketoreduktase	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	NADPH	[72]
aus Hansenula polymorpha	aus Saccharomyces cerevisiae		
Poly-3-hydroxybutyrat-Operon aus	Pyridin Nucleotid Transhydrogenase	NADPH	[73]
Alcaligenes eutrophus	aus E. coli		
Cytochrom P450cam Monooxygenase,	Glycerindehydrogenase		[74, 75]
Putidaredoxinreduktase, Putidaredoxin	aus F coli	NADH	[/4; /5]
aus Pseudomonas putida			
Leucindehydrogenase	Formiatdehydrogenase	NADH	[76; 77]
aus Bacillus cereus	aus Candida boidinii	10 IDII	
(S)-spezifische ADH	Formiatdehydrogenase	NADH	[62]
aus Rhodococcus erythropolis	aus Candida boidinii	NADII	
2-Ketosäurereduktase aus F_{coli} K12	Glucosedehydrogenase	NADPH	[78]
2 Ixtosutroroduktase aus L. con K12	aus Bacillus subtilis	11110111	
Mannitoldehydrogenase	Formiatdehydrogenase	NADH	[79; 80]
aus Leuconostoc pseudomesenteroides	aus Mycobacterium vaccae	INADII	

 Tabelle 2: Literaturbekannte Ganzzellsysteme, in denen ein Produktionsenzym mit einem cofaktorregenerierenden Enzym coexprimiert wird.

Tabelle 2 zeigt, dass künstlich erzeugte Designerzellen, die zusätzlich zu einem produzierenden Enzym ein cofaktorregenerierendes Enzym exprimieren, bereits in mehreren Fällen einsatzbereit vorliegen. Die Verwendung solcher Zellen stellt ein einfaches, hocheffizientes und breit anwendbares Verfahren zur Synthese optisch aktiver Alkohole dar ^[81].

Im folgenden Absatz sind Beispiele mit chiralen Alkoholen als Bausteinen pharmazeutischer Wirkstoffe aufgezeigt. Vor allem chirale α - oder β -Hydroxyester, aber auch β , δ -Dihydroxyester spielen hier eine wichtige Rolle^[82].

4.2 Chirale Alkohole als Bausteine pharmazeutischer Wirkstoffe

Chirale Alkohole kommen beispielsweise als Bausteine in der Produktion von Hemmstoffen des Cholesterol-Synthese-Enzyms, genauer der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA-Reduktase, zum Einsatz. Die HMG-CoA-Reduktase katalysiert die Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonat, einen Schritt im Cholesterin-Biosyntheseweg ^[83]. Die Hemmung dieses Enzyms führt zur Senkung des Cholesterinspiegels sowie des Gehalts an low-density-Lipoprotein, Triglyceriden und very-low-density-Lipoprotein im Blut, wobei die Menge an high-density Lipoprotein erhöht wird ^[84]. Dies ist bei allen Formen von Hypercholesterinämie erwünscht, um das Arteriosklerose-Risiko zu senken.

Abbildung 4 zeigt drei verschiedene HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren.



Atorvastatin



Fluvastatin

Pravastatin

COOF

Abbildung 4: Hemmstoffe der HMG-CoA-Reduktase als Beispiele für pharmazeutische Wirkstoffe mit einem chiralen Alkoholbaustein^[85-87].

Die in Abbildung 4 gezeigten Wirkstoffe enthalten jeweils eine Dihydroxyhexanoat-Seitenkette, die zwei chirale C-Atome aufweist. Diese Seitenkette kann durch Alkoholdehydrogenasen hoch enantio- und stereoselektiv direkt aus einem Dioxohexansäure-Derivat produziert werden ^[88]. Ein anderer Weg führt über die Reduktion eines 3-Oxobutansäurederivats, z. B. 4-Chlor-3-oxobutansäureethylester, die ebenfalls hoch stereoselektiv von Alkoholdehydrogenasen katalysiert werden kann ^[89].

Ein anderes Beispiel für die Verwendung chiraler Alkohole zur Produktion pharmazeutischer Wirkstoffe ist die Synthese von Inhibitoren für das Angiotensin-I-Conversionsenzym (ACE-Inhibitoren). Dieses Enzym katalysiert den Schritt von Angiotensin I zu Angiotensin II, einer der stärksten blutdrucksteigernden Substanzen ^[90]. Inhibitoren des ACE werden deshalb gegen überhöhten Blutdruck und Herzkrankheiten eingesetzt ^[91]. ACE-Inhibitoren wurden aus der Struktur des ACE-Substrats Angiotensin I entwickelt ^[92].

Bei der Synthese dieser Gruppe von Inhibitoren werden chirale 2-Hydroxy-4-phenylbutansäureethylester-Bausteine verwendet ^[93]. Abbildung 5 zeigt verschiedene dieser Wirkstoffe, die den genannten Baustein als Seitenkette tragen.



Trandolapril

Abbildung 5: Inhibitoren des Angiotensin-I-Conversionsenzyms als Beipsiel für Wirkstoffe in deren Synthese ein chiraler Alkoholbaustein benötigt wird^[94-102].

Um die genannten chiralen Alkohole herstellen zu können, die als Bausteine für die Synthese pharmazeutischer Wirkstoffe dienen, werden unter anderem Alkoholdehydrogenasen eingesetzt. Obwohl bereits einige Enzyme bekannt sind, die die korrespondierenden prochiralen Ketone reduzieren, werden stets neue Enzyme benötigt, die ein verändertes Substratspektrum, eine andere Enantioselektivität oder eine höhere Aktivität zeigen.

Problemstellung und Zielsetzung

Obwohl bereits viele Alkoholdehydrogenasen bekannt sind, die die Reduktion prochiraler Carbonylverbindungen katalysieren, gibt es eine Vielzahl von chiralen Alkoholen, die bislang nicht auf biokatalytischem Weg produziert werden. Beispiele für solche chiralen Alkohole sind Verbindungen mit voluminösen Substituenten benachbart zur Hydroxygruppe oder halogen-substituierten Seitenketten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb das Auffinden neuartiger Alkoholdehydrogenasen und ihre Bereitstellung für den Einsatz in Biotransformationen. Zu diesem Zweck sollten verschiedene Screeningmethoden entwickelt und eingesetzt werden.

Zum einen sollten Wildtypstämme aus der am Institut für Molekulare Enzymtechnologie Analytik vorliegenden Stammsammlung durch mittels Photometer und Gaschromatographie auf ihre Aktivität gegenüber bestimmten Substraten hin untersucht werden. Anschließend sollten einerseits aus aktiven Stämmen Enzyme über chromatographische Methoden aufgereinigt, N-Terminal ansequenziert und die zugehörigen Gene durch den Einsatz von speziellen PCR-Methoden isoliert werden. Andererseits sollten aus der genomischen DNA weiterer aktiver Stämme Genbanken in E. coli produziert werden. Über einen zu entwickelnden Agarplattentest sollten diese Genbanken gescreent und auf diese Weise die Gene der für die Aktivität verantwortlichen Enzyme isoliert werden.

Weiterhin sollten sequenzbasierte Ansätze für das Auffinden weiterer Alkoholdehydrogenasen genutzt werden. Hier sollten ADH-spezifische Primer entwickelt und durch PCR, in der genomische DNA eines aktiven Mikroorganismus als Template dient, das entsprechende ADH-Gen amplifiziert werden.

Nach der Isolierung der *adh*-Gene sollten die Enzyme in *E. coli* überexprimiert und charakterisiert werden. Weiterhin sollten diese Enzyme gemeinsam mit cofaktorregenerierenden Enzymen in zellfreien Biotransformationen eingesetzt werden. Zusätzlich sollten Ganzzellsysteme entwickelt werden, in denen sowohl eine Alkoholdehydrogenase als auch ein cofaktorregenerierendes Enzym exprimiert wird. Nach der Durchführung von Ganzzellbiotransformationen sollten die eingesetzten Systeme miteinander verglichen werden.

Die aus den verschiedenen Screeningansätzen resultierenden Alkoholdehydrogenasen sollten weiterhin in den Stoffwechsel der sie natürlicherweise exprimierenden Mikroorganismen eingeordnet werden.

Material und Methoden

1 Material

1.1 Geräte

Analytik

Gaschromatograph GC 17-A	Shimadzu
Chromatographie	
BioCAD Sprint	PerSeptive Biosystems
Desintegration	
Schwingmühle MM200 Sonopuls HD60 Desintegrator S	Retsch Bandelin IMA
Elektrophorese	
Elektrophoresekammer Mupid®-ex NuPAGE® XCell SureLock TM Mini Cell NuPAGE® Bis-Tris Gele NuPAGE® XCell II TM Blot Modul EagleEye II	Eurogentec Invitrogen Invitrogen Invitrogen Stratagene
PCR	
Personal Cycler	Biometra
Spektroskopie	
UV/VIS-Spektralphotometer UV-1602	Shimadzu
Ultrafiltration	
Microcon 10 kDa bzw. 3 kDa Amicon Ultrafiltrationszelle Modell 8050 und 8010 YM-Membran 10 kDa	Millipore Millipore Millipore
Zentrifugation	
Sorvall RC5B und RC5B-Plus Tischzentrifuge Mikro 22R Tischzentrifuge Rotina 35R Speed-Vac-Konzentrator Univapo 150H Kühlfalle Unicryo MC2L	DuPont Hettich Hettich Uniequip Uniequip

1.2 Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien waren mindestens von p.a.-Qualität und stammten von Sigma, Aldrich, Fluka, Roth, Acros oder Merck. Medienbestandteile wurden von Merck, Difco oder Oxoid bezogen. Restriktionsenzyme waren von Fermentas oder New England BioLabs. Alle weiteren Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten waren von Qiagen, Fermentas, Clontech oder Roche.

1.3 Vektoren	
pET-21a(+)	Novagen
pETDuet-1	Novagen
pZErO-2	Invitrogen
1.4 Mikroorganismen	
Nocardia globerula	DSM 46019
Brevibacterium iodinum	DSM 20626
Deinococcus radiodurans	DSM 20539
Gordonia amarae	DSM 43392
Arthrobacter sp.	DSM 4640
Brevibacterium linens	DSM 43297
Rhodococcus erythropolis	DSM 20425
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene
E. coli BL21(DE3)	Novagen
E. coli TOP10	Invitrogen

2 Mikrobiologische Methoden

2.1 Anzucht und Medien

Verwendete Medien wurden vor dem Gebrauch bei 121 °C und 2 bar Druck für 20 Minuten autoklaviert. Festen Medien wurden 15 g/l Agar zugesetzt.

Medium für die Anzucht von Nocardia globerula:

Glucose	10 g/l
Pepton	10 g/l
Casein Pepton	2 g/l
Hefeextrakt	2 g/l
NaCl	6 g/l
pH 7,8	

Medium für die Anzucht von Brevibacterium iodinum, Deinococcus radiodurans, Arthrobacter sp. und Brevibacterium linens:

Casein Pepton, tryptisch verdaut	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Glucose	5 g/l
NaCl	5 g/l
рН 7,2 - 7,4	

Medium für die Anzucht von Gordonia amarae und Rhodococcus erythropolis:

Glucose	4 g/l
Hefeextrakt	4 g/l
Malzextrakt	10 g/l
CaCO ₃ (nur bei Festmedium)	2 g/l
pH 7,2 (mit KOH)	

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) für die Anzucht von E. coli-Stämmen

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

рН 7,0

Bei Anzucht von *E. coli*-Stämmen, die ein Plasmid mit Ampicillin-Resistenzgen trugen (pET-21a(+) bzw. pETDuet-1), wurden dem LB-Medium 100 μ g/ml Ampicillin zugesetzt (LBamp-Medium). Bei Plasmiden mit Kanamycin-Resistenzgen (pZErO-2) wurden 50 μ g/ml Kanamycin zugesetzt (LBkan-Medium).

Die Anzucht von *Nocardia globerula*, *Gordonia amarae* und *Rhodococcus erythropolis* erfolgte bei 28 °C, die Anzucht von *Brevibacterium iodinum*, *Deinococcus radiodurans*, *Arthrobacter* sp. und *Brevibacterium linens* bei 30 °C. *E. coli* wurde, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C kultiviert. Alle Flüssigkulturen wurden bei 120 rpm inkubiert.

2.2 Expression von Genen

Zur rekombinanten Expression von Genen wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) verwendet. Die Gene waren dabei in die Expressionplasmide pET-21a(+) bzw. pETDuet-1 kloniert, die jeweils ein Ampicillin-Resistenzgen tragen. Für die Expression wurden zunächst 30 ml LBamp im 100 ml-Kolben mit einer Gefrierkultur beimpft und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 l LBamp im 5 l-Kolben 1-prozentig aus der Übernachtkultur beimpft und bei 37 °C und 120 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 – 0,7 inkubiert. Nachfolgend wurde die Genexpression durch Zugabe von 0,1 – 1 mM IPTG induziert und die Kulturen zwischen 3 und 22 Stunden bei Temperaturen von 23 – 37 °C inkubiert.

2.3 Stammhaltung von Bakterienstämmen

Zur Lagerung von Bakterienstämmen über lange Zeit wurden zunächst Flüssigkulturen der Stämme über Nacht angezogen. Gefrierkulturen wurden hergestellt, indem in Cryoröhrchen (Nunc) 700 μ l Übernachtkultur mit 300 μ l sterilem, 86-prozentigem Glycerin versetzt wurden. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3 Molekularbiologische Methoden

3.1 Präparation von DNA

3.1.1 Präparation genomischer DNA

Für die Präparation genomischer DNA wurden Zellen aus 200 ml einer 2-prozentig angeimpften Übernachtkultur durch Zentrifugation (15 min, 4 °C, 5000 rpm) geerntet und das Pellet in 4 Volumen Lysispuffer resuspendiert.

Lysispuffer:

15 % Saccharose 50 mM EDTA in 50 mM Tris-HCl mit NaOH auf pH 8,0

3 mg/ml Lysozym wurden zugegeben und der Ansatz 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 1 % SDS, ein Volumen A. dest., 0,4 mg/ml Proteinase K und 0,1 mg/ml RNase A zugesetzt. Es folgte eine Inkubation von 1 Stunde im Wasserbad bei 50 °C. 2 Volumen 100 mM Tris-Puffer pH 8,0 gesättigtes Phenol wurden nun durch Schwenken mit dem Ansatz vermischt und im Folgenden 20 Minuten bei 4 °C und 5000 zentrifugiert. Die wässrige Phase mit 2 rpm wurde Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI) im Verhältnis 25:24:1 versetzt, die Phasen durch Schwenken vermischt und erneut zentrifugiert. Die obere Phase wurde wieder mit einem Volumen PCI versetzt und der Ansatz abzentrifugiert. Nun folgte die Zugabe von 25 ml Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1) und ein erneuter Zentrifugationsschritt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 4,8 versetzt. Anschließend wurde sie mit 2 Volumen eiskaltem Ethanol (-20 °C) überschichtet. Die genomische DNA fiel an der Grenzschicht aus und konnte dem Ansatz entnommen werden. Die DNA wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 70-prozentigem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde sie in der Speed Vac getrocknet, in 100 µl TE Puffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Der Rest des Ansatzes wurde über Nacht bei -20 °C

eingefroren, am nächsten Tag wieder aufgetaut und die erneut an der Grenzschicht ausgefallene DNA wie oben beschrieben behandelt.

3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mittels QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen laut Anweisung des Herstellers.

3.2 Restriktion von DNA

Zu analytischen und präparativen Zwecken wurden 0,5 bis 1 µg DNA mit 1 - 5 Units Restriktionsenzym in einem Volumen von 30 bis 50 µl für 90 Minuten nach Anweisung des Herstellers (Fermentas bzw. New England BioLabs) geschnitten. Im Anschluss wurde die DNA im Agarosegel aufgetrennt und ggf. aus dem Agarosegel präpariert.

3.3 Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA

Dem Restriktionsansatz wurde nach Durchführung der Restriktion Alkalische Phosphatase aus Shrimps oder aus Kälberdarm zugesetzt (Shrimp Alkaline Phosphatase bzw. Calf Intestine Alkaline Phosphatase, Fermentas). Die Dephosphorylierung wurde laut Herstellerangaben durchgeführt.

3.4 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels DNA Rapid Ligation Kit von Roche bzw. Rapid Ligation Kit von Fermentas nach Anweisung der Hersteller. Die Ligationsansätze wurden dabei 15 bzw. 30 Minuten bei Raumtemperatur bzw. 22 °C inkubiert.

3.5 Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Zellen

Die Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Methode von Hanahan ^[103]. Die kompetenten Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

3.6 Transformation

Für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde 1 µl Plasmid-Lösung bzw. 5 µl Ligationsansatz (siehe 3.4) zu 100 µl kompetenten *E. coli*-Zellen gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 50 Sekunden in einen Thermoblock mit einer Temperatur von 42 °C gegeben und danach sofort wieder auf Eis gestellt, wo sie für zwei Minuten abgekühlt wurden. Nun wurden 300 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz bei 37 °C und 600 rpm für 30 Minuten inkubiert. Je nach weiterer Verwendung wurden die Zellen auf Agarplatten ausplattiert oder der Transformationsansatz in Flüssigmedium gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C, Ansätze in Flüssigmedium wurden zusätzlich bei 120 rpm geschüttelt.

3.7 Sequenzierung von DNA

Sämtliche DNA-Sequenzierungsarbeiten wurden von der Firma Sequiserve, Vaterstetten, durchgeführt.

3.8 Auftrennung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese

Für die Aufreinigung, Quantifizierung und Isolierung von DNA wurde die Methode der Gelelektrophorese in 0,8- bzw. 1-prozentigen Agarosegelen verwendet. Die DNA wird hierbei parallel zu einem bekannten Größenstandard (hier: Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) oder 1 kb DNA Ladder (Invitrogen)) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die für die Auftrennung benötigten Gele wurden unter Verwendung von 0,5 x TBE-Puffer hergestellt, der ebenfalls als Elektrophoresepuffer diente. Die Elektrophorese erfolgte bei ca. 10 V/cm Gellänge.

0,5 x TBE-Puffer:

8,9 mM Tris

8,9 mM Borsäure

0,25 mM EDTA

pH 8,3

Den verwendeten Agarosegelen wurde 0,005 % (v/v) Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) zugesetzt. Die Analyse und Dokumentation der Agarosegele erfolgte über das Videosystem EagleEye II (Stratagene). Hierbei wurden die Agarosegele von unten mit UV-Licht einer Wellenlänge von 312 nm bestrahlt. Bei dieser Wellenlänge wird die Fluoreszenz des während des Laufs in die DNA interkalierten Ethidiumbromids angeregt und so die DNA-Banden sichtbar gemacht.

3.9 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mittels Qiagen Gel Extraction Kit laut Anweisung des Herstellers.

3.10 Primersynthese

Sämtliche Primer wurden bei der Firma metabion (Martinsried) als Lyophilisat bezogen und in A. dest. in einer Konzentration von 100 pmol/µl gelöst.

3.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur spezifischen Amplifikation von Genen aus genomischer DNA, im Screening sowie zur Aufklärung von Gensequenzen mittels GenomeWalker[™] Universal Kit eingesetzt. Verwendung fanden sowohl die *Taq*-DNA-Polymerase von Qiagen sowie die Advantage[™] GC Genomic Polymerase von Clontech.

Standard-PCR-Ansatz (*Taq*-Polymerase, Qiagen):

5 – 100 ng DNA als Template
10 μl Polymerase-Puffer (10 x)
je 0,2 mM dNTPs
200 pmol Primer 1
200 pmol Primer 2
evtl. 20 μl Q-Solution
5 U Polymerase
A. dest. ad 100 μl

Standard-PCR-Ansatz (Advantage[™] GC Genomic Polymerase, Clontech):

5 – 100 ng DNA als Template
10 μl Polymerase-Puffer (5 x)
je 0,2 mM dNTPs
100 pmol Primer 1
100 pmol Primer 2
20 μl GC-Melt
2,5 U Polymerase
A. dest. ad 50 μl
Die PCR wurde in automatischen Thermocyclern der Firma Biometra (Biometra 200 und 500) durchgeführt. Im Folgenden sind die beiden typischen Standard-PCR-Programme aufgeführt.

Standard-PCR-Programm (Taq-Polymerase, Qiagen):

Denaturierung	3 min	94 °C
10 Zyklen:		
Denaturierung	1 min	94 °C
Primeranlagerung	1 min	(Tm + 3 °C) -0,5 °C pro Zyklus
Elongation	1 min	72 °C
25 Zyklen:		
Denaturierung	1 min	94 °C
Primeranlagerung	1 min	(Tm - 2 °C)
Elongation	1 min	72 °C
finale Elongation	10 min	72 °C
Aufbewahrung im Cycler		4 °C

Standard-PCR-Programm (Advantage[™] GC Genomic Polymerase, Clontech):

Denaturierung	1 min	95 °C
8 Zyklen:		
Denaturierung	45 sec	94 °C
Anlagerung + Elongation	3 min	(Tm + 8 °C) -1 °C pro Zyklus
32 Zyklen:		
Denaturierung	45 sec	94 °C
Anlagerung + Elongation	3 min	(Tm - 2 °C)
finale Elongation	7 min	(Tm - 2 °C)
Aufbewahrung im Cycler		4 °C

3.12 Isolierung von Genen mittels GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech)

Die Isolierung von Genen über das GenomeWalker[™] Universal Kit von Clontech erfolgte laut Anweisung des Herstellers. Bei den im Folgenden beschriebenen PCRs wurde die Advantage[™] GC Genomic Polymerase (Clontech) verwendet. Der Ablauf ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.



Abbildung 6: Überblick über die Funktionsweise des GenomeWalker™ Universal Kit, Clontech.

Wie in Abbildung 6 dargestellt wurde zunächst genomische DNA des Organismus, aus dem das Gen isoliert werden sollte, präpariert. Die genomische DNA wurde anschließend in vier parallelen Ansätzen mit den Restriktionsenzymen EcoRV, DraI, PvuII und SspI geschnitten und die im Kit mitgelieferten Adaptoren an die entstandenen Fragmente ligiert. In einer ersten PCR konnte nun über einen Adaptor-spezifischen Primer (AP1) und einen Genspezifischen Primer (GSP1) die gesuchte Stelle aus dem Genom amplifiziert werden. In einer zweiten PCR mit verschachtelt liegenden Adaptor-spezifischen (AP2) und Genspezifischen (GSP2) Primern wurde das Produkt noch einmal spezifisch amplifiziert. Die PCR-Ansätze wurden im Agarosegel analysiert, die PCR-Produkte aus dem Gel ausgeschnitten, extrahiert und schließlich sequenziert. Gegebenenfalls wurden die PCRs mit weiteren Gen-spezifischen Primern durchgeführt, bis die komplette gesuchte Gensequenz bekannt war.

3.13 Erstellung einer Genbank in *E. coli*

Aus dem Organismus, der auf ADH-Aktivität hin untersucht werden sollte, wurde genomische DNA isoliert und in Parallelansätzen mithilfe der Restriktionsenzyme EcoRI, NotI, ApaI, XhoI, HindIII, KpnI, SacI, PstI, XbaI und Sau3A in Fragmente unterschiedlicher Größe geschnitten. Die Restriktionsdauer wurde derart gewählt, dass nur Fragmente mit einer Größe von mindestens 1 kb entstanden. Diese DNA-Fragmente wurden in pZErO-2 kloniert, die resultierenden Vektoren mittels Hitzeschock in chemisch kompetente *E. coli* TOP10-Zellen transformiert und auf LBkan-Platten ausplattiert. Die nun vorliegenden Genbanken wurden in einem Screening auf ADH-Aktivität getestet.

3.14 Klonierung der Plasmide für die Coexpression zweier Gene in Cofaktorregenerierungssystemen

Für die Coexpression zweier Enzyme in *E. coli* stellt die Firma Novagen unter anderem so genannte pETDuet-1 Vektoren her, die zwei Multiple Cloning Sites mit jeweils einem eigenen T7-Promotor und einer eigenen Ribosomenbindestelle aufweisen. Nur hinter der zweiten Multiple Cloning Site befindet sich ein T7-Terminator. Dieser Umstand hat zur Folge, dass beim Transkriptionsstart am T7-Promotor vor MCS1 ein Transkript entsteht, das die Gene aus beiden Multiple Cloning Sites sowie ihre Ribosomenbindestellen umfasst. Bei Transkriptionsstart am T7-Promotor vor MCS2 entsteht zusätzlich ein Transkript, das das Gen in MCS2 und die zugehörige Ribosomenbindestelle umfasst. Das Gen in MCS2 wird also doppelt abgelesen.

Um in den Ganzzellbiokatalysatoren eine besonders gute Expression der NGADH zu gewährleisten, wurde das Gen *ngadh* in MCS2 kloniert. Zusätzlich wurde jeweils eines der Gene für die NADH-regenerierenden Enzyme in MCS1 kloniert. Außerdem wurde ein pETDuet-1-Konstrukt hergestellt, in dem *ngadh* in MCS1 und *fdh* in MCS2 enthalten sind, um dessen Eigenschaften mit denen des Konstrukts zu vergleichen, das die Gene in der umgekehrten Reihenfolge trägt. Da bereits beschrieben ist, dass weder 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase noch Malic Enzyme bei Anfügung eines N-terminalen His-Tags Aktivitätseinbußen zeigen (siehe ^[104] und ^[105], wurden beide Gene in den Konstrukten, in denen sie in MCS1 enthalten sind, so kloniert, dass sie einen N-terminalen His-Tag erhalten. Dieser verändert die Eigenschaften der beiden Enzyme nicht, lässt jedoch bei Bedarf die einfache Aufreinigung über eine Ni-NTA-Säule zu. Die weiteren Enzyme werden durch das Anfügen eines N-terminalen His-Tags inaktiviert und wurden deshalb ohne His-Tag kloniert.

Um die verschiedenen Gene in die Multiple Cloning Sites von pETDuet-1 klonieren zu können, wurden sie aus genomischer DNA der jeweiligen Organismen unter Verwendung der im Anhang unter 1.4 aufgeführten Primer amplifiziert und unter Verwendung der oben beschriebenen Standardmethoden kloniert. Die Expression der einzelnen Vektoren erfolgte in *E. coli* BL21(DE3). Die Expressionsbedingungen wurden anhand der optimalen Bedingungen für die einzelnen Enzyme ausgewählt.

4 Biochemische Methoden

4.1 Herstellung eines zellfreien Rohextrakts

Für die Herstellung eines zellfreien Rohextrakts wurde zunächst eine 20-prozentige Zellsuspension hergestellt. Der verwendete Puffer richtete sich nach der Verwendung des Rohextraktes, d.h. es wurde z. B. der optimale Puffer für das enthaltene Enzym oder der benötigte Puffer für die nachfolgende Aufreinigung eingesetzt. *Nocardia globerula, Brevibacterium iodinum, Deinococcus radiodurans, Gordonia amarae* und *Arthrobacter* sp. wurden ausschließlich mittels Retschmühle oder Desintegrator S aufgeschlossen. *E. coli-*Zellen hingegen wurden immer mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach erfolgtem Zellaufschluss wurden die Zelltrümmer und ggf. die Glasperlen mittels Zentrifugation für 10 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C abgetrennt.

4.1.1 Zellaufschluss mittels Schwingmühle

Der Zellaufschluss in der Schwingmühle erfolgte mechanisch durch Glasperlen. Zu diesem Zweck wurden zwei Teile Glasperlen (Durchmesser: 0,3 mm) mit einem Teil Zellsuspension vermischt und je nach Volumen in Eppendorfgefäße oder Hantelaufsätze gefüllt. Der Aufschluss erfolgte über zweimal 5 Minuten bei maximaler Schwingfrequenz. Zwischen beiden Intervallen wurden die Gefäße 5 Minuten auf Eis abgekühlt.

4.1.2 Zellaufschluss mittels Desintegrator S

Der Zellaufschluss mittels Desintegrator S erfolgte ebenfalls mechanisch durch Glasperlen und ist hauptsächlich für große Volumina geeignet. Hier wurde ein Teil Zellsuspension mit einem Teil Glasperlen (Durchmesser: 0,3 mm) vermischt und die Zellen durch Rühren bei 3500 rpm aufgeschlossen. Während des Aufschlusses wurde der Ansatz auf Eis gekühlt.

4.1.3 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Der Ultraschallaufschluss erfolgte mittels Bandelin Sonopuls bei 70 % Puls und 50 % Intensität für zwei Minuten auf Eis.

4.2 Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt in Enzymlösungen wurden nach der Methode von Bradford ^[106] bestimmt. Für die Eichgerade wurden BSA-Konzentrationen von 0,01 bis 0,1 mg/ml verwendet.

4.3 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Für die Bestimmung der Aktivität einer Dehydrogenase wurde die Umsetzung des Cofaktors NAD(P) bzw. NAD(P)H genutzt. Im Gegensatz zu NAD(P)H absorbiert NAD(P) bei 340 nm nicht, so dass bei dieser Wellenlänge im Photometer die Oxidation von NAD(P)H zu NAD(P) bzw. die Reduktion von NAD(P) zu NAD(P)H beobachtet werden kann. Die Aktivitäten der Enzyme wurden nach Formel 1 berechnet:

Formel 1: Berechnung der Volumenaktivität eines Enzyms.

Volumenaktivität $(U / ml) = \frac{\Delta E / \Delta t * V}{\varepsilon * d * v} * f$

- $\Delta E/\Delta t = Extinktionsänderung bei 340 nm [min⁻¹]$
- $V = Testvolumen [\mu l]$
- ε = molarer Extinktionskoeffizient für NAD(P)H [6,22 ml * mmol⁻¹ * cm⁻¹]
- d = Schichtdicke der Küvette [cm]
- $v = Probenvolumen [\mu]$
- f = Verdünnungsfaktor der Enzymlösung

Um die spezifische Aktivität [U/mg] einer Enzymlösung zu bestimmen, wurde die Volumenaktivität [U/ml] durch den Proteingehalt [mg/ml] geteilt.

4.3.1 Aktivitätstest im Photometer

Alle im Folgenden aufgeführten Enzymtests wurden bei 340 nm und 37 °C über eine Minute im Photometer durchgeführt. Das Testvolumen betrug jeweils 1000 μ l und das Probenvolumen, d.h. die Menge an ggf. verdünnter Enzymlösung, betrug 25 μ l. Als Negativkontrolle wurde *E. coli* BL21(DE3) mit pET-21a(+) ohne Insert eingesetzt.

4.3.1.1 3-Hydroxacyl-CoA-Dehydrogenase (HADH)

Testansatz (Reduktion eines Ketons):

10 mM Substrat in 100 mM Citrat-Na₂HPO₄ pH 6 bzw. 100 mM TEA pH 7,0

0,25 mM NADH

Testansatz (Oxidation eines Alkohols):

10 mM Substrat in 100 mM Glycin-NaOH pH 10,0

2,5 mM NAD

4.3.1.2 Glucosedehydrogenase (GDH)

Testansatz

100 mM $\beta\text{-}D\text{-}Glucose$ in 100 mM TEA pH 7,0

2,5 mM NAD

4.3.1.3 Malic Enzyme (MAE)

Testansatz

100 mM L-Malat (auf pH 7,0 eingestellt) in 100 mM TEA pH 7,0

10 mM MgCl₂

2,5 mM NAD

4.3.1.4 L-Lactatdehydrogenase (L-LDH)

Testansatz

100 mM Na-L-Lactat in 100 mM TEA pH 7,0

2,5 mM NAD

4.3.1.5 Formiatdehydrogenase (FDH)

Testansatz

150 mM Na-Formiat in 100 mM TEA pH 7,0

2,5 mM NAD

4.4 Bestimmung von Temperatur- und pH-Optimum eines Enzyms

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums eines Enzyms wurde der oben beschriebene photometrische Aktivitätstest bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Analog dazu wurde das pH-Optimum unter Einsatz verschiedener Puffer bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Die Konzentration der eingesetzten Puffer betrug dabei immer 100 mM.

4.5 Bestimmung der Ammoniumsulfat-Toleranz eines Enzyms

Zur Bestimmung der Ammoniumsulfat-Toleranz eines Enzyms wurden je 100 μ l Rohextrakt mit verschiedenen Konzentrationen an Ammoniumsulfat versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Pellet in 200 μ l 50 mM Tris-HCl pH 7,0 gelöst und die Enzymaktivität in Überstand und Pellet getestet.

4.6 Chromatographische Methoden für die Proteinaufreinigung

Je nach Ziel der Aufreinigung wurden 80 g *Nocardia globerula* bzw. *Brevibacterium iodinum* oder 1 g rekombinante *E. coli*-Zellen in 20-prozentiger Zellsuspension wie unter 4.1 beschrieben aufgeschlossen und der Rohextrakt mittels chromatographischer Methoden aufgereinigt.

4.6.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Matrix:	Butylsepharose FF (Pharmacia)
Equilibrierungspuffer:	2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ in 100 mM KPi pH 6,0
Elutionspuffer:	100 mM KPi pH 6,0
Gradient:	100 % Equilibrierungspuffer \rightarrow 100 % Elutionspuffer in 10 Säulenvolumen

bzw.

Matrix:	Phenylsepharose FF (Pharmacia)
Equilibrierungspuffer:	1,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ in 100 mM MES pH 6,5
Elutionspuffer:	100 mM MES pH 6,5
Gradient:	100 % Equilibrierungspuffer \rightarrow 100 % Elutionspuffer in 10
	Säulenvolumen

4.6.2 Anionenaustauschchromatographie

Matrix:		Q-Sepharose FF (Pharmacia)
Equilibrierungspuffer:		100 mM KPi pH 6,0 bzw. 100 mM MES pH 6,0
Elutionspuffe	r:	1 M NaCl in 100 mM KPi pH 6,0 bzw. 100 mM MES pH 6,0
Gradient:	100 % Equilil	prierungspuffer $\rightarrow 100$ % Elutionspuffer in 10 Säulenvolumen

4.6.3 Hydroxylapatitchromatographie

Matrix:		Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite 80 µm (BioRad)				
Equilibrierungspuffer:		150 mM NaCl in 10 mM KPi pH 6,0				
Elutionspuffer		250 mM NaCl in 400 mM KPi pH 6,0				
Gradient:	100 % Equilit	orierungspuffer $\rightarrow 100$ % Elutionspuffer in 10 Säulenvolumen				

4.6.4 Gelfiltration

Matrix:	HiLoad 16/60 Superdex G200 (Pharmacia)
Trennbereich:	10 - 600 kDa

Laufpuffer: 150 mM NaCl in 100 mM KPi pH 6,0 bzw. 100 mM MES pH 6,0

4.6.5 Bestimmung des Molekulargewichts mittels Gelfiltration

Um das Molekulargewicht eines Proteins mittels Gelfiltration zu bestimmen, wurden zunächst bekannte Eichproteine (siehe Tabelle 3) über die oben beschriebene Superdex G200-Säule gegeben und aus den resultierenden Elutionszeiten nach Formel 2 der Verteilungskoeffizient Kav berechnet. Durch Auftragung der Verteilungskoeffizienten gegen die bekannten Molekulargewichte wurde eine Eichgerade erstellt. Anhand dieser Eichgeraden, die in Abbildung 7 dargestellt ist, konnte im Folgenden aus der Elutionszeit des jeweiligen Enzyms das zugehörige Molekulargewicht abgeleitet werden.

Tabelle 3: Zur Eichung der Gelfiltrationssäule Superdex G-200 verwendete Proteine.

Eichprotein	MW [kDa]
Thyroglobulin	669000
Ferritin	440000
Catalase	232000
Aldolase	158000
Albumin	67000
Ovalbumin	43000
Chymotrypsinogen A	25000
Ribonuclease A	13700

Formel 2: Berechnung des Verteilungskoeffizienten Kav zur Ermittlung des Molekulargewichts eines Proteins mittels Gelfiltration.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

K_{av} = Verteilungskoeffizient

 $V_e = Elutionsvolumen des Proteins$

 $V_0 = Ausschlussvolumen$

V_t = Säulenvolumen



Abbildung 7: Eichgerade der Gelfiltration zur Bestimmung des Molekulargewichts eines Proteins.

4.7 Konzentrieren, Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen

Für das Konzentrieren, Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen wurde eine Amicon Ultrafiltrationszelle mit YM10-Membran (Millipore) laut Anweisung des Herstellers verwendet. Die Ausschlussgrenze der Membran betrug 10 kDa.

4.8 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Um Proteinlösungen auf ihre Zusammensetzung hin zu testen, wurden die enthaltenen Proteine in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Durchführung erfolgte in NuPAGE® XCell SureLock[™] Mini Cell-Elektrophoreseeinheiten über NuPAGE® Bis-Tris Gele (beides Invitrogen) nach Anweisung des Herstellers. Es wurden hauptsächlich 10-prozentige Bis-Tris-Gele mit MOPS-Puffer eingesetzt. Als Marker wurde hauptsächlich Mark12[™] Wide Range Protein Standard (Invitrogen) eingesetzt.

4.9 Western Blot mittels NuPAGE Western Transfer

Die Übertragung von Proteinen aus einem ungefärbten SDS-Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte mittels Western Blot unter Verwendung des NuPAGE® XCell II[™] Blot Moduls (Invitrogen) nach Anweisung des Herstellers. Es wurde für 65 Minuten bei 30 V, 170 mA und 150 W geblottet.

4.10 Färbung von Proteinen in SDS-Gelen und auf Membranen

4.10.1 Coomassiefärbung von Proteinen in SDS-Gelen

Die Coomassiefärbung von Proteinen erfolgte unter Verwendung der SimplyBlue SafeStain-Färbelösung von Invitrogen nach Anweisung des Herstellers.

4.10.2 Silberfärbung von Proteinen in SDS-Gelen

Die Silberfärbung von Proteinen erfolgte mittels Silbernitrat nach ^[107]. Sie diente auf Grund ihrer hohen Sensitivität dazu, auch geringere Proteinmengen in SDS-Gelen sichtbar zu machen.

4.10.3 Amidoschwarzfärbung von Proteinen auf PVDF-Membranen

Die Amidoschwarzfärbung erfolgte durch Einlegen der PVDF-Membran für 10 Minuten in Amidoschwarzlösung. Anschließend wurde der Hintergrund mittels Entfärberlösung entfärbt und die Membran getrocknet.

Amidoschwarzlösung:

0,1 % Amidoschwarz 40 % Ethanol 10 % konzentrierte Essigsäure in A. dest.

Entfärberlösung:

40 % Ethanol 10 % konzentrierte Essigsäure

in A. dest.

4.11 Keton- und Alkoholanalytik mittels Gaschromatographie

Die Analyse der unter 4.14 und 4.16 beschriebenen Umsetzungen fand im Gaschromatographen GC-17A (Shimadzu) statt. Hierbei kam die chirale Säule CP-Chirasil-DEX CB (Chrompack, 25 m x 0,25 mm ID) zum Einsatz. Als Trägergas diente Helium (1,3 ml/min). Die einzelnen Analyseprogramme, die zur Analytik der verschiedenen Ketone/Alkohole eingesetzt wurden, sind im Folgenden aufgeführt.

4.11.1 8-Chlor-6-oxooctansäureethylester- / 8-Chlor-6-hydroxyoctansäureethylester-Analytik

Im GC-Programm zur Analytik von 8-Chlor-6-oxooctansäureethylester und 8-Chlor-6hydroxyoctansäureethylester verlief die Temperaturänderung wie folgt: 60 °C (5 min); 60 -> 195 °C (5 °C/min).

4.11.2 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester- / 2-Hydroxy-4-phenylbutansäureethylester-Analytik

Im GC-Programm für die Analytik von 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester und (*R*)- bzw. (*S*)-2-Hydroxy-4-phenylbutansäureethylester war der folgende Temperaturverlauf enthalten: 60 °C (5 min); 60 -> 150 °C (18 °C/min); 150 °C (5 min); 150 -> 165 °C (1 °C/min); 165 -> 195 °C (30 °C/min); 195 °C (4 min).

4.12 2-Octanon- / 2-Octanol-Analytik

Im GC-Programm für die Auftrennung von 2-Octanon und (*R*)- bzw. (*S*)-2-Octanol liefen die Temperatursteigerungen wie im Folgenden aufgezeigt parallel ab: 60 °C (5 min); 60 -> 85 °C (5 °C/min); 85 °C (5 min); 85 -> 95 °C (0,5 °C/min); 95 -> 195 °C (100 °C/min); 195 °C (4 min).

4.13 Probenvorbereitung für die Analyse im Gaschromatographen

Proben für die Analyse im Gaschromatographen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, mit einem Volumen von 50 µl zu verschiedenen Zeiten den Ansätzen entnommen. Jede Probe wurde zu 100 µl Essigsäureethylester gegeben und eine Minute gevortext. Anschließend folgten fünf Minuten Zentrifugation bei 14000 rpm. Die organische Phase wurde in ein GC-Vial überführt und mittels Gaschromatographie analysiert.

4.14 Reduktion von Ketonen mittels zellfreier Systeme

Die Reaktionen erfolgten in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit einem Gesamtvolumen von 1 ml bei 37 °C und 800 rpm. Die Zusammensetzungen der verschiedenen Reaktionsgemische sind in Tabelle 4, Tabelle 5, Tabelle 6 und Tabelle 7 dargestellt.

TEA pH 7,0 [mM]	100					
Na-Formiat [mM]	150					
2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester [mM]	10					
NAD [mM]	1					
ADH [U]	0,1	0,5	0,1	1	5	1
FDH [U]	0,5	0,1	0,1	5	1	1

Tabelle 4: Zusammensetzung der Ansätze für Biotransformationen im zellfreien System mit FDH aus *Candida boidinii* als cofaktorregenerierendem Enzym.

TEA pH 7,0 [mM]	100					
β-D-Glucose [mM]	100					
2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester [mM]	10					
NAD [mM]	1					
ADH [U]	0,1	0,5	0,1	1	5	1
GDH [U]	0,5	0,1	0,1	5	1	1

Tabelle 5: Zusammensetzung der Ansätze für Biotransformationen im zellfreien System mit GDH aus *Bacillus subtilis* als cofaktorregenerierendem Enzym.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Ansätze für Biotransformationen im zellfreien System mit MAE aus *E. coli* als cofaktorregenerierendem Enzym.

TEA pH 7,0 [mM]	100					
L-Malat pH 7,0 [mM]	100					
MgCl ₂	10					
2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester [mM]	10					
NAD [mM]	1					
ADH [U]	0,1	0,5	0,1	1	5	1
MAE [U]	0,5	0,1	0,1	5	1	1

Tabelle 7: Zusammensetzung der Ansätze für Biotransformationen im zellfreien System mit L-LDH aus *Bacillus subtilis* als cofaktorregenerierendem Enzym.

TEA pH 7,0 [mM]	100					
Na-L-Lactat [mM]	100					
2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester [mM]	10					
NAD [mM]	1					
ADH [U]	0,1	0,5	0,1	1	5	1
L-LDH [U]	0,5	0,1	0,1	5	1	1

4.15 Reduktion von 8-Chlor-6-oxooctansäureethylester mittels Wildstammzell-Rohextrakt

Die Reduktion von Ketonen mittels Rohextrakt von Wildstammzellen wurde für die Analyse im Gaschromatographen in 1 ml-Ansätzen durchgeführt. Dabei gab es zwei verschiedene Ansätze, einen mit NAD als Cofaktor und einen mit NADP als Cofaktor. Im Ansatz mit NAD wurde mittels Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* NADH produziert, im Ansatz mit NADP wurde mittels Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae* NADPH produziert. Tabelle 8 und Tabelle 9 zeigen die Zusammensetzungen der Ansätze. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C. Nach jeweils zwei und 24 Stunden wurden Proben mit einem Volumen von 100 µl entnommen und wie unter 4.13 beschrieben behandelt.

Substanz	mit NAD	
KPi pH 6,5 [mM]	50	
Na-Formiat [mM]	100	
Formiatdehydrogenase	1 Unit	
8-Chlor-6-oxooctansäureethylester [mM]	10	
NAD [mM]	1	
Rohextrakt aus Wildstamm	1 Unit	
A. dest.	ad 1000 µl	

Tabelle 8: Zusammensetzung des Ansatzes mit NAD zur Reduktion eines Ketons mittels Wildstammzell-Rohextrakts für die Analytik im Gaschromatographen.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Ansatzes mit NADP zur Reduktion eines Ketons mittels Wildstammzell-Rohextrakts für die Analytik im Gaschromatographen.

Substanz	mit NADP	
KPi pH 6,5 [mM]	50	
Glucose-6-Phosphat [mM]	40	
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	1 Unit	
8-Chlor-6-oxooctansäureethylester [mM]	10	
NADP [mM]	1	
Rohextrakt aus Wildstamm	1 Unit	
A. dest	ad 1000 µl	

4.16 Reduktion von 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mittels Ganzzellbiokatalysatoren ohne Cofaktorregenerierung

Die Zusammensetzung der Ansätze für die Reduktion von 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mittels Ganzzellbiokatalysatoren ohne Cofaktorregenerierungssystem erfolgte wie in Tabelle 10 beschrieben.

Substanz pNGADH in E. coli BL21(DE3) TEA pH 7,0 [mM] TEA pH 8,0 [mM] 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester [mM] Na-Formiat [mM] Na-L-Lactat [M] L-Malat pH 7,0 [mM] β-D-Glucose [mM] MgCl₂ [mM] NAD [mM] Zellsuspension (50 g/l) pH 7,0 [µl] Zellsuspension (50 g/l) pH 8,0 [µl] A. dest. ad 1000 µl

Tabelle 10: Zusammensetzung der Ansätze für die Ganzzellbiotransformation von 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester ohne Cofaktorregenerierung.

Proben mit einem Volumen von 50 μ l wurden zu verschiedenen Zeiten entnommen und wie unter 4.13 beschrieben behandelt.

4.17 Reduktion von 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mittels Ganzzellbiokatalysatoren mit enzymgekoppelter Cofaktorregenerierung

Die benötigten Cofaktorregenerierungssysteme wurden wie unter 3.14 beschrieben hergestellt. Der Einsatz der Systeme in Biotransformationen mittels Ganzzellbiokatalysatoren erfolgte in Ansätzen mit einem Volumen von 1 ml bei 37 °C und ca. 600 rpm. In den Ansätzen wurde standardmäßig 100 mM TEA pH 7,0 als Puffer eingesetzt, da bei diesem pH-Wert alle eingesetzten Enzyme hohe Aktivität zeigen. Des Weiteren wurde den Ansätzen als Substrat für die NGADH 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester sowie das jeweils vom cofaktorregenerierenden Enzym benötigte Substrat zugesetzt. Weiterhin wurden Ansätze mit und ohne Zusatz von 1 mM NAD durchgeführt. Die Behandlung der Proben erfolgte wie unter 4.13 beschrieben. Im Folgenden sind die Zusammensetzungen der einzelnen Ansätze tabellarisch aufgeführt.

4.17.1 Biotransformation mittels *E. coli* BL21(DE3) mit pGDH-NGADH

In den durchgeführten Biotransformationen mit *E. coli* BL21(DE3) mit pGDH-NGADH wurden 5 mg bzw. 1 mg bzw. 0,5 mg Zellen pro Ansatz verwendet. Die folgende Auflistung zeigt die Zusammensetzung der Ansätze.

100 mM TEA pH 7,0

100 mM β-D-Glucose

10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester

+/- 1 mM NAD

1/10 Vol. bzw. 1/50 Vol. bzw. 1/100 Vol. Zellsuspension (50 g/l)

A. dest. ad 1 ml

4.17.2 Biotransformation mittels *E. coli* BL21(DE3) mit pMAE-NGADH

In den durchgeführten Biotransformationen mit *E. coli* BL21(DE3) mit pMAE-NGADH wurden 5 mg bzw. 0,5 mg Zellen pro Ansatz verwendet. In der folgenden Auflistung ist die Zusammensetzung der Ansätze gezeigt.

100 mM TEA pH 7,0

10 mM MgCl₂

100 mM L-Malat pH 7,0

10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester

+/- 1 mM NAD

1/10 Vol. bzw. 1/100 Vol. Zellsuspension (50 g/l)

A. dest. ad 1 ml

4.17.3 Biotransformation mittels *E. coli* BL21(DE3) mit pL-LDH-NGADH

In den durchgeführten Biotransformationen mit *E. coli* BL21(DE3) mit pL-LDH-NGADH wurden 5 mg Zellen pro Ansatz verwendet. In den verschiedenen Ansätzen wurden pH-Werte von 7,0 bis 8,0 und L-Lactat-Konzentrationen von 100 mM bis 1 M eingesetzt, um die optimalen Bedingungen zu ermitteln. Die folgende Aufstellung zeigt die Zusammensetzung der Ansätze.

100 mM TEA pH 7,0 bzw. pH 7,5 pH 8,0

100 mM bzw. 200 mM bzw. 500 mM bzw. 1 M L-Lactat

10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester

+/- 1 mM NAD

1/10 Vol. Zellsuspension (50 g/l)

A. dest. ad 1 ml

4.17.4 Biotransformation mittels *E. coli* BL21(DE3) mit pFDH-NGADH bzw. mit pNGADH-FDH

In den durchgeführten Biotransformationen mit *E. coli* BL21(DE3) mit pFDH-NGADH bzw. pNGADH-FDH wurden 5 mg bzw. 0,5 mg Zellen pro Ansatz verwendet. Im Folgenden ist die Zusammensetzung der Ansätze aufgeführt.

100 mM TEA pH 7,0 bzw. pH 7,5 pH 8,0
150 mM Na-Formiat
10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester
+/- 1 mM NAD
1/10 Vol. bzw. 1/100 Vol. Zellsuspension (50 g/l)
A. dest. ad 1 ml

5 Screening nach neuen Alkoholdehydrogenasen

5.1 Aktivitätsbasiertes Screening

Beim aktivitätsbasierten Screening werden Wildtypstämme oder Genbank-tragende *E. coli*-Zellen auf die Fähigkeit hin untersucht, ein gewünschtes Keton zu reduzieren bzw. einen gewünschten Alkohol zu oxidieren. Der Nachweis der gesuchten Aktivität erfolgt entweder indirekt über die Oxidation bzw. Reduktion des Cofaktors NAD(P)H bzw. NAD(P) oder direkt über den Nachweis des gewünschten Produkts.

5.1.1 Screening von Wildtyp-Stämmen mittels Analytik in Photometer und Gaschromatograph

Das aktivitätsbasierte Screening von Wildtypstämmen gestaltet sich ungleich schwieriger als das Screening von E. coli-Zellen. Chemische Aufschlussbedingungen, wie sie im Screening der Genbanken in E. coli eingesetzt werden, müssten hier aufgrund der verschiedenen Zelltypen mit unterschiedlichen Zellmembranen variiert werden. Einfacher ist die Anwendung mechanischer Aufschlussbedingungen, die jedoch mit einem High-Throughput-Screening nicht zu vereinbaren sind. Das Screening von Wildtypstämmen kann demnach nur mit einem geringeren Durchsatz durchgeführt werden. Für das durchgeführte Screening wurden verschiedene Wildtypstämme über die Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen und in dem von der DSMZ empfohlenen Medium über Nacht angezogen. Die Zellen wurden bei 4 °C und 8000 rpm für 15 Minuten abzentrifugiert (Sorvall RC5B) und gegebenenfalls bei -20 °C gelagert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte wie unter 4.1.1 beschrieben. Der resultierende Rohextrakt wurde daraufhin wie unter 4.3.1 beschrieben im Photometer auf Aktivität überprüft. Da hierbei nur ein indirekter Aktivitätsnachweis erfolgt, indem die Oxidation des Cofaktors NADH beobachtet wird, wurden Stämme, die im Photometer aktiv erschienen, anschließend in einer unter 4.15 beschriebenen Umsetzung mit anschließender GC-

Analytik eingesetzt. Hierbei wurde die Produktion des gewünschten Alkohols nachgewiesen und so die Aktivität bestätigt. Nachfolgend wurde das aktive Enzym aus dem Wildtypstamm mittels Chromatographie aufgereinigt, die N-terminale Sequenz bestimmt und schließlich die Gensequenz mittels GenomeWalker[™] Universal Kit ermittelt.

5.1.2 Screening von Genbanken in rekombinanten *E. coli*-Stämmen mittels Formazantest

Da es sich beim Screening von rekombinanten *E. coli*-Stämmen stets um die gleichen Zellen handelt, können gleich bleibende chemische Aufschlussmethoden eingesetzt werden, nach dem sie ein Mal optimiert sind. Die im Nachfolgenden eingesetzte Screeningmethode eignet sich deshalb gut für ein High-Throughput-Screening. Die Herstellung von Genbanken ist unter 3.13 beschrieben. Die rekombinanten *E. coli*-Zellen der Genbank wurden auf LBkan-Agar angezogen und mittels Formazantest ^[25] angefärbt. Positive Klone wurden mittels sterilem Zahnstocher gepickt und in 5 ml LBkan-Medium angezogen. Die enthaltenen Plasmide wurden präpariert und sequenziert. Das gefundene ADH-Gen (*gaadh*) wurde in pET-21a(+) kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert.

5.2 Sequenzbasiertes Screening

5.2.1 Recherche in Datenbanken mittels BLAST

Das "Basic Local Alignment Search Tool"^[108], ^[109], genannt BLAST, steht zum Beispiel über die Webseite http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.shtml zur Verfügung. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit lag BLAST 2.2.14 vom 07. Mai 2006 vor. Das Programm vergleicht Protein- oder DNA-Sequenzen mit Sequenzdatenbanken und berechnet die statistische Signifikanz der Übereinstimmung. Auf diese Weise kann BLAST dazu genutzt werden, funktionelle und evolutionäre Verwandtschaften zwischen Sequenzen abzuleiten bzw. dabei helfen, Sequenzen einer bestimmten Gen- oder Proteinfamilie zuzuordnen. Ausführliche Informationen befinden sich unter http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/handbook/ch16d1.pdf.

In den von BLAST durchsuchten Datenbanken befinden sich außer den bereits klonierten und charakterisierten Proteinen zusätzlich so genannte hypothetische oder putative Proteine, deren Sequenz aus DNA-Sequenzen abgeleitet wurde, die bei der Sequenzierung des Genoms einzelner Organismen bekannt geworden sind. Solche putativen oder hypothetischen Proteine werden ohne direkte Mitwirkung von Menschen durch Computerprogramme erfasst und anhand ähnlicher Sequenzbereiche bekannten Proteinfamilien zugeordnet. Da bisher ausschließlich die DNA-Sequenz dieser Proteine bzw. ihrer Gene bekannt ist, kann erst durch die Klonierung und Charakterisierung des jeweiligen Proteins die Funktion verifiziert werden. Auf diese Weise können also bisher noch nicht in Biotransformationen eingesetzte Enzyme gefunden, erstmals kloniert und charakterisiert und schließlich ihrer Funktion entsprechend eingesetzt werden.

In dieser Arbeit wurde die Funktion "BLASTp" dazu genutzt, ähnliche Enzyme zu der bereits bekannten NGADH zu finden.

Ergebnisse

1 Aktivitätsbasiertes Screening von Wildtypstämmen

Das unter 5.1.1 beschriebene Screening mittels Analytik im Photometer und im Gaschromatographen stellt die herkömmliche, relativ arbeitsaufwendige Weise des Screenings nach neuen Enzymen dar. Während der vorliegenden Arbeit wurde nach neuen Alkoholdehydrogenasen gesucht. Zu diesem Zweck wurden im klassischen Screening 107 verschiedene Stämme aus der Stammsammlung des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie auf die Reduktion des Substrats 8-Chlor-6-oxooctansäureethylester hin getestet. Die aktiven Stämme sowie die im Photometer bestimmte Volumenaktivitäten und die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen mittels Gaschromatographie sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Ergebnisse des klassischen Screenings von 107 Wildtypstämmen hinsichtlich der Reduktion von 8-Chlor-6-oxooctansäureethylester, gezeigt sind die Stämme, die sowohl im Photometertest als auch in der Analyse mittels Gaschromatographie Aktivität zeigten; n. g. = nicht getestet.

		Volakt. (U/ml)		GC	
Stamm	DSM-Nr.	NADH	NADPH	NADH	NADPH
Brevibacterium linens	20425	2,03	0,44	+	-
Arthrobacter sp.	4640	2,10	0,11	+	-
Nocardia globerula	46019	1,21	0,36	+	-
Brevibacterium iodinum	20626	1,06	0,55	+	-
Gordonia amarae	43392	1,08	0,09	+	-

Aus den aktiven Stämmen wurden zunächst die Stämme *Nocardia globerula* und *Brevibacterium iodinum* ausgewählt, da sie die höchste Umsatzrate zeigten. In der vorliegenden Arbeit wird unter anderem beschrieben, wie die entsprechenden Enzyme mittels chromatographischer Methoden aufgereinigt, anschließend N-terminal ansequenziert und mittels GenomeWalker[™] Universal Kit die zugehörigen Gene ermittelt wurden.

2 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (HADH) aus Nocardia globerula

2.1 Charakterisierung der Wildtyp-NGADH

Das im Screening entdeckte Enzym aus dem Wildstamm *Nocardia globerula* wurde zunächst aufgrund der von ihm katalysierten Reaktion als Alkoholdehydrogenase (ADH) bezeichnet und nach den Anfangsbuchstaben des Stamms NGADH genannt. Die NGADH aus Wildtyp-Zellen wird im Folgenden als WT-NGADH bezeichnet. Um das WT-Enzym zu charakterisieren, wurde zunächst die Wachstumskurve einer *Nocardia globerula*-Kultur aufgenommen und zu verschiedenen Zeitpunkten die Enzymaktivität bestimmt. Anschließend wurde mittels Butylsepharose FF gereinigtes Enzym eingesetzt, um Temperatur- und pH-Optimum zu ermitteln und die Umsetzung einiger Substrate zu testen. Weiterhin wurde im Zuge der chromatographischen Aufreinigung mittels Gelfiltration das Molekulargewicht der WT-NGADH ermittelt.

2.1.1 Wachstumskurve von Nocardia globerula im Vergleich zur Enzymaktivität

Um die Wachstumskurve von *Nocardia globerula* zu bestimmen, wurden zwei 5 l-Kolben mit 2 l Medium für die Anzucht von *Nocardia globerula* (siehe 2.1) befüllt und einprozentig aus einer *Nocardia globerula*-Vorkultur angeimpft. Die Kolben wurden bei 28 °C und 100 rpm inkubiert. Die optische Dichte wurde zu verschiedenen Zeiten im Photometer gemessen. Außerdem wurde die spezifische Aktivität des gesuchten Enzyms aus 15 ml Probe nach 12, 16,5 und 36 Stunden bestimmt. Die resultierenden Kurven sind in Abbildung 8 gezeigt.



Abbildung 8: Wachstumskurve von *Nocardia globerula* und spezifische Aktivität nach einer Inkubation über 12, 16,5 und 36 Stunden.

Aus Abbildung 8 geht hervor, dass nach 12 Stunden die exponentielle Wachstumsphase der Kultur erreicht ist. Die stationäre Phase tritt nach ca. 28 Stunden ein. Die höchste spezifische Aktivität der WT-NGADH ist bereits nach 16 Stunden erreicht und bleibt von diesem Zeitpunkt an konstant. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich bei der NGADH um ein konstitutiv exprimiertes Enzym handelt. Um die höchste Enzymausbeute zu erzielen, lohnt es sich also, die Zellen bis zum Erreichen der stationären Phase nach 28 Stunden wachsen zu lassen und dann zu ernten.

2.1.2 Temperaturoptimum

Für die Bestimmung des Temperaturoptimums wurde der Enzymtest im Photometer (siehe 4.3.1) bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Das resultierende Diagramm ist in Abbildung 9 dargestellt. Das Temperaturoptimum der WT-NGADH liegt bei 40 °C.



Abbildung 9: Temperaturoptimum der WT-NGADH.

2.1.3 pH-Optimum

Um das pH-Optimum der neu entdeckten ADH zu bestimmen, wurde die Enzymaktivität im Photometer bei verschiedenen pH-Werten in verschiedenen Puffern gemessen. Das ermittelte pH-Optimum liegt bei einem pH-Wert von 6,0. Abbildung 10 zeigt das zugehörige Diagramm.



Abbildung 10: pH-Optimum der WT-NGADH.

2.1.4 Molekulargewicht

Während der Gelfiltration, die den vierten Schritt der chromatographischen Aufreinigung darstellte und in 4.6.4 beschrieben ist, wurde das Molekulargewicht der WT-NGADH ermittelt. Das Molekulargewicht der WT-NGADH beträgt 135 kDa.

2.2 Aufreinigung der NGADH aus dem Wildstamm

Um das neu entdeckte Enzym aus *Nocardia globerula* soweit aufzureinigen, bis ihm im SDS-Gel eine definierte Bande zugeordnet werden konnte, kamen verschiedene, hauptsächlich chromatographische Methoden zum Einsatz. Im Folgenden sind ausschließlich die Methoden aufgeführt, mit denen das Enzym erfolgreich aufgereinigt werden konnte.

2.2.1 Bestimmung der Ammoniumsulfat-Toleranz

der für Da in Vorbereitung den ersten Chromatographieschritt (Hydrophobe Interaktionschromatographie mittels FF) der Rohextrakt Butylsepharose mit Ammoniumsulfat versetzt werden musste, wurde zunächst die Ammoniumsulfat-Toleranz der WT-NGADH im Rohextrakt überprüft. Abbildung 11 stellt die gemessenen Aktivitäten in Überstand und Pellet in Abhängigkeit von der Ammoniumsulfat-Konzentration dar.



Abbildung 11: Ammoniumsulfat-Toleranz der NGADH.

Der beschriebene Versuch zeigt, dass die NGADH bis zu einer Konzentration von ca. 2 M Ammoniumsulfat im Überstand vorliegt, ab ca. 2,5 M ist der verbleibende Anteil im ausgefällten Sediment zu finden. Insgesamt ist festzustellen, dass die NGADH ab 2,5 M Ammoniumsulfat stark inaktiviert wird. Für die Aufreinigung mittels Butylsepharose FF wird das Enzympräparat daher mit 2 M Ammoniumsulfat versetzt.

2.2.2 Aufreinigung mittels chromatographischer Verfahren

Für die Aufreinigung mittels Butylsepharose FF wurden 50 g Nocardia globerula mittels Desintegrator S aufgeschlossen. Als Aufschlusspuffer wurde hier 50 mM TEA pH 6,0 versetzt mit 2 M Ammoniumsulfat eingesetzt. Der resultierende Rohextrakt wurde auf die mit dem gleichen Puffer equilibrierte Butylsepharose FF-Säule mit einem Volumen von 80 ml gegeben und mit einem Gradienten von 2 M auf 0 M Ammoniumsulfat in 10 Säulenvolumen eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt und in 50 mM TEA pH 6,0 umgepuffert. Der resultierende Ansatz wurde auf eine mit 50 mM TEA pH 6,0 equilibrierte Q-Sepharose FF-Säule mit einem Volumen von 50 ml aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0 M NaCl auf 1 M NaCl in 10 Säulenvolumen. Die aktiven Fraktionen wurden erneut vereinigt und in 10 mM KPi pH 6.0 + 150 mM NaCl umgepuffert. Mit dem gleichen Puffer wurde eine Hydroxylapatitsäule mit einem Volumen von 10 ml equilibriert und mit dem umgepufferten Pool der aktiven Fraktionen beladen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 10 mM KPi pH 6,0 + 150 mM NaCl auf 400 mM KPi + 250 mM NaCl in 10 Säulenvolumen. Erneut wurden die aktiven Fraktionen gepoolt und zum Abschluss über eine Superdex G200 Gelfiltrationssäule weiter gereinigt. Zusätzlich wurde, wie schon unter 2.1.4 beschrieben, bei diesem Schritt das Molekulargewicht der WT-NGADH bestimmt. Die aktiven Fraktionen wurden mittels Microcon-Ultrafiltrationseinheiten auf ca. 200 µl eingeengt, 10 µl je Fraktion im SDS-Gel analysiert, der Rest weiter bis auf 25 µl eingeengt und in einem weiteren SDS-Gel als Vorbereitung für den Western Blot aufgetrennt. Die beiden analytischen SDS-Gele sind in Abbildung 12 und Abbildung 13 gezeigt.



Abbildung 12: SDS-Gel zur Dokumentation des Aufreinigungserfolgs vom Rohextrakt bis zur dritten Säule (Silberfärbung nach^[107].



1 + 4 + 7 + 10: Mark12, Invitrogen 2 + 3 + 5 + 6 + 8 + 9: aktive Fraktionen Gelfiltration

Abbildung 13: SDS-Gel der aktivsten Fraktionen nach der Gelfiltration (Silberfärbung nach ^[107].

Das in Abbildung 13 gezeigte SDS-Gel weist eine sehr starke Bande in Höhe von ca. 36 kDa auf. Um der NGADH im SDS-Gel eine bestimmte Bande zuzuordnen, wurde zunächst die Überlegung angestellt, welches Molekulargewicht eine Untereinheit der NGADH (MW des nativen Enzyms: 135 kDa, siehe 2.1.4) haben könnte. Bei den meisten bekannten ADHs handelt es sich um Monomere, Dimere oder Tetramere. Generell lässt sich sagen, dass multimere Dehydrogenasen meistens aus einer geraden Anzahl an Untereinheiten bestehen [110]. Es kommen demnach vorrangig Banden einer Größe von entweder ca. 135 kDa (Monomer), ca. 68 kDa (Dimer) oder ca. 34 kDa (Tetramer) in Frage. Im Bereich kleiner als 30 kDa und größer als 65 kDa liegen nach der Aufreinigung keine Banden mehr. Genau bei 34 kDa liegt ebenfalls keine Bande, das Aktivitätsprofil der aktiven Fraktionen stimmt jedoch genau mit dem Profil der Bandenstärken bei 36 kDa überein. Es sind bereits Alkoholdehydrogenasen bekannt, die im SDS-Gel größer erscheinen, als es das mittels Gelfiltration oder auch das anhand der AS-Sequenz errechnete Molekulargewicht vermuten

lassen würde ^[111]. Somit konnte geschlossen werden, dass es sich bei den dicken Banden im Bereich von 36 kDa um die NGADH handelt.

Der Verlauf der Aufreinigung sowie der Aufreinigungserfolg sind in Tabelle 12 dokumentiert. In den Fraktionen aus der Hydroxylapatitchromatographie sowie aus der Gelfiltration konnte der Proteingehalt aufgrund der geringen Proteinmenge nicht mehr bestimmt werden. Deshalb wurde der Proteingehalt anhand der SDS-Gele im Vergleich zu den vorherigen Schritten abgeschätzt und die spezifische Aktivität sowie der Aufreinigungsfaktor nur als Größenordnung angegeben.

Aufreinigungsschritt	spez. Akt. [U/mg]	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute [%]	Aufreinigungsfaktor
Rohextrakt	0,54	1010	100	1
Butylsepharose FF	6,85	407	40	13
Q-Sepharose FF	48,05	299	30	89
Hydroxylapatit	> 70	138	14	> 130
Superdex G200	> 200	68	7	> 370

Tabelle 12: Dokumentation der Aufreinigung der WT-NGADH.

2.3 Blot und N-terminale Ansequenzierung

Nachdem die aktiven Fraktionen auf 25 µl eingeengt und im SDS-Gel aufgetrennt waren, wurden die Proteine aus dem Gel mittels Western Blot im NuPAGE® XCell II[™] Blot Modul auf eine PVDF-Membran geblottet und mittels Amidoschwarzfärbung angefärbt. Der erhaltene Blot ist in Abbildung 14 gezeigt.



1 + 4 + 7 + 10: Mark12, Invitrogen 2 + 3 + 5 + 6 + 8 + 9 : aktive Fraktionen Gelfiltration

Abbildung 14: Blot der aktivsten Fraktionen nach der Gelfiltration auf PVDF-Membran (Amidoschwarzfärbung).

Die Banden im Bereich von 36 kDa, die die NGADH enthielten, wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die N-terminale Aminosäuresequenz mittels Edman-Abbau ermittelt. Auf diese Weise konnten die ersten 26 Aminosäuren der NGADH bestimmt werden. Die erhaltene Sequenz lautet:

N'-SEIQNVTVLGAGVLGSQIVMQAAYAG-C'

2.4 Aufklärung der kompletten NGADH-Gensequenz

2.4.1 Datenbank-Vergleich des N-Terminus

Um die komplette Gensequenz der NGADH aufzuklären, wurde zunächst der ermittelte N-Terminus mittels BLAST Datenbankvergleich mit bereits bekannt Proteinsequenzen und mit Proteinsequenzen, die aus sequenzierten DNA-Bereichen abgeleitet werden konnten, verglichen. Es ergaben sich die folgenden vier Sequenzen als ähnlichste Treffer:

"hypothetical protein gbs1717" aus *Streptococcus agalactiae* NEM316
Sequenz: 3 IKNLTVAGSGVLGSQIAFQAAY 24
(70 % Übereinstimmung)

"3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase family protein" aus *Streptococcus agalactiae* 2603V/R Sequenz: 3 IKNLTVAGSGVLGSQIAFQAAY 24 (70 % Übereinstimmung)

"putative 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase" aus *Nocardia farcinica* IFM 10152 Sequenz: 21 DIKKVTVLGTGVLGSQIAFQTAF 43 (64 % Übereinstimmung)

"probable 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase" aus *Deinococcus radiodurans* strain R1
Sequenz: 54 IKTVTVCGSGVLGSQIAFQTAF 75
(62 % Übereinstimmung)

Alle vier Proteinsequenzen sind aus DNA-Sequenzen abgeleitet, die während der Sequenzierung der kompletten Genome der jeweiligen Mikroorganismen erhalten wurden. Die codierten Enzyme sind demnach weder beschrieben oder charakterisiert noch kloniert, sondern lediglich anhand ihrer Sequenz teilweise der Gruppe der 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen zugeordnet worden. Die kompletten Sequenzen der vier gefundenen Proteine wurden alignt, um auch den restlichen Teil zu vergleichen. Das Alignment ist in Abbildung 15 dargestellt.

Nocardia farcinica Deinococcus radiodurans Streptococcus agalactiae NEM316 Streptococcus agalactiae 2603V/R	SRGEENSMAVDIKKVTVL MTRLRVWSRLGLLHGVWLAKLRPTPSRSPAAFVEPPGELASLPRGARQESSMSIKTVTVC MTIKNLTVA MTIKNLTVA : **.:**	28 60 9 9
Nocardia farcinica Deinococcus radiodurans Streptococcus agalactiae NEM316 Streptococcus agalactiae 2603V/R	GTGVLGSQIAFQTAFHGFDVTAYDISEQALDAARERFAKLAAAYRQDVPGATEDKTEATR GSGVLGSQIAFQTAFHGFDVHLYDINDAAIAKARETLGKLQARYQQDLKVDAQQTGDAFA GSGVLGSQIAFQAAYKGMSVTIYDINDEALNKGKERIKKLAKVYQSEIETAKEAYSDKAK GSGVLGSQIAFQAAYKGMSVTIYDINDEALNKGKERIKKLAKVYQSEIETAKEAYSDKAK *:*********:*:::::::::::::::::::::::	88 120 69 69
Nocardia farcinica Deinococcus radiodurans Streptococcus agalactiae NEM316 Streptococcus agalactiae 2603V/R	SGITVTADLAAAAAEADLVIEAVPEVLDI RISFFTDIAEAVKGVDLVIEAIPENMDI SIKYNKNLLPSLDHIFLSKVADSLDLIADLPNQITFSKNLDQAVSDADLVIEAVPETVSI SIKYNKNLLPSLDHIFLSKVADSLDLIADLPNQITFSKNLDQAVSDADLVIEAVPETVSI :.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:.:	117 148 129 129
Nocardia farcinica Deinococcus radiodurans Streptococcus agalactiae NEM316 Streptococcus agalactiae 2603V/R	KRDTYRRLGELAPARTIFATNSSTLLPSDIKDFTGRPDRFLALHFANQVWKFNTAEVMGT KRKFYNQLGEVADPNTIFATNSSTLLPSQFMEETGRPEKFLALHFANEIWKFNTAEIMRT KEDFYKQLAKVAPSKTIFATNSSTLVPSQFADITGRPDKFLAMHFANNIWQNNIVEIMGH KEDFYKQLAKVAPSKTIFATNSSTLVPSQFADITGRPDKFLAMHFANNIWQNNIVEIMGH **.:*.:*	177 208 189 189
Nocardia farcinica Deinococcus radiodurans Streptococcus agalactiae NEM316 Streptococcus agalactiae 2603V/R	PDTDPAVYRTVVEFAEAIGMVPIELHKEKSGYVLNSLLVPFLNAGMALAAGGYAEPEAVD PRTDDAVFDTVVQFAKDIGMVALPMYKEQAGYILNTLLVPLLGAALELVVKGIADPQTVD KGTDDEVVKEALAFSKDIGMVPLHIHKEQPGYILNSILVPFLESALALYYNKVSDSETID KGTDDEVIKEALAFSKDIGMVPLHIHKEQPGYILNSILVPFLESALALYYDKVSDSETID ** * .: *:: *****: ::**:.**:**:**:**: :: *	237 268 249 249
Nocardia farcinica Deinococcus radiodurans Streptococcus agalactiae NEM316 Streptococcus agalactiae 2603V/R	KTWRIATGAPMGPFQILDVIGLTTPYNILAHGDADTQKLATWLKENYIDKGKL KTWMIATGAPRGPFAFLDVIGLTTPYNINMASAETNPGSAAAAKYIKENYIDKGKL KTWKLGTGAPMGPLEILDIIGIDTAYNIMKNYSDTNSDPNSLHAHLAKMLKEEFIDKGRT KTWKLGTGAPMGPLEILDIIGIDTAYNIMKNYSDTNSDPNSLHAHLAKMLKEEFIDKGRT *** :.**** **: :**:**: *.*** :. :: *. :**::****:	290 324 309 309
Nocardia farcinica Deinococcus radiodurans Streptococcus agalactiae NEM316 Streptococcus agalactiae 2603V/R	GIATGEGFYKY 301 GTATGEGFYKYPNPAFESADFLK 347 GKAAGHGFYDYD 321 GKAAGHGFYDYD 321 * *:*.***.*	

Abbildung 15: Alignment der vier besten BLAST-Treffer bezogen auf den N-Terminus der NGADH; homologe Bereiche der vier Enzyme sind grau markiert.

In der Mitte sowie am C-Terminus der alignten Sequenzen befanden sich homologe Bereiche, die in Abbildung 15 grau markiert sind.

2.4.2 Entwicklung spezifischer Primer anhand der BLAST-Ergebnisse

Analog zu den in Abbildung 15 grau markierten Bereichen wurden anhand der Codon Usage in Nocardia Primer entwickelt. Dabei wurde ein Primer analog zum grau unterlegten Bereich am C-Terminus bzw. zwei Primer analog zum grau markierten Bereich in der Mitte des Enzyms konstruiert, von denen einer strikt an der Codon Usage orientiert und der andere etwas weniger spezifisch war. Außerdem wurde ein Primer anhand der Aminosäuresequenz des NGADH-N-Terminus entwickelt. Alle Primer sind im Anhang unter 1.1.1 aufgeführt. Parallel wurden nun drei PCRs durchgeführt, in denen der Nterminale Primer mit den drei weiteren Primern kombiniert wurde. Ein PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 900 bp entstand in der PCR mit N-terminalem Primer und Primer analog zum C-terminalen Bereich. Nach der Sequenzierung des PCR-Produkts wurde die DNA-Sequenz in die Aminosäuresequenz übersetzt. Die ersten zehn Aminosäuren stimmten genau mit den aus dem Edman-Abbau bekannten Aminosäuren 17 bis 26 überein, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass es sich bei dem erhaltenen PCR-Produkt tatsächlich um ein Stück des gesuchten Gens handelte. Die so erhaltene Sequenzinformation konnte nun für die Ermittlung der DNA-Sequenz von N-Terminus und C-Terminus mittels GenomeWalker™ Universal Kit verwendet werden.

2.4.3 Aufklärung der kompletten Gensequenz mittels GenomeWalker™ Universal Kit

Das Kit wurde nach Anweisung des Herstellers verwendet. Die Gen-spezifischen Primer sind im Anhang unter 1.1.2 aufgeführt. Die resultierenden PCR-Produkte wurden unter Verwendung der im GenomeWalker[™] Universal Kit eingesetzten Primer sequenziert und die erhaltenen Sequenzen aneinandergefügt, so dass das komplette Gen *ngadh* erhalten werden konnte. Die kompletten Gen- und Proteinsequenzen sind im Anhang aufgeführt. Durch eine Datenbankrecherche mittels BLAST ergab sich eine endgültige Zuordnung zur Enzymklasse der 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen (HADHs). Die Benennung der in dieser Arbeit beschriebenen Enzyme erfolgte wie bereits erwähnt als ADHs in Kombination mit jeweils dem ersten Buchstaben von Gattungs- und Artnamen des Organismus, aus dem die Enzyme stammen (z.B. <u>NG</u>ADH aus <u>Nocardia globerula</u>). Die korrekte Bezeichnung ist jedoch HADH.

Da nun die komplette Gensequenz bekannt war, konnte das Gen amplifiziert und für die Überexpression in einen Expressionsvektor kloniert werden.

2.4.4 Rekombinante Überexpression der NGADH

2.4.4.1 Amplifikation des Gens ngadh

Für die PCR zur Amplifikation des Gens mussten zunächst Primer entwickelt werden, die zu den beiden Enden des Gens passen und die für die Klonierung in den Expressionsvektor passende Schnittstellen enthalten. Diese Primer sind im Anhang unter 1.1.3 aufgeführt. Unter Verwendung der beiden Primer wurde das ngadh-Gen amplifiziert und mit den Schnittstellen NdeI und BamHI versehen. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt und, Expressionsvektor ebenso wie der pET-21a(+), mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Nach der Restriktion wurden PCR-Produkt und geschnittener Vektor im Agarosegel aufgetrennt, die Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA extrahiert. Nun wurden der geschnittene Vektor und das geschnittene PCR-Produkt ligiert; der entstehende Vektor wurde pNGADH genannt. Anschließend wurden einerseits zur Vermehrung von pNGADH E. coli XL1-Blue-Zellen und andererseits zur Expression des Enzyms E. coli BL21(DE3)-Zellen mit dem Vektor pNGADH transformiert. Der Vektor pNGADH ist in Abbildung 16 dargestellt.



Abbildung 16: Vektorkarte von pNGADH (pET-21a(+) mit ngadh).

2.5 Charakterisierung der rec-NGADH

2.5.1 Expressionsoptimierung

Um eine optimale Enzymausbeute bei der Anzucht der rekombinanten *E. coli* BL21(DE3) mit pNGADH zu erzielen, wurden drei Parameter während der Anzucht wie folgt variiert:

Dauer der Expression: 3 h / 5 h / 18 h

Temperatur während der Expression: 23 °C / 30 °C / 37 °C

IPTG-Konzentration: 0,1 mM / 0,5 mM / 1 mM

In Abbildung 17, Abbildung 18 und Abbildung 19 sind die Ergebnisse der Expressionsoptimierung dargestellt.



Abbildung 17: Expression der NGADH in E. coli BL21(DE3) nach Zugabe von 0,1 mM IPTG.



Abbildung 18: Expression der NGADH in E. coli BL21(DE3) nach Zugabe von 0,5 mM IPTG.



Abbildung 19: Expression der NGADH in E. coli BL21(DE3) nach Zugabe von 1 mM IPTG.

Aus Abbildung 17, Abbildung 18 und Abbildung 19 wird deutlich, dass die besten Expressionsbedingungen die Folgenden sind:

1 mM IPTG / 30 °C / 18 h

1 mM IPTG / 37 °C / 5 h

Da bei der Anzucht der Zellen für 18 h mehr Zellmaterial erhalten wird, also die erzielte Enzymmenge im Vergleich größer ist, wurden im Weiteren hauptsächlich die zuerst aufgeführten Bedingungen gewählt.

Das in Abbildung 20 gezeigte SDS-Gel dokumentiert die rekombinante Überexpression der NGADH in *E. coli* BL21(DE3) mit pNGADH.





2.5.2 Aufreinigung der rekombinanten NGADH

Für den Einsatz in den weiteren Schritten der Charakterisierung der NGADH wurde das Enzym chromatographisch aufgereinigt. Zu diesem Zweck wurde ein 20prozentiger Rohextrakt auf eine mit 100 mM MES pH 6,5 equilibrierte Q-Sepharose FF-Säule gegeben und in 10 Säulenvolumen mit einem Gradienten von 0 M auf 1 M NaCl eluiert. Die aktivsten Fraktionen wurden gepoolt, der Pool mit 1,5 M (NH₄)₂SO₄ versetzt und auf eine mit 100 mM MES pH 6,5 + 1,5 M (NH₄)₂SO₄ equilibrierte Phenylsepharose FF-Säule gegeben. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 1,5 M auf 0 M (NH₄)₂SO₄. Der Aufreinigungserfolg wurde im SDS-Gel (siehe Abbildung 21) dokumentiert. Die spezifische Aktivität der rekombinanten NGADH konnte durch die Aufreinigung um den Faktor 10 gesteigert werden. Die zugehörige Aufreinigungstabelle ist in Tabelle 13 dargestellt.

Aufreinigungsschritt	spez. Akt. [U/mg]	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute [%]	Aufreinigungs- faktor
Rohextrakt	101	3745	100	1,0
Pool Q-Sepharose FF	226	1189	32	2,2
Pool Phenylsepharose FF	881	719	19	8,7
aktivste Fraktion Phenylsepharose FF	1063	112	3	10,5

Tabelle 13: Tabelle zur Dokumentation des Aufreinigungserfolgs der recNGADH.



1: Rohextrakt *E. coli* BL21(DE3) mit pNGADH 2+3: aktivste Fraktionen nach Aufreinigung mittel Q-Sepharose FF 4: Pool der aktivsten Fraktionen nach der Aufreinigung mittel Q-Sepharose FF versetzt mit 1,5 M (NH₄)₂SO₄

5+6: aktivste Fraktionen nach Aufreinigung mittels Phenylsepharose FF 7: wie 5, jedoch nur 1/3 der Proteinmenge aufgetragen

8: Mark12, Invitrogen

Abbildung 21: SDS-PAGE zur Dokumentation der Aufreinigung der rekombinanten NGADH mittels Q-Sepharose FF und Phenylsepharose FF (Coomassiefärbung).

2.5.3 Cofaktorspezifität der NGADH

Im Zuge der Charakterisierung wurde getestet, ob die rec-NGADH außer NADH auch NADPH als Cofaktor nutzen kann. Es zeigte sich, dass 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mit 0,25 mM NADPH als Cofaktor nur mit einer relativen Aktivität von 0,1 % umgesetzt wird im Vergleich zur Aktivität mit 0,25 mM NADH.
2.5.4 Temperaturoptimum

Um das Temperaturoptimum der rekombinanten NGADH zu ermitteln, wurde wie schon bei der Arbeit mit der WT-NGADH der Aktivitätstest im Photometer bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Der zugehörige Graph ist in Abbildung 22 dargestellt.



Abbildung 22: Temperaturoptimum der rec-NGADH.

Das ermittelte Temperaturoptimum der rekombinanten NGADH liegt bei 35 °C. Der photometrische Standardtest wird jedoch weiter bei 37 °C durchgeführt, um die Vergleichbarkeit mit früheren Experimenten zu gewährleisten.

2.5.5 pH-Optimum

Zur Ermittlung des pH-Optimums der rec-NGADH wurde der Aktivitätstest im Photometer mit verschiedenen Puffern bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Der Graph in Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse.



Abbildung 23: pH-Optimum der rec-NGADH.

Der optimale pH-Wert der rekombinanten NGADH liegt bei pH 6,5. Hohe Enzymaktivitäten können mit Citrat-Na₂HPO₄-Puffer und TEA-Puffer in einem pH-Bereich von 6,0 bis 7,5 erzielt werden. Ebenfalls zeigte sich, dass die Aktivität der rec-NGADH in Tris-HCl-Puffer beim gleichen pH-Wert deutlich geringer ist. Der Enzymtest im Photometer wird deshalb weiterhin bei pH 6,0 bis pH 6,5 durchgeführt.

2.5.6 Molekulargewicht

Das Molekulargewicht der rec-NGADH wurde mittels Gelfiltration bestimmt und betrug, ebenso wie das der WT-NGADH, 135 kDa. Die Berechnung des Molekulargewichts einer Untereinheit aus der Aminosäuresequenz ergibt ein theoretisches Molekulargewicht von 33,5 kDa. Ein Tetramer hat also ein theoretisches Molekulargewicht von 134 kDa. Das tatsächliche mittels Gelfiltration ermittelte Molekulargewicht der NGADH stimmt demnach recht genau mit dem theoretischen Molekulargewicht überein, und es zeigt sich, dass es sich bei der NGADH tatsächlich um ein Tetramer handelt. In der SDS-PAGE läuft eine Untereinheit der NGADH jedoch etwas höher als erwartet bei ca. 37 kDa.

2.5.7 Substratspektrum

Um das Substratspektrum der NGADH zu bestimmen, wurden verschiedene Ketone und Ketoester als Substrat im photometrischen Aktivitätstest eingesetzt. Das verwendete Enzympräparat stammte aus der Aufreinigung über eine Q-Sepharose FF-Säule und hatte eine spezifische Aktivität von ca. 220 U/mg (siehe Tabelle 13). Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt. Die Enzymaktivität unter Verwendung des Substrats 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester wurde als 100 % gesetzt. Alle anderen Enzymaktivitäten sind im Bezug auf diesen Wert prozentual angegeben.

Tabelle 14: Substratspektrum der rekombinanten NGADH; die Aktivität wurde jeweils prozentual auf die als 100 % gesetzte Aktivität bei der Reduktion des Substrats 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester bezogen; das verwendete Enzympräparat stammte aus der Aufreinigung mittels Q-Sepharose FF (Tabelle 13) und hatte eine spezifische Aktivität von ca. 220 U/mg.

Substrat	Aktivität [%]
	100,00
	45,82
	12,69
	0,00
	0,04
	0,01
	0,01

Substrat	Aktivität [%]
	0,02
<u>i</u> , <u>i</u> , <u>i</u>	0,00
Å Ås×	49,44
	0,46
	0,11
	0,12
	1,25
0	0,01
0	0,09
	0,01
	0,38
	0,02

Substrat	Aktivität [%]
0	0,31
0	0,28
	0,97
	1,18
	0,84
	3,29
	0,56
	0,80
	3,45
	4,35
	0,27
	10,58

Substrat	Aktivität [%]
	0,26
	0,01
	0,01
	0,01

Es zeigte sich, dass die rec-NGADH bevorzugt mittellangkettige aliphatische Ketone (C_8 bis C_{10}) und Ketoester mit relativ großen endständigen Substituenten reduziert. In Bezug auf die mittellangkettigen Ketone lässt sich sagen, dass sie besser reduziert werden, je weiter zur Mitte die Ketogruppe liegt. Acetophenon sowie verschiedene Acetophenon-Derivate wurden als Substrate getestet, jedoch nicht umgesetzt. Die Umsetzung der in Tabelle 14 aufgeführten Substrate wurde stichprobenartig im Gaschromatographen verifiziert.

2.5.8 Enantioselektivität

Durch die Analyse der von der rec-NGADH produzierten chiralen Alkohole im Gaschromatographen wurde überprüft, welche Enantiomere vorrangig gebildet werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Ketoester 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester hauptsächlich zu (*S*)-2-Hydroxy-4-phenylbutansäureethylester reduziert wird, während 4-Chlor-3-oxobutansäureethylester zum korrespondierenden (S)-Alkohol reduziert wird und 2-Octanon hauptsächlich zu (*R*)-2-Octanol. Die ermittelten *ee*-Werte betrugen > 96 % bzw. > 99 % bzw. ca. 40 %.

2.5.9 Kinetische Konstanten der rec-NGADH

kinetischen Konstanten der rec-NGADH Zur Bestimmung der wurden die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten des Enzyms bei verschiedenen Substratund Cofaktorkonzentrationen gemessen. Nach der Auftragung der gemessenen Werte gegen die Substrat- bzw. Cofaktorkonzentration wurden mit Hilfe des Programms OriginPro 7.5G nach der Michaelis-Menten-Gleichung die Michaelis-Konstanten (K_M-Werte) berechnet. Bei der Auswertung war zu beachten, dass sich die eingesetzten Ketoester und Ketone nur in geringen Konzentrationen in Wasser lösen, so dass aussagekräftige Werte über die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei Konzentrationen > 15 mM fehlen. Aus den durchgeführten Berechnungen ergaben sich die in Tabelle 15 aufgeführten Werte. Die Oxidation von (S)-2-Hydroxy-4-phenylbutansäureethylester durch die NGADH war im Photometer bis zu einer Substratkonzentration von 10 mM nicht messbar.

 Tabelle 15: K_M-Werte der rec-NGADH.

Substrat	K _M [mM]
2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester	20,68
4-Chlor-3-oxobutansäureethylester	218,51
2-Octanon	32,23
NADH	0,03
(R)-2-Octanol	4,69
NAD	0,21

2.6 Biotransformation mit NGADH im zellfreien System

Die rekombinante NGADH wurde in Biotransformationen im zellfreien System eingesetzt. Als Enzyme für die Regenerierung von NADH dienten für diese Anwendung bereits bekannte Enzyme, nämlich die Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii*, die Glucosedehydrogenase (GDH) aus *Bacillus subtilis* und das Malic Enzyme (MAE) aus *E. coli*. Es wurde jeweils 1 U NGADH mit 5 U bzw. 1 U cofaktorregenerierendem Enzym kombiniert, wobei alle verwendeten Enzyme über einen Chromatographieschritt mittels Q-Sepharose FF aufgereinigt waren. Als Substrat wurde 10 mM 2-Oxo-4phenylbutansäureethylester eingesetzt. Die Ergebnisse der Biotransformationen sind in Abbildung 24 gezeigt.



Abbildung 24: Biotransformationen von 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mit je 1 U NGADH im zellfreien System; die Cofaktorregenerierung erfolgte über 5 bzw. 1 U der Enzyme FDH bzw. MAE bzw. GDH.

Abbildung 24 zeigt, dass die Biotransformationen von 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mittels NGADH mit allen eingesetzten cofaktorregenerierenden Enzymen etwa gleich schnell ablaufen. Es zeigten sich keine Auswirkungen durch die Variation der Menge an cofaktorregenerierendem Enzym. Die schnellste Umsetzung erfolgte bei Einsatz von 5 Units GDH. Um den Verlauf der Reaktionen genauer untersuchen zu können, müssten diese mit geringerer Enzymmenge durchgeführt werden.

2.7 Einsatz von pNGADH in *E. coli* BL21(DE3) als Ganzzellbiokatalysator

Ganzzellbiokatalysatoren eignen sich aufgrund ihrer einfachen Handhabung besonders für den Einsatz in Biotransformationen. Um zu überprüfen, ob *E. coli*-eigene Enzyme bereits eine ausreichende Regenerierung des Cofaktors NADH gewährleisten können, wurden je 5 mg *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit pNGADH ohne zusätzliches Regenerierungsenzym unter Zugabe verschiedener Substanzen in Ganzzellbiotransformationen eingesetzt. Die zugesetzten Substanzen waren dabei die Substrate der möglichen cofaktorregenerierenden Enzyme GDH, L-LDH, Malic Enzyme und FDH, nämlich β-D-Glucose, Na-L-Lactat, Na-L-Malat und Na-Formiat. Als Kontrollversuch wurde parallel ein Ansatz ohne Zusatz der genannten Substanzen durchgeführt. Außerdem wurde jeder Versuch parallel unter Zugabe von 1 mM NAD bzw. ohne Zugabe von NAD durchgeführt. Abbildung 25 und Abbildung 26 zeigen die Ergebnisse dieser Versuche. Das Edukt in den durchgeführten Ganzzellbiotransformationen war 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester.



Abbildung 25: Ganzzellbiotransformationen von 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mit 5 mg *E. coli* BL21(DE3) mit pNGADH ohne cofaktorregenerierendes Enzym unter Zugabe verschiedener Substrate bei Zugabe von 1 mM NAD, Ansatzvolumen = 1 ml.

In den Ansätzen mit Zusatz von NAD zeigten sich deutliche Unterschiede im Ablauf der Reaktionen. Im Ansatz mit 100 mM L-Malat ist nach 3 Stunden eine Produktbildung von > 99 % zu beobachten. Der Ansatz mit 1 M L-Lactat zeigt ein Maximum von knapp 90 % Produkt, wobei dieses nach fünf Stunden erreicht ist. Alle anderen Ansätze zeigen keinen großen Unterschied zum Kontrollansatz ohne Zusatz einer weiteren Substanz. Hier wird die maximale Umsatzrate erst nach > 24 Stunden erreicht.



Abbildung 26: Ganzzellbiotransformationen von 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mit 5 mg *E. coli* BL21(DE3) mit pNGADH ohne cofaktorregenerierendes Enzym unter Zugabe verschiedener Substrate ohne Zugabe von NAD; a = Skala bis 25 Stunden, b = Skala bis 6 Stunden; Ansatzvolumen = 1 ml.

In den Ansätzen ohne NAD-Zugabe kann im Ansatz mit 100 mM L-Malat nach 24 Stunden die höchste Produktbildung (77 %) beobachtet werden. Beim Betrachten des Bereichs der Inkubationszeit bis sechs Stunden ist jedoch zu sehen, dass zunächst im Ansatz mit 1 M L-Lactat die schnellste Umsetzung stattfindet. Die Produktbildung steigt hier jedoch in den ersten sechs Stunden nicht über 34 % und auch nach 24 Stunden sind lediglich 41 % des Edukts umgesetzt. Deutlich am geringsten ist die Produktbildung im Ansatz ohne weiteren Zusatz (37 % nach 24 Stunden). Die Ansätze mit Zusatz von β -D-Glucose und Na-Formiat zeigen nach 24 Stunden 42 bzw. 51 % Umsatz.

Im Photometer wurde parallel getestet, ob durch Rohextrakt aus *E. coli* BL21(DE3) mit pNGADH bei Zusatz von 100 mM β -D-Glucose, 150 mM Na-Formiat, 100 mM L-Malat oder 1 M L-Lactat NAD zu NADH reduziert werden kann. Dem Ansatz wurde 1 mM NAD zugesetzt. Es zeigte sich bei den Ansätzen mit Glucose, Formiat und Lactat keine messbare Reduktion von NADH. Bei Zusatz von 100 mM L-Malat konnte jedoch die Produktion von NADH detektiert werden. Die gemessene Aktivität entsprach 4,5 U/ml. Dieses Ergebnis passt zu den in den Ganzzellumsetzungen bestimmten Resultaten.

2.8 Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren mit Cofaktorregenerierungssystemen

Die in 2.7 gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass der Einsatz rekombinanter *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit pNGADH ohne zusätzliches cofaktorregenerierendes Enzym in Ganzzellbiotransformationen nur eine sehr langsame Produktbildung bewirkt. Aus diesem Grund wurden im Zuge dieser Arbeit Ganzzellbiokatalysatoren mit NGADH und Cofaktorregenerierungssystem entwickelt. Als NADH-regenerierende Enzyme wurden die Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii*, die Glucosedehydrogenase (GDH) aus *Bacillus subtilis* und das Malic Enzyme (MAE) aus *E. coli* eingesetzt. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit erstmals die L-Lactatdehydrogenase (L-LDH) aus *Bacillus subtilis* zur Regenerierung des Cofaktors NADH genutzt. Da dieses Enzym in der Anwendung als cofaktorregenerierendes Enzym noch nicht beschrieben ist, wird im nächsten Absatz die Klonierung und Charakterisierung dieses Enzyms behandelt.

2.8.1 L-LDH aus B. subtilis als cofaktorregenerierendes Enzym

Die L-Lactatdehydrogenase aus *Bacillus subtilis* ist als Wildtyp-Enzym bereits seit langer Zeit bekannt und beschrieben ^[112], ^[113] und ^[114]. Die rekombinante Expression wurde im Zuge dieser Arbeit zum ersten Mal durchgeführt, die Sequenz des Gens war jedoch aus der kompletten Sequenzierung des Genoms von *Bacillus subtilis* bekannt. Das Gen wurde mittels PCR aus genomischer DNA von *Bacillus subtilis* amplifiziert; die Primer sind im Anhang aufgeführt. Das Gen wurde in die Multiple Cloning Site 1 des Expressionsvektors pETDuet-1 kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert (0,1 mM IPTG, 30 °C, 22 h). Die Expression ist in Abbildung 27 dokumentiert.



Abbildung 27: Dokumentation der Expression von pL-LDH in *E. coli* BL21(DE3) im SDS-Gel (Coomassiefärbung).

Das Molekulargewicht der L-LDH beträgt ca. 35 kDa. Die entsprechende Bande ist in Abbildung 27 gut zu erkennen. Es fällt auf, dass trotz sehr milder Expressionsbedingungen mit Induktion durch nur 0,1 mM IPTG und Expression bei 30 °C ein großer Teil des Enzyms als Inclusion Bodies vorliegt.

Anschließend folgte die Charakterisierung der rekombinanten L-LDH, im Folgenden auch rec-L-LDH genannt. Verwendet wurde dabei ein Enzympräparat, das über Q-Sepharose FF gereinigt wurde. Die Aufreinigung ist in Tabelle 16 dokumentiert.

Tabelle 16: Dokumentation der Aufreinigung der rekombinanten L-Lactatdehydrogenase mittels Q-Sepharose FF.

Aufreinigungsschritt	spez. Akt. [U/mg]	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute [%]	Aufreinigungs- faktor
Rohextrakt	8,8	152	100	1,0
Pool Q-Sepharose FF	9,3	57	37	1,1
aktivste Fraktion Q-Sepharose FF	11,7	11	7	1,3

2.8.1.1 Temperaturoptimum

Die Bestimmung des Temperaturoptimums der L-LDH aus *B. subtilis* für die Oxidation von L-Lactat erfolgte durch Enzymtests im Photometer bei verschiedenen Temperaturen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt. Das Temperaturoptimum lag bei 30 °C.



Abbildung 28: Abhängigkeit der rec-L-LDH-Aktivität von der Temperatur.

2.8.1.2 pH-Optimum

Die Bestimmung des pH-Optimums für die Oxidation von L-Lactat erfolgte ebenfalls durch Enzymtests im Photometer unter Variation der pH-Werte bei Einsatz verschiedener Puffer. Der zugehörige Graph ist in Abbildung 29 gezeigt. Es ergab sich ein pH-Optimum von 7,0. Hierbei ist anzumerken, dass das Enzym auch bei pH-Werten von 6,5 bis 8,0 noch Aktivitäten von über 50 % zeigte.



Abbildung 29: Abhängigkeit der rec-L-LDH-Aktivität vom pH-Wert.

2.8.1.3 Kinetische Konstanten

Die für die rekombinante L-LDH aus *Bacillus subtilis* gemessenen kinetischen Konstanten sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Substrat	K _M -Wert [mM]	K _I [mM]
Na-L-Lactat	18,46	
Na-DL-Lactat	29,65	318,17
NAD	0,53	

Tabelle 17: Kinetische Konstanten der rekombinanten L-LDH aus Bacillus subtilis.

Aus Tabelle 17 geht hervor, dass der K_M-Wert für DL-Lactat ungefähr 1,6fach so hoch ist, wie der K_M-Wert für L-Lactat. Bei Einsatz von DL-Lactat als Substrat für die L-LDH nimmt die maximale spezifische Aktivität auf ca. 75 % ab im Vergleich zur spezifischen Aktivität gemessen mit reinem L-Lactat. Der K_I-Wert für reines D-Lactat ist für das Wildtyp-Enzym als 45 mM beschrieben ^[113]. Daher ist der Einsatz von DL-Lactat als Substrat in Biotransformationen unter Berücksichtigung der eingesetzten Lactat-Konzentrationen (siehe Punkt 2.8.5.3) nicht zu empfehlen.

2.8.2 Vergleich mit den Eigenschaften der WT-L-LDH

Die Charakterisierung der Wildtyp-L-LDH aus *Bacillus subtilis* erfolgte bereits im Jahre 1965 ^[113]. In Tabelle 18 werden die im Zuge dieser Arbeit ermittelten Eigenschaften der rec-L-LDH mit den beschriebenen Eigenschaften der WT-L-LDH ^[113] verglichen.

Tabelle 18: Vergleich der Eigenschaften der rec-L-LDH aus *B. subtilis* mit den Eigenschaften der WT-L-LDH^[113].

	WT-L-LDH	rec-L-LDH
Temperaturoptimum (Oxidation von L-Lactat) [°C]	k. A.	30 °C
pH-Optimum (Oxidation von L-Lactat)	7,2	7,0
K _M (L-Lactat) [mM]	30	18
K_{M} (NAD) [mM]	0,9	0,5

Es zeigt sich, dass alle in dieser Arbeit ermittelten Eigenschaften der rec-L-LDH jeweils in der gleichen Größenordnung liegen wie die Angaben für das Wildtyp-Enzym ^[113]. Die in dieser Arbeit bestimmten K_M -Werte für das rekombinante Enzym liegen um den Faktor 1,7 bzw. 1,8 niedriger, der optimale pH-Wert liegt um den Faktor 1,03 niedriger.

Die Umsetzung verschiedener Substratanaloga wurde bereits anhand des Wildtyp-Enzyms getestet ^[113]. Es wurde beobachtet, dass das Enzym außer der Reduktion von Pyruvat (Aktivität wurde als 100 % gesetzt) auch Glyoxylat (57 %), Hydroxypyruvat (45 %) und α -Ketobutyrat (8 %) reduzieren kann.

Im Folgenden sind nun die einzelnen Cofaktorregenerierungssysteme, die in der vorliegenden Arbeit hergestellt wurden, sowie ihr Einsatz in Ganzzellbiotransformationen beschrieben.

2.8.3 Cofaktorregenerierung mittels Glucosedehydrogenase (GDH)

2.8.3.1 Herstellung des Konstrukts pGDH-NGADH

Der Vektor pGDH-NGADH wurde wie unter 3.14 beschrieben auf Grundlage des Vektors pETDuet-1 hergestellt. Zu diesem Zweck wurde das Gen *gdh* in MCS1 und das Gen *ngadh* in MCS2 kloniert. Der resultierende Vektor pGDH-NGADH ist in Abbildung 30 dargestellt.



Abbildung 30: Vektorkarte von pGDH-NGADH (pETDuet-1 mit gdh in MCS1 und ngadh in MCS2).

2.8.3.2 Expression von pGDH-NGADH in *E. coli* BL21(DE3)

Die Expression in den *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit pGDH-NGADH erfolgte nach Zugabe von 1 mM IPTG bei 37 °C für 5 Stunden. Das in Abbildung 31 gezeigte SDS-Gel dokumentiert die Expression beider Enzyme. Die GDH hat ein Molekulargewicht von ca. 28 kDa, läuft im SDS-Gel aber bei ca. 31 kDa ^[55] und die NGADH läuft bei ca. 37 kDa.





Abbildung 31: Dokumentation der Expression von pGDH-NGADH in *E. coli* BL21(DE3) im SDS-Gel (Coomassiefärbung).

Im SDS-Gel (Abbildung 31) ist eine deutliche Überexpression der NGADH zu beobachten. Die GDH, die bei ca. 31 kDa zu sehen sein sollte, ist entweder trotz optimaler Expressionsbedingungen kaum exprimiert worden oder sie bildet mit der NGADH eine einzige Bande.

2.8.3.3 Einsatz des Konstrukts pGDH-NGADH

Zunächst wurde die Aktivität der beiden exprimierten Enzyme GDH und NGADH im Photometer bestimmt. Es ergab sich hierbei für die GDH eine spezifische Aktivität von 1,36 U/mg und für die NGADH eine Aktivität von 527 U/mg. Die geringe Aktivität der GDH ist hierbei möglicherweise durch die Klonierung in die erste Multiple Cloning Site und die daraus folgende geringere Expression zu erklären. Abbildung 32 zeigt den Einsatz des Systems in Ganzzellbiotransformationsansätzen am Beispiel der Reduktion von 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester.



Abbildung 32: Ganzzellbiotransformation von 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mit *E. coli* BL21(DE3) pGDH-NGADH; Ansätze mit und ohne 1 mM NAD, mit 5 mg bzw. 1 mg bzw. 0,5 mg Zellen; a = Skala bis 25 Stunden, b = Skala bis 5 Stunden; Ansatzvolumen = 1 ml.

Die durchgeführten Ganzzellbiotransformationen zeigten, dass der Einsatz der GDH als cofaktorregenerierendes Enzym wie gewünscht funktioniert. In den Ansätzen, denen 1 mM NAD zugefügt wurde, konnte die Umsetzung im Gegensatz zu den Ansätzen ohne NAD-Zugabe deutlich gesteigert werden. Bei Einsatz von 5 mg Zellen war bereits nach 20 Minuten ein Umsatz von > 99 % erzielt werden. Insgesamt ließ sich bei allen Ansätzen außer dem Ansatz mit nur 0,5 mg Zellen und ohne NAD-Zugabe eine Umsetzung von > 99 % des Substrats erzielen. Der ermittelte *ee*-Wert lag dabei bei Einsatz von 5 mg Zellen bei > 99 %. Wurden nur 1 mg bzw. 0,5 mg Zellen eingesetzt, lag der *ee*-Wert bei > 98 %. Ohne NAD-Zugabe wurde jeweils ein etwas schlechterer *ee*-Wert erzielt als bei NAD-Zugabe.

2.8.4 Cofaktorregenerierung mittels Malic Enzyme (MAE)

2.8.4.1 Herstellung des Konstrukts pMAE-NGADH

Die Konstruktion des Vektors pMAE-NGADH erfolgte durch Klonierung von *mae* in MCS1 und von *ngadh* in MCS2 von pETDuet-1. Der Vektor pMAE-NGADH ist in Abbildung 33 gezeigt.



Abbildung 33: Vektorkarte von pMAE-NGADH (pETDuet-1 mit mae in MCS1 und ngadh in MCS2).

2.8.4.2 Expression von pMAE-NGADH in *E. coli* BL21(DE3)

Die Expression in den *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit pMAE-NGADH erfolgte nach Zugabe von 0,1 mM IPTG für 22 Stunden bei 30 °C. Das in Abbildung 34 gezeigte SDS-Gel dokumentiert die Expression der beiden Enzyme in den Zellen. Das Malic Enzyme hat ein Molekulargewicht von 64 kDa, kloniert mit His-Tag sind es theoretisch 66,7 kDa. Im SDS-Gel ist die MAE-Bande bei ca. 60 kDa zu sehen. Die NGADH läuft im SDS-Gel bei ca. 37 kDa.



1: Mark12, Invitrogen 2: Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3) mit pMAE-NGADH 3: Pellet von *E. coli* BL21(DE3) mit pMAE-NGADH

Abbildung 34: Dokumentation der Expression von pMAE-NGADH in *E. coli* BL21(DE3) im SDS-Gel (Coomassiefärbung).

2.8.4.3 Einsatz des Konstrukts pMAE-NGADH

Vor dem Einsatz des Systems MAE-NGADH in Ganzzellumsetzungen wurde die Aktivität der beiden Enzyme im Photometer überprüft. Hierbei zeigte sich für das Malic Enzyme eine spezifische Aktivität von 49,6 U/mg und für die NGADH eine spezifische Aktivität von 703 U/mg. Als Substrat für das MAE wurde L-Malat eingesetzt. Da D-Malat einen kompetitiven Inhibitor darstellt ^[115], ist der Einsatz von DL-Malat nicht empfehlenswert. Die bei Einsatz des Systems in Ganzzellbiotransformationen von 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 35 gezeigt.



Abbildung 35: Ganzzellbiotransformation von 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mit *E. coli* BL21(DE3) pMAE-NGADH; Ansätze mit und ohne 1 mM NAD, mit 5 mg bzw. 0,5 mg Zellen; a = Skala bis 55 Stunden, b = Skala bis 5 Stunden; Ansatzvolumen = 1 ml.

Es stellte sich heraus, dass bei Einsatz des Malic Enzyme als cofaktorregenerierendes Enzym eine noch bessere Umsetzung des Edukts 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester stattfindet als bei Einsatz der GDH. Hier ist bei Einsatz von 5 mg Zellen bereits nach fünf Minuten eine Umsetzung von > 99 % des Substrats erfolgt, und selbst bei Einsatz von nur 0,5 mg Zellen ist die Umsetzung nach 15 Minuten mit > 99 % Produktbildung abgeschlossen. Auch hier zeigt sich wieder, dass die Zugabe von 1 mM NAD eine starke Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit bewirkt. Der erzielte *ee*-Wert liegt bei Ansätzen mit NAD-Zugabe stets bei > 98 %, bei Ansätzen ohne zugesetztes NAD bei > 96 %.

2.8.5 Cofaktorregenerierung mittels L-Lactatdehydrogenase (L-LDH)

2.8.5.1 Herstellung des Konstrukts pL-LDH-NGADH

Durch die Klonierung von *l-ldh* in MCS1 und *ngadh* in MCS2 von pETDuet-1 erfolgte die Herstellung des Vektors pL-LDH-NGADH. Abbildung 36 zeigt die zugehörige Vektorkarte.



Abbildung 36: Vektorkarte von pL-LDH-NGADH (pETDuet-1 mit *l-ldh* in MCS1 und *ngadh* in MCS2).

2.8.5.2 Expression von pL-LDH-NGADH in *E. coli* BL21(DE3)

Die Expression in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit pL-LDH-NGADH erfolgte nach Zugabe von 0,1 mM IPTG für 22 Stunden bei 30 °C. Abbildung 37 zeigt ein SDS-Gel, mit dem die Expression beider Proteine dokumentiert ist. Die L-LDH hat ein Molekulargewicht von ca. 35 kDa, die NGADH läuft im SDS-Gel bei ca. 37 kDa. Die Banden von L-LDH und NGADH werden im SDS-Gel nicht getrennt, sondern bilden zusammen eine dicke Bande. Es fällt auf, dass ein großer Teil der Enzyme unlöslich exprimiert ist und als Inclusion Bodies im Pellet vorliegt.



1: Mark12, Invitrogen 2: Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3) mit pL-LDH-NGADH 3: Pellet von *E. coli* BL21(DE3) mit pL-LDH-NGADH

Abbildung 37: Dokumentation der Expression von L-LDH und NGADH in *E. coli* BL21(DE3) mit pL-LDH-NGADH (Coomassiefärbung).

2.8.5.3 Einsatz des Konstrukts pL-LDH-NGADH

Die zunächst durchgeführte Überprüfung der Enzymaktivität im Photometer ergab für die L-LDH eine spezifische Aktivität von 0,16 U/mg (Oxidation von L-Lactat) und für die NGADH eine spezifische Aktivität von 52 U/mg. Es zeigte sich hier also trotz geeigneter Expressionsbedingungen eine im Vergleich zu den anderen Konstrukten relativ geringe Aktivität für die NGADH. Der Einsatz der Zellen mit L-LDH und NGADH in Ganzzellbiotranformationen von 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester wurde bei verschiedenen pH-Werten und L-Lactat-Konzentrationen durchgeführt. Der K_M-Wert für das Reaktionsprodukt Pyruvat liegt mit 0,8 mM wesentlich niedriger als der K_M-Wert für das Substrat L-Lactat (18 mM). Aus diesem Grund sollten Bedingungen ermittelt werden, bei denen trotz Produktion von Pyruvat weiterhin die Oxidation von L-Lactat abläuft. Bei Einsetzen der Rückreaktion, also der Reduktion von Pyruvat, würde NADH verbraucht, das damit der ADH nicht mehr zur Verfügung stehen würde. Es wäre möglich, dass in diesem Fall die ADH die Oxidation des produzierten Alkohols katalysiert, was zu einer schlechteren Ausbeute führen würde. Dies soll durch die Auswahl geeigneter Bedingungen verhindert werden. Abbildung 38 und Abbildung 39 zeigen die ermittelten Ergebnisse.



Abbildung 38: Ganzzellbiotransformation von 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mit *E. coli* BL21(DE3) pL-LDH-NGADH; Variation der pH-Werte, L-Lactat-Konzentration 100 mM; 5 mg Zellen, Ansatzvolumen = 1 ml.



Abbildung 39: Ganzzellbiotransformation von 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mit *E. coli* BL21(DE3) pL-LDH-NGADH; Variation der L-Lactat-Konzentration, Zusatz von 1 mM NAD, pH 8,0; 5 mg Zellen; a = Skala bis 50 Stunden, b = Skala bis 5 Stunden; Ansatzvolumen = 1 ml.

Es zeigte sich, dass die Umsetzung unter NAD-Zugabe bei einem pH-Wert von 8,0 etwas schneller abläuft als bei pH 7,5. Ein Grund dafür könnte sein, dass bei dem niedrigeren pH-Wert die NADH-verbrauchende Reduktion des bereits entstandenen Pyruvat zu L-Lactat durch die L-LDH auftritt, deren pH-Optimum für diese Reaktion bei 6,0 liegt ^[116]. Ohne Zusatz von NAD läuft die Reaktion bei beiden pH-Werten gleich schnell ab. Zusätzlich läuft bei einem pH-Wert von 7,5 eine Rückreaktion von vorher erreichten 99 % Umsatz

zurück auf 88 % ab, was vermutlich ebenfalls auf die parallel ablaufende, durch die L-LDH katalysierte Reduktion des vorher entstandenen Pyruvats zurückzuführen ist. Bei pH 8,0 bleibt die erreichte Produktkonzentration konstant bei > 98 %. Wird bei pH 8,0 die L-Lactat-Konzentration variiert, zeigt sich, dass eine höhere L-Lactat-Konzentration zu einer schnelleren Umsetzung führt. Abbildung 38 zeigt zusätzlich, dass auch hier ohne zusätzliche Zugabe von NAD eine wesentliche langsamere Umsetzung stattfindet und selbst nach 24 Stunden nur eine Umsetzung von ca. 85 % erreicht ist.

2.8.6 Cofaktorregenerierung mittels Formiatdehydrogenase (FDH)

2.8.6.1 Herstellung des Konstrukts pFDH-NGADH

Zur Herstellung des Konstrukts pFDH-NGADH wurde das Gen *fdh* in MCS1 und das Gen *ngadh* in MCS2 von pETDuet-1 kloniert. Die Vektorkarte ist in Abbildung 40 dargestellt.



Abbildung 40: Vektorkarte von pFDH-NGADH (pETDuet-1 mit fdh in MCS1 und ngadh in MSC2).

2.8.6.2 Herstellung des Konstrukts pNGADH-FDH

Um zwei Vektoren mit umgekehrter Genreihenfolge vergleichen zu können, wurde zusätzlich ein Vektor auf Basis von pETDuet-1 konstruiert, in den das Gen *ngadh* in MCS1 und das Gen *fdh* in MCS2 kloniert wurden. Der resultierende Vektor wurde pNGADH-FDH genannt, und die zugehörige Vektorkarte ist in Abbildung 41 dargestellt.



Abbildung 41: Vektorkarte von pNGADH-FDH (pETDuet-1 mit ngadh in MCS1 und fdh in MCS2).

2.8.6.3 Expression von pFDH-NGADH und pNGADH-FDH in *E. coli* BL21(DE3)

Die Expression in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit pFDH-NGADH und die Expression in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit pNGADH-FDH erfolgten nach Zugabe von 0,1 mM IPTG für 22 Stunden bei 30 °C. In Abbildung 42 ist das SDS-Gel dargestellt, mit dem die Expression in beiden rekombinanten Stämmen dokumentiert ist. Das Molekulargewicht der FDH beträgt 40,3 kDa pro Untereinheit, sie läuft jedoch im SDS-Gel etwas höher ^[55]. Die NGADH läuft im SDS-Gel bei ca. 37 kDa: Mit His-Tag läuft sie etwas höher, denn das Molekulargewicht der angefügten Aminosäuren beträgt ca. 2,7 kDa.



- 1: Rohextrakt *E. coli* BL21(DE3) mit pFDH-NGADH 2: Pellet von *E. coli* BL21(DE3) mit pFDH-NGADH 3: Mark12, Invitrogen
- 4: Rohextrakt E. coli BL21(DE3) mit pNGADH-FDH
- 5: Pellet von E. coli BL21(DE3) mit pNGADH-FDH

Abbildung 42: Dokumentation der Expression von FDH und NGADH in den Konstrukten pFDH-NGADH und pNGADH-FDH in *E. coli* BL21(DE3) (Coomassiefärbung).

Abbildung 42 zeigt, dass in beiden Systemen trotz optimaler Expressionsbedingungen ein Teil der Enzyme unlöslich exprimiert ist und als Inclusion Bodies im Zellpellet vorliegt. Die FDH ist aufgrund der Klonierung in MCS2 (siehe Material und Methoden, Punkt 3.14) wie erwartet im System pNGADH-FDH deutlich stärker exprimiert als im System pFDH-NGADH. Mit der Expressionsrate der NGADH verhält es sich erwartungsgemäß umgekehrt.

2.8.6.4 Einsatz des Konstrukts pFDH-NGADH

Bei photometrischen Messungen zeigte sich, dass die FDH im System pFDH-NGADH sehr schwach exprimiert wird, ihre spezifische Aktivität im Rohextrakt beträgt 0,0026 U/mg. Die spezifische Aktivität der NGADH ist mit 70 U/mg für dieses Enzym ebenfalls verhältnismäßig niedrig. Auch hier sind beide Enzyme trotz optimaler Expressionsbedingungen nicht sehr gut exprimiert. Die beim Einsatz des Systems in Ganzzellbiotransformationen von 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 43 dargestellt.



Abbildung 43: Ganzzellbiotransformation von 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mit *E. coli* BL21(DE3) pFDH-NGADH; Ansätze mit und ohne 1 mM NAD, mit 5 mg bzw. 0,5 mg Zellen, Ansatzvolumen = 1 ml.

Auch hier zeigt sich wieder, dass die Zugabe von 1 mM NAD eine deutliche Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit bewirkt. Während mit 5 mg Zellen und unter NAD-Zugabe nach sechs Stunden die maximale Umsatzrate von ca. 99 % erreicht ist, zeigt sich bei den Ansätzen mit 5 mg Zellen ohne NAD sowie bei beiden Ansätzen mit 0,5 mg Zellen nur eine sehr schwache Aktivität. Der erzielte *ee*-Wert lag für den Ansatz mit 5 mg Zellen und NAD-Zugabe bei > 96 %. Die *ee*-Werte der drei anderen Ansätze waren nicht genau zu ermitteln, da sich die aufgrund der geringen Produktbildung sehr kleinen Peaks nicht deutlich genug von den Grundlinienschwankungen abhoben.

2.8.6.5 Einsatz des Konstrukts pNGADH-FDH

Die Überprüfung der Aktivität beider Enzyme dieses Systems im Photometer ergab, dass die FDH hier eine spezifische Aktivität von 0,49 U/mg aufwies und die NGADH eine spezifische Aktivität von 1421 U/mg zeigte. Der Einsatz des Systems in Ganzzellbiotransformationen von 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester ist in Abbildung 44 dokumentiert.



Abbildung 44: Ganzzellbiotransformation von 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mit *E. coli* BL21(DE3) pNGADH-FDH; Ansätze mit und ohne 1 mM NAD, mit 5 mg bzw. 0,5 mg Zellen, Ansatzvolumen = 1 ml.

Der des Konstrukts pNGADH-FDH Е. coli BL21(DE3) Einsatz in in Ganzzellbiotransformationen von 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester zeigte, dass dieses System einen deutlich schnelleren Umsatz des Substrats aufwies als das System, bei dem die Gene in umgekehrter Reihenfolge auf dem Vektor liegen. Mehr als 99 % Produktbildung sind bei Einsatz von 5 mg Zellen und Zusatz von 1 mM NAD bereits nach 45 Minuten erreicht. Wieder zeigte sich, dass die Zugabe von 1 mM NAD eine deutliche Aktivitätssteigerung bewirkt.

3 HADH aus Brevibacterium iodinum

Ein weiteres Enzym, das im klassischen Screening (siehe 1) gefunden wurde, ist die ADH aus *Brevibacterium iodinum*. Der Wildtyp-Stamm dieses Bakteriums zeigt, wie auch *Nocardia globerula*, die Reduktion von 8-Chlor-6-oxooctansäureethylester. Das für diese Reduktion verantwortliche Enzym wurde ebenfalls mittels chromatographischer Methoden aus dem Wildstamm isoliert und die Gensequenz aufgeklärt. Anschließend erfolgten auch hier die Überexpression in *E. coli* und der Einsatz in Biotransformationen im zellfreien System. Das Enzym wurde nach den Anfangsbuchstaben des Wildtyp-Stammes "BIADH" genannt.

3.1 Charakterisierung der Wildtyp-BIADH

Zunächst wurde das Enzym charakterisiert, d.h. es wurden neben dem Molekulargewicht Temperatur- und pH-Optimum bestimmt, um während der Aufreinigungsschritte optimale Bedingungen für eine maximale Enzymaktivität einsetzen zu können.

3.1.1 Temperaturoptimum

Die Temperaturabhängigkeit der WT-BIADH-Aktivität ist in Abbildung 45 dargestellt. Das Temperaturoptimum liegt bei 35 °C.



Abbildung 45: Aktivität der WT-BIADH in Abhängigkeit von der Temperatur.

3.1.2 pH-Optimum

Das pH-Optimum der WT-BIADH liegt bei 6,3 bis 6,6, aber auch noch bei pH-Werten von 5,8 und 7,0 kann eine fast maximale Aktivität beobachtet werden. Abbildung 46 zeigt die Aktivität der WT-BIADH in Abhängigkeit vom pH-Wert während des Photometertests mit verschiedenen Puffern.



Abbildung 46: Aktivität der WT-BIADH in Abhängigkeit von pH-Wert und Puffer.

3.1.3 Molekulargewicht

Das Molekulargewicht der WT-BIADH wurde im Zuge der chromatographischen Aufreinigung mittels Gelfiltration bestimmt. Wie auch schon unter 2.1.4 beschrieben, wurde zunächst eine Eichgerade erstellt, so dass anhand der Elutionszeit das Molekulargewicht ermittelt werden konnte. Das ermittelte Molekulargewicht lag bei 61,8 kDa. Unter der Annahme, dass es sich bei diesem Enzym um ein Dimer handelt, würde das Molekulargewicht einer Untereinheit 30,6 kDa betragen.

3.2 Chromatographische Aufreinigung aus dem Wildstamm

Die chromatographische Aufreinigung der WT-BIADH erfolgte über verschiedene Schritte. Nach dem Zellaufschluss wurde der Rohextrakt zunächst 15 Minuten bei 50 °C inkubiert, um die Hitzefällung einiger unerwünschter Proteine zu erzielen. Nach der anschließenden Zentrifugation wurde der hitzebehandelte Rohextrakt auf eine mit 100 mM TEA pH 6,5 equilibrierte Q-Sepharose FF-Säule gegeben. Die Elution erfolgte mittels eines Gradienten von 0 M auf 1 M NaCl. Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt und in 10 mM KPi pH 6,5 mit 150 mM NaCl umgepuffert. Der umgepufferte Pool wurde auf eine mit dem gleichen Puffer equilibrierte Hydroxylapatitsäule aufgetragen. Die Elution erfolgte hier mit 250 mM NaCl in 400 mM KPi pH 6,5. Die aktiven Fraktionen wurden wiederum gepoolt und umgepuffert, dieses Mal in 100 mM KPi pH 6,0 mit 150 mM NaCl. Schließlich erfolgte als letzter Aufreinigungsschritt die Gelfiltration über eine Superdex G200-Säule. Während dieses Aufreinigungsschrittes wurde gleichzeitig das Molekulargewicht des Enzyms bestimmt. Der Aufreinigungserfolg wurde mittels eines SDS-Gels dokumentiert, das in Abbildung 47 abgebildet ist.



Abbildung 47: SDS-Gel zur Dokumentation der Aufreinigung der WT-BIADH vom Rohextrakt bis zur Gelfiltration (Silberfärbung nach^[107].

Tabelle 19 dokumentiert den Aufreinigungserfolg in Tabellenform. Wie schon im Zuge der Aufreinigung der NGADH aus dem Wildstamm beschrieben, konnte auch hier der Proteingehalt in den Fraktionen aus der Hydroxylapatitchromatographie sowie aus der Gelfiltration aufgrund der geringen Proteinmenge nicht mehr bestimmt werden. Deshalb wurde auch hier der Proteingehalt anhand der SDS-Gele im Vergleich zu den vorherigen Schritten abgeschätzt und die spezifische Aktivität sowie der Aufreinigungsfaktor nur als Größenordnung angegeben.

		Gesamtaktivität		
Aufreinigungsschritt	spez. Akt. [U/mg]	[U]	Ausbeute [%]	Aufreinigungsfaktor
Rohextrakt	0,44	108	100	1
Hitzedenaturierung	0,55	94	88	1
Q-Sepharose FF	19,80	34	32	45
Hydroxylapatit	> 166	34	31	> 377
Superdex G200	> 500	0,08	0,07	> 1100

Tabelle 19: Aufreinigung der BIADH aus *Brevibacterium iodinum*-Rohextrakt; Dokumentation des Erfolgs der einzelnen Aufreinigungsschritte.

Die Aufkonzentration der einzelnen aktiven Fraktionen nach der Gelfiltration erfolgte wie schon unter 2.2.2 beschrieben.

3.3 Blot und N-terminale Ansequenzierung

Wie bereits unter 2.3 beschrieben, erfolgte auch hier die Auftrennung aller eingeengten aktiven Fraktionen aus der Gelfiltration im SDS-Gel und anschließend der Western Blot der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran. Die Banden bei ca. 32 kDa, wie sie auch im SDS-Gel in Abbildung 47 zu sehen sind, wurden ausgeschnitten und mittels Edman-Abbau N-terminal ansequenziert.

Die N-terminale Ansequenzierung ergab die folgende Aminosäuresequenz:

N'-MNDIAXVTVLGAGVLGAQIAYQAAYSGFDVT-C'

3.4 Aufklärung der Gensequenz

3.4.1 Datenbankvergleich mittels BLAST

Der erste Schritt zur Aufklärung der Gensequenz der BIADH war, wie schon bei der NGADH, der Datenbankvergleich mittels BLAST. Es ergaben sich auch hier die vier unter 2.4.1 aufgeführten Treffer. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass NGADH und BIADH zur selben Enzymklasse der 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen gehören.

3.4.2 Amplifikation eines Teilstücks von biadh

Um zusätzlich zum N-Terminus weitere Sequenzinformationen zu erhalten, wurde zunächst ein Primer passend zum N-Terminus der BIADH entwickelt. Dieser wurde in parallelen PCRs als 3'-Primer eingesetzt, wobei jeweils einer der unter 2.4.1 beschriebenen Primer als 5'-Primer und genomische DNA aus *Brevibacterium iodinum* als Template diente. Auf diese Weise konnte ein DNA-Fragment mit einer Größe von 285 bp aus der Reaktion mit dem C-Primer analog zum mittleren homologen Bereich gewonnen werden. Die Sequenzierung des Fragments lieferte weitere Sequenzinformationen, so dass nun genug Sequenz des Gens bekannt war, um das GenomeWalker[™] Universal Kit anzuwenden.

3.4.3 Aufklärung der kompletten *biadh*-Sequenz mittels GenomeWalker™ Universal Kit

Das GenomeWalker[™] Universal Kit wurde laut Anweisung des Herstellers eingesetzt. Die eingesetzten genspezifischen Primer sind im Anhang unter 1.2.1 aufgeführt. Durch den Einsatz des GenomeWalker[™] Universal Kits konnte die komplette Sequenz des Gens *biadh* ermittelt werden. Sie ist ebenfalls im Anhang aufgeführt. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von NGADH und BIADH zeigen eine Übereinstimmung von 48 %.

3.5 Rekombinante Überexpression der BIADH

Um die BIADH rekombinant über zu exprimieren, musste das Gen zunächst mittels PCR aus der genomischen DNA von *Brevibacterium iodinum* amplifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden zwei Primer entwickelt, die passende Schnittstellen trugen, um das Gen in den Expressionsvektor pET-21a(+) zu klonieren. Die verwendeten Primer sind im Anhang unter 0 aufgeführt. Das amplifizierte Gen mit den entsprechenden Schnittstellen wurde mit den Restriktionsenzymen NdeI und HindIII geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor kloniert. Der resultierende pET-21a(+), der in seiner Multiple Cloning Site das Gen *biadh* trug, wurde pBIADH genannt. Er ist in Abbildung 48 gezeigt.



Abbildung 48: Vektorkarte von pBIADH (pET-21a(+) mit biadh).

Mit dem Vektor pBIADH wurden parallel *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert, um das Enzym zu exprimieren, sowie *E. coli* XL1-Blue-Zellen, um den Vektor zu vermehren.

3.6 Charakterisierung der BIADH

3.6.1 Expressionsoptimierung

Um eine optimale Expression der BIADH zu erzielen, wurden wie schon bei der NGADH beschrieben verschiedene Parameter variiert:

IPTG-Konzentration: 0,5 mM / 1 mM / 2 mM

Expressionsdauer: 3 h / 5 h / 21 h

Expressionstemperatur: 30 °C / 34 °C / 37 °C

Abbildung 49, Abbildung 50 und Abbildung 51 zeigen die Aktivität der rekombinanten BIADH in Abhängigkeit von den Expressionsbedingungen.



Abbildung 49: Expression der BIADH in E. coli BL21(DE3) nach Zugabe von 0,5 mM IPTG.



Abbildung 50: Expression der BIADH in E. coli BL21(DE3) nach Zugabe von 1 mM IPTG.


Abbildung 51: Expression der BIADH in E. coli BL21(DE3) nach Zugabe von 2 mM IPTG.

Die höchste Aktivität konnte nach Induktion mit 1 mM IPTG und Expression bei 37 °C für 5 Stunden erzielt werden. Aus diesem Grund wurden diese Expressionsbedingungen für alle weiteren Expressionen der BIADH gewählt.

3.6.2 Aufreinigung der rekombinanten BIADH

Um die BIADH in den kommenden Charakterisierungsschritten einzusetzen, wurde sie zunächst mittels Q-Sepharose FF gereinigt. Zu diesem Zweck wurden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit pBIADH zu einem 20%igen Rohextrakt verarbeitet, der auf eine mit 100 mM MES-Puffer pH 6,5 equilibrierte Q-Sepharose FF-Säule gegeben wurde. Nach der Elution mit einem Gradienten von 0 M auf 1 M NaCl in 10 Säulenvolumen wurde der Aufreinigungserfolg im SDS-Gel dokumentiert (Abbildung 52). Die spezifische Aktivität der BIADH konnte durch die Aufreinigung um den Faktor 5 gesteigert werden. Der Aufreinigungserfolg ist in Tabelle 20 dokumentiert.

Tabelle 20:	Aufreinigungstabelle zu	r Dokumentation der	Aufreinigung der recBIADH.	

Aufreinigungsschritt	spez. Akt. [U/mg]	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute [%]	Aufreinigungsfaktor
Rohextrakt	56	1599	100	1,0
Pool Q-Sepharose FF	223	836	52	4,0
aktivste Fraktion Q-Sepharose FF	281	287	18	5,0



Abbildung 52: SDS-PAGE zur Dokumentation der Aufreinigung der rekombinanten BIADH mittels Q-Sepharose FF (Coomassiefärbung).

3.6.3 Cofaktorspezifität der BIADH

Während der Charakterisierung der rec-BIADH wurde getestet, ob das Enzym außer NADH auch NADPH als Cofaktor nutzen kann. Es zeigte sich, dass 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mit 0,25 mM NADPH als Cofaktor im Vergleich zu der Reaktion mit 0,25 mM NADH nur zu 0,6 % umgesetzt wird.

3.6.4 Temperaturoptimum

Um das Temperaturoptimum der BIADH zu bestimmen, wurde der photometrische Aktivitätstest bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Es ergab sich ein Temperaturoptimum von 37 °C. Abbildung 53 stellt die ermittelten Ergebnisse graphisch dar.



Abbildung 53: Messungen zur Bestimmung des Temperaturoptimums der rekombinanten BIADH.

3.6.5 pH-Optimum

Zur Ermittlung des pH-Optimums der BIADH wurde der Enzymtest im Photometer bei verschiedenen pH-Werten in unterschiedlichen Puffern durchgeführt. Das ermittelte pH-Optimum der BIADH liegt bei 6,0. Die gewonnenen Ergebnisse sind in Abbildung 54 gezeigt.



Abbildung 54: Messungen zur Bestimmung des pH-Optimums der rekombinanten BIADH.

3.6.6 Molekulargewicht

Das Molekulargewicht der rekombinant exprimierten BIADH wurde im Zuge der Aufreinigung der rec-BIADH mittels Gelfiltration ermittelt. Es liegt mit 63,8 kDa im gleichen Bereich wie das Molekulargewicht der WT-BIADH. Da das errechnete Molekulargewicht einer Untereinheit bei 30,7 kDa liegt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Enzym um ein Dimer handelt.

3.6.7 Substratspektrum

Um das Substratspektrum der rekombinanten BIADH zu testen, wurden verschiedene Ketone und Ketoester im photometrischen Aktivitätstest als Substrat eingesetzt. Die Aktivität, die die BIADH mit dem Substrat 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester zeigte, wurde dabei als 100 % gesetzt. Die verwendete Enzymlösung stammte aus der Aufreinigung über ein Q-Sepharose FF-Säule (siehe Tabelle 20) und hatte mit dem Standardsubstrat eine spezifische Aktivität von ca. 220 U/mg. Die gemessenen Ergebnisse sind in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Substratspektrum der rekombinanten BIADH; die Aktivität mit dem Substrat 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester wurde als 100 % gesetzt; die verwendete Enzymlösung stammte aus der Aufreinigung mittels Q-Sepharose FF (Tabelle 20) und hatte eine spezifische Aktivität von ca. 220 U/mg.

Substrat	Aktivität [%]
	100,00
	79,49
CI	11,45
	0,85

Substrat	Aktivität [%]
	1,56
	2,07
	4,78
	5,40
	1,91
	1,38
<u> </u>	0,14
<u> </u>	16,10
	1,34
	1,11
	0,14
	0,70

Substrat	Aktivität [%]
	7,28
0	0,24
o	1,41
°,	3,15
O C	0,94
0 s s	0,99
0	1,90
	0,55
O L	0,14
0	3,13
0	3,05
0	0,42

Substrat	Aktivität [%]
°	0,46
0	3,55
	0,51
	9,93
0,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	1,59
	5,67
	7,78
	2,08
0	2,64
	17,55
	9,96
	0,33

Substrat	Aktivität [%]
	16,29
O C C	0,75
	0,76
O	0,26

Die Reduktion der in Tabelle 21 aufgeführten Substrate wurde stichprobenartig im Gaschromatographen verifiziert. Acetophenon und verschiedene seiner Derivate wurden ebenfalls als Substrat getestet, hier konnte jedoch kein Umsatz nachgewiesen werden.

3.6.8 Enantioselektivität

Während der Biotransformationen mit 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester im zellfreien System wurde überprüft, welches Enantiomer des korrespondierenden Alkohols von der BIADH bevorzugt synthetisiert wird. Es zeigte sich, dass die BIADH (*S*)-2-Hydroxy-4-phenylbutansäureethylester mit einem *ee*-Wert von ca. 98 % produziert. Demnach wird das gleiche Enantiomer wie bei Umsetzungen mit der NGADH gebildet, allerdings mit signifikant höherem *ee*-Wert. Außerdem wird 4-Chlor-3-oxobutansäureethylester mit einem *ee*-Wert von 99,5 % zum korrespondierenden (*S*)-Alkohol reduziert. 2-Octanon wird zu (*R*)-2-Octanol mit einem *ee*-Wert von ca. 10 % reduziert.

3.6.9 Kinetische Konstanten der BIADH

Zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten der BIADH wurden, wie schon im Falle der NGADH erklärt (2.5.9), die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der BIADH bei Einsatz verschiedener Substrat- und Cofaktorkonzentrationen bestimmt. Mit Hilfe des Programms OriginPro 7.5G wurden anschließend die gemessenen Werte an die Michaelis-Menten-Gleichung angepasst und die K_M-Werte berechnet. Sie sind in Tabelle 22 aufgelistet.

Substrat	K _M [mM]
2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester	3,95
2-Octanon	2,36
3-Octanon	5,99
2-Nonanon	4,59
3-Nonanon	9,43
NADH	0,15
(R)-2-Octanol	3,01
NAD ((<i>R</i>)-2-Octanol)	0,17

Tabelle 22: K_M-Werte der rec-BIADH.

3.7 Biotransformation mit BIADH im zellfreien System

Für den Einsatz der BIADH in Biotransformationen im zellfreien System wurden verschiedene cofaktorregenerierende Enzyme verwendet. Dabei handelte es sich um die Formiatdehydrogenase (FDH) aus Candida boidinii, die L-Lactatdehydrogenase (L-LDH) Malic Enzyme (MAE) aus **Bacillus** subtilis, das aus *E*. coli sowie die Glucosedehydrogenase (GDH) aus Bacillus subtilis. Jeweils in parallelen Ansätzen wurde 1 U BIADH mit 1 U bzw. 5 U cofaktorregenerierendem Enzym kombiniert. Alle eingesetzten Enzyme waren partiell über eine Q-Sepharose FF-Säule aufgereinigt. Als Substrat wurde 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester eingesetzt. Die gemessenen Ergebnisse sind in Abbildung 55 dargestellt.



Abbildung 55: Biotransformationen von 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mit BIADH im zellfreien System unter Verwendung verschiedener cofaktorregenerierender Enzyme.

Es zeigte sich, dass die Umsetzungen mit FDH und MAE vergleichbar schnell abliefen. Die Umsetzungen mit L-LDH und GDH waren ebenfalls ungefähr gleich schnell, liefen aber im Vergleich zu FDH und MAE deutlich langsamer ab. Dabei spielte es jeweils keine große Rolle, ob 1 U oder 5 U des cofaktorregenerierenden Enzyms im Ansatz enthalten waren.

4 Genbank-Screening von Gordonia amarae

Der Stamm *Gordonia amarae*, der im unter 1 beschriebenen Screening ADH-Aktivität zeigte, wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Aufklärung der Sequenz des ADH-Gens einem Genbank-Screening unterzogen. Zu diesem Zweck erfolgte zunächst die Herstellung einer Genbank von *Gordonia amarae* in *E. coli* TOP10-Zellen unter Verwendung des Vektors pZErO-2.

4.1 Herstellung einer Genbank von Gordonia amarae in E. coli

Für die Herstellung einer Genbank aus *Gordonia amarae* wurde zunächst genomische DNA aus dem Stamm isoliert. Die genomische DNA wurde daraufhin in parallelen Ansätzen mit den Restriktionsenzymen EcoRI, NotI, ApaI, XhoI, HindIII, KpnI, SacI, PstI, XbaI und Sau3A geschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pZErO-2 ligiert. Mit diesen Konstrukten wurden *E. coli* TOP10-Zellen transformiert, die anschließend auf LBkan-Platten ausplattiert wurden. Diese Platten wurden im Folgenden im aktivitätsbasierten Screening eingesetzt.

4.2 Screening der Genbank mittels aktivitätsbasierter Screeningmethoden

Das aktivitätsbasierte Screening wurde wie unter 5.1.2 beschrieben durchgeführt. Insgesamt wurden 15564 Klone gescreent und 6 positive Kolonien erhalten. Die Inserts der Vektoren aus den positiven Klonen wurden sequenziert. Bei der anschließenden Datenbank-Recherche mittels BLASTx zeigte sich, dass einer der sechs Klone ein Insert trug, in dem ein Open Reading Frame mit Ähnlichkeit zu 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen (HADHs) lag. In den anderen Inserts konnten keine Gene gefunden werden, die Ähnlichkeiten zu Dehydrogenasen zeigten.

Das HADH-Gen konnte relativ einfach anhand des Startcodons ATG und des Stopcodons TGA identifiziert werden. Die DNA- und die Aminosäuresequenz sind im Anhang aufgeführt. Das neu entdeckte Enzym wurde, wie schon im Falle der NGADH beschrieben, nach den Anfangsbuchstaben von Gattungs- und Artnamen des Wildtyp-Organismus als GAADH bezeichnet, da auch die HADHs zu den Alkoholdehydrogenasen (ADHs) zählen. Im in Abbildung 56 gezeigten Alignment mit den im Verlaufe dieser Arbeit bereits charakterisierten Enzymen NGADH und BIADH zeigen sich eindeutige Sequenzübereinstimmungen. Die Sequenzübereinstimmung zwischen NGADH und GAADH beträgt 26 %, die zwischen BIADH und GAADH liegt bei 27 %.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

NGADH BIADH GAADH	MSEIQNVTVLGAGVLGSQIVMQAAYAGKKVVAYDIKQEFLDKLPARWEWMRGHYA 55 MNDIARVTVLGAGVLGAQIAYQAAYSGFDVTVYDIGDEALSAGRKRLDALVTAYR 55 MTESTFIAPEQVGVLGGGRMGAGIAHAFLLAGSRVGIVERDADAAEAATARVLESIDA 58 : * *** * :*: * :* * : : * * : : * * :	
NGADH BIADH GAADH	KDLSDFTAEKFDDAVGRITTSTDIAEAVGDADVVIEAVPENLDLKKEVWGNVGKAVKDSA 115 VEVEGATEASTQAALERLATTTDLAQAAGNADLIIEAVPERLDIKRETYEKLAALAPEHT 115 SVARGTALDSPEAYRARLTTGTDAALFA-QCTLVVEAVPEDLALKVDALRRVEAQIAPDA 117 . : . : *::* ** * . : :::***** * :* : . :	
NGADH BIADH GAADH	ILLTNSSSLRPSDFADATGRADRFLALHFANMVWRSNTGEVMATPKTDPAVFDRTVEFAR 175 IFATNSSTLLPSDMKDFTGRPDRFLALHFANQIWKFNTAEVMGTAETSPAVFDTVVEFAR 175 AIASNTSSISIDELAAVLDRPSRLLGMHFFNPVPASTLVEIVHGASTAPALVDAARGWVA 177 ::::::::::::::::::::::::::::::::::::	
NGADH BIADH GAADH	EINLQPFPVHKETPGYLLNSLLIPWLDAAGDLYANEVANPHVIDEDWKVSTGAPKGPFET 235 AIGMVPIPVLKERPGYVLNSLLVPFLMAALDLAAGGYAQPEDVDNVWRIATGAPMGFPQI 235 AIGKTPIVVA-DAPGFASSRLGVAIGLEAIRMLEEGVASAEDIDAAMTLGYKHPVGPLRL 236 *. *: * : **: . * : . * : . * : . * * * * * *	
NGADH BIADH GAADH	YDIVGFNVAVNIGRNRPDATESQKKFNNLLQERGIDQGKAGLGDGCGFYEYDGNGRIVRP 295 YDVVGLGTAYNILSSGDEHSRRLAAWLKEHYIDRGRMGAGAGGGFYD-DPQG 286 TDIVGLDVRLGIAEYLS-AQLGERFEPPALLRRLVAEGHLGRKSGRGFYEWDASGREQK- 294 *:**:* * .: * .: * * * * ***: * .*	
NGADH BIADH GAADH	NPDWIIYED 304	

Abbildung 56: Alignment der im aktivitätsbasierten Genbank-Screening gefundenen 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase aus *Gordonia amarae* mit den bereits bekannten Enzymen NGADH und BIADH.

Zusätzlich konnten in dem gleichen Insert, das das 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Gen trug, ein zweiter sowie der Beginn eines dritten Open Reading Frames (ORF) identifiziert werden. Beide wurden einem Datenbankabgleich mittels BLASTx unterzogen. Dabei stellte sich heraus, dass der zweite ORF vermutlich eine Enoyl-CoA Hydratase/Isomerase codiert und der Beginn des dritten ORF Ähnlichkeiten zu β-Ketoadipyl-CoA-Thiolasen bzw. Acetyl-CoA-Acetyl-Tranferasen aufweist.

4.3 Überexpression der GAADH

Um die im aktivitätsbasierten Genbank-Screening gefundene 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase aus *Gordonia amarae* (im Weiteren auch GAADH genannt) rekombinant zu exprimieren, wurde zunächst das zugehörige Gen amplifiziert. Dazu wurden Primer entwickelt, die zusätzlich zur 5'- bzw. 3'-terminalen Sequenz des Gens die Schnittstellen NdeI und HindIII für die Klonierung in pET-21a(+) trugen. Die Primer sind im Anhang unter 1.5 aufgeführt. Das resultierende PCR-Produkt wurde mit NdeI und HindIII geschnitten und in einen mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen Vektor pET-21a(+) ligiert. Der entstehende Vektor wurde als pGAADH bezeichnet und ist in Abbildung 57 dargestellt. Mit diesem Vektor wurden sowohl zur Vermehrung des Vektors *E. coli* XL1-Blue-Zellen als auch zur Expression der GAADH *E. coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert.



Abbildung 57: Vektorkarte von pGAADH (pET-21a(+) mit gaadh).

4.4 Charakterisierung der GAADH

Um die neu entdeckte GAADH zu charakterisieren, wurde wie auch schon bei den vorher entdeckten 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen zunächst die Expression in *E. coli* BL21(DE3) optimiert. Anschließend wurden Temperatur- und pH-Optimum sowie Molekulargewicht, Substratspektrum, Enantioselektivität und kinetische Konstanten bestimmt. Zur Optimierung der Expression wurden die folgenden Parameter wie angegeben variiert: IPTG-Konzentration: 0,5 mM / 1 mM / 2 mM

Expressionsdauer: 3 h / 5 h / 21 h

Expressionstemperatur: 30 °C / 34 °C / 37 °C

Die gemessenen Ergebnisse sind in Abbildung 58, Abbildung 59 und Abbildung 60 dargestellt.



Abbildung 58: Ansätze der Expressionsoptimierung von GAADH in pET-21a(+) in *E. coli* BL21(DE3) nach Induktion mit 0,5 mM IPTG.



Abbildung 59: Ansätze der Expressionsoptimierung von GAADH in pET-21a(+) in *E. coli* BL21(DE3) nach Induktion mit 1 mM IPTG.



Abbildung 60: Ansätze der Expressionsoptimierung von GAADH in pET-21a(+) in *E. coli* BL21(DE3) nach Induktion mit 2 mM IPTG.

Die Expressionsoptimierung ergab, dass nach einer Induktion mit 1 mM IPTG und Inkubation für 3 Stunden bei 34 °C ein optimales Expressionsergebnis erzielt werden konnte.

4.4.1 Aufreinigung der rekombinanten GAADH

Für die weitere Charakterisierung wurde die rekombinante GAADH mittels Q-Sepharose FF aufgereinigt. Zu diesem Zweck wurden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit pGAADH in einer 20%igen Zellsuspension aufgeschlossen und abzentrifugiert. Der resultierende Rohextrakt wurde abzentrifugiert und auf eine mit 100 mM MES pH 6,0 equilibrierte Q-Sepharose FF-Säule gegeben. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0 M auf 1 M NaCl in 10 Säulenvolumen. Das in Abbildung 61 gezeigte SDS-Gel, in dem die GAADH bei ca. 32 kDa läuft, dokumentiert die Überexpression und die Aufreinigung. Die spezifische Aktivität der GAADH konnte durch die Aufreinigung um das 1,4fache gesteigert werden. Der Aufreinigungserfolg ist in Tabelle 23 dokumentiert.

Tabelle 23: Dokumentation des Erfolgs der Aufreinigung der recGAADH.

Aufreinigungsschritt	spez. Akt. [U/mg]	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute [%]	Aufreinigungsfaktor
Rohextrakt	0,4	6,73	100	1,0
Pool Q-Sepharose FF	0,5	1,59	24	1,3
aktivste Fraktion Q-Sepharose FF	0,6	0,72	11	1,5



Abbildung 61: Dokumentation der Überexpression der GAADH in *E. coli* BL21(DE3) mit pGAADH und der Aufreinigung mittels Q-Sepharose FF (Coomassiefärbung).

4.4.2 Cofaktorspezifität der GAADH

Im Verlauf der Charakterisierung der rec-GAADH wurde getestet, ob das Enzym auch NADPH statt NADH als Cofaktor nutzen kann. Es zeigte sich, dass die GAADH 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mit 0,25 mM NADPH als Cofaktor um den Faktor 4 schlechter reduziert als mit 0,25 mM NADH.

4.4.3 Temperaturoptimum

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums der rekombinanten GAADH wurde der Aktivitätstest im Photometer bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 62 dargestellt.



Abbildung 62: Bestimmung des Temperaturoptimums der GAADH.

Das Temperaturoptimum der GAADH liegt, wie in Abbildung 62 zu sehen ist, bei 37 °C.

4.4.4 pH-Optimum

Um das pH-Optimum der GAADH zu bestimmen, wurde der photometrische Aktivitätstest bei verschiedenen pH-Werten und mit verschiedenen Puffern durchgeführt. Die ermittelten Ergebnisse sind in Abbildung 63 dargestellt.



Abbildung 63: Bestimmung des pH-Optimums der GAADH.

Abbildung 63 zeigt, dass das pH-Optimum der rekombinanten GAADH bei pH 6,0 liegt.

4.4.5 Molekulargewicht

Das Molekulargewicht der GAADH wurde mittels Gelfiltration bestimmt. Zu diesem Zweck wurde eine Superdex G200 Gelfiltrationssäule mit einer mittels Q-Sepharose FF gereinigten GAADH-Probe beladen. Die Aktivität wurde in den erhaltenen Fraktionen wurde mittels Gaschromatographie überprüft. Aus der Elutionszeit wurde das Molekulargewicht der GAADH anhand der Eichgerade errechnet. Das ermittelte Molekulargewicht lag bei 68 kDa. Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei der GAADH um ein Dimer handelt.

4.4.6 Substratspektrum

Um das Substratspektrum der GAADH zu testen, wurden im photometrischen Aktivitätstest verschiedene Ketone und Ketoester als Substrat eingesetzt. Das verwendete Enzympräparat stammte aus der chromatographischen Aufreinigung über eine Q-Sepharose FF-Säule (Tabelle 23). Die Aktivität, die die GAADH mit dem Substrat 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester zeigte, wurde als 100 % gesetzt. In Relation dazu zeigt die GAADH mit dem Substrat 8-Chlor-6-oxooctansäureethylester eine Aktivität von ca. 40 %. Da die GAADH sehr instabil ist und nach der Aufreinigung sehr schnell an Aktivität verliert, verfälschte das Hintergrundrauschen des Photometers die gemessenen Aktivitäten. Mit den in Abbildung 64 gezeigten Substraten zeigte die GAADH eine messbare

Umsetzung. Als relative Aktivität kann hier jedoch nur < 35 % als Größenordnung angegeben werden.



Abbildung 64: Substrate, die von der GAADH umgesetzt werden, deren relative Aktivitäten im Vergleich zu der Aktivität mit 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester nur als < 35 % angegeben werden können; verwendetes Enzympräparat: über eine Säule aufgereinigte GAADH (siehe Tabelle 23).

Die Bildung von Produkt wurde stichprobenartig im Gaschromatographen verifiziert. Wie bei den bisher beschriebenen Enzymen auch wurden Acetophenon und seine Derivate von der GAADH nicht reduziert. Die besten Substrate sind, wie auch bei NGADH und BIADH, Ketoester mit großen Seitenketten.

4.4.7 Enantioselektivität

Durch die Analyse der von der GAADH produzierten chiralen Alkohole im Gaschromatographen wurde überprüft, welche Enantiomere vorrangig gebildet werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Ketoester 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester und 4-Chlor-3-oxobutansäureethylester hauptsächlich zum korrespondierenden (*S*)-Alkohol reduziert werden, während 2-Octanon hauptsächlich zu (*R*)-2-Octanol reduziert wird. Die ermittelten *ee*-Werte betrugen ca. 97 %, > 99 % bzw. ca. 40 %.

4.4.8 Kinetische Konstanten der GAADH

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der GAADH war es geplant, die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten des aufgereinigten Enzyms bei verschiedenen Substrat- und Cofaktorkonzentrationen gemessen. Da die GAADH eine geringe spezifische Aktivität zeigt und sehr instabil ist, konnte bereits nach dem ersten Chromatographieschritt, der Aufreinigung über eine Q-Sepharose FF-Säule, nur noch wenig aktives Enzym gefunden werden. Auch das Aufkonzentrieren der Enzymlösung, das zu einer höheren Volumenaktivität im gereinigten Enzympräparat geführt hätte, schlug fehl, da bei diesem Schritt die GAADH ausfiel und nicht mehr aktiv in der Lösung vorlag. Die Messung der kinetischen Konstanten durch den Einsatz von Rohextrakt war nicht möglich, da dieser bereits im photometrischen Test ohne Substrat eine zu hohe Hintergrundaktivität aufwies. Aus diesen Gründen war die Bestimmung der kinetischen Konstanten der GAADH nicht möglich.

4.5 Biotransformation mit GAADH im zellfreien System

Für den Einsatz der GAADH in Biotransformationen im zellfreien System wurde die Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* als cofaktorregenerierendes Enzym eingesetzt. In zwei parallelen Ansätzen wurden 1 U GAADH mit 1 U bzw. 5 U FDH kombiniert. Als GAADH-Präparat wurde aufgrund der geringen Stabilität des Enzyms Rohextrakt eingesetzt, die verwendete FDH war partiell gereinigt. Als Substrat wurde 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester eingesetzt. Die gemessenen Ergebnisse sind in Abbildung 55 dargestellt.



Abbildung 65: Biotransformationen von 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mit GAADH im zellfreien System unter Verwendung der FDH aus *C. boidinii* als cofaktorregenerierendes Enzym.

Es zeigte sich, dass die Umsetzungen mit 5 U und 1 U FDH vergleichbar schnell abliefen. Der Ansatz mit 5 U FDH führte jedoch zu einer etwas höheren Ausbeute von 99,5 % nach fünf Stunden (Ansatz mit 1 U FDH: 96,3 % nach fünf Stunden).

5 Sequenzbasiertes Screening

5.1 Datenbank-Recherche mittels BLAST

Wie bereits im Teil Material und Methoden unter 5.2.1 beschrieben, wurde in dieser Arbeit mittels BLASTp nach Enzymen gesucht, die der ADH aus *Nocardia globerula* ähneln. Die Treffer wurden daraufhin überprüft, ob sie aus einem Bakterium stammten und ob es sich bei diesem Bakterium um einen Organismus handelt, mit dem unter Sicherheitsstufe 1-Bedingungen gearbeitet werden kann. Der Treffer mit der höchsten Ähnlichkeit, auf den diese Kriterien zum Zeitpunkt der Recherche zutrafen, war die putative 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase aus *Deinococcus radiodurans*, die im Folgenden auch als put-DRADH bezeichnet wird.

5.2 HADH aus Deinococcus radiodurans

Bei dem Organismus *Deinococcus radiodurans* handelt es sich um ein Gram-positives Bakterium, dessen vollständiges Genom sequenziert ist. Nachdem das komplette Genom von *Deinococcus radiodurans* sequenziert war ^[117], wurden durch Verwendung der Software GLIMMER ^[118] Open Reading Frames ermittelt. Diese Open Reading Frames wurden nicht experimentell bestätigt, sondern ohne weitere Korrektur in einer Datenbank veröffentlicht. Dort wurde die Sequenz der putativen 3Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase mittels blastp gefunden. Die DNA-Sequenz und die Aminosäuresequenz des gefundenen Enzyms sind im Anhang aufgeführt. Um im Folgenden Überlegungen zum Transkriptionsstart besser erklären zu können, sind die Aminosäure- sowie die DNA-Sequenz zusätzlich in Abbildung 66 gezeigt.

```
ttgacgcgcctccgagtgtggagtaggttgggtttgttacacggtgtgtgggttagcgaaa
  T R L R V W S R L G L L H G V
ctgcggcccacacccagtcgttcaccggctgctttcgtggagccgcccggtgaacttgcc
L R P T P S R S P A A F V E P P G E L A
AROES
                         M S
ggcagcggcgttctcggttcgcaaatcgcttttcagaccgcttttcacggcttcgacgtt
     G V L
            GSQI
                    AFQTAFH
                                    GFD
\verb|cacctctacgacatcaacgacgccgccatcgccaaggcccgcgaaacgctcggcaagttg||
H L Y D I N D A A I A K A R E T L G K L
{\tt caggcccgctaccagcaggacctgaaggtggacgcccagcagaccggcgacgcctttgcg}
Q A R Y Q Q D L K V D A Q Q T G
                                    D
                                      A F
{\tt cgcatcagctttttcaccgacattgccgaagccgtcaagggtgtggacctcgttatcgaa}
R I S F F T D I A E A V K G V D L
                                       V T
\verb"gccattcctgagaacatggacatcaagcgcaagttctacaaccagctaggtgaggtggct"
AIPENMDIKRKF
                           YNOLGE
NTIFATNSSTLLPSQ
gaaaccgggcgccccgagaagttcctggcgctgcacttcgccaacgaaatctggaagttc
     G R P E K F L A L H F A N E I W K
E T
a \verb+acaccgccgaa + \verb+catgcgcacgcccaggaccgatgacgccgtgttcgacacggtggtg
N T A E I M R T P R T D D A V F D T V
{\tt cagttcgccaaggacatcggcatggtggcgctgcccatgtacaaggagcaggccggctac}
Q F A K D I G M V A L P M Y K E
atcctgaatacgctgctggtgccgctgctgggcgccgcgctggaactggtcgtcaagggc
ILNTLLVPLLGAALELVVK
ccgttcgccttcctggacgtgatcggcttgaccacgccctacaacatcaacatggcgagc
           DVI
                  G L T T P Y N I N M
     AFL
\verb|gccgagaccaatcccggcagcgccgccgccgccaaatacatcaaggaaaactacatcgac||
A E T N P G S A A A A K Y I K E N Y I D
aagggcaaattgggcaccgcgaccggcgagggcttttacaagtaccccaatccggccttc\\
K G K L G T A T G E G F Y K Y P N P A
gagagcgccgacttcctgaaataa
ESADFLK
```

Abbildung 66: Komplette DNA- und Aminosäuresequenz der putativen 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase aus *Deinococcus radiodurans*.

In Abbildung 66 sind zwei Codons grau markiert, bei denen es sich um das seltene Startcodon TTG am Anfang der Sequenz und um das erste ATG-Codon der Sequenz handelt. Beim Alignment der putativen 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase mit den bereits bekannten HADHs zeigen sich wie in Abbildung 67 dargestellt die Sequenzübereinstimmungen erst ab dem in Abbildung 66 grau markierten Methionin-Codon ATG.

BIADH put_DRADH NGADH GAADH	MNDIARVTVL LTRLRVWSRLGLLHGVWLAKLRPTPSRSPAAFVEPPGELASLPRGARQESSMSIKTVTVC MSEIQNVTVL MTESTFIAPEQVGVL * *	10 60 10 15
BIADH put_DRADH NGADH GAADH	GAGVLGAQIAYQAAYSGFDVTVYDIGDEALSAGRKRLDALVTAYRVEVEGATEASTQAAL GSGVLGSQIAFQTAFHGFDVHLYDINDAAIAKARETLGKLQARYQQDLK-VDAQQTGDAF GAGVLGSQIVMQAAYAGKKVVAYDIKQEFLDKLPARWEWMRGHYAKDLSDFTAEKFDDAV GGGRMGAGIAHAFLLAGSRVGIVERDADAAEAATARVLESIDASVARGTALDSPEAY *.* :*: *. * * * : : : : *	70 119 70 72
BIADH put_DRADH NGADH GAADH	ERLATTTDLAQAAGNADLIIEAVPERLDIKRETYEKLAALAPEHTIFATNSSTLLPSDMK ARISFFTDIAEAVKGVDLVIEAIPENMDIKRKFYNQLGEVADPNTIFATNSSTLLPSQFM GRITTSTDIAEAVGDADVVIEAVPENLDLKKEVWGNVGKAVKDSAILLTNSSSLRPSDFA RARLTTGTDAALFAQCTLVVEAVPEDLALKVDALRRVEAQIAPDAAIASNTSSISIDELA * :::**:** : :* . : : : : : ::::	130 179 130 132
BIADH put_DRADH NGADH GAADH	DFTGRPDRFLALHFANQIWKFNTAEVMGTAETSPAVFDTVVEFARAIGMVPIPVLKERPG EETGRPEKFLALHFANEIWKFNTAEIMRTPRTDDAVFDTVVQFAKDIGMVALPMYKEQAG DATGRADRFLALHFANMVWRSNTGEVMATPKTDPAVFDRTVEFAREINLQPFPVHKETPG AVLDRPSRLLGMHFFNPVPASTLVEIVHGASTAPALVDAARGWVAAIGKTPIVVA-DAPG .*:*.:** * * : . *:: * *:: * . : * . : . * . : : . *	190 239 190 191
BIADH put_DRADH NGADH GAADH	YVLNSLLVPFLNAALDLAAGGYAQPEDVDNVWRIATGAPMGPFQIYDVVGLGTAYNILSS YILNTLLVPLLGAALELVVKGIADPQTVDKTMMIATGAPRGPFAFLDVIGLTTPYNINMA YLLNSLLIPWLDAAGDLYANEVANPHVIDEDWKVSTGAPKGPFETYDIVGFNVAVNIGRN FASSRLGVAIGLEAIRMLEEGVASAEDIDAAMTLGYKHPVGPLRLTDIVGLDVRLGIAEY : * : * : * : * : * : * : *	250 299 250 251
BIADH put_DRADH NGADH GAADH	GDEHSRRLAAWLKEHYIDRGRMGAGAGGGFYDDPQG 286 SAETNPGSAAAAKYIKENYIDKGKLGTATGEGFYKYPNPAFESADFLK 347 RPDATESQKKFNNLLQERGIDQGKAGLGDGCGFYEYDGNGRIVRPNPDWIIYED- 304 LSAQLGERFEPPALLR-RLVAEGHLGRKSGRGFYEWDASGREQK 294 :: .: .*: * * ****	

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

Abbildung 67: Alignment der Proteinsequenz der putativen 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase aus *Deinococcus radiodurans* mit NGADH und BIADH.

Es stellte sich deshalb die Frage, ob das eigentliche Gen der 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase aus *Deinococcus radiodurans* wirklich bei dem im Computer ermittelten Codon beginnt oder bei dem grau markierten Methionin-Codon ATG. Um diesem Sachverhalt aufzuklären, wurden beide Varianten wie im Folgenden aufgeführt in pET-21a(+) kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert, um die Enzymaktivitäten zu vergleichen.

5.2.1 Rekombinante Überexpression der verschiedenen Varianten der put-DRADH

Um die beiden Varianten der putativen DRADH in *E. coli* klonieren zu können, mussten zunächst die verschiedenen Genvarianten mittels PCR amplifiziert werden. Die verwendeten 5'-Primer trugen dabei jeweils eine NdeI-Restriktionsschnittstelle, die bereits ein ATG-Codon in Frame mit dem amplifizierten Gen enthält. Von diesem 5'-Primer wurden zwei verschiedene Varianten entwickelt. Eine Variante trug nach der NdeI-Schnittstelle die ersten 20 Basen der kompletten Gensequenz der put-DRADH ab dem Codon TTG, während die zweite Variante nur die ersten 26 Basen der Sequenz ab dem

Methionin-Codon ATG trug. Die eingesetzten 3'-Primer waren jeweils dieselben. Alle Primer sind im Anhang unter 1.6 aufgeführt.

Nach der Amplifikation beider Genvarianten wurden die PCR-Produkte sowie jeweils ein Aliquot pET-21a(+) mit NdeI und HindIII geschnitten, ligiert und *E. coli* BL21(DE3) mit den resultierenden Vektoren transformiert. Zusätzlich wurden die resultierenden Vektoren in *E. coli* XL1-Blue vermehrt. Nach der Expression wurden die *E. coli* BL21(DE3)-Stämme mit den Varianten der putativen DRADH aufgeschlossen und die Rohextrakte einem photometrischen Enzymtest unterzogen. Dabei diente 2-Oxo-4-phenylbutansäure-ethylester als Substrat. Der Test wurde bei 37 °C und in Citrat-Na₂HPO₄-Puffer pH 6,5 durchgeführt, da NGADH und BIADH bei diesen Bedingungen gute Aktivität zeigen. Die gemessenen Enzymaktivitäten sind in Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 24: Aktivitätsvergleich zwischen beiden Varianten der DRADH.

Rohextrakt	spezifische Aktivität [U/mg]
komplette Sequenz	55,91
Sequenz ab Met	235,52

Der Aktivitätsvergleich der beiden Varianten zeigt, dass die DRADH-Variante ab Methionin 4,2-mal so aktiv ist wie die Variante mit der kompletten Sequenz. Die unter 5.2 geäußerte Vermutung, dass die tatsächliche Gensequenz erst bei dem in Abbildung 66 grau markierten Methionin-Codon beginnt, hat sich damit bestätigt. Im Weiteren wird die Variante ab TTG nicht mehr berücksichtigt und nur noch mit der Variante ab dem ersten Methionin-Codon ATG gearbeitet.

Der Sequenzvergleich zwischen der nun bestätigten Proteinsequenz der DRADH und den bekannten Enzymen NGADH, BIADH und GAADH zeigte Sequenzübereinstimmungen von 41 % (DRADH – NGADH), 52 % (DRADH – BIADH) bzw. 21 % (DRADH – GAADH).

In Abbildung 68 ist die Vektorkarte des Expressionsvektor pET-21a(+) mit dem tatsächlichen Gen *dradh* dargestellt. Dieser Vektor wurde pDRADH genannt.



Abbildung 68: Vektorkarte von pDRADH (pET-21a(+) mit *dradh*).

5.2.2 Charakterisierung der DRADH

Zur Charakterisierung der ADH aus *Deinococcus radiodurans* wurden, ebenso wie bei den bisher beschriebenen Proteinen, nach der Expressionsoptimierung das Temperaturoptimum, das pH-Optimum, das Molekulargewicht, das Substratspektrum sowie Enantioselektivität und kinetische Konstanten bestimmt.

5.2.2.1 Expressionsoptimierung

Um eine optimale Expression der rekombinanten DRADH zu erzielen, wurden verschiedene Kombinationen der im Folgenden aufgelisteten Parameter getestet:

IPTG-Konzentration: 0,1 mM / 0,5 mM / 1 mM

Expressionsdauer: 5 h / 21 h

Expressionstemperatur: 30 °C / 34 °C / 37 °C



Die erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 69 und Abbildung 70 dargestellt.

Abbildung 69: Expression der DRADH in *E. coli* BL21(DE3) bei einer Expressionsdauer von 5 Stunden.



Abbildung 70: Expression der DRADH in *E. coli* BL21(DE3) bei einer Expressionsdauer von 21 Stunden.

Die beste spezifische Aktivität der DRADH im Rohextrakt wurde nach Induktion mit 1 mM IPTG und einer Inkubation für 5 Stunden bei 34 °C erzielt. Die höchste Ausbeute an DRADH wurde bei einer Induktion mit 1 mM IPTG und einer Inkubation für 5 Stunden bei 30 °C mit 5060 U pro 30 ml Kulturvolumen erreicht. Für den Einsatz der rec-DRADH zur Aufreinigung und späteren Charakterisierung wurden die Anzuchtbedingungen mit der höchsten Enzymausbeute gewählt (5 Std. / 30 °C / 1 mM IPTG). Die erfolgreiche Expression der DRADH ist im SDS-Gel in Abbildung 71 dokumentiert.

5.2.2.2 Aufreinigung der rec-DRADH

Um die rekombinante DRADH aufzureinigen, wurde zunächst eine 20%ige Zellsuspension von *E. coli* BL21(DE3) mit pDRADH in 100 mM MES-Puffer pH 6,5 hergestellt und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Rohextrakt auf eine mit dem gleichen Puffer equilibrierte Q-Sepharose FF-Säule gegeben und nicht bindende Proteine von der Säule gespült. Anschließend wurde mit einem Gradienten von 0 M auf 1 M NaCl in 10 Säulenvolumen eluiert. Der Aufreinigungserfolg wurde im in Abbildung 71 gezeigten SDS-Gel und in Tabelle 25 dokumentiert. Die spezifische Aktivität der DRADH wurde durch die Aufreinigung um den Faktor 5 gesteigert.

Aufreinigungsschritt	spez. Akt. [U/mg]	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute [%]	Aufreinigungsfaktor
Rohextrakt	1174	17296	100	1,0
Pool Q-Sepharose FF	2092	9976	58	1,8
aktivste Fraktion Q-Sepharose FF	5906	5906	34	5,0

Fabelle 25: Aufreinigungstabelle zur	Dokumentation der Aufr	einigung der r	ekombinanten DRAD	Η
--------------------------------------	-------------------------------	----------------	-------------------	---



Abbildung 71: SDS-Gel zur Dokumentation der Aufreinigung der DRADH mittels Q-Sepharose FF (Coomassiefärbung).

In den weiteren Charakterisierungsschritten wurde jeweils auf diese Weise aufgereinigtes Enzym eingesetzt.

5.2.2.3 Cofaktorspezifität der DRADH

Im Verlauf der Charakterisierung der rec-DRADH wurde getestet, ob das Enzym auch NADPH statt NADH als Cofaktor nutzen kann. Bei Einsatz von 0,25 mM Cofaktor zeigte sich, dass die DRADH 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mit NADPH mit einer relativen Aktivität von 0,7 % im Vergleich zu der Reaktion mit NADH umsetzt.

5.2.2.4 Temperaturoptimum

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums der rec-DRADH wurde der photometrische Enzymtest bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 72 dargestellt.



Abbildung 72: Messergebnisse der Bestimmung des Temperaturoptimums der rec-DRADH.

Die in Abbildung 72 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das Temperaturoptimum der rec-DRADH bei 37,5 °C liegt. Es zeigte sich außerdem, dass im gesamten Bereich von 35 bis 45 °C sehr hohe Aktivitäten von über 84 % der maximalen Aktivität festgestellt werden konnten.

5.2.2.5 pH-Optimum

Zur Bestimmung des pH-Optimums der rec-DRADH wurde die photometrische Aktivitätsbestimmung bei verschiedenen pH-Werten und in verschiedenen Puffern durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 73 gezeigt.



Abbildung 73: Messergebnisse der Bestimmung des Temperaturoptimums der rec-DRADH.

Das gemessene pH-Optimum der rec-DRADH liegt bei pH 6,0. Im gesamten pH-Bereich zwischen pH 5,0 und pH 7,0 liegt die Enzymaktivität über 80 % gemessen an der höchsten Aktivität bei pH 6,0.

5.2.2.6 Molekulargewicht

Das Molekulargewicht der rekombinanten DRADH wurde mittels Gelfiltration bestimmt. Zu diesem Zweck wurde die rec-DRADH zunächst mittels Q-Sepharose FF aufgereinigt und die aktivsten Fraktionen wurden gepoolt. Aus diesem Pool wurde anschließend 1 ml entnommen und über eine Gelfiltrationssäule gegeben. Anhand der vorher aufgenommenen Eichgerade konnte aus der Elutionszeit der rec-DRADH das Molekulargewicht des Enzyms errechnet werden. Das ermittelte Molekulargewicht lag bei 131,48 kDa. Für eine Untereinheit der rec-DRADH ergibt sich ein aus der Aminosäuresequenz berechnetes Molekulargewicht von 32,4 kDa. Es ergibt sich also die Schlussfolgerung, dass es sich bei der rec-DRADH um ein Tetramer handelt.

5.2.2.7 Substratspektrum

Zur Überprüfung des Substratspektrums der rec-DRADH wurden verschiedene Substanzen daraufhin getestet, ob sie von der DRADH reduziert bzw. oxidiert werden können. Die erzielte Aktivität mit dem aktivsten Substrat 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester wurde als 100 % gesetzt und alle anderen Aktivitätswerte in Relation dazu in % angegeben. Das verwendete Enzympräparat stammte aus der Aufreinigung mittels Q-Sepharose FF (Tabelle 25) und hatte mit dem Standardsubstrat eine spezifische Aktivität von ca. 2000 U/mg.

Tabelle 26: Substratspektrum der rekombinanten DRADH; die Aktivität mit dem Substrat 2-Oxo-4phenylbutansäureethylester wurde als 100 % gesetzt; hier wurde das Enzympräparat aus der Aufreinigung mittels Q-Sepharose FF mit einer Aktivität von ca. 2000 U/mg verwendet (Tabelle 25).

Strukturformel	Aktivität [%]
	100,00
	93,57
CI	28,55
	0,20
	0,69
	0,07
	0,07
	0,15

Substrat	Aktivität [%]
<u>i</u> i,×	0,02
	0,13
	0,69
	1,51
	1,07
	0,01
	1,58
	6,98
	1,91
	9,32
	5,52
	3,29

Substrat	Aktivität [%]
	9,45
	7,44
	2,27
	0,17
ОН	0,05
	0,07
	0,03
	0,06

Acetophenon und seine Derivate wurden ebenfalls im Photometertest als Substrate eingesetzt. Ihre Reduktion wird durch die DRADH jedoch nicht katalysiert. Die Reduktion der in Tabelle 26 aufgeführten Substrate wurde stichprobenartig im Gaschromatographen verifiziert.

5.2.2.8 Enantioselektivität

Der von der DRADH durch Reduktion von 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester gebildete Alkohol wurde im Zuge der durchgeführten Biotransformationen analysiert. Es zeigte sich, dass die DRADH (*S*)-2-Hydroxy-4-phenylbutansäureethylester produziert. Somit zeigt sich die Bildung des gleichen Enantiomers wie bei den bereits bekannten Enzymen NGADH, BIADH und GAADH. Der gemessene *ee*-Wert lag bei ca. 94 %. Weiterhin wird 4-Chlor-3-oxobutansäureethylester zum korrespondierenden (*S*)-Alkohol (> 99,5 % *ee*) und 2-Octanon zu beinahe gleichem Anteilen zu (*R*)- und (*S*)-2-Octanol (*ee*-Wert für (*R*)-2-Octanol: 1 %) reduziert.

5.2.2.9 Kinetische Konstanten der rekombinanten DRADH

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der rekombinanten DRADH wurden die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der DRADH bei verschiedenen Substrat- und Cofaktorkonzentrationen gegen die jeweilige Substrat- bzw. Cofaktorkonzentration aufgetragen. Mittels OriginPro 7.5G-Software wurden aus den Daten die zugehörige Michaelis-Menten-Gleichung und somit die K_M-Werte der DRADH berechnet. Die K_M-Werte sind in Tabelle 27 aufgeführt.

Tabelle 27: K_M-Werte der rec-DRADH.

Substrat	K _M [mM]
2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester	17,23
2-Octanon	4,61
(R)-2-Octanol	0,04
NADH	0,09
NAD	0,08

5.2.3 Biotransformation mit DRADH im zellfreien System

In den mit der DRADH im zellfreien System durchgeführten Biotransformationen wurden in parallelen Ansätzen FDH und GDH als cofaktorregenerierende Enzyme verwendet. Alle drei Enzyme waren jeweils über einen Chromatographieschritt mittel Q-Sepharose FF gereinigt. Die eingesetzten Enzymmengen wurden wie folgt variiert, um das optimale Verhältnis zu ermitteln: 0,1 U DRADH + 0,5 U FDH 0,5 U DRADH + 0,1 U FDH 0,1 U DRADH + 0,1 U FDH 0,1 U DRADH + 0,5 U GDH 0,5 U DRADH + 0,1 U GDH 0,1 U DRADH + 0,1 U GDH

Die Ansätze wurden wie in 4.14 beschrieben durchgeführt. Das verwendete Substrat war 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester. Alle Ergebnisse sind in Abbildung 74 dargestellt.



Abbildung 74: Ergebnisse der Biotransformationen von 10 mM 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester mit DRADH im zellfreien System; cofaktorregenerierende Enzyme: FDH bzw. GDH.

Die Biotransformationen in den durchgeführten Versuchen liefen so schnell ab, dass bereits nach einer Stunde die maximale Konzentration an (*S*)-2-Hydroxy-4-phenylbutansäureethylester erreicht war. Ab diesem Zeitpunkt blieb die Produktkonzentration in den Ansätzen weitgehend konstant und schwankte zwischen 91 und 95 %. Der erzielte *ee*-Wert lag wie bereits erwähnt bei ca. 94 %. Der Vergleich der ersten 60 Minuten der
Biotransformationen zeigt keine deutlichen Unterschiede in den sechs Ansätzen. Die Ansätze mit 0,5 U DRADH + 0,1 U FDH und mit 0,1 U DRADH + 0,5 U GDH zeigen in den ersten 5 bis 10 Minuten eine etwas schnellere Reduktion des 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylesters. Ab dem Zeitpunkt der Entnahme der 15-Minuten-Probe liegt jedoch die Produktmenge in allen Ansätzen ungefähr auf dem gleichen Level. Die leichten Schwankungen, die zu beobachten sind, resultieren aus den relativ kleinen Peakflächen bei Einsatz von nur 10 mM des Substrats 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester, die bewirken, dass sich das Grundlinienrauschen relativ stark auf die gemessenen Ergebnisse auswirkt. Der *ee*-Wert des Produkts konnte auch durch eine Absenkung der Reaktionstemperatur von 37 °C auf 30 °C bzw. 25 °C bzw. 20 °C nicht gesteigert werden.

5.3 Sequenzbasiertes Screening mittels sequenzspezifischer Primer

Um weitere 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen zu finden, wurde ein sequenzbasiertes Screening mittels sequenzspezifischer Primer durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden zunächst anhand homologer Bereiche Primer entwickelt, die spezifisch an 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Gene binden. Mit Hilfe dieser Primer wurden PCRs durchgeführt, in denen genomische DNA aus *Brevibacterium linens* als Template eingesetzt wurde. Dieser Stamm zeigte wie auch *Nocardia globerula* und *Brevibacterium iodinum* im unter Punkt 1 des Ergebnisteils beschriebenen Screening die Reduktion von 8-Chlor-6-oxo-octansäureethylester und war daher ein guter Kandidat für das Aufweisen von 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen.

5.3.1 Alignment von HADHs zur Entwicklung von HADHspezifischen Primern

Um HADH-spezifische Primer zu entwickeln, wurden zwei verschiedene Alignments der bekannten HADHs mit weiteren, mittels BLAST gefundenen, putativen Enzymen durchgeführt. Diese Alignments sind in Abbildung 75 und Abbildung 76 dargestellt und dienten dem Zweck, homologe Bereiche zu finden, die in allen alignten HADHs auftraten. Die genutzten homologen Bereiche sind in Abbildung 75 und Abbildung 76 grau unterlegt dargestellt. Analog zu diesen homologen Bereichen wurden daraufhin unter Berücksichtigung der Codon-Usage in *Brevibacterium linens* Primer entwickelt, die spezifisch an *hadh*-Gene binden sollten. Die Primer sind im Anhang aufgeführt.

Brevibacterium iodinum Nocardia farcinica Bacillus sp. Psychroflexus torquis Deinococcus radiodurans Lactobacillus reuteri Lactobacillus salivarius Streptococcus agalactiae Nocardia globerula	DIA 	5 23 15 4 2 4 60 5
Brevibacterium iodinum Nocardia farcinica Bacillus sp. Psychroflexus torquis Deinococcus radiodurans Lactobacillus reuteri Lactobacillus salivarius Streptococcus agalactiae Nocardia globerula	RVTVLGAGVLGSQIAYQAAYSGFDVTVYDIGDEALSAGRKRLDALVTAYRVEVEGATEAS KVTVLGTGVLGSQIAFQTAFHGFDVTAYDISEQALDAARERFAKLAAAYRQDVPGATEDK NVTVAGSGVLGSQIAFQTAFKGFNVSVYDINDEALDRARDRIGKLKPRYQEDLG-ASEEE NITVAGSGVLGSQIAFQTAFHGFDVILYDINDDVLEKAKAKFTTMSEAFKKDLN-ASKEQ TVTVCGSGVLGSQIAFQTAFHGFDVHLYDINDAAIAKARETLGKLQARYQQDLK-VDAQQ NIMIAGAGVLGSQIAYQTALSGFNVSVYNHHDTAERRIKALKSDYERDLH-LTDKE KITIAGAGTLGSQIAFQAAFYGFTVSIWNPHDTAERRIKALKSDYERDLH-LTDKE KITIAGAGTLGSQIAFQAAFYGFTVSIWNPHDTAERRIKKLAKVYQSEIE-TAKEA NVTVLGAGVLGSQIAFQAAYKGMSVTIYDINDEALNKGKERIKKLAKVYQSEIE-TAKEA NVTVLGAGVLGSQIYMQAAYAGKKVVAYDIKQEFLDKLPARWEWMRGHYAKDLSDFTAEK : : *:*.** **. *: * : : : : : :	65 83 74 63 63 58 60 119 65
Brevibacterium iodinum Nocardia farcinica Bacillus sp. Psychroflexus torquis Deinococcus radiodurans Lactobacillus reuteri Lactobacillus salivarius Streptococcus agalactiae Nocardia globerula	TQAALERLA -TTTDLAQAAGNADLIIEAV TEATRSGIT -VTADLAAAAAAADLVIEAV VNSAYERIS -FHS-DLAAAVADADLVIEAV LDSAYSNLS -YIS-NLSEAVKDADLLIEAV TGDAFARIS -FFT-DIAEAVKGVDLVIEAI FQQGLNNIK -VITDDVATAVKDADLMIEAL VKRAMKNIV -EITNDMEIATKNTEYVIESV YSDKAKSIKYNKNLLPSLDHIFLSKVADSLDLIADLPNQITFSKNLDQAVSDADLVIEAV ; :: ::	93 111 102 91 91 87 89 179 93
Brevibacterium iodinum Nocardia farcinica Bacillus sp. Psychroflexus torquis Deinococcus radiodurans Lactobacillus reuteri Lactobacillus salivarius Streptococcus agalactiae Nocardia globerula	2 3 PERLDIKRETYEKLAALAPEHTIFATNSSTLLPSDIKDFTGRPDRFLALHFANQUWKFNT PEVLDIKRDTYRLGELAPARTIFATNSSTLLPSQFADATGRPEHFLALHFANQUWKFNT PEVVQIKIDFYTKLGSVAPEKTIFATNSSTLLPSQFAEVTGRPSKFLALHFANDIWRNNT PENMDIKRKFYNQLGEVADPNTIFATNSSTLLPSQFAEVTGRPSKFLALHFANDIWRNNT PESLELKEQFYEEVSELAPEKTIFASNSSTFIPSQLAPYTDRPEKFLAHHFANAIWKFNT PENLEIKGIFYQKMCQVLPKDVILASNSSTLVPSQLVKFVDRPEKFLHMHFANHIWKFNT PETVNIKEDFYKQLAKVAPSKTIFATNSSTLVPSQFADITGRPDKFLAMHFANNIWQNNI PENLDLKKEVWGNVGKAVKDSAILLTNSSSLRPSDFADATGRADRFLALHFANMVWRSNT ** ::* : :: :: :***:: **::*.:** :****	153 171 162 151 151 147 149 239 153
Brevibacterium iodinum Nocardia farcinica Bacillus sp. Psychroflexus torquis Deinococcus radiodurans Lactobacillus reuteri Lactobacillus salivarius Streptococcus agalactiae Nocardia globerula	4 AEVMGTAETSPAVFDTVVEFARAIGMVPIPVLKERPGYUNSLLVPFLNAALDLAAGGYA AEVMGTPDTDPAVYRTVVEFAEAIGMVPIELHKEKSGYVLNSLLVPFLNAGMALAAGGYA AEVMGHPGTSKEVFDDVIEFAKAIGMVALPVHKEQPGYILNSLLVPFLEAGQKLLLNGVA AEIMGTPQTNPETFKDVVNFAKAIGMLALPLHKEQPGYILNSLLVPLLSAATNLLAKEVA AEIMGTPQTSPEVIEEATKFAREIKMVPVILNKEQAGYILNSLLVPLLSAGLSLWAKGVA SEIVGNEKTDKEVIDKVVEFAKEINMVPVILNKEQGGYILNSLSVPYLNALGLWAKGVA VEIMGHKGTDDEVIKEALAFSKDIGMVPLHIHKEQPGYILNSLSVPYLNALGLWAKGVA SEVCNATPKTDPAVFDTVVEFAREINLQPFPVHKETPGYLLNSLLIPMLDAAGDLYANEVA *:: * *: *: *: * *: *	213 231 222 211 211 207 209 299 213
Brevibacterium iodinum Nocardia farcinica Bacillus sp. Psychroflexus torquis Deinococcus radiodurans Lactobacillus reuteri Lactobacillus salivarius Streptococcus agalactiae Nocardia globerula	5 QPEDVDNVWRIATGAPMGPFQIYDVVGLGTAYNILSSGDEHSRRLAAWLKEHY EPEAVDKTWRIATGAPMGPFQILDVIGLTTPYNILAHGDADTQKLATWLKENY DPETIDKTWMIATGAPKGPFAILDIVGVTTAYNIANGK-GQAGMAESAKLAEMLKRDY DFQTIDKTWMKATGAPIGPFAILDIVGINTVYNIYKMASGKSQDPLKIKTTEYLKEKF DPQTVDKTWMIATGAPRGPFAFLDVIGLTTPYNINMAS-AETNPGSAAAKYIKENY DPAMIDKDWMISTGAPMGPFGILDMVGLRTAAQIERNAYAQTKDESHKEIADKMEQ-M DPMIDKDWMKATGSPMGPFMSLDAIGLRTTYAIFNAHAEDAAAKAIADKLKQ-M DSETIDKTWKLGTGAPMGPLEILDIIGIDTAYNIMKNYSDTNSDPNSLHAHLAKMLKEEF NPHVIDEDWKVSTGAPKGPFETYDIVGFNVAVNIGRNRPDATESQKKFNNLLQERG : :*: * .**: **: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *:	266 284 279 269 267 264 263 359 269
Brevibacterium iodinum Nocardia farcinica Bacillus sp. Psychroflexus torquis Deinococcus radiodurans Lactobacillus reuteri Lactobacillus salivarius Streptococcus agalactiae Nocardia globerula	IDRGRMGAGAGGGFYDDPQG286 IDKGKLGIATGEGFYKY9NPSYMEDDFLDS 309 IDANKLGVSNGEGFYKYPNPSYMEDDFLDS 298 IDKGKLGTATGEGFYKYPNPAFESADFLK- 296 IQEGHEGKESGQGFYNYPNPAFMDPDFLKH 294 IDEGHYGIEAGEGFYKYPHPAYESADFLKV 293 IDKGRTGKAAGHGFYDYD377 IDQGKAGLGDGGCGFYEYDGNGRIVRPNPDWIIYEDSTP 307 *: .: * * ***	

Abbildung 75: Alignment verschiedener mittels blastp gefundener putativer 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen aus unterschiedlichen Bakterienstämmen und der aus dieser Arbeit bekannten Enzyme.

	6	
BIADH	MNDIARVTVLGAGVLGAQIAYQAAYSGFDVTVYDIGDEALSAGRKRLDALVTAYR 5	55
DRADH	MSIKTVTVCGSGVLGSQIAFQTAFHGFDVHLYDINDAAIAKARETLGKLQARYQ 5	54
NGADH	MSEIQNVTVLGAGVLGSQIVMQAAYAGKKVVAYDIKQEFLDKLPARWEWMRGHYA 5	55
GAADH	MTESTFIAPEOVGVLGGGRMGAGIAHAFLLAGSRVGIVERDADAAEAATARVLESID 5	57
	* * * : * : * * : :	
DIADU		115
BIADH	VEVEGATEASIQAALERLATITIDLAQAAGNADLITEAVPERLDIKRETYEKLAALAPEHT 1	112
DRADH	QDLK-VDAQQTGDAFARISFFTDIAEAVKGVDLVIEAIPENMDIKRKFYNQLGEVADPNT I	113
NGADH	KDLSDFTAEKFDDAVGRITTSTDIAEAVGDADVVIEAVPENLDLKKEVWGNVGKAVKDSA 1	115
GAADH	ASVARGTALDSPEAYRARLTTGTDAALFAQCTLVVEAVPEDLALKVDALRRVEAQIAPDA 1	117
	.: . * * :::**:**::*: :	
	7	
BIADH	IFATNSSTLLPSDMKDFTGRPDRFLALHFANOIWKFNTAEVMGTAETSPAVFDTVVEFAR 1	175
DRADH	IFATNSSTLLPSOFMEETGRPEKFLALHFANEIWKFNTAEIMRTPRTDDAVFDTVVOFAK 1	173
NGADH	TLUTNSSSLEPSDEADATGEADEFLALHEANNWESNTGEVMATEKTDEAVEDETVEEAR 1	175
CAADU		177
GAADH	ALASNI SI SI DELAAV LDRPSKILGMINF INPVASI LVEIVIIGASI APALVDAARGWVA I	1//
BIADH	AIGMVPIPVLKERPGYVLNSLLVPFLNAALDLAAGGYAQPEDVDNVWRIATGAPMGPFQI 2	235
DRADH	DIGMVALPMYKEQAGYILNTLLVPLLGAALELVVKGIADPQTVDKTWMIATGAPRGPFAF 2	233
NGADH	EINLQPFPVHKETPGYLLNSLLIPWLDAAGDLYANEVANPHVIDEDWKVSTGAPKGPFET 2	235
GAADH	AIGKTPIVVA-DAPGFASSRLGVAIGLEAIRMLEEGVASAEDIDAAMTLGYKHPVGPLRL 2	236
	*: : * :. * : * :* :. * **:	
	8	
BTADH	YDVVGLGTAYNTLSSGDEHSRELAAWLKEHYIDRGRMGAGAGGGFYDDP	284
DRADH		285
NGADH	VDTVGENVAVALGENEDDATESOKKENNLLOFEGIDOGKAGLGDGGGEVEVDGAGETVED	295
CANDII		200
GAADH	IDIVGLDVRLGIAEILSAQLGERFEPPALLR-RLVAEGHLGRRSGRGFIEWDA 2	288
	:::* :: . : .*: * * ***	
BIADH	QG 286	
DRADH	NPAFESADFLK 296	
NGADH	NPDWIIYED 304	
GAADH	SGREQK 294	

Abbildung 76: Alignment der bisher in dieser Arbeit isolierten 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen.

5.3.2 Einsatz der HADH-spezifischen Primer zur Amplifikation von HADH-Fragmenten

Die entwickelten Primer wurden wie erwähnt parallel in PCRs eingesetzt, in denen genomische DNA aus *Brevibacterium linens* als Template diente. Zusätzlich wurden auch die unter 2.4.2 und 3.4.2 entwickelten Primer verwendet. Leider konnten trotz Einsatz aller möglichen Kombinationen von Primern nur unspezifische Amplifikate erzielt werden, von denen keines Homologie zu einer Dehydrogenase zeigte.

6 Einordnung der gefundenen HADHs in den Zellstoffwechsel

6.1 Wachstum auf Fettsäuren

Nach der Datenbankrecherche mittels BLAST wurden die vier gefundenen Enzyme aus *Nocardia globerula, Brevibacterium iodinum, Gordonia amarae* und *Deinococcus radiodurans* als 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen (HADHs) eingeordnet. NADH-abhängige HADHs katalysieren im Zellstoffwechsel einen wichtigen Schritt der β-Oxidation von Fettsäuren. Um zu überprüfen, ob die Produktion der Enzyme in Wildtypzellen durch das Wachstum auf Fettsäuren induziert wird, wurden die vier Stämme auf 1/3 Vollmedium mit Zusatz von 25 mM Palmitinsäure (C16) und 21 mM Octansäure (C8) angezogen. Die Zellen wurden geerntet, aufgeschlossen und die HADH-Aktivität im Photometer bestimmt. Als Vergleich wurden Kulturen auf dem von der DSMZ empfohlenen Vollmedium (VM) angezogen und mit den geernteten Zellen ebenso verfahren. Durch die Gegenüberstellung der gemessenen spezifischen Aktivitäten der Rohextrakte wurde überprüft, ob das Wachstum auf Fettsäuren eine vermehrte Bildung der HADHs induziert. Die Messergebnisse sind in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28: Aktivität der HADHs aus Wildtypzellen nach Anzucht auf Normalmedium bzw. auf 1/3 Vollmedium mit Fettsäuren.

	spez.	. Akt. [U/mg]	
Stamm	Vollmedium	1/3 VM + Fettsäuren	rel. Akt. bei Zusatz von Fettsäuren [%]
Nocardia globerula	2,26	1,80	80
Brevibacterium iodinum	18,26	16,97	93
Gordonia amarae	0,24	0,20	82
Deinococcus radiodurans	1,34	nicht gewachsen	

Tabelle 28 zeigt, dass der Stamm *Deinococcus radiodurans* auf 1/3 Vollmedium mit zugesetzten Fettsäuren nicht wachsen konnte. In den Zellen der Wildtypstämme *Nocardia globerula, Brevibacterium iodinum* und *Gordonia amarae* wird die Produktion der HADHs durch das Wachstum auf Medium mit Fettsäuren nicht gesteigert. Die spezifische Aktivität der Rohextrakte ist in allen drei Fällen nach Wachstum auf Fettsäuremedium geringer als nach Wachstum auf Vollmedium (zwischen 80 % und 93 % der Aktivität). Eine Induktion der HADH-Expression durch Fettsäuren konnte also nicht nachgewiesen werden.

Diskussion und Ausblick

1 Entdeckung neuer 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Screeningexperimente führten zu vier neuen Enzymen, die kloniert und charakterisiert wurden. Zwei der enzymcodierenden Gene, nämlich die aus Nocardia globerula und Brevibacterium iodinum, wurden mittels Aufreinigung der Enzyme, N-terminaler Ansequenzierung und GenomeWalker[™] Universal Kit isoliert. Das Gen, das für das Enzym aus Gordonia amarae codiert, wurde über das Screening einer Genbank gefunden. Ein weiteres konnte Enzym mittels Datenbankrecherche gefunden werden. Es stammt aus dem komplett durchsequenzierten Organismus Deinococcus radiodurans.

1.1 Vergleich der Eigenschaften der neu gefundenen Enzyme

Die Temperatur- und pH-Optima der in dieser Arbeit isolierten und charakterisierten Enzyme sowie die Molekulargewichte der Enzyme sind in Tabelle 29 aufgeführt. Die Bestimmung der Molekulargewichte der nativen Enzyme erfolgte durch Gelfiltration.

Tabelle 29: Temperatur- und pH-Optima sowie Molekulargewichte der neu entdeckten ADHs aus *Nocardia globerula, Brevibacterium iodinum, Gordonia amarae* und *Deinococcus radiodurans*; natives MW bestimmt mittels Gelfiltration, MW ber./UE = aus der Aminosäuresequenz berechnetes Molekulargewicht.

Enzym	Tempopt. [°C]	pH-Opt.	MW [kDa]	Anzahl UE	MW ber./UE [kDa]
NGADH	35	6,5	135	4	33,5
BIADH	37	6,0	64	2	30,7
GAADH	37	6,0	68	2	30,6
DRADH	37,5	6,0	131	4	32,4

Tabelle 29 zeigt, dass alle gefundenen ADHs Temperaturoptima besitzen, die im Bereich von 35 bis 37 °C liegen. Die pH-Optima für die Reduktion von Ketonen liegen ebenfalls im gleichen Bereich und zwar zwischen 6,0 und 6,5. Das Molekulargewicht der Untereinheiten der Enzyme liegt jeweils im Bereich von 31 bis 34 kDa. Bei NGADH und DRADH handelt es sich um Tetramere, während es sich bei der ADH aus *Brevibacterium iodinum* und der ADH aus *Gordonia amarae* um Dimere handelt.

Tabelle 30 zeigt die ermittelten K_M -Werte der in dieser Arbeit neu beschriebenen 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen mit Ausnahme der GAADH. Die K_M -Werte der

GAADH waren aufgrund der geringen spezifischen Aktivität und der Instabilität des Enzyms nicht zu ermitteln.

K _M -Werte				
Substrat	NGADH	BIADH	GAADH	DRADH
2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester	20,68	3,95	n. b.	17,23
2-Octanon	32,23	2,36	n. b.	4,61
NADH	0,03	0,15	n. b.	0,09
(R)-2-Octanol	4,69	3,01	n. b.	0,04
NAD	0,21	0,17	n. b.	0,08

Tabelle 30: K_M -Werte der im Verlauf dieser Arbeit charakterisierten neuen 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen; n. b. = nicht bestimmbar.

Die in Tabelle 30 aufgeführten K_M -Werte für 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester sind mit 4 bis 21 mM relativ hoch. Dieser Ester ist jedoch das Substrat, mit dem alle vier Enzyme die höchste Aktivität zeigen. Eine Erklärung dafür wäre, dass dieser Ketoester als nichtnatürliche Verbindung nicht besonders gut in die Substratbindetasche des Enzyms passt. Ist er jedoch einmal gebunden, wird er sehr gut reduziert.

Für (*S*)-2-Hydroxy-4-phenylbutansäureethylester konnten bis zu einer Konzentration von 10 mM keine K_M -Werte bestimmt werden, da mit diesem Substrat im Photometer keine Umsetzung nachgewiesen werden konnte. Dies könnte damit zu erklären sein, dass dieser Alkohol noch schlechter an die Substratbindestelle im Enzym passt als das korrespondierende Keton und deshalb so langsam oxidiert wird, dass der Nachweis im Photometer nicht möglich ist.

Die NGADH zeigt mit 32 mM einen relativ hohen K_M -Wert für 2-Octanon und mit 5 mM einen niedrigeren für (*R*)-2-Octanol. Der K_M -Wert für NADH ist jedoch um den Faktor 7 kleiner als der für NAD. Der NGADH kann also anhand dieser Werte keine bevorzugte Reaktionsrichtung zugeordnet werden.

Bei Betrachtung der K_M-Werte für die BIADH fällt auf, dass sowohl die K_M-Werte für 2-Octanon und (R)-2-Octanol als auch die K_M-Werte für NADH und NAD ungefähr übereinstimmen. Hier kann der Schluss gezogen werden, dass das Enzym in seiner natürlichen Funktion beide Reaktionen katalysiert.

Die ADH aus *Deinococcus radiodurans* zeigt im Vergleich zum K_M -Wert für 2-Octanon einen 100fach niedrigeren K_M -Wert für (*R*)-2-Octanol. Die K_M -Werte für NADH und NAD liegen jedoch ungefähr gleich. Es lässt sich deshalb vermuten, dass die DRADH in ihrer physiologischen Funktion entweder Reduktion und Oxidation im gleichen Maße oder leicht bevorzugt die Oxidation eines Alkohols katalysiert.

In Tabelle 31 sind die relativen Aktivitäten der einzelnen Enzyme bei Verwendung verschiedener Substrate aufgeführt. Dabei ist die Aktivität mit 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester als 100 % gesetzt und die weiteren Aktivitäten abhängig von diesem Wert berechnet worden. Die relative Aktivität der GAADH mit 4-Chlor-3-oxobutansäureethylester und 2-Octanon konnte aufgrund der geringen spezifischen Aktivität und der Instabilität des Enzyms nicht ermittelt werden. Es wurde jedoch festgestellt, dass die GAADH kein Substrat besser umsetzt als 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester.

Tabelle 31: Vergleich der relativen Aktivität bei Einsatz verschiedener ausgewählter Substrate (100 % = Aktivität mit 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester); n. b. = nicht bestimmbar.

	relative Aktivität			
Edukt	NGADH	BIADH	GAADH	DRADH
2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester	100 %	100 %	100 %	100 %
4-Chlor-3-oxobutansäureethylester	12,69 %	11,45 %	n. b.	28,55 %
2-Octanon	0,97 %	0,51 %	n. b.	1,58 %

Tabelle 32 zeigt die *ee*-Werte, die bei Reduktion der Ketone aus Tabelle 31 erzielt werden.

 Tabelle 32: Vergleich der *ee*-Werte verschiedener Produkte aus zellfreien Biotransformationen (Cofaktorregenerierung mittels 5 U FDH).

	ee-Wert			
Produkt	NGADH	BIADH	GAADH	DRADH
(S)-2-Hydroxy-4-phenylbutansäureethylester	> 96 %	98 %	>96 %	94 %
(S)-4-Chlor-3-hydroxybutansäureethylester	> 99 %	> 99,5 %	> 99 %	> 99,5 %
(R)-2-Octanol	40 %	10 %	40 %	ca. 1 %

Aus Tabelle 31 wird deutlich, dass alle vier Enzyme die höchste Aktivität in Gegenwart von 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester als Substrat zeigen. Der ee-Wert des resultierenden (S)-Alkohols liegt bei 94 bis 98 %. 4-Chlor-3-oxobutansäureethylester wird im Vergleich zu 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester nur 1/3 bis 1/9 so gut umgesetzt, der resultierende *ee*-Wert für den (S)-Alkohol liegt jedoch mit > 99 % bzw. > 99,5 % besser, das Substrat kann also selektiver umgesetzt werden. 2-Octanon wird trotz des niedrigeren K_M-Werts (siehe Tabelle 30) deutlich schlechter umgesetzt 2-Oxo-4als phenylbutansäureethylester. (R)-2-Octanol wird durch die NADH und die GAADH nur mit einem ee-Wert von 40 % hergestellt, von der BIADH sogar nur mit einem ee-Wert von 10 %. Die DRADH produziert nahezu racemisches 2-Octanol.

Diskussion

Insgesamt lässt sich aus dem Vergleich der Substratspektren (siehe Ergebnisteil) der Schluss ziehen, dass die vier in dieser Arbeit entdeckten und charakterisierten neuen Enzyme bevorzugt Ketone mit zwei großen Seitenketten umsetzen. Besonders gut werden dabei Ketoester oder Ketothioester reduziert.

1.2 Vergleich mit bisher bekannten bakteriellen 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen

In der Literatur sind bereits mehrere bakterielle NADH-abhängige 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen bekannt. Sie katalysieren entweder im Verlauf der Fettsäure- β -Oxidation die Oxidation von (*S*)-3-Hydroxyacyl-CoA zu 3-Oxoacyl-CoA oder umgekehrt während der Synthese von Speicherstoffen oder in der Buttersäuregärung die Reduktion von 3-Oxoacyl-CoA zu (*R*)- oder (*S*)-3-Hydroxyacyl-CoA (Abbildung 77).

 $\begin{array}{c} OH & O \\ -H & -H \\ R-CHCH_2 C-S-CoA + NAD \end{array} \xrightarrow{HADH} \begin{array}{c} O & O \\ -H & -H \\ R-C-CH_2 C-S-CoA + NADH \end{array}$

Abbildung 77: Durch 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen katalysierte Reaktionen; $R = (CH_2)_X-CH_3$; X = 0 bis 14.

Einige Enzyme sind auf die Reduktion des kurzkettigen Acetoacetyl-CoA zu (*R*)- oder (*S*)-3-Hydroxybutyryl-CoA spezialisiert. Diese Enzyme werden auch als 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenasen bezeichnet. Im Rahmen der Fettsäurebiosynthese kommen ebenfalls 3-Hydoxyacyl-CoA-Dehydrogenasen zum Einsatz. Diese sind jedoch meist NADPHabhängig.

In Tabelle 33 bis Tabelle 35 sind verschiedene bakterielle 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen und 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenasen aufgeführt. Hier wird dargestellt, welche Funktion die Enzyme im Stoffwechsel der Mikroorganismen übernehmen. Die biochemischen Eigenschaften der Enzyme, die bereits charakterisiert wurden, sind ebenfalls aufgeführt.

i		т., ,
Organismus	vermutete Funktion im Organismus	Literatur
Mycobacterium smegmatis	Fettsäurekettenverlängerung	[119]
Clostridium tyrobutyricum	Buttersäure-Produktion	[120]
Clostridium acetobutylicum	Buttersäure- und Butanol-Biosynthese	[121]
	nicht in die Biosynthese von Poly-3-Hydroxybutyrat-	
Zoogloeg ramigera	Speicherstoffen involviert; evtl. beteiligt an der	[122]
2008ioca ramigera	indirekten Umwandlung von (S)- zu (R)-3-hydroxy-	
	butyryl-CoA	
Pseudomonas oleovorans	β-Oxidation	[123]
Clostridium acetobutylicum	Buttersäuregärung + β-Oxidation	[124]
Clostridium beijerinckii	k. A.	[124]
Methylobacterium rhodesianum	β-Oxidation	[125]
Rhodospirillum rubrum	Acetoactetyl-CoA -> (S)-β-Hydroxybutyryl-CoA	[125]
E. coli	β-Oxidation, Multienzymkomplex	[126]

Tabelle 33: Bisher beschriebene bakterielle 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen und ihre Funktion im Stoffwechsel der entsprechenden Mikroorganismen; k. A. = keine Angaben.

Tabelle 34: pH-Optima und Cofaktorspezifität der literaturbekannten bakteriellen 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen; k. A. = keine Angaben.

Organismus	pH-Opt. Red.	Cofaktor	Literatur
Mycobacterium smegmatis	6,0	NADH	[119]
Clostridium tyrobutyricum	k. A.	NADH	[120]
Clostridium acetobutylicum	k. A.	NADH	[121]
Zoogloea ramigera	6,3	NADH	[122]
Pseudomonas oleovorans	k. A.	NADH	[123]
Clostridium beijerinckii	k. A.	NADH > NADPH	[124]
Methylobacterium rhodesianum	7,0	NADH (100 %) > NADPH (50 %)	[125]

Tabelle 35: Molekulargewichte der bereits vor dieser Arbeit bekannten bakteriellen 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen.

Organismus	Molekulargewicht (nativ) [kDa]	MW pro Untereinheit [kDa]	Literatur
Mycobacterium smegmatis	50,3	50,3	[119]
Clostridium tyrobutyricum	240	33	[120]
Zoogloea ramigera	150	35	[122]
Clostridium beijerinckii	213	30,8	[124]
Methylobacterium rhodesianum	340	55	[125]

Tabelle 36: K_M -Werte der bisher in der Literatur beschriebenen bakteriellen 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen.

Organismus	K _M NADH [mM]	K _M NAD [mM]	Literatur
Mycobacterium smegmatis	0,033	0,083	[119]
Zoogloea ramigera	0,0065	0,007	[122]
Methylobacterium rhodesianum	0,030	0,022	[125]

Im Vergleich mit den in dieser Arbeit beschriebenen Enzymen zeigt sich, dass die K_{M} -Werte für NADH und NAD größtenteils im gleichen Bereich liegen. Hier fällt lediglich die

BIADH mit etwas höheren K_M -Werten auf. Von den fünf literaturbekannten Enzymen, deren Molekulargewicht beschrieben ist, bestehen drei Enzyme aus Untereinheiten, die ein Molekulargewicht von 31 bis 35 kDa haben, genau wie die vier in dieser Arbeit beschriebenen Enzyme. In der nativen Form handelt es sich bei dem Enzym aus *Zoogloea ramigera* wie bei NGADH und DRADH um ein Tetramer, während das hohe Molekulargewicht der nativen Enzyme aus den beiden Clostridien-Stämmen vermuten lässt, das diese Enzyme eine wesentlich höher multimere Struktur haben^[124].

Die einzige beschriebene Synthese chiraler Alkohole über ein derartiges Enzym, die bisher bekannt ist, wurde mittels 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase aus *Clostridium tyrobutyricum* durchgeführt. Die physiologische Funktion dieses Enzyms ist die Reduktion von 3-Oxobutyryl-CoA zu (*S*)-3-Hydroxybutyryl-CoA ^[120]. Bei Verwendung von 3-Oxobutansäureethylester als Substrat wurde der korrespondierende (*S*)-Alkohol mit einem *ee*-Wert von > 99 % hergestellt.

1.3 Einordnung der neu gefundenen Enzyme in den Zellstoffwechsel

Im Ergebnisteil unter Punkt 4.2 wurde beschrieben, dass in *Gordonia amarae* vor dem Gen gaadh zwei weitere Gene liegen, nämlich eines codierend für eine putative β -Ketoadipyl-Thiolase und das andere codierend für eine Enoyl-CoA-Hydratase/Isomerase. Da der 3'-Terminus des ersten Gens und somit auch die upstream gelegenen Promotor- und Operator-Sequenzen fehlen, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, dass es sich hier um ein Operon handelt. Die Anordnung der Gene lässt dies jedoch vermuten.

Bei Betrachtung der Genomsequenz des komplett durchsequenzierten Mikrooganismus *Nocardia farcinica* lässt sich ein putatives Operon finden, das die gleichen Gene trägt. Hier ist ebenfalls die Reihenfolge β -Ketoadipyl-Thiolase - Enoyl-CoA-Hydratase/Isomerase – 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase gegeben. Zusätzlich enthält das putative Operon aus *Nocardia farcinica* an vierter Stelle das Gen für eine weitere Enoyl-CoA-Hydratase/Isomerase. Die weitere downstream-Sequenz des Operons in *Gordonia amarae* ist nicht bekannt. Daher ist es möglich, dass dort ebenfalls eine weitere Enoyl-CoA-Hydratase/Isomerase zu finden ist. Im ebenfalls komplett sequenzierten Genom von *Deinococcus radiodurans* lässt sich kein derartiges putatives Operon finden.

Die GAADH und das entsprechende putative Protein aus Nocardia farcinica, das als NFA21590 bezeichnet wird, wurden alignt, um die Sequenzen zu vergleichen. Das Alignment zeigt eine sehr große Übereinstimmung der beiden Sequenzen, wobei 52 % der Aminosäuren homolog sind (Abbildung 78).

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

GAADH NFA21590	MTESTFIAPEQVGVLGGGRMGAGIAHAFLLAGSRVGIVERDADAAEAATARVLESIDASV 60 MTEPTVPQRVAVIGGGRMGAGIAQVFATLGSTVVVAEAGDRAAALDRIATGLRRAA 56 ***.* .*::*.*:*************************
GAADH NFA21590	ARGTALDSPE-AYRARLTTGTDAALFAQCTLVVEAVPEDLALKVDALRRVEAQIAPDA 117 ERG-ALDGRDPETVLAAVRTVAAPRELPADADLVVEAVPENPALKAEVLAAADSVVGLGA 115 ** *** .** . * *: * *:. ******** .** .
GAADH NFA21590	AIASNTSSISIDELAAVLDRPSRLLGMHFFNPVPASTLVEIVHGASTAPALVDAARGWVA 177 VIASNTSSLSITELGAALDNPQRFLGMHFFNPVPASALVEIVLAPATDPAVVARVRGWVA 175 .************************************
GAADH NFA21590	AIGKTPIVVADAPGFASSRLGVAIGLEAIRMLEEGVASAEDIDAAMTLGYKHPVGPLRLT 237 ALGKAEVLVNDSPGFATSRLGVCLGLEAIRMVEEGVADPAAIDRAMELGYRHPMGPLRST 235 *:**: ::* *:**************************
GAADH NFA21590	DIVGLDVRLGIAEYLSAQLGERFEPPALLRRLVAEGHLGRKSGRGFYEWDASGREQK- 294 DLVGLDVRLAIAEHLAATLGPRFTPPRLLREKVERGELGRKTGQGFYTWDTTASGGRA 293 *:*******.***:*:*:* ** ** ** ***. * .*.****:*:*** **::. :

Abbildung 78: Alignment der 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase aus *Gordonia amarae* mit der aus einem putativen Operon aus *Nocardia farcinica* (nfa21590).

Beim Alignment des bekannten Teilstücks der β-Ketoadipyl-Thiolase aus *Gordonia amarae* mit dem putativen Enzym aus *Nocardia farcinica* ergibt sich eine Übereinstimmung von 65 %. Wird die Enoyl-CoA-Hydratase/Isomerase aus *Gordonia amarae* mit derjenigen alignt, die in *Nocardia farcinica* die gleiche Position im Operon einnimmt, ergibt sich eine Homologie von 53 %.

Da die in beiden Operons enthaltenen Gene für Enzyme des Fettsäurestoffwechsels codieren, lässt sich vermuten, dass die GAADH in ihrer physiologischen Funktion eine Reaktion des Fettsäurestoffwechsels katalysiert.

Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Enzyme aus *Nocardia globerula* und *Brevibacterium iodinum* ähneln eher einer weiteren putativen 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase aus *Nocardia farcinica*, die nicht in ein Operon eingebunden ist. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass diese Enzyme eine andere Funktion im Zellstoffwechsel übernehmen als das Enzym aus *Gordonia amarae*.

Abbildung 79 zeigt den Kohlenwasserstoff- und Fettsäurestoffwechsel in Actinomyceten [127]



Abbildung 79: Kohlenwasserstoff- und Fettsäurestoffwechsel in Actinomyceten nach ^[127]; TCA = Tricarbonsäurecyclus (tricarboxylic acid cycle).

Actinomyceten, darunter auch Nocardia globerula, Verschiedene können auf einziger C-Quelle wachsen [127]. Nach Oxidation Kohlenwasserstoffen als der Kohlenwasserstoffe zu Fettsäuren können diese über **β**-Oxidation und Tricarbonsäurezyklus abgebaut werden. Weiterhin können sie aber auch zum Aufbau von Speicher- oder anderen Fetten genutzt werden. Als Speicherstoffe können außer den hier erwähnten Fetten auch Polyhydroxybutyrate und -valerate dienen. Der Stoffwechsel, der zur Synthese dieser Speicherstoffe führt, ist in Abbildung 80 dargestellt.



Abbildung 80: Produktion von Speicherstoffen in Nocardia sp. und Rhodococcus sp. nach [128].

Im Zusammenhang mit der Betrachtung der Stoffwechselwege in Actinomyceten, zu denen auch *Nocardia goberula* und *Brevibacterium iodinum* gehören, könnte es sich bei NGADH und BIADH also um Enzyme handeln, die einen Schritt im Aufbau von Speicherstoffen wie Fetten oder Polyhydroxybutyraten und –valeraten katalysieren.

Das Bakterium *Deinococcus radiodurans* ist mit den drei anderen HADH-Quellen *Nocardia globerula, Brevibacterium iodinum* und *Gordonia amarae* nur insofern verwandt, als dass es sich bei allen um Eubakterien handelt. Während *Deinococcus radiodurans* zum Stamm *Deinococcus-Thermus* gehört, ordnen sich die anderen drei Mikroorganismen in das Phylum *Actinobacteria* ein. Da über den Stoffwechsel in *Deinococcus* sp. keine Einzelheiten bekannt sind, kann die DRADH nur allgemein in den Fettsäurestoffwechsel eingeordnet werden.

2 Ganzzellbiokatalysatoren mit Cofaktorregenerierungssystemen

2.1 Vergleich von biochemischen Eigenschaften der Ganzzellbiotransformationssysteme

Zur Auswertung der Ganzzellsysteme mit NGADH und cofaktorregenerierendem Enzym ist zunächst der Vergleich der pH-Optima von NGADH und cofaktorregenerierendem Enzym nötig. Diese Vergleiche sind in Abbildung 81, Abbildung 82, Abbildung 83 und Abbildung 84 gezeigt.



Abbildung 81: Vergleich der pH-Optima von GDH (Substrat: β -D-Glucose) aus ^[55] und NGADH (Substrat: 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester); die Aktivität beim optimalen pH-Wert wurde = 100 % gesetzt.



Abbildung 82: Vergleich der pH-Optima von MAE (Substrat: L-Malat) aus ^[129] und NGADH (Substrat: 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester); die Aktivität beim optimalen pH-Wert wurde = 100 % gesetzt.



Abbildung 83: Vergleich der pH-Optima von L-LDH (Substrat: L-Lactat) und NGADH (Substrat: 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester); die Aktivität beim optimalen pH-Wert wurde = 100 % gesetzt.



Abbildung 84: Vergleich der pH-Optima von FDH (Substrat: Na-Formiat) aus ^[130] und NGADH (Substrat: 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester); die Aktivität beim optimalen pH-Wert wurde = 100 % gesetzt.

Abbildung 81 und Abbildung 82 zeigen, dass die pH-Optima von GDH und MAE im deutlich basischeren Bereich liegen als das der NGADH. Abbildung 83 und Abbildung 84 lassen erkennen, dass die pH-Optima von L-LDH und FDH weitgehend mit dem pH-Optimum der NGADH übereinstimmen. Bei der Ganzzellbiokatalyse liegen die NGADH und das jeweilige cofaktorregenerierende Enzym im Inneren von *E. coli*-Zellen vor. Der pH-Wert im Zellinneren von *E. coli* berechnet sich nach Formel 3.

Formel 3: Berechnung des pH-Werts im Inneren einer *E. coli*-Zelle nach ^[131]. $pH_{int} = 7,6 + 0,1 \cdot (pH_{ext} - 7,6)$ $pH_{int} = pH$ im Zellinneren

 $pH_{ext} = pH$ -Wert in der Umgebung

Die Berechnung des pH-Werts in E. coli bei einem pHext von 7,0, wie er bei Ganzzellumsetzungen mit den Systemen GDH-NGADH, MAE-NGADH, FDH-NGADH und NGADH-FDH vorlag, ergibt einen pH_{int} von 7,54. Bei einem pH_{ext} von 8,0, wie er bei der optimalen Ganzzellbiokatalyse mit dem System L-LDH-NGADH vorlag, ergibt sich ein pH_{int} von 7,64. Diese Beispiele demonstrieren die bereits aus Formel 3 ersichtliche Tatsache, dass bei einer Schwankung von pHext um 1,0 der pHint von E. coli nur um 0,1 variiert.

Die spezifischen Aktivitäten der NGADH und der cofaktorregenerierenden Enzyme bis auf die der L-LDH wurden im Photometer bei pH 7,0 bestimmt. Die Aktivität der L-LDH wurde bei pH 8,0 gemessen. Die Berechnung der spezifischen Aktivitäten für die cofaktorregenerierenden Enzyme und die NGADH beim pH_{int} während der entsprechenden Ganzzellumsetzung nach Formel 3 erfolgte anhand von Abbildung 81, Abbildung 82, Abbildung 83 und Abbildung 84.

Tabelle 37 zeigt die gemessenen spezifischen Aktivitäten im Photometer und die daraus berechneten spezifischen Aktivitäten bei pH_{int}.

berechneten Aktivitäten bei z Malat, L-LDH: L-Lactat, FDI bei photometrischen Messung	ellinternem pH (pH _{int}); Substrate H: Na-Formiat, NGADH: 2-Oxo- en: GDH, MAE, L-LDH, FDH, N	e waren: GDH: β-D-Glucose, MA 4-phenylbutansäureethylester; μ VGADH: pH 7,0, L-LDH: pH 8,0	AE: L- oH-Wert)).
	cofaktorregenerierendes Enzym	NGADH	

Tabelle 37: Spezifische Aktivitäten der einzelnen Enzyme in den Ganzzellbiokatalysatoren und die

	cofaktorregenerierendes Enzym		NGADH	
	spez. Akt. [U/mg]		spez. Akt.	[U/mg]
System	im Photometer	bei pH _{int}	im Photometer	bei pH _{int}
pGDH-NGADH	1,36	1,77	527	484
pMAE-NGADH	49,60	50,50	703	645
pL-LDH-NGADH	0,16	0,24	52	47
pFDH-NGADH	0,0026	0,00	70	65
pNGADH-FDH	0,49	0,48	1421	1305

Es zeigte sich, dass die NGADH trotz optimaler Expressionsbedingungen in den verschiedenen Regenerierungssystemen unterschiedlich aktiv ist. Von den Systemen mit ngadh in MCS2 von pETDuet-1 hat das System in Kombination mit MAE die höchste NGADH-Aktivität, dicht gefolgt von dem System in Kombination mit GDH. Die Systeme mit FDH und L-LDH zeigen eine etwa zehnfach geringere NGADH-Aktivität. Der Grund für die niedrige Aktivität können hier die in Abbildung 37 und Abbildung 42 sichtbaren Inclusion Bodies sein, die darauf hinweisen, dass der größte Teil der NGADH und evtl. auch des cofaktorregenerierenden Enzyms unlöslich vorliegt. Bei pETDuet-1, auf dessen Basis die vorliegenden Systeme konstruiert wurden, handelt es sich um ein high-copy Plasmid mit einer Kopienzahl von ungefähr 40. Die damit einhergehende schnelle Expression könnte eine Ursache für die genannten Inclusion Bodies sein. Um sowohl die NGADH als auch L-LDH bzw. FDH als cofaktorregenerierende Enzyme löslich zu exprimieren, könnten die Konstrukte auf Basis eines low-copy Plasmids mit nur 10 bis 12 Kopien pro Zelle wie z. B. pACYCDuet-1 (Novagen) erstellt werden.

2.2 Vergleich der Ganzzellbiotransformationen ohne Cofaktorregenerierung

Um zu testen, ob E. coli-eigene Enzyme (GDH, MAE, L-LDH, FDH) bereits eine ausreichende Cofaktorregenerierung gewährleisten können, wurden Ganzzellbiotransformationen mit E. coli BL21(DE3) mit pNGADH durchgeführt. Den einzelnen Ansätzen wurde β-D-Glucose, L-Malat, L-Lactat bzw. Formiat zugesetzt. Die gewählten Konzentrationen waren die gleichen, die auch später in den Ganzzellbiotransformationen mit Cofaktorregenerierungssystemen eingesetzt wurden. Diese zugesetzten Substanzen werden bei intakten Zellen durch aktiven Transport über die Zellmembran bewegt. Die hier verwendeten E. coli-Zellen waren jedoch bei -20 °C gelagert. Ihre Zellmembranen sind durch Eiskristalle geschädigt, so dass die Translokation von Glucose, Formiat, Malat und Lactat in die Zellen wahrscheinlich durch freie Diffusion stattfindet. Die resultierenden Ergebnisse sind im Ergebnisteil unter 2.7 dargestellt. Um die durchgeführten Biotransformationen untereinander und mit den Transformationen mit Cofaktorregenerierungssystemen zu vergleichen, wurden die spezifischen Zellaktivitäten berechnet.

Tabelle 38: Spezifische Zellaktivitäten [µmol Produkt/min*mg Zellfeuchtmasse] der E. coli BL21(DE3)-
Zellen mit pNGADH ohne Zusatz bzw. bei Zusatz von 100 mM β-D-Glucose, 100 mM L-Malat,
1 M L-Lactat oder 150 mM Formiat.

	spezifische Zellaktivität [µmol Produkt/min*mg Zellfeuchtmasse]		
System	mit 1 mM NAD	ohne NAD	
ohne Zusatz	3,6	0,5	
100 mM β-D-Glucose	3,0	1,7	
100 mM L-Malat	43,8	2,2	
1 M L-Lactat	7,1	2,6	
150 mM Formiat	4,1	1,5	

Tabelle 38 zeigt, dass die spezifischen Zellaktivitäten der *E. coli*-Zellen mit pNGADH ohne cofaktorregenerierende Enzyme relativ gering sind. Die höchste Zellaktivität zeigen die Zellen mit 43 U/mg Zellfeuchtmasse bei Zusatz von 100 mM L-Malat und 1 mM NAD. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Resultat der photometrischen Aktivitätsbestimmung überein, bei der nur bei Zusatz von 100 mM L-Malat eine NAD-Reduktion von 4,5 U/ml gemessen werden konnte. Die anderen Substrate bewirkten hier keine Bildung von NADH.

Für die Regenerierung des Cofaktors NADH bei Zusatz von 100 mM L-Malat ist wahrscheinlich vor allem die Malat-Dehydrogenase verantwortlich, deren physiologische Rolle die Katalyse der Oxidation von L-Malat bei gleichzeitiger Reduktion von NAD im Citratzyklus ist. Diese Reaktion findet vermutlich auch bei Zugabe von L-Malat zur Ganzzellbiotransformation statt und führt zu den gemessenen hohen spezifischen Zellaktivitäten. Bei Zusatz von 1 M L-Lactat und 1 mM NAD ergibt sich eine spezifische Zellaktivität von 7 U/mg Zellfeuchtmasse. Diese spezifische Zellaktivität ist deutlich höher als die spezifische Zellaktivität ohne Zusatz bzw. mit Glucose oder Formiat. Hier könnte eine E. coli-eigene L-Lactatdehydrogenase den Cofaktor NADH regenerieren. E. coli exprimiert eine L-Lactatdehydrogenase bevorzugt unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen ^[15], wie diese sicherlich bei der Anzucht der Zellen im 5 l-Kolben zum Erntezeitpunkt am Ende der Wachstumsphase vorlagen. Zellen ohne Zusatz einer der genannten Substanzen und mit Zusatz von 1 mM NAD sowie Zellen mit NAD und β-D-Glucose bzw. Formiat zeigen spezifische Zellaktivitäten von ca. 3-4 U/mg Zellfeuchtmasse. Bei Zugabe von β-D-Glucose wäre evtl. eine Regenerierung von NADH über die Glykolyse und den Citratzyklus zu erwarten gewesen. Der erste Schritt der Glykolyse ist die Phosphorylierung der Glucose zu Glucose-6-Phosphat durch die Hexokinase^[15]. Dieser Schritt ist ATPabhängig. Die Bereitstellung von ATP durch die Atmungskette ist jedoch von einer intakten Zellmembran abhängig. Diese ist bei den verwendeten E. coli-Zellen durch die Lagerung bei -20 °C vermutlich nicht gegeben, so dass die zugesetzte Glucose nicht verstoffwechselt werden kann. Deshalb bewirkt die Zugabe von Glucose keine Cofaktorregenerierung und somit keine Steigerung der spezifischen Zellaktivität.

Das zugesetzte Na-Formiat wird in *E. coli* durch ein als Formiat-Hydrogenlyase bezeichnetes Enzymsystem zu H₂ und CO₂ verstoffwechselt ^[15]. Die beteiligten Enzyme, eine Formiatdehydrogenase und eine Hydrogenase, sind nicht cofaktor-abhängig ^[132], d. h. sie können NAD nicht reduzieren. Aus diesem Grund kann die gewünschte Regenerierung von NADH nicht stattfinden und die spezifischen Zellaktivitäten bleiben niedrig.

Ohne Zusatz von NAD und ohne Zusatz eines weiteren Substrats liegt die spezifische Zellaktivität bei 0,5 U/mg Zellfeuchtmasse. Die weiteren Zusätze bewirken hier lediglich eine Steigerung auf ca. 2 U/mg Zellfeuchtmasse.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die *E. coli*-eigenen Enzyme für eine effiziente Cofaktorregenerierung nicht ausreichen.

2.3 Gegenüberstellung der einzelnen Cofaktorregenerierungssysteme

Damit die Systeme im Hinblick auf die spezifische Aktivität der einzelnen Enzyme besser verglichen werden können, wurden die spezifischen Aktivitäten der NGADH jeweils in Bezug zu der spezifischen Aktivität des cofaktorregenerierenden Enzyms gesetzt (Tabelle 39).

Tabelle 39: Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der NGADH zu denen der cofaktorregenerierenden Enzyme in den einzelnen Ganzzellbiokatalysatoren.

	spez. Akt.
System	NGADH / cofreg. Enzym
pGDH-NGADH	387
pMAE-NGADH	14
pL-LDH-NGADH	327
pFDH-NGADH	27046
pNGADH-FDH	2900

Tabelle 39 zeigt, dass das Verhältnis zwischen NGADH und cofaktorregenerierendem Enzym in keinem der Systeme ausgewogen ist. Der geringste Unterschied in der Enzymmenge liegt im System MAE-NGADH vor, in dem nur 14mal so viel NGADH wie MAE vorliegt. Das am wenigsten ausgewogene System ist das System FDH-NGADH mit 27.046facher Menge an NGADH. Hier liegt schon im Vergleich der spezifischen Aktivität der reinen Enzyme ein sehr großer Unterschied vor. Die NGADH hat im aufgereinigten Zustand 1063 U/mg, die FDH im Vergleich nur 6,5 U/mg. Es zeigte sich weiterhin ein deutlicher Unterschied beim Vergleich der Systeme FDH-NGADH und NGADH-FDH. Beim System FDH-NGADH liegt das Verhältnis NGADH/FDH um den Faktor 9,3 höher als im System NGADH-FDH. Der Grund dafür ist wahrscheinlich, dass wie erwartet (siehe Material und Methoden, Abschnitt 3.14) im System NGADH-FDH das Gen *fdh* in MCS1 stärker transkribiert wird als das Gen *ngadh* in MCS2. Tabelle 41 und Tabelle 40 zeigen die ermittelten spezifischen Zellaktivitäten in Units pro Milligramm Zellfeuchtmasse mit und ohne Zusatz von 1 mM NAD zu den Ganzzellbiotransformationen.

Tabelle 40: Spezifische Zellaktivitäten [µmol Produkt/min*g Zellfeuchtmasse] der einzelnen Cofaktorregenerierungssysteme und relative Zellaktivität bezogen auf das aktivste System GDH-NGADH, das als 100 % gesetzt wurde; Werte ohne Zusatz von NAD.

System	spezifische Zellaktivität [µmol Produkt/min*mg Zellfeuchtmasse]	Zellaktivität [%]
pGDH-NGADH	92	100,0
pMAE-NGADH	35	38,5
pL-LDH-NGADH	4	4,9
pFDH-NGADH	2	1,9
pNGADH-FDH	5	5,3

Die eindeutig höchste Aktivität ohne Zusatz von NAD (Tabelle 40) zeigt mit 92 U/mg Zellfeuchtmasse das System GDH-NGADH, während das System MAE-NGADH im Vergleich dazu nur eine relative Aktivität von 38,5 % aufweist. Dieses Ergebnis ist auffällig, weil im System pGDH-NGADH das cofaktorregenerierende Enzym eine wesentlich geringere spezifische Aktivität aufweist als im System pMAE-NGADH (Tabelle 37).

Der Grund für den Unterschied zwischen den System pMAE-NGADH und pGDH-NGADH liegt wahrscheinlich an den K_M-Werten für NAD der Enzyme MAE und GDH. Der K_M-Wert der GDH für NAD liegt bei 0,04 mM ^[55], während der K_M-Wert des MAE für NAD bei 0,14 mM liegt ^[129]. Bei niedrigen NAD-Konzentrationen, wie sie in den Ganzzellbiotransformationen ohne Zusatz von NAD vorliegen, bewirkt ein Enzym mit niedrigerem K_M-Wert für NAD, wie die GDH, wahrscheinlich eine wesentlich effizientere Regenerierung von NADH als ein Enzym mit einem dreifach höheren K_M-Wert für NAD, wie das MAE. Bei Zusatz von NAD dagegen spielt der K_M-Wert keine Rolle und die hohe spezifische Aktivität des MAE wirkt sich gegenüber der niedrigeren spezifischen Aktivität der GDH positiv auf die spezifische Zellaktivität aus.

Die Ergebnisse der Ganzzellbiotransformationen ohne NAD-Zusatz mit L-LDH (NAD-K_M-Wert: 0,53 mM) und mit FDH (NAD-K_M-Wert: 0,04 mM) zeigen sehr schlechte spezifische Zellaktivitäten. Dies kann durch den hohen NAD-K_M-Wert der L-LDH, die niedrige spezifische Aktivität der cofaktorregenerierenden Enzyme in den Zellen (Tabelle 37) und die schlechte Aktivität der NGADH in den Systemen mit pL-LDH-NGADH und pFDH-NGADH erklärt werden. Hier wird also die sehr schlechte Expression der FDH nicht durch ihren geringen NAD-K_M-Wert aufgewogen.

Für die Verwendung in Ganzzellbiotransformationen ohne Zusatz von NAD lässt sich also sagen, dass zusätzlich zu einer möglichst hohen spezifischen Aktivität des cofaktorregenerierenden Enzyms ein niedriger K_M -Wert für NAD von entscheidender Bedeutung ist. Außerdem sollte die eingesetzte ADH eine möglichst hohe spezifische Aktivität zeigen.

Tabelle 41: Spezifische Zellaktivitäten [µmol Produkt/min*g Zellfeuchtmasse] der einzelnen Cofaktorregenerierungssysteme und relative Zellaktivitäten bezogen auf das aktivste System MAE-NGADH, das als 100 % gesetzt wurde; Werte bei Zusatz von 1 mM NAD.

System	spezifische Zellaktivität [µmol Produkt/min*mg Zellfeuchtmasse]	Zellaktivität [%]
pGDH-NGADH	355	14,8
pMAE-NGADH	2404	100,0
pL-LDH-NGADH	59	2,4
pFDH-NGADH	9	0,4
pNGADH-FDH	42	1,7

Bei Betrachtung der spezifischen Zellaktivitäten in den Ganzzellbiotransformationen mit Zusatz von 1 mM NAD (Tabelle 41) fällt auf, dass hier die spezifische Zellaktivität des Systems pMAE-NGADH mit 2400 U/mg fast siebenfach so hoch ist wie die des Systems pGDH-NGADH. Das Verhältnis ist also im Vergleich zu den Versuchen ohne Zusatz von NAD umgekehrt. Der Grund hierfür könnte sein, dass bei der vorliegenden NAD-Konzentration der K_M-Wert der Enzyme keine Rolle mehr spielt und die hohe spezifische Aktivität des Malic Enzyme in den Zellen (siehe Tabelle 37) zu einer hohen spezifischen Zellaktivität führt, während die spezifische Zellaktivität durch die niedrigere spezifische Aktivität der GDH (siehe ebenfalls Tabelle 37) verringert wird.

Die Systeme L-LDH-NGADH, FDH-NGADH und NGADH-FDH zeigen deutlich niedrigere spezifische Zellaktivitäten. Diese liegen vermutlich an der niedrigen Aktivität der cofaktorregenerierenden Enzyme in den drei Systemen, die bei 0,24 U/mg bzw. 0,0025 U/mg bzw. 0,48 U/mg liegen (siehe Tabelle 37) und dem daraus resultierenden sehr unausgewogenen Verhältnis zwischen NGADH und cofaktorregenerierendem Enzym. Außerdem liegt, wie unter Punkt 2.1 erwähnt, in den Zellen mit pL-LDH-NGADH sowie mit pFDH-NGADH ein relativ großer Teil der Enzyme als Inclusion Bodies vor. Das bedeutet, dass dieser Teil der exprimierten Enzyme inaktiv ist, was ebenfalls in einer schlechten spezifischen Zellaktivität resultiert.

Insgesamt lässt sich sagen, dass ein ausgewogeneres Verhältnis zwischen ADH und cofaktorregenerierendem Enzym bei Zusatz von 1 mM NAD zur Ganzzellbiotransformation

bessere spezifische Zellaktivitäten bewirkt. Zudem ist es wichtig, dass beide Enzyme möglichst stark und gut löslich exprimiert werden.

Um die spezifischen Zellaktivitäten weiter zu steigern, wäre es sinnvoll, die ADH, die als homogenes Präparat eine sehr hohe spezifische Aktivität aufweist, in weiteren Ganzzellsystemen mit einem cofaktorregenerierenden Enzym mit ähnlich hoher spezifischer Aktivität zu koppeln. Eine weitere Möglichkeit wäre es, die spezifischen Aktivitäten beider Enzyme über die Expressionsrate zu steuern und damit anzugleichen. Zum Beispiel könnten Promotoren eingesetzt werden, die getrennt voneinander regulierbar sind. Besonders im Cofaktorregenerierungssystem mit L-LDH, aber auch im System mit FDH, liegen die cofaktorregenerierenden Enzyme in hohem Anteil als Inclusion Bodies vor und sind damit nicht aktiv. Hier könnten zusätzlich die Expressionsbedingungen erneut überprüft und evtl. über eine weitere Verbesserung der Bedingungen die Expression der Enzyme in löslicher Form gesteigert werden. Dadurch könnte sich die spezifische Zellaktivität in diesen Fällen erhöhen.

2.4 Auswirkung des Zusatzes von Cofaktor bei Ganzzellbiotransformationen

Tabelle 42 zeigt den Vergleich der Ganzzellbiotransformationen mit und ohne Zusatz von 1 mM NAD anhand der spezifischen Zellaktivitäten in U/mg Zellfeuchtmasse.

	spezifische Zellaktivität [µmol Produkt/min*mg Zellfeuchtmasse]		
System	+ 1 mM NAD	- NAD	+ NAD / - NAD
pGDH-NGADH	355,0	92,0	4
pMAE-NGADH	2404,0	35,4	68
pL-LDH-NGADH	58,5	4,5	13
pFDH-NGADH	9,3	1,7	5
pNGADH-FDH	41,6	4,9	9

Tabelle 42: Vergleich der spezifischen Zellaktivitäten [U/mg Zellfeuchtmasse] mit und ohne Zusatz von 1 mM NAD.

Durch den Vergleich der spezifischen Zellaktivitäten mit und ohne Zusatz von 1 mM NAD zeigt sich, dass der Zusatz von 1 mM NAD die spezifische Zellaktivität deutlich beeinflusst. Im Falle der GDH, die mit ihrem niedrigen K_M-Wert für NAD von 0,04 mM auch bei den geringen zellinternen NAD-Konzentrationen bereits eine hohe Aktivität zeigt, bewirkt der Zusatz von NAD nur eine Steigerung um den Faktor 4. Beim MAE mit seinem NAD-K_M-Wert von 0,14 mM bewirkt der Zusatz von NAD jedoch eine Steigerung um den Faktor 68.

Bei Betrachtung der Ganzzellbiotransformationen mit L-LDH (NAD-K_M-Wert: 0,53 mM) und mit FDH (NAD-K_M-Wert: 0,04 mM) zeigt sich die gleiche Tendenz. Der Zusatz von NAD bewirkt bei der Cofaktorregenerierung mit L-LDH eine Steigerung um den Faktor 13, im Fall der FDH nur um 5 bzw. 9. Der niedrige NAD-K_M-Wert der FDH kann also nicht die niedrige spezifische Aktivität des Enzyms ausgleichen. Es wirken sich wahrscheinlich zusätzlich zu den geringen spezifischen Aktivitäten der cofaktorregenerierenden Enzyme in den Systemen mit pL-LDH-NGADH und pFDH-NGADH die geringen spezifischen Aktivitäten der NGADH aus. In Zellen mit pFDH-NGADH und pNGADH-FDH spielt sicherlich auch das ungünstige Verhältnis zwischen NGADH und FDH eine Rolle. In Zellen mit pL-LDH-NGADH könnte es sein, dass die L-LDH bei dem vorliegenden zellinternen pH von 7,56 in geringem Maße zusätzlich die Rückreaktion (die NADH-verbrauchende Oxidation des durch die L-LDH produzierten Pyruvats) katalysiert, was sich ebenfalls negativ auf die spezifische Zellaktivität auswirken würde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Zellen mit pGDH-NGADH auch ohne Zusatz von Cofaktor in Ganzzellbiotransformationen effektiv eingesetzt werden können, während bei den anderen Systemen die Zugabe von NAD sinnvoll ist.

2.5 Vergleich der Ganzzellbiotransformationen mit und ohne Cofaktorregenerierung

Um die Ganzzellbiotransformationen mit und ohne Cofaktorregenerierungssystem vergleichen zu können, zeigen die folgenden Tabellen den durch den Einsatz eines Cofaktorregenerierungssystems erzielten Steigerungsfaktor der spezifischen Zellfeuchtmassen. In Tabelle 43 sind die Steigerungsfaktoren der spezifischen Zellaktivitäten durch Verwendung eines Cofaktorregenerierungssystems ohne Zusatz von NAD dargestellt. Tabelle 44 zeigt die Steigerungsfaktoren bei Zusatz von 1 mM NAD.

Tabelle 43: Steigerung der spezifischen Zellaktivitäten mit Cofaktorregenerierungssystem und	
NGADH im Vergleich zu Zellen mit pNGADH ohne Cofaktorregenerierungssystem; ohne Zusat	tz von
NAD.	

	spez. Zellakt. mit Regsystem / ohne Reg	gsystem
zusätzl. Substrat	Steigerung um den Faktor	
100 mM β-D-Glucose	mit pNGADH / mit pGDH-NGADH:	54,4
100 mM L-Malat	mit pNGADH / mit pMAE-NGADH:	16,3
1 M L-Lactat	mit pNGADH / mit pL-LDH-NGADH:	1,7
150 mM Formiat	mit pNGADH / mit pFDH-NGADH:	1,1
150 mM Formiat	mit pNGADH / mit pNGADH-FDH:	3,2

Ohne den Zusatz von NAD fällt die Erhöhung der spezifischen Zellaktivität durch den Einsatz von Cofaktorregenerierungssystemen zwar weniger stark aus, ist jedoch bei den

Systemen pGDH-NGADH und pMAE-NGADH deutlich zu beobachten. Diese Steigerung wird durch die hohe spezifische Aktivität der cofaktorregenerierenden Enzyme und im Falle des MAE durch günstigere Verhältnis zwischen das NGADH und Regenerierungsenzym verursacht. Die Systeme pL-LDH-NGADH, pFDH-NGADH und pNGADH-FDH bewirkten nur eine geringe Steigerung. Eine Erklärung, bezogen auf die Systeme mit pFDH-NGADH und pNGADH-FDH, könnte die sehr geringe spezifische Aktivität der FDH sein. Zusätzlich ist die FDH in den Zellen mit pFDH-NGADH sehr schlecht exprimiert, was sich ebenfalls negativ auf die spezifische Zellaktivität auswirkt. Außerdem ist die NGADH im System FDH-NGADH sowie auch im System L-LDH-NGADH nur relativ wenig aktiv (Tabelle 37), wodurch die spezifische Zellaktivität weiter verringert wird. Eine Steigerung der Expression der genannten Enzyme könnte sich positiv auf die spezifische Zellaktivität auswirken.

Absatz 2.2 zeigt, dass bereits die *E. coli*-eigene Malatdehydrogenase bei Zusatz von 100 mM L-Malat eine gewisse Cofaktorregenerierung bewirken kann. Möglicherweise kann dieses *E. coli*-eigene Enzym bereits einen großen Teil des zellinternen NAD für die Cofaktorregenerierung nutzen. Das durch pMAE-NGADH zusätzlich exprimierte MAE kann deshalb nur den verbleibenden Rest des NAD regenerieren. Somit kann aufgrund der NAD-Limitierung keine noch größere Steigerung erreicht werden. Die *E. coli*-eigene GDH hingegen bewirkt nur ein sehr geringes Level an Cofaktorregenerierung, so dass die zusätzliche Expression der GDH die Nutzung des kompletten zellinternen NAD ermöglicht und die spezifische Zellaktivität dadurch beträchtlich steigert.

Tabelle 44: Steigerung der spezifischen Zellaktivitäten mit Cofaktorregenerierungssystem und
NGADH im Vergleich zu Zellen mit pNGADH ohne Cofaktorregenerierungssystem; Zusatz von 1 mM
NAD.

	spez. Zellakt. mit Regsystem / ohne Regsystem	
zusätzl. Substrat	Steigerung um den Faktor	
100 mM β-D-Glucose	mit pNGADH / mit pGDH-NGADH:	119,4
100 mM L-Malat	mit pNGADH / mit pMAE-NGADH:	54,9
1 M L-Lactat	mit pNGADH / mit pL-LDH-NGADH:	8,2
150 mM Formiat	mit pNGADH / mit pFDH-NGADH:	2,3
150 mM Formiat	mit pNGADH / mit pNGADH-FDH:	10,2

Im Rahmen dieser Arbeit bestand der Anspruch, die spezifischen Zellaktivitäten durch den Einsatz eines Cofaktorregenerierungssystems deutlich zu steigern. Wie aus Tabelle 44 Ziel hervor geht, konnte dieses in Teilen durch den Einsatz der Cofaktorregenerierungssysteme mit pFDH-NGADH, pL-LDH-NGADH und pNGADH-FDH erreicht werden. Durch den Einsatz der Systeme mit GDH bzw. mit MAE konnte die spezifische Zellaktivität sehr stark gesteigert werden. Hier sind die spezifischen Zellaktivitäten um den Faktor 120 bzw. 55 höher als ohne Regenerierungssystem.

Abschließend kann gesagt werden, dass die vorliegenden Ganzzellbiokatalysatoren für die Produktion chiraler Alkohole mit hohen *ee*-Werten eingesetzt werden können. Für die industrielle Nutzung müssen in weiteren Arbeiten einerseits die eingesetzte Eduktmenge gesteigert und andererseits die Produktisolierung ausgearbeitet werden.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten vier neue, NADH-abhängige, (*R*)-spezifische Alkoholdehydrogenasen isoliert und charakterisiert werden, die vor allem die Reduktion von Ketonen und Ketoestern mit zwei voluminösen Substituenten stereoselektiv katalysieren. Drei der neuen Enzyme stammen aus den Actinomyceten *Nocardia globerula*, *Brevibacterium iodinum*, *Gordonia amarae* und das vierte aus *Deinococcus radiodurans*.

Die neuen Alkoholdehydrogenasen (ADHs) aus *Nocardia globerula* (NGADH) und *Brevibacterium iodinum* (BIADH) wurden über das herkömmliche, relativ arbeitsaufwendige Verfahren mittels Screening einer Stammsammlung, Aufreinigung der Enzyme über verschiedene chromatographische Methoden, N-terminale Ansequenzierung und anschließende Ermittlung der Gensequenz mittels GenomeWalkerTM Universal Kit isoliert. Danach erfolgte die Klonierung in den Expressionsvektor pET-21a(+) und die Expression in *E. coli* BL21(DE3).

Aus *Gordonia amarae* wurde eine Genbank in *E. coli* erstellt, nachdem im Screening die Aktivität des Wildstammes nachgewiesen worden war. Diese Genbank wurde über einen eigens entwickelten aktivitätsbasierten Plattentest gescreent. Die Inserts aus den Plasmiden der resultierenden aktiven Stämme wurden sequenziert und auf diese Weise die dritte neue ADH gefunden. Das *adh*-Gen wurde ebenfalls in den Expressionsvektor pET-21a(+) kloniert und das Enzym, genannt GAADH, in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert.

Die vierte ADH wurde über eine Datenbankrecherche mittels BLASTp gefunden. Zu diesem Zweck wurde über BLASTp in verschiedenen Datenbanken nach Sequenzen gesucht, die eine hohe Homologie zu den Sequenzen der bereits bekannten Enzyme aus *Nocardia globerula* und *Brevibacterium iodinum* zeigten. Aus den erhaltenen Sequenzen wurden diejenigen gewählt, die aus den Sequenzierungen kompletter Genome hervorgegangen waren. Die zugehörigen Gene waren bisher nicht kloniert und die Proteine nicht charakterisiert worden. Aus diesen Sequenzen wurde ein Gen aus *Deinococcus radiodurans* ausgewählt, das im Rahmen dieser Arbeit erstmals kloniert wurde. Die Überexpression der *Deinococcus radiodurans*-ADH (DRADH) erfolgte wie auch im Falle der anderen drei ADHs mittels pET-21a(+) in *E. coli* BL21(DE3).

Die Einordnung in den Stoffwechsel der Wildtyporganismen konnte hauptsächlich über Sequenzhomologien erfolgen. Es handelt sich in allen Fällen um 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen. Diese Enzyme katalysieren einen Schritt des Fettsäurestoffwechsels. Die vorliegende Arbeit beschreibt demnach als erste die Klonierung solcher Enzyme für die Anwendung in der Synthese chiraler Alkohole.

Alle vier in dieser Arbeit erstmals beschriebenen Enzyme wurden im Rahmen zellfreier Umsetzungen für die Synthese chiraler Alkohole eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester von den verschiedenen Enzymen zu (*S*)-2-Hydroxy-4-phenylbutansäureethylester mit *ee*-Werten von 94 bis 98 % reduziert wird. Bei der Reduktion von 4-Chlor-3-oxo-butansäureethylester zum korrespondierenden (*S*)-Alkohol wurden mit NGADH und GAADH *ee*-Werte von 99 %, mit BIADH und DRADH von > 99,5 % erreicht.



Abbildung 85: Durch die vier im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen NADH-abhängigen ADHs (NGADH, BIADH, GAADH, DRADH) katalysierte Reduktion von 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester zum korrespondierenden (S)-Alkohol.

Für den Einsatz in der Synthese chiraler Alkohole wurden in der vorliegenden Arbeit Ganzzellkatalysatoren erstellt. Diese tragen außer der NGADH jeweils eins von vier Enzymen, die den teuren Cofaktor NADH regenerieren. Die Klonierung der Gene erfolgte in pETDuet-1, einem Vektor, der für die Coexpression zweier Gene zwei Multiple Cloning Sites beinhaltet. Die verwendeten cofaktorregenerierenden Enzyme waren die Glucosedehydrogenase (GDH) aus *Bacillus subtilis*, das Malic Enzyme (MAE) aus *E. coli*, die L-Lactatdehydrogenase aus *Bacillus subtilis* und die Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*.



Abbildung 86: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit erstellten Ganzzellbiokatalysatoren mit verschiedenen Cofaktorregenerierungssystemen am Beispiel der Reduktion von 2-Oxo-4-phenylbutansäureethylester.

Die verschiedenen Cofaktorregenerierungssysteme wurden nach den enthaltenen Gene und deren Reihenfolge im Plasmid mit pGDH-NGADH, pMAE-NGADH, pL-LDH-NGADH, pFDH-NGADH und pNGADH-FDH bezeichnet. Diese Plasmide wurden in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und in Ganzzellbiotransformationen von 2-Oxo-4-phenylbutan-säureethylester eingesetzt. Die resultierenden Ergebnisse wurden ausgewertet und untereinander sowie mit Ergebnissen aus Ganzzellumsetzungen ohne Cofaktorregenerierungssystem verglichen.

Der Einsatz des Systems pMAE-NGADH zeigte bei Zusatz von 1 mM NAD zum Reaktionsansatz von allen eingesetzten Systemen die besten Resultate. Die spezifische Zellaktivität betrug 2404 U/mg Zellfeuchtmasse. In allen Ganzzellbiotransformationen mit Cofaktorzusatz wurden bei Ausbeuten von über 99 % jeweils *ee*-Werte von > 98 % gemessen. In Ganzzellbiotransformationen ohne Zusatz von NAD zeigte das System mit pGDH-NGADH mit 92 U/mg Zellfeuchtmasse die höchste spezifische Zellaktivität. Ganzzellbiotransformationen ohne Cofaktorregenerierungssystem zeigten die höchste spezifische Zellaktivität (44 U/mg) bei Zusatz von 100 mM L-Malat zu den eingesetzten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit pNGADH. Die Ganzzellbiotransformationen ohne Zusatz von NAD sowie ohne Cofaktorregenerierungssystem ergaben bei geringerer Ausbeute auch niedrigere *ee*-Werte als die Umsetzungen mit Cofaktorzusatz zum Ganzzellbiokatalysator mit Cofaktorregenerierungssystem.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass ein optimales Ganzzell-Cofaktorregenerierungssystem eine möglichst gute Expression der eingesetzten Alkoholdehydrogenase zeigen muss. Weiterhin wirkt sich eine hohe spezifische Aktivität der eingesetzten regenerierenden Enzyme positiv auf die spezifische Zellaktivität aus. Wenn beide coexprimierten Enzyme, also ADH und cofaktorregenerierendes Enzym, eine ähnliche spezifische Aktivität in den Zellen zeigen, ist dies von Vorteil. Das Expressionsverhältnis der beiden Enzyme konnte durch die Anordnung der Gene im Coexpressionsvektor beeinflusst werden.

Der Zusatz von NAD zur Ganzzellbiotransformation hat eine deutliche Steigerung der spezifischen Zellaktivität zur Folge. Ohne Zusatz von Cofaktor kann also das Potenzial der Ganzzellbiokatalysatoren nicht optimal genutzt werden. Wird kein NAD zugesetzt, ist es wichtig, ein cofaktorregenerierendes Enzym einzusetzen, das einen möglichst niedrigen K_M-Wert für NAD hat. Mit den meisten im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Ganzzellsystemen sind effiziente Umsetzungen nur möglich, wenn Cofaktor zugesetzt wird.

Eine Ausnahme bildet das System mit pGDH-NGADH, mit dem auch ohne Zugabe von NAD zufrieden stellende Biotransformationen durchgeführt werden können.

Insgesamt lässt sich sagen, dass mit den vier in dieser Arbeit erstmals beschriebenen Enzymen mit hohen Ausbeuten enantiomerenreine Alkohole produziert werden können. Durch Coexpression einer der Alkoholdehydrogenasen mit cofaktorregenerierenden Enzymen können in Ganzzellbiotransformationen hohe spezifische Zellaktivitäten erreicht werden.

Summary

In this work four new NADH-dependent alcohol dehydrogenases (ADHs) were isolated. The overexpression was carried out after cloning of the genes into pET-21a(+) vector and transformation into *E. coli* BL21(DE3) cells. All of the four enzymes were characterized and applied in cell-free biotransformations. The newly found enzymes reduced ketones and ketoesters with two bulky side-chains enantioselectively to the corresponding alcohols as it was desired. Using sequence homologies the enzymes were classified as 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenases. The physiological function of this kind of enzymes is the catalysation of a reaction in fatty acid metabolism. The application of the new ADHs for synthesis of chiral alcohols was shown using ethyl 2-oxo-4-phenylbutyrate and ethyl 4-chloro-3-oxobutyrate as substrates. These prochiral ketones were reduced to the corresponding alcohols by cell-free biotransformations. The *ee*-value of the resulting ethyl (*S*)-2-hydroxy-4-phenylbutyrate was between 94 % and 98 % dependend on the enzyme. Ethyl (*S*)-4-chloro-3-hydroxybutyrate was produced with an *ee*-value of > 99 % / > 99,5 %.

For the application in synthesis of chiral alcohols whole-cell catalysts were produced during this work. These carry in addition to one of the alcohol dehydrogenases one of four cofactor regenerating enzymes, which regenerate the expensive cofactor NADH. Cloning of the genes was carried out using pETDuet-1, which is a vector with two multiple cloning sites for coexpression of two genes. The cofactor regenerating enzymes were glucose dehydrogenase from Bacillus subtilis, malic enzyme (MAE) from E. coli, L-lactate dehydrogenase from Bacillus subtilis and formate dehydrogenase from Candida boidinii. The plasmids were transformed into E. coli BL21(DE3) and used in whole-cell biotransformations of ethyl 2-oxo-4-phenylbutyrate. Application of the system carrying MAE and ADH showed, with an addition of 1 mM NAD to the reaction volume, the best results of all systems. In all whole-cell biotransformations with addition of cofactor yields > 99 % and *ee*-values > 98 % were achieved. The results derived from this work show, that the best whole-cell cofactor regenerating system is the one with a high-level expression of the ADH and a similar specific activity of the cofactor regenerating enzyme. The expression of both enzymes can be influenced by variation of the location of the genes in the expression plasmid as well as the choice of the expression system (vector, host cells). The addition of NAD to the whole-cell biotransformation leads to a significant increase of specific cell activity. Without addition of cofactor the potential of the whole-cell biocatalysts can not be utilized in complete. When no NAD is added it is crucial to use a

cofactor regenerating enzyme with a low K_M -value for NAD. With the most whole-cell systems developed during this work efficient conversions are only possible by adding cofactor. An exception is the system with glucose dehydrogenase and ADH which can be satisfyingly applied to biotransformations without addition of NAD.

In conclusion this work shows that with the four newly found and characterized enzymes enantiomerically pure alcohols can be produced. Coexpression of one of the ADHs with cofactor regenerating enzymes resulted in formation of whole-cell biocatalysts which reduce prochiral ketones with high specific cell activities.

Anhang

1 Primer

1.1 Primer für das Gen ngadh

1.1.1 Primer zur Gewinnung von Sequenzinformationen von ngadh

5'-Primer NGADH (analog zu Aminosäure 8 bis 16):

5'-TTGGAGCCGGCGTCCTCGGCTCCCAG-3'

3'-Primer analog zum mittleren homologen Bereich:

5'-GGTSSWSSWGTTGGTSCCGAAGATGGT-3'

degenerierter 3'-Primer analog zum mittleren homologen Bereich:

5'-SGTSSWSSWGTTSGTSCCGAAGATSGT-3'

3'-Primer analog zum C-terminalen homologen Bereich

5'-SGCSDTGCCSRKSYKGCCCTTGTCGAT-3'

1.1.2 Primer für das GenomeWalker™ Universal Kit

Gen-spezifischer Primer N1

5'-TCATCGAACTTCTCGGCGGTGAAGTCG-3'

Gen-spezifischer Primer N2

5'-TTGTCGAGGAACTCCTGCTTGATGTCG-3'

Gen-spezifischer Primer C1

5'-CCTACGACATCGTCGGGTTCAATGTCG-3'

Gen-spezifischer Primer C2

5'-CGGAGTCCCAGAAGAAGTTCAACAACC-3'

1.1.3 Primer für die Klonierung in pET-21a(+)

5'-Primer mit NdeI-Schnittstelle:

5'-GGGAATTCCATATGAGCGAAATTCAGAATGTCACCG-3'

3'- Primer mit BamHI-Schnittstelle

5'-CGCGGATCCGCGTCAGTCCTCGTAGATGATCCAGTC-3'

1.2 Primer für das Gen biadh

1.2.1 Primer für das GenomeWalker™ Universal Kit

Gen-spezifischer Primer N1

5'-ACGGCCTCGATGATGAGATCGGCATTCC-3'

Gen-spezifischer Primer N2

5'-GACCTCGACCCGGTAGGCGGTGACGA-3'

Gen-spezifischer Primer C1

5'-ACTCGCTGCTCGTGCCCTTCCTCAATG-3'

Gen-spezifischer Primer C2

5'-CGCGCCCATGGGACCGTTCCAGATCTA-3'

Sequenzierprimer N3

5'-CAGGGCCTCGTCGCCGATGTCGTAGAC-3'

Sequenzierprimer C3

5'-GTGGGCCTCGGCACCGCCTACAACATC-3'
1.2.2 Primer für die Klonierung in pET-21a(+)

- 5'-Primer mit NdeI-Schnittstelle
- 5'-GGAATTCCATATGAACGACATCGCCCGCGTCAC-3'
- 3'-Primer mit HindIII-Schnittstelle
- 5'-TATTCGGAAGCTTTCAGCCCTGCGGGTCGTCGTA-3'

1.3 Primer zur Amplifikation des L-LDH-Gens aus *Bacillus* subtilis in MCS1 von pETDuet-1

- 5'-Primer mit EcoRI-Schnittstelle:
- 5'-CCGGAATTCATGAACAAACATGTAAATAAAGTAGC-3'
- 3'-Primer mit PstI-Schnittstelle:

5'-AAGGCGCCGGCGATACCGGCTGGTCGACTTAGTTGACTTTTGTTCTGCAAAA-3'

1.4 Primer zur Klonierung von ngadh, gdh, mae und fdh in die Cofaktorregenerierungskonstrukte

1.4.1 Primer zur Klonierung von *ngadh* in MCS1

- 5'-Primer mit Sall-Schnittstelle:
- 5'-TAGCGTCGACATGAGCGAAATTCAGAATGTCACCGTA-3'
- 3'-Primer mit NotI-Schnittstelle:

5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTCAGTCCTCGTAGATGATCCAGTC-3'

1.4.2 Primer zur Klonierung von ngadh in MCS2

- 5'-Primer mit NdeI-Schnittstelle:
- 5'-GGAATTCCATATGAGCGAAATTCAGAATGTCACCGTA-3'
- 3'-Primer mit XhoI-Schnittstelle:
- 5'-AATCCGCTCGAGTCAGTCCTCGTAGATGATCCAGTC-3'

1.4.3 Primer zur Klonierung von gdh in MCS1

5'-Primer mit EcoRI-Schnittstelle:

5'-CCGGAATTCATGTATCCGGATTTAAAAGGAAAAGTCG-3'

3'-Primer mit NotI-Schnittstelle:

5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTTAACCGCGGCCTGCCTG-3'

1.4.4 Primer zur Klonierung von mae in MCS1

5'-Primer mit SalI-Schnittstelle:

5'-TAGCGTCGACATGGATATTCAAAAAGAGTGAGTGACA-3'

3'-Primer mit NotI-Schnittstelle:

5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTTAGATGGAGGTACGGCGGTA-3'

1.4.5 Primer zur Klonierung von fdh in MCS1

5'-Primer mit EcoRI-Schnittstelle:

5'-CCGGAATTCATGAAGATTGTCTTAGTTCTTTATGATG-3'

3'-Primer mit NotI-Schnittstelle:

5'-ATAGTTTAGCGGCCGCCTATTTCTTATCGTGTTTACCGTAAG-3'

1.4.6 Primer zur Klonierung von fdh in MCS2

5'-Primer mit NdeI-Schnittstelle:

5'-GGAATTCCATATGAAGATTGTCTTAGTTCTTTATGATG-3'

3'-Primer mit XhoI-Schnittstelle:

5'-CCGCTCGAGCTATTTCTTATCGTGTTTACCGTAAG-3'

1.5 Primer zur Klonierung von gaadh

- 5'-Primer (NdeI-Schnittstelle):
- 5'-GGAATTCCATATGACCGAGAGCACGTTCATCGCG-3'
- 3'-Primer (HindIII-Schnittstelle):
- 5'-CCAAGCTTTCATTTCTGTTCCCTTCCTGAGGCG-3'

1.6 Primer zur Klonierung von put-dradh

- 5'-Primer für das komplette Gen ab TTG mit NdeI-Schnittstelle
- 5'-GGAATTCCATATGTTGACGCGCCTCCGAGTGTG-3'
- 5'-Primer für das Gen ab dem ersten Met-Codon ATG mit NdeI-Schnittstelle:
- 5'-GGAATTCCATATGAGCATCAAGACAGTTACGGTGTG-3'
- 3'-Primer mit HindIII-Schnittstelle
- 5'-TATTCGGAAGCTTTTATTTCAGGAAGTCGGCGCTCTC

1.7 Primer für das sequenzbasierte Screening auf 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen

5'-Primer:

Homologer Bereich 1

GGNGTSCTSGGNWSNCARATCGC

Homologer Bereich 2

ACSATCTTCGCNACSAAYWSNWSNACSCT

Homologer Bereich 4

TTCYTSGCNHTSCAYTTCGCNAAYVANATCTG

Homologer Bereich 6

GTACTGGGSGCCGGSGTSCTCGG

Homologer Bereich 7

ARGCCGTNCCSGAGVRCCTCGACCTCAAG

3'-Primer:

Homologer Bereich 2

AGSGTNSWNSWRTTSGTNGCGAAGATSGT

Homologer Bereich 3

GSACSAGSAGNSWRTTSAGGATRTANCC

Homologer Bereich 4

CCAGATNTNNTTNGCGAANTGNANNGCNANGAA

Homologer Bereich 5

TTCYTSGCNHTSCAYTTCGCNAAYVANATCTGG

Homologer Bereich 8

NNNKCMCYYCYSSKSGTMBTCGTAGAAGCC

2 Sequenzen

2.1 Gensequenz von ngadh

Das Gen ngadh besteht aus 915 bp.

2.2 Proteinsequenz der NGADH

MSEIQNVTVLGAGVLGSQIVMQAAYAGKKVVAYDIKQEFLDKLPARWEWMRGHYAKDLSDF TAEKFDDAVGRITTSTDIAEAVGDADVVIEAVPENLDLKKEVWGNVGKAVKDSAILLTNSS SLRPSDFADATGRADRFLALHFANMVWRSNTGEVMATPKTDPAVFDRTVEFAREINLQPFP VHKETPGYLLNSLLIPWLDAAGDLYANEVANPHVIDEDWKVSTGAPKGPFETYDIVGFNVA VNIGRNRPDATESQKKFNNLLQERGIDQGKAGLGDGCGFYEYDGNGRIVRPNPDWIIYED

Die NGADH besteht aus 304 Aminosäuren.

2.3 Gensequenz von biadh

ATGAACGACATCGCCCGCGTCACCGTGCTGGGCGCCGGAGTGCTCGGCGCCCAGATCGCCT ACCAGGCCGCCTACTCCGGCTTCGACGTCACCGTCTACGACATCGGCGACGAGGGCCTGAG CGCCGGCCGCAAGCGCCTGGACGCGCTCGTCACCGCCTACCGGGTCGAGGGCGCGCC ACCGAGGCCAGCACGCAGGCAGCGCTCGAGCGCCTGGCGACGACGACGGCGCAGG CCGCGGGGAATGCCGATCTCATCATCGAGGCCGTCCCGGAGCGCCTCGACATCAAGCGCGA GACCTACGAGAAGCTCGCGGCGCCCGCCCGAGCACACGATCTTCGCGACGAACTCCTCG ACCCTGCTGCCCAGCGACATGAAGGACTTCACGGGGGCGGCCCGACCGCTTCCTCGCCCTGC ACTTCGCCAACCAGATCTGGAAGTTCAACACCGCCGAGGTCATGGGGCACGGCGGAGACGAG CCCCGCGGGTCTTCGACACGGTCGTGGAGTTCGCCCGCGCCCATCGGCATGGTGCCCATCCCC GTGCTCAAGGAGCGCCCCGGCTACGTGCTCAACTCGCTGCTCGTGCCCTTCCTCAATGCGG CCCTCGACCTGGCGGCGGCGGCGGCGACGACAGCCAGAGGACGTCGACAACGTCTGGCGGAT CGCCACGGGCGCGCCCATGGGACCGTTCCAGATCTACGACGTCGTGGGCCTCGGCACCGCC TACAACATCCTGTCGAGCGGCGATGAGCACAGCCGGCGCGCCTCGCCGCCTGGCTCAAGGAGC ACTACATCGACCGCGGCCGCATGGGCCCCGGCGCGCGGCGGCGGCGCGCCCGCA GGGCTGA

Das Gen biadh besteht aus 861 bp.

2.4 Proteinsequenz der BIADH

MNDIARVTVLGAGVLGAQIAYQAAYSGFDVTVYDIGDEALSAGRKRLDALVTAYRVEVEGA TEASTQAALERLATTTDLAQAAGNADLIIEAVPERLDIKRETYEKLAALAPEHTIFATNSS TLLPSDMKDFTGRPDRFLALHFANQIWKFNTAEVMGTAETSPAVFDTVVEFARAIGMVPIP VLKERPGYVLNSLLVPFLNAALDLAAGGYAQPEDVDNVWRIATGAPMGPFQIYDVVGLGTA YNILSSGDEHSRRLAAWLKEHYIDRGRMGAGAGGGFYDDPQG

Die BIADH besteht aus 286 Aminosäuren.

2.5 Gensequenz von gaadh

TGCTGCGACGCCTGGTCGCCGAAGGCCACCTCGGCCGCAAGAGCGGACGCGGCTTCTACGA ATGGGACGCCTCAGGAAGGGAACAGAAATGA

Das Gen gaadh besteht aus 885 bp.

2.6 Proteinsequenz der GAADH

MTESTFIAPEQVGVLGGGRMGAGIAHAFLLAGSRVGIVERDADAAEAATARVLESIDASVA RGTALDSPEAYRARLTTGTDAALFAQCTLVVEAVPEDLALKVDALRRVEAQIAPDAAIASN TSSISIDELAAVLDRPSRLLGMHFFNPVPASTLVEIVHGASTAPALVDAARGWVAAIGKTP IVVADAPGFASSRLGVAIGLEAIRMLEEGVASAEDIDAAMTLGYKHPVGPLRLTDIVGLDV RLGIAEYLSAQLGERFEPPALLRRLVAEGHLGRKSGRGFYEWDASGREQK

Die GAADH besteht aus 294 Aminosäuren.

2.7 Gensequenz von dradh

Das Gen dradh besteht aus 891 bp.

2.8 Proteinsequenz der DRADH

MSIKTVTVCGSGVLGSQIAFQTAFHGFDVHLYDINDAAIAKARETLGKLQARYQQDLKVDA QQTGDAFARISFFTDIAEAVKGVDLVIEAIPENMDIKRKFYNQLGEVADPNTIFATNSSTL LPSQFMEETGRPEKFLALHFANEIWKFNTAEIMRTPRTDDAVFDTVVQFAKDIGMVALPMY KEQAGYILNTLLVPLLGAALELVVKGIADPQTVDKTWMIATGAPRGPFAFLDVIGLTTPYN INMASAETNPGSAAAAKYIKENYIDKGKLGTATGEGFYKYPNPAFESADFLK

Die DRADH besteht aus 296 Aminosäuren.

Literaturverzeichnis

[1] Berg, J. M., Tymoczko, J. L. and Stryer, L. (2003). Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

- [2] Drepper, T., Eggert, T., Hummel, W., Leggewie, C., Pohl, M., Rosenau, F. and Jaeger, K. E. (2006), New biocatalysts for white biotechnology, Chemie Ingenieur Technik 78 239-248.
- [3] Spok, A. (2006), Safety regulations of food enzymes, Food Technology and Biotechnology 44 197-209.
- [4] Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. and Witholt, B. (2001), Industrial biocatalysis today and tomorrow, Nature 409 258-268.
- [5] Longo, M. A. and Sanroman, M. A. (2006), Production of food aroma compounds: Microbial and enzymatic methodologies, Food Technology and Biotechnology 44 335-353.
- [6] Hanson, R. (2005), Purification and cloning of a ketoreductase used for the preparation of chiral alcohols, Advanced Synthesis & Catalysis 347 1073-1080.
- [7] Patel, R. N., Banerjee, A., Pendri, Y. R., Liang, J., Chen, C. P. and Mueller, R. (2006), Preparation of a chiral synthon for an HBV inhibitor: enzymatic asymmetric hydrolysis of (1 alpha,2 beta,3 alpha)-2-(benzyloxymethyl)cyclopent-4-ene-1,3-diol diacetate and enzymatic asymmetric acetylation of (1 alpha,2 beta,3 alpha)2-(benzyloxymethyl)cyclopent-4-ene-1,3-diol, Tetrahedron-Asymmetry 17 175-178.
- [8] Patel, R. N. (2001), Enzymatic synthesis of chiral intermediates for Omapatrilat, an antihypertensive drug, Biomolecular Engineering 17 167-182.
- [9] Patel, R. N. (2003), Microbial/enzymatic synthesis of chiral pharmaceutical intermediates, Current Opinion in Drug Discovery & Development 6 902-920.
- [10] Patel, R. N. (2006), Biocatalysis: Synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals, Current Organic Chemistry 10 1289-1321.
- [11] Patel, R. N. (2002), Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals, Enzyme and Microbial Technology 31 804-826.
- [12] Patel, R. N. (2004), Biocatalytic synthesis of chiral pharmaceutical intermediates, Food Technology and Biotechnology 42 305-325.
- [13] Ravot, G., Wahler, D., Favre-Bulle, O., Cilia, V. and Lefevre, F. (2003), High throughput discovery of alcohol dehydrogenases for industrial biocatalysis, Advanced Synthesis & Catalysis 345 691-694.
- [14] Reetz, M. T. and Ruggeberg, C. J. (2002), A screening system for enantioselective enzymes based on differential cell growth, Chemical Communications 1428-1429.

- [15] Schlegel, H. G. (1992). Allgemeine Mikrobiologie, Thieme Verlag, Stuttgart.
- [16] Minning, S., Weiss, A., Bornscheuer, U. T. and Schmid, R. D. (1999), Determination of peracid and putative enzymatic peracid formation by an easy colorimetric assay, Analytica Chimica Acta 378 293-298.
- [17] Tsukatani, T., Higuchi, T. and Matsumoto, K. (2005), Enzyme-based microtiter plate assay for gamma-aminobutyric acid: Application to the screening of gammaaminobutyric acid-producing lactic acid bacteria, Analytica Chimica Acta 540 293-297.
- [18] Reetz, M. T., Kuhling, K. M., Wilensek, S., Husmann, H., Hausig, U. W. and Hermes, M. (2001), A GC-based method for high-throughput screening of enantio selective catalysts, Catalysis Today 67 389-396.
- [19] Reetz, M. T., Kuhling, K. M., Deege, A., Hinrichs, H. and Belder, D. (2000), Superhigh-throughput screening of enantioselective catalysts by using capillary array electrophoresis, Angewandte Chemie-International Edition 39 3891-3893.
- [20] Wahler, D. and Reymond, J. L. (2001), Novel methods for biocatalyst screening, Current Opinion in Chemical Biology 5 152-158.
- [21] Jaeger, K. E., Eggert, T., Eipper, A. and Reetz, M. T. (2001), Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts, Applied Microbiology and Biotechnology 55 519-530.
- [22] Eggert, T. (2006), Bionics in reagent glass Biocatalyst design based on the example of nature through controlled evolution, Chemie Ingenieur Technik 78 453-459.
- [23] Conway, T., Sewell, G. W., Osman, Y. A. and Ingram, L. O. (1987), Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*, Journal of Bacteriology 169 2591-2597.
- [24] Knietsch, A., Waschkowitz, T., Bowien, S., Henne, A. and Daniel, R. (2003), Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: Generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*, Applied and Environmental Microbiology 69 1408-1416.
- [25] Ansorge-Schumacher, M. B., Slusarczyk, H., Schümers, J. and Hirtz, D. (2006), Directed evolution of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* for improved stability during entrapment in polyacrylamide, FEBS Journal 273 3938-3945.
- [26] Reetz, M. T., Becker, M. H., Klein, H. W. and Stockigt, D. (1999), A method for highthroughput screening of enantioselective catalysts, Angewandte Chemie-International Edition 38 1758-1761.
- [27] Cipolla, L. (2004), Combinatorial libraries of biocatalysts: Application and screening, Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening 7 101-114.

- [28] Cohen, N., Abramov, S., Dror, Y. and Freeman, A. (2001), In vitro enzyme evolution: the screening challenge of isolating the one in a million, Trends in Biotechnology 19 507-510.
- [29] Zocher, F., Enzelberger, M. M., Bornscheuer, U. T., Hauer, B. and Schmid, R. D. (1999), A colorimetric assay suitable for screening epoxide hydrolase activity, Analytica Chimica Acta 391 345-351.
- [30] Hummel, W., Abokitse, K., Drauz, K., Rollmann, C. and Gröger, H. (2003), Towards a large-scale asymmetric reduction process with isolated enzymes: Expression of an (S)-alcohol dehydrogenase in *E. coli* and studies on the synthetic potential of this biocatalyst, Advanced Synthesis & Catalysis 345 153-159.
- [31] Jörnvall, H. (1999), Multiplicity and complexity of SDR and MDR enzymes, Advances in Experimental Medicine and Biology 463 359-364.
- [32] Jörnvall, H., Hoog, J. O. and Persson, B. (1999), SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature, Febs Letters 445 261-264.
- [33] Reid, M. F. and Fewson, C. A. (1994), Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases, Critical Reviews in Microbiology 20 13-56.
- [34] Hummel, W. (1997), New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds, Advances in Biochemical Engineering Biotechnology 58 145-184.
- [35] Hummel, W. and Kula, M. R. (1989), Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds, European Journal of Biochemistry 184 1-13.
- [36] Endo, T. and Koizumi, S. (2001), Microbial conversion with cofactor regeneration using genetically engineered bacteria, Advanced Synthesis & Catalysis 343 521-526.
- [37] Leskovac, V., Trivic, S. and Pericin, D. (2002), The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, Fems Yeast Research 2 481-494.
- [38] Butt, S. and Roberts, S. M. (1987), Opportunities for using enzymes in organic synthesis, Chemistry in Britain 23 127-135.
- [39] Roberts, S. M. and Williamson, N. M. (1997), The use of enzymes for the preparation of biologically active natural products and analogues in optically active form, Current Organic Chemistry 1 1-20.
- [40] Jörg, G., Hemery, T. and Bertau, M. (2005), Effects of cell stress protectant glutathione on the whole-cell biotransformation of ethyl 2-chloro-acetoacetate with *Saccharomyces cerevisiae*, Biocatalysis and Biotransformation 23 9-17.
- [41] Amidjojo, M. and Weuster-Botz, D. (2005), Asymmetric synthesis of the chiral synthon ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate using *Lactobacillus kefir*, Tetrahedron-Asymmetry 16 899-901.

- [42] Hummel, W., Kuzu, M. and Geueke, B. (2003), An efficient and selective enzymatic oxidation system for the synthesis of enantiomerically pure D-*tert*-leucine, Organic Letters 5 3649-3650.
- [43] Wichmann, R. and Vasic-Racki, D. (2005), Cofactor regeneration at the lab scale, Technology Transfer in Biotechnology: From Lab to Industry to Production 92 225-260.
- [44] Eckstein, M., Daussmann, T. and Kragl, U. (2004), Recent developments in NAD(P)H regeneration for enzymatic reductions in one- and two-phase systems, Biocatalysis and Biotransformation 22 89-96.
- [45] Trivedi, A. H., Spiess, A. C., Daussmann, T. and Büchs, J. (2006), Effect of additives on gas-phase catalysis with immobilised *Thermoanaerobacter* species alcohol dehydrogenase (ADH T), Applied Microbiology and Biotechnology 71 407-414.
- [46] Bastos, F. D., dos Santos, A. G., Jones, J., Oestreicher, E. G., Pinto, G. F. and Paiva, L. M. C. (1999), Three different coupled enzymatic systems for *in situ* regeneration of NADPH, Biotechnology Techniques 13 661-664.
- [47] Sybesma, W. F. H., Straathof, A. J. J., Jongejan, J. A., Pronk, J. T. and Heijnen, J. J. (1998), Reductions of 3-oxo esters by baker's yeast: Current status, Biocatalysis and Biotransformation 16 95-134.
- [48] Ansorge-Schumacher, M. B., Steinsiek, S., Eberhard, W., Keramidas, N., Erkens, K., Hartmeier, W. and Büchs, J. (2006), Assaying CO₂ release for determination of formate dehydrogenase activity in entrapment matrices and aqueous-organic twophase systems, Biotechnology and Bioengineering 95 199-203.
- [49] Hummel, W. (1990), Reduction of acetophenone to (R)-(+)-phenylethanol by a new alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*, Applied Microbiology and Biotechnology 34 15-19.
- [50] Hummel, W. and Riebel, B. (1996), Chiral alcohols by enantioselective enzymatic oxidation, Enzyme Engineering Xiii 799 713-716.
- [51] Hummel, W. (1999), Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments, Trends in Biotechnology 17 487-492.
- [52] Goldberg, K., Edegger, K., Kroutil, W. and Liese, A. (2006), Overcoming the thermodynamic limitation in asymmetric hydrogen transfer reactions catalyzed by whole cells, Biotechnology and Bioengineering 95 192-198.
- [53] Yamamoto, H., Matsuyama, A. and Kobayashi, Y. (2003), Synthesis of ethyl (S)-4chloro-3-hydroxybutanoate using fabG-homologues, Applied Microbiology and Biotechnology 61 133-139.
- [54] Iwakura, M., Hattori, J., Arita, Y., Tokushige, M. and Katsuki, H. (1979), Studies on regulatory functions of malic enzymes .6. Purification and molecular-properties of

NADP-linked malic enzyme from *Escherichia coli* W, Journal of Biochemistry 85 1355-1365.

- [55] Weckbecker, A. (2005). Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren zur Synthese von chiralen Alkoholen, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Jülich.
- [56] Shaked, Z. and Whitesides, G. M. (1980), Enzyme-catalyzed organic-synthesis -NADH regeneration by using formate dehydrogenase, Journal of the American Chemical Society 102 7104-7105.
- [57] Wichmann, R., Wandrey, C., Bückmann, A. F. and Kula, M. R. (1981), Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration, Biotechnology and Bioengineering 23 2789-2802.
- [58] Wong, C. H., Drueckhammer, D. G. and Sweers, H. M. (1985), Enzymatic vs. fermentative synthesis - Thermostable glucose dehydrogenase catalyzed regeneration of NAD(P)H for use in enzymatic synthesis, Journal of the American Chemical Society 107 4028-4031.
- [59] Na'amnieh, S. (2002). Entwicklung eines rekombinanten Ganzzellsystems -Klonierung, Coexpression und Mutagenese der Phenylalanin-Dehydrogenase aus *Rhodococcus* sp. M4 und des Malic Enzymes aus *E. coli* K12, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Jülich.
- [60] Chenault, H. K. and Whitesides, G. M. (1987), Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis, Applied Biochemistry and Biotechnology 14 147-197.
- [61] Yamada-Onodera, K., Kawahara, N., Tani, Y. and Yamamoto, H. (2004), Synthesis of optically active diols by *Escherichia coli* transformant cells that express the glycerol dehydrogenase gene of *Hansenula polymorpha* DL-1, Engineering in Life Sciences 4 413-417.
- [62] Gröger, H., Hummel, W., Rollmann, C., Chamouleau, F., Husken, H., Werner, H., Wunderlich, C., Abokitse, K., Drauz, K. and Buchholz, S. (2004), Preparative asymmetric reduction of ketones in a biphasic medium with an (S)-alcohol dehydrogenase under in situ-cofactor-recycling with a formate dehydrogenase, Tetrahedron 60 633-640.
- [63] Molinari, F. (2006), Oxidations with isolated and cell-bound dehydrogenases and oxidases, Current Organic Chemistry 10 1247-1263.
- [64] Weckbecker, A. and Hummel, W. (2004), Improved synthesis of chiral alcohols with *Escherichia coli* cells co-expressing pyridine nucleotide transhydrogenase, NADP⁺dependent alcohol dehydrogenase and NAD⁺-dependent formate dehydrogenase, Biotechnology Letters 26 1739-1744.
- [65] Galkin, A., Kulakova, L., Yoshimura, T., Soda, K. and Esaki, N. (1997), Synthesis of optically active amino acids from alpha-keto acids with *Escherichia coli* cells expressing heterologous genes, Applied Environmental Microbiology 63 4651-4656.

- [66] Kataoka, M., Sri Rohani, L. P., Wada, M., Kita, K., Yanase, H., Urabe, I. and Shimizu, S. (1998), *Escherichia coli* transformant expressing the glucose dehydrogenase gene from *Bacillus megaterium* as a cofactor regenerator in a chiral alcohol production system, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 62 167-169.
- [67] Kataoka, M., Yamamoto, K., Kawabata, H., Wada, M., Kita, K., Yanase, H. and Shimizu, S. (1999), Stereoselective reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the aldehyde reductase and glucose dehydrogenase genes, Applied Microbiology and Biotechnology 51 486-490.
- [68] Kataoka, M., Kita, K., Wada, M., Yasohara, Y., Hasegawa, J. and Shimizu, S. (2003), Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols, Applied Microbiology and Biotechnology 62 437-445.
- [69] Kizaki, N., Yasohara, Y., Hasegawa, J., Wada, M., Kataoka, M. and Shimizu, S. (2001), Synthesis of optically pure ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes, Applied Microbiology and Biotechnology 55 590-595.
- [70] Boonstra, B., Rathbone, D. A., French, C. E., Walker, E. H. and Bruce, N. C. (2000), Cofactor regeneration by a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase for biological production of hydromorphone, Applied and Environmental Microbiology 66 5161-5166.
- [71] Ernst, M., Kaup, B., Müller, M., Bringer-Meyer, S. and Sahm, H. (2005), Enantioselective reduction of carbonyl compounds by whole-cell biotransformation, combining a formate dehydrogenase and a (*R*)-specific alcohol dehydrogenase, Applied Microbiology and Biotechnology 66 629-634.
- [72] Lee, L. G. and Whitesides, G. M. (1985), Enzyme-catalyzed organic synthesis: A comparison of strategies for *in situ* regeneration of NAD from NADH, Journal of the American Chemical Society 107 6999-7008.
- [73] Sanchez, A. M., Andrews, J., Hussein, I., Bennett, G. N. and San, K. Y. (2006), Effect of overexpression of a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (UdhA) on the production of poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*, Biotechnology Progress 22 420-425.
- [74] Mouri, T., Kamiya, N. and Goto, M. (2006), Increasing the catalytic performance of a whole cell biocatalyst harboring a cytochrome P450cam system by stabilization of an electron transfer component, Biotechnology Letters 28 1509-1513.
- [75] Mouri, T., Michizoe, J., Ichinose, H., Kamiya, N. and Goto, M. (2006), A recombinant *Escherichia coli* whole cell biocatalyst harboring a cytochrome P450cam monooxygenase system coupled with enzymatic cofactor regeneration, Applied Microbiology and Biotechnology 72 514-520.
- [76] Gröger, H., May, O., Werner, H., Menzel, A. and Altenbuchner, J. (2006), A "Second-Generation process" for the synthesis of L-neopentylglycine: Asymmetric reductive amination using a recombinant whole cell catalyst, Organic Process Research & Development 10 666-669.

- [77] Menzel, A., Werner, H., Altenbuchner, J. and Gröger, H. (2004), From enzymes to "designer bugs" in reductive amination: A new process for the synthesis of L-*tert*leucine using a whole cell-catalyst, Engineering in Life Sciences 4 573-576.
- [78] Yun, H., Choi, H. L., Fadnavis, N. W. and Kim, B. G. (2005), Stereospecific synthesis of (*R*)-2-hydroxy carboxylic acids using recombinant *E. coli* BL21 overexpressing YiaE from *Escherichia coli* K12 and glucose dehydrogenase from *Bacillus subtilis*, Biotechnology Progress 21 366-371.
- [79] Kaup, B., Bringer-Meyer, S. and Sahm, H. (2004), Metabolic engineering of *Escherichia coli*: construction of an efficient biocatalyst for D-mannitol formation in a whole-cell biotransformation, Applied Microbiology and Biotechnology 64 333-339.
- [80] Kaup, B., Bringer-Meyer, S. and Sahm, H. (2005), D-mannitol formation from Dglucose in a whole-cell biotransformation with recombinant *Escherichia coli*, Applied Microbiology and Biotechnology 69 397-403.
- [81] Gröger, H., Chamouleau, F., Orologas, N., Rollmann, C., Drauz, K., Hummel, W., Weckbecker, A. and May, O. (2006), Enantioselective reduction of ketones with "Designer cells" at high substrate concentrations: Highly efficient access to functionalized optically active alcohols, Angewandte Chemie-International Edition 45 5677-5681.
- [82] Patel, R. N. (2001), Biocatalytic synthesis of intermediates for the synthesis of chiral drug substances, Current Opinion in Biotechnology 12 587-604.
- [83] Holdgate, G. A., Ward, W. H. J. and McTaggart, F. (2003), Molecular mechanism for inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase by rosuvastatin, Biochemical Society Transactions 31 528-531.
- [84] Malhotra, H. S. and Goa, K. L. (2001), Atorvastatin: an updated review of its pharmacological properties and use in dyslipidaemia, Drugs 61 1835-1881.
- [85] Roth, B. D. (2002), The discovery and development of atorvastatin, a potent novel hypolipidemic agent, Progress in Medicinal Chemistry 40 1-22.
- [86] Jokubaitis, L. A. (1996), Development and pharmacology of fluvastatin, British journal of clinical practice Supplement 77A 11-15.
- [87] Jungnickel, P. W., Cantral, K. A. and Maloley, P. A. (1992), Pravastatin: a new drug for the treatment of hypercholesterolemia, Clinical pharmacy 11 677-689.
- [88] Müller, M., Wolberg, M., Schubert, T. and Hummel, W. (2005), Enzyme-catalyzed regio- and enantioselective ketone reductions, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 92 261-287.
- [89] Patel, R. N. (2001), Enzymatic synthesis of chiral intermediates for drug development, Advanced Synthesis & Catalysis 343 527-546.

- [90] Ballenweg, S. (2006). RÖMPP Online (Georg Thieme Verlag KG).
- [91] Patel, R. N. (2003), Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals: Case studies from BMS, Current Organic Chemistry 7 1369-1386.
- [92] Fallert-Müller, A. (1999-2000). Lexikon der Biochemie, Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München.
- [93] Schmidt, E., Ghisalba, O., Gygax, D. and Sedelmeier, G. (1992), Optimization of a process for the production of (*R*)-2-hydroxy-4-phenylbutyric acid - an intermediate for inhibitors of angiotensin converting enzyme, Journal of Biotechnology 24 315-327.
- [94] Kelly, J. G. and O'Malley, K. (1990), Clinical pharmacokinetics of the newer ACE inhibitors. A review, Clinical pharmacokinetics 19 177-196.
- [95] Clozel, J. P. and Hefti, F. (1988), Cilazapril prevents the development of cardiac hypertrophy and the decrease of coronary vascular reserve in spontaneously hypertensive rats, Journal of cardiovascular pharmacology 11 568-572.
- [96] Vlasses, P. H., Larijani, G. E., Conner, D. P. and Ferguson, R. K. (1985), Enalapril, a nonsulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibitor, Clinical pharmacy 4 27-40.
- [97] Goa, K. L., Balfour, J. A. and Zuanetti, G. (1996), Lisinopril. A review of its pharmacology and clinical efficacy in the early management of acute myocardial infarction, Drugs 52 564-588.
- [98] Chrysant, S. G. and Chrysant, G. S. (2004), Pharmacological and clinical profile of moexipril: a concise review, Journal of clinical pharmacology 44 827-836.
- [99] Julius, S., Li, Y., Brant, D., Krause, L. and Taylor, D. (1991), Quinapril, an angiotensin converting enzyme inhibitor, prevents cardiac hypertrophy during episodic hypertension, Hypertension 17 1161-1166.
- [100] Mills, T. P. (1992), Ramipril: a review of the new ACE inhibitor, The Journal of the Arkansas Medical Society 88 437-440.
- [101] Noble, S. and Sorkin, E. M. (1995), Spirapril. A preliminary review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of hypertension, Drugs 49 750-766.
- [102] Wiseman, L. R. and McTavish, D. (1994), Trandolapril. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in essential hypertension, Drugs 48 71-90.
- [103] Hanahan, D. (1983), Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, Journal of Molecular Biology 166 557-580.
- [104] Liu, X. J., Chu, X. S., Yu, W. H., Li, P. F. and Li, D. (2004), Expression and purification of His-tagged rat mitochondrial short-chain 3-hydroxyacyl-CoA

dehydrogenase wild-type and Ser137 mutant proteins, Protein Expression and Purification 37 344-351.

- [105] Karsten, W. E., Chooback, L., Liu, D., Hwang, C. C., Lynch, C. and Cook, P. F. (1999), Mapping the active site topography of the NAD-malic enzyme via alaninescanning site-directed mutagenesis, Biochemistry 38 10527-10532.
- [106] Bradford, M. M. (1976), Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry 72 248-254.
- [107] Blum, H., Beier, H. and Gross, H. J. (1987), Improved silver staining of plantproteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, Electrophoresis 8 93-99.
- [108] Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J. H., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997), Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucleic Acids Research 25 3389-3402.
- [109] Schäffer, A. A., Aravind, L., Madden, T. L., Shavirin, S., Spouge, J. L., Wolf, Y. I., Koonin, E. V. and Altschul, S. F. (2001), Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements, Nucleic Acids Research 29 2994-3005.
- [110] Schomburg, D. (1987). BRENDA (BRaunschweig ENzyme DAtabase).
- [111] Abokitse, K. and Hummel, W. (2003), Cloning, sequence analysis, and heterologous expression of the gene encoding a (S)-specific alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 43297, Applied Microbiology and Biotechnology 62 380-386.
- [112] Yoshida, A. and Freese, E. (1965), Purification and chemical characterization of lactate dehydrogenase of *Bacillus subtilis*, Biochimica Et Biophysica Acta 99 56-65.
- [113] Yoshida, A. (1965), Enzymic properties of lactate dehydrogenase of *Bacillus subtilis*, Biochimica Et Biophysica Acta 99 66-77.
- [114] Hediger, M. A., Frank, G. and Zuber, H. (1986), Structure and function of L-lactate dehydrogenases from thermophilic and mesophilic bacteria .4. The primary structure of the mesophilic lactate dehydrogenase from *Bacillus subtilis*, Biological Chemistry Hoppe-Seyler 367 891-903.
- [115] Yamaguchi, M., Tokushige, M. and Katsuki, H. (1973), Studies on regulatory functions of malic enzymes .2. Purification and molecular properties of nicotinamide adenine dinucleotide-linked malic enzyme from *Escherichia coli*, Journal of Biochemistry 73 169-180.
- [116] Garvie, E. I. (1980), Bacterial lactate dehydrogenases, Microbiological Reviews 44 106-139.
- [117] White, O., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Dodson, R. J., Haft, D. H., Gwinn, M. L., Nelson, W. C., Richardson, D. L., et al. (1999),

Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1, Science 286 1571-1577.

- [118] Salzberg, S., Delcher, A., Kasif, S. and White, O. (1998), Microbial gene identification using interpolated Markov models, Nucleic Acids Research 26 544-548.
- [119] Shimakata, T., Fujita, Y. and Kusaka, T. (1979), Purification and characterization of 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase of *Mycobacterium smegmatis*, Journal of Biochemistry 86 1191-1198.
- [120] Bayer, M., Günther, H. and Simon, H. (1995), Purification and characterization of the NADH-dependent (S)-specific 3-oxobutyryl-CoA reductase from *Clostridium tyrobutyricum*, Archives of Microbiology 163 310-312.
- [121] Youngleson, J. S., Jones, D. T. and Woods, D. R. (1989), Homology between hydroxybutyryl and hydroxyacyl CoenzymeA dehydrogenase enzymes from *Clostridium acetobutylicum* fermentation and vertebrate fatty-acid beta-oxidation pathways, Journal of Bacteriology 171 6800-6807.
- [122] Shuto, H., Fukui, T., Saito, T., Shirakura, Y. and Tomita, K. (1981), An NAD-linked acetoacetyl-CoA reductase from *Zoogloea ramigera* I-16-M, European Journal of Biochemistry 118 53-59.
- [123] Fiedler, S., Steinbüchel, A. and Rehm, B. H. A. (2002), The role of the fatty acid beta-oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas oleovorans* in polyhydroxyalkanoate biosynthesis: molecular characterization of the fadBA operon from *P. oleovorans* and of the enoyl-CoA hydratase genes *phaJ* from *P. oleovorans* and *Pseudomonas putida*, Archives of Microbiology 178 149-160.
- [124] Bennett, G. N. and Rudolph, F. B. (1995), The central metabolic pathway from Acetyl-CoA to Butyryl-Coa in *Clostridium acetobutylicum*, Fems Microbiology Reviews 17 241-249.
- [125] Mothes, G. and Babel, W. (1994), *Methylobacterium rhodesianum* MB-126 possesses two acetoacetyl-CoA reductases, Archives of Microbiology 161 277-280.
- [126] Binstock, J. F., Pramanik, A. and Schulz, H. (1977), Isolation of a multienzyme complex of fatty-acid oxidation from *Escherichia coli*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74 492-495.
- [127] Alvarez, H. M. (2003), Relationship between beta-oxidation pathway and the hydrocarbon-degrading profile in actinomycetes bacteria, International Biodeterioration & Biodegradation 52 35-42.
- [128] Alvarez, H. M., Kalscheuer, R. and Steinbüchel, A. (1997), Accumulation of storage lipids in species of *Rhodococcus* and *Nocardia* and effect of inhibitors and polyethylene glycol, Lipid - Fett 99 239-246.

- [129] Adjogble, K. Z. (2000). Heterologe Expression von einer Aminosäure-Dehydrogenase und einem coenzym-regenerierenden Enzym, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Jülich.
- [130] Mesentsev, A. V., Lamzin, V. S., Tishkov, V. I., Ustinnikova, T. B. and Popov, V. O. (1997), Effect of pH on kinetic parameters of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase, Biochemical Journal 321 475-480.
- [131] Slonczewski, J. L., Rosen, B. P., Alger, J. R. and Macnab, R. M. (1981), pH homeostasis in *Escherichia coli*: Measurement by 31P nuclear magnetic resonance of methylphosphonate and phosphate, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 78 6271-6275.
- [132] Dharmadi, Y., Murarka, A. and Gonzalez, R. (2006), Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: A new platform for metabolic engineering, Biotechnology and Bioengineering 94 821-829.

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. W. Hummel für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen.

Des Weiteren danke ich

Herrn Prof. Dr. J. Jose für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. K.-E. Jäger für die Möglichkeit, meine Arbeit an seinem Institut unter hervorragenden Bedingungen durchzuführen.

Frau Dr. A. Weckbecker für die stetige Diskussionbereitschaft, die unermüdliche Geduld bei der Durchsicht dieser Arbeit und die Einarbeitung in biochemische Arbeitstechniken. Außerdem möchte ich mich an dieser Stelle für vier Jahre sehr produktive und vor allem freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Frau Dipl.-Ing. A. Gronen, Herrn H. Hönemann und Herrn M.Sc. Bio-Med. Eng. Shivaprasad Sandru für die Unterstützung und die Mitarbeit im Labor.

Frau A. Sterlein, Herrn Dr. K. Abokitse, Frau Dipl.-Biol. A. Markert, Herrn Dipl.-Chem. A. Heck, Herrn Dipl.-Biol. A. Schulz sowie K. Wetjen und O. Mahmoud für die schöne Zeit in Büro und Labor.

allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie für die nette Arbeitsatmosphäre.

dem Bundesministerium für Bildung und Forschung sowie der Firma Degussa für die finanzielle Unterstützung eines Teils dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern E. und W. Schümers, meinem Bruder P. Schümers sowie meinem Freund R. Parkot für die stetige Unterstützung und Ermutigung in den letzten Jahren und während meines ganzen Lebens.

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

Düsseldorf, den 01.12.2006

(Julia Schümers)