

Spezifische ω -Transaminasen zur Herstellung von enantiomerenreinen β - und γ -Aminosäuren

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Greifswald

vorgelegt von

Uwe Wegner

Greifswald, 08.02.2023

Dekan: Prof. Dr. Gerald Kerth

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Joachim Schüller

2. Gutachter: Prof. Dr. Raffael Schaffrath

Tag der Promotion: 26.06.2023

Inhalt

Inhalt	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Zusammenfassung	VII
Summary	IX
1. Einleitung	1
1.1. Ungewöhnliche Aminosäuren in der Natur	1
1.2. Pharmazeutische Anwendungen für nicht proteinogene Aminosäuren	6
1.3. Synthesewege für β - und γ -Aminosäuren	8
1.4. ω -Transaminasen	12
1.5. Die Donororganismen	13
1.5.1. <i>Variovorax boronicumulans</i>	14
1.5.2. <i>Sphaerobacter thermophilus</i>	14
1.5.3. <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	15
1.5.4. <i>Priestia megaterium</i>	15
1.5.5. <i>Blastobotrys raffinosifermentans</i>	15
1.6. Zielstellung der Arbeit	18
2. Material und Methoden	20
2.1. Bakterienstämme	20
2.2. Hefestämme	20
2.3. Medien für die Kultivierung	20
2.4. Kultivierung von <i>E. coli</i> XL1	24
2.5. Kultivierung weiterer Bakterien- und Hefestämme	24
2.6. Aktivitätstest für ω -Transaminasen	25
2.7. Gensynthese	26
2.8. Plasmidkonstruktion	27
2.9. Isolation der DNA Fragmente und des linearisierten Vektors	27
2.10. Ligation der Gene und des Vektors	28
2.11. Transformation von <i>E. coli</i> XL1	28
2.12. Selektion positiver Transformanden	28
2.13. Plasmidisolation aus <i>E. coli</i> XL1	29
2.14. Messung der Nukleinsäurekonzentrationen	30
2.15. Überprüfen der Sequenzen	30

2.16. Transformation von <i>E. coli</i> BL21DE3	30
2.17. Enzymproduktion mit <i>E. coli</i> BL21DE3	31
2.18. Fermentation zur Produktion größerer Enzymmengen	31
2.19. Bestimmung des Glukosegehaltes der Fermenterproben	37
2.20. Amplifikation der Transaminase-Gene und Konstruktion des XPLOR®3 Vektors	37
2.21. Isothermales Assembly der Transaminase-Gene und des Vektors	38
2.22. Aktivitätstest mit verschiedenen Aminodonoren	39
2.23. Bestimmen des optimalen Aminoakzeptors für VboTA	41
2.24. Bestimmung des pH Optimums.....	42
2.25. Bestimmen des Oligomerisierungsgrades von VboTA	43
2.26. Substrat/Produktinhibition von VboTA	43
2.27. Bestimmung der K_m -Werte von VboTA	44
2.28. Bestimmung des Temperaturoptimums	45
2.29. Bestimmung der Temperaturstabilität.....	45
2.30. Haltbarkeitstest VboTA	46
2.31. Bioinformatische Analysen.....	46
2.31.1. Homologiensuche mittels BLAST.....	46
2.31.2. Identifikation potenzieller ω -Transaminasen in <i>B. raffinosifermentans</i>	47
2.31.3. Sequenzvergleiche mittels COBALT.....	47
2.31.4. Falten der StoTA-Varianten mittels AlphaFold.....	48
2.31.5. Visualisierung der 3D-Strukturen der Proteine.....	48
3. Ergebnisse	49
3.1. Ergebnisse der Literaturrecherche	50
3.1.1. Testen potenzieller Kandidaten	50
3.1.2. Klonierung und Expression von VboTA	54
3.1.3. Aktivitätstests mit VboTA	58
3.1.4. Bestimmung von Temperatur und pH Optimum sowie der Thermostabilität	60
3.1.5. Produkt- und Eduktinhibition	62
3.1.6. Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von VboTA	63
3.1.7. Bestimmen kinetischer Konstanten von VboTA.....	65
3.1.8. Stabilitätstest von VboTA	66
3.1.9. Ergebnisse der Enzymproduktionen im Fermenter	69
3.1.10. Ergebnisse der Glukosemessungen.....	69
3.1.11. Strukturelle Vergleiche zweier Gruppen von ω -Transaminasen.....	70
3.2. Ergebnisse der Untersuchungen der StoTA.....	76
3.2.1. Bestimmen der zu verändernden Aminosäuren in StoTA.....	76

Inhalt

3.2.2. Ergebnisse des Vortests mit Rohextrakten	78
3.2.3. Klonierung und Expression der StoTA Mutanten	79
3.2.4. Bestimmung der Aktivität und kinetischer Konstanten von StoTA	81
3.2.5. Ergebnisse struktureller Analysen	83
3.3. Ergebnisse der Tests mit der Stammsammlung	88
3.3.1. Testen potenzieller Kandidaten	88
3.3.2. Wachstumsversuche mit <i>B. raffinosifermentans</i>	89
3.3.3. Ergebnisse der Sequenzvergleiche der <i>Bacillus</i> -Stämme	90
3.3.4. Ergebnisse Sequenzvergleiche <i>B. raffinosifermentans</i>	92
3.3.5. Klonierung und Expression der potenziellen ω -Transaminasen von <i>B. raffinosifermentans</i> .	95
3.3.6. Ergebnisse der Aktivitätstests	95
4. Diskussion	99
4.1. Diskussion der Ergebnisse der <i>V. boronicumulans</i> ω -Transaminase	99
4.2. Diskussion der Ergebnisse der <i>S. thermophilus</i> ω -Transaminase	105
4.3. Diskussion der Ergebnisse von <i>B. raffinosifermentans</i>	115
5. Zusammenfassung	117
6. Literatur	119
Anhang	135
Eigenständigkeitserklärung	140
Danksagung	141

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln einiger Cryptophycine 2

Abbildung 2: Strukturen verschiedener Destruixine, zyklischer Peptide, die β -Alanin enthalten 3

Abbildung 3: Strukturformeln von Homoprolin (links) und Homopipecolinsäure (rechts) 4

Abbildung 4: Struktur von Paclitaxel. 5

Abbildung 5: Strukturformeln von Andrimind, sowie den Moiramiden A, B und C. β -Phe: β -Phenylalanin 5

Abbildung 6: Aminierung durch nucleophile Substitution am Beispiel einer β -Ketosäure. 8

Abbildung 7: Reaktion der kinetischen Auflösung von β -Aminosäuren mit Hilfe von ω -Transaminasen. 10

Abbildung 8: Reaktionsschema der asymmetrischen Synthese am Beispiel von β -Aminosäuren. 12

Abbildung 9: Reaktionsschema der kinetischen Auflösung am Beispiel einer β -Aminosäure. 25

Abbildung 10: Übergeordnete Struktur der Fermentationsrezepte. 32

Abbildung 11: Rezept für die Enzymproduktion mit *E. coli*..... 33

Abbildung 12: Rezept für die Enzymproduktion mit *E. coli*..... 35

Abbildung 13: Liste der als Aminodonoren verwendeten Aminosäuren. 39

Abbildung 14: Liste der als Aminodonor verwendeten Amine. 40

Abbildung 15: Reaktion einer α -Ketosäure, hier Pyruvat als Beispiel, mit DNPH und anschließender Behandlung mit Natronlauge. 41

Abbildung 16: Positivkontrolle als Beweis, dass der Aktivitätstest funktioniert..... 50

Abbildung 17: Sequenzvergleich VboTA und StoTA..... 52

Abbildung 18: Vergleich von VboTA mit einem potentiell Motive von ω -Transaminasen..... 53

Abbildung 19: Aktivitätstest mit dem Rohextrakt von *V. boronicumulans*. 54

Abbildung 20: Vektorkarte von vboTA in pET 21 b (+). 55

Abbildung 21: Wachstumskurven *E. coli* BL21 DE3 VboTA, induziert und nicht induziert. 56

Abbildung 22: 1D SDS-Gel (links) und entsprechender Westernblot (rechts) der verschiedenen Reinigungsschritte von VboTA. 57

Abbildung 23: Aktivität von VboTA in $\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ Enzym nach 1 h bei 30 °C und pH 8.0 bzw. 9.0 unter Verwendung von verschiedenen Aminoakzeptoren und mit β -F und β -HA als Aminodonoren..... 58

Abbildung 24: Von VboTA umgesetztes α -Ketoglutarat, nach 1 h bei 30 °C und pH 9 (blau), und nach 3 h bei 30 °C und pH 9 (orange). 59

Abbildung 25: Relative Aktivität von VboTA mit verschiedenen Aminodonoren..... 60

Abbildung 26: Relative Aktivität von VboTA mit β -Phenylalanin, nach einstündiger Inkubation des Enzyms bei Temperaturen zwischen 20 und 90 °C. 61

Abbildung 27: Substrat/Produkt Inhibition. 62

Abbildung 28: Messung der Standards zur Bestimmung des Molekulargewichts der nativen VboTA. 64

Abbildung 29: Zeitverlauf der Aktivitätsabnahme von VboTA. 67

Abbildung 30: Zeitverlauf der Aktivitätsabnahme von VboTA. 68

Abbildung 31: Alignment der ω -Transaminasen, die nur aliphatische Aminosäuren als Substrat akzeptieren. ... 71

Abbildung 32: Alignment der ω -Transaminasen, die sowohl aliphatische als auch aromatische Aminosäuren als Substrat akzeptieren. 72

Abbildung 33: Ausschnitt der Struktur von 5ZTX [190] als ein Repräsentant für aliphatische ω -TAs. 73

Abbildung 34: Ausschnitt der Struktur von VboTA. 74

Abbildung 35: Alignment aller sieben ω -Transaminasen aus den vorherigen Vergleichen. 75

Abbildung 36: Vergleich der Sequenzen von StoTA und dem potenziellen Motive für aromatische ω -TAs [184]... 76

Abbildung 37: Detailaufnahme des aktiven Zentrums von StoTA. 78

Abbildung 38: Aktivitäten der StoTA-Varianten. 79

Abbildung 39: 1D SDS-Gel der verschiedenen Reinigungsschritte von zwei StoTA-Varianten und dem Wildtyp. . 80

Abbildung 40: Westernblot der verschiedenen Reinigungsschritte von zwei StoTA-Varianten und dem Wildtyp. 81

Abbildung 41: LDDT (Local Distance Difference Test) Scores für die einzelnen Aminosäuren von StoTA, das nicht-modifizierte Enzym wurde gefaltet. 83

Abbildung 42: Vergleich der 3D-Strukturen des Wildtyps von StoTA. 84

Abbildung 43: Vergleich der 3D-Strukturen des Wildtyps von StoTA und der Variante S17P. 85

Abbildung 44: Vergleich der 3D-Strukturen des Wildtyps von StoTA und der Variante T38V. 85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 45: Vergleich der 3D-Strukturen des Wildtyps von StoTA und der Variante Y47T.	86
Abbildung 46: Vergleich der 3D-Strukturen des Wildtyps von StoTA und der Variante N70E.....	86
Abbildung 47: Vergleich der 3D-Strukturen des Wildtyps von StoTA und der Variante S17PT38V.	87
Abbildung 48: Vergleich der 3D-Strukturen des Wildtyps von StoTA und der Variante T38VY47T.	87
Abbildung 49: Vergleich der 3D-Strukturen des Wildtyps von StoTA und der Variante S17PT38VY47T.	88
Abbildung 50: Wachstumskurven von <i>B. raffinosifermentans</i> LS3 in verschiedenen Medien.....	89
Abbildung 51: Vergleich LsoTA (NCBI Accession: WP_082295014.1) gegen StoTA.....	91
Abbildung 52: Sequenzvergleich PmoTA (NCBI Accession: WP_098476556.1) gegen StoTA.....	92
Abbildung 53: Funktionelle Domänen in BroTA1.	93
Abbildung 54: Sequenzvergleich der potenziellen ω -TAs von <i>B. raffinosifermentans</i>	94
Abbildung 55: Aktivität von BroTA1	96
Abbildung 56: Aktivität von BroTA2	97
Abbildung 57: Aktivität von BroTA3	98
Abbildung 58: Sequenzvergleich von VboTA (Query_10001) und 5ZTX (Query_10002).	101
Abbildung 59: Nahaufnahme des aktiven Zentrums im Strukturvergleich von VboTA und 5ZTX.....	102
Abbildung 60: Strukturvergleich zwischen StoTA (blau) und VboTA (braun).	106
Abbildung 61: Vergleich der Hydrophobizität der Eingänge zweier ω -Transaminasen von <i>M. loti</i>	108
Abbildung 62: Unterschiede zwischen der Elektrostatik und der Hydrophobizität nach dem Aminosäureaustausch N70E.	109
Abbildung 63: Detailaufnahme des aktiven Zentrums von StoTA	110
Abbildung 64: Detailaufnahme des aktiven Zentrums von VboTA.....	111
Abbildung 65: Unterschiede zwischen der Elektrostatik und der Hydrophobizität nach dem Aminosäureaustausch S17P.	112
Abbildung 66: Unterschiede zwischen der Elektrostatik und der Hydrophobizität nach dem Aminosäureaustausch T38V.....	113
Abbildung 67: Unterschiede zwischen der Elektrostatik und der Hydrophobizität nach dem Aminosäureaustausch Y47T.	114

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Zusammensetzung der LB haltigen Glukoselösung.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 2: Zusammensetzung von Medium 535.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 3: Zusammensetzung Medium 98.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 4: Zusammensetzung des Bodenextrakts für Medium 98.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 5: Zusammensetzung HMM.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 6: Zusammensetzung der Spurenelemente für das HMM.</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 7: Vitaminmix für das HMM.</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 8: Zusammensetzung der Ansätze zur Aktivitätsbestimmung mit verschiedenen Aminodonoren.</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 9: Zusammensetzung von P1.</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 10: Zusammensetzung von P2.</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 11: Zusammensetzung von P3.</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 12: Zusammensetzung des Autoinduktionsmedium.</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 13: Kohlenhydrate für Autoinduktionsmedium.</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 14: Liste der Primer, mit denen potenzielle ω-Transaminasen aus dem Genom von B. raffinosifermentans amplifiziert werden konnten.</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 15: Primer mit denen die Gene der potentiellen ω-Transaminasen von B. raffinosifermentans an den Enden um 18 Basenpaare verlängert wurden.</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 16: Zusammensetzung der Ansätze zur Aktivitätsbestimmung mit verschiedenen Aminodonoren.</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 17: Liste und Zusammensetzung der für die Bestimmung des pH-Optimums verwendeten Puffer.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 18: Standardproteine für die Größenausschlusschromatographie.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 19: Kinetische Konstanten von VboTA.</i>	<i>65</i>
<i>Tabelle 20: Enantiomeren-Überschuss.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabelle 21: Biochemische Eigenschaften von StoTA.....</i>	<i>82</i>
<i>Tabelle 22: Die spezifischen Aktivitäten [$\mu\text{mol mol}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$] der Varianten für verschiedene Aminodonoren sind angegeben.</i>	<i>82</i>
<i>Tabelle 23: Homologie-Vergleiche zwischen den drei potenziellen ω-Transaminasen von B. raffinosifermentans.</i>	<i>94</i>

Zusammenfassung

In den letzten Jahren gewannen ω -Transaminasen zunehmend an Bedeutung. Ihr breites Substratspektrum, das sowohl Aminosäuren als auch Amine umfasst, macht sie interessant für biotechnologische Anwendungen. Im Gegensatz zu α -Aminotransferasen sind ω -Aminotransferasen nicht auf α -Aminosäuren als Aminodonor bzw. α -Ketosäuren als Aminoakzeptoren beschränkt. Auch sind einige ω -Transaminasen in der Lage, Aldehyde oder Ketone zu aminieren. Dadurch sind sie vielseitig einsetzbar. Seit ihrer Entdeckung wurden ω -Transaminasen in einer Vielzahl von Organismen nachgewiesen. Viele dieser Enzyme stammen aus Pilzen und Bakterien. Da es ständig Bedarf an neuen Transaminasen gibt, wurden verschiedene Organismen auf das Vorhandensein solcher Enzyme untersucht. Die Hefe *Blastobotrys raffinosifermentans* LS3 ist einer dieser Organismen. Für diese Hefe existiert bereits eine Vielzahl biotechnologischer Anwendungen, was unter anderem an ihren vielseitigen physiologischen Möglichkeiten liegt. Um das Spektrum dieses Stammes noch zu erweitern, wurde sein Genom auf ORFs gescannt. Die ermittelten ORFs wurden translatiert und die so erhaltenen, theoretischen Proteine in einer Proteindatenbank gespeichert. Die Einträge dieser Datenbank wurden einem „hmmerscan“ (hmm ist kurz für „hidden Markov model“) unterzogen. Dabei werden die Proteine in sogenannte Pfams, kurz für Proteinfamilien, eingeteilt. Drei Proteine wurden der Familie PF00202.21 zugeordnet. Das ist die sogenannte Aminotran_3 Familie. In dieser Familie befinden sich eukaryotische ω -Transaminasen. Die Gene *brota1*, *brota2* und *brota3* codieren für diese Enzyme. Jeweils eins der Gene wurde in den Vektor XPLOR®3 kloniert, damit die potentiellen ω -Transaminasen in *B. raffinosifermentans* G1212 [*aleu2 atrp1:ALEU2*] [1] überexprimiert werden können. Eine Besonderheit von BroTA1 ist, dass es neben der Aminotran_3 Domäne noch eine AAA Domäne aufweist. Deshalb ist es mit etwa 85 kDa auch deutlich größer als die meisten ω -Transaminasen, die meist zwischen 45 und 50 kDa liegen. BroTA2 und BroTA3 beinhalten nur die Aminotran_3 Domäne. Alle drei Enzyme zeigen niedrige Aktivität bei der kinetischen Auflösung racemischer β -Aminosäuren.

Neben den eukaryotischen ω -Transaminasen wurden auch einige bakterielle Enzyme untersucht. Literatursuche und das Screenen der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Hefegenetik des Leibniz-Instituts für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung führten zu mehreren potentiellen bakteriellen ω -Transaminasen. Das zu Beginn dieser Arbeit noch

Zusammenfassung

als hypothetisches Protein bezeichnete Enzym von *Variovorax boronicumulans* hat sich als ω -Transaminase herausgestellt. Das Enzym wurde detailliert hinsichtlich des Substratspektrums und seiner biochemischen Eigenschaften charakterisiert. Es handelt sich hierbei um eine ω -Transaminase mit β -Aktivität. Diese Transaminase akzeptiert sowohl aromatische als auch aliphatische β -Aminosäuren als Substrat. Sequenzvergleiche dieses Enzyms mit anderen ω -Transaminasen, die nur aliphatische Aminosäuren akzeptieren, führten zu tieferen Einblicken in konservierte Bereiche dieser beiden Gruppen von ω -Transaminasen.

Der dritte Ansatz war das Anpassen einer bekannten ω -Transaminase des thermophilen Bakteriums *Sphaerobacter thermophilus* an ein potentiell Motif für aromatische ω -Transaminasen. Dadurch sollte die Aktivität des Enzyms erhöht werden. Dieser Ansatz führte zu 7 Varianten des Enzyms mit höherer Aktivität als der Wildtyp. Durch diese Versuche wurden einige für die Transferaseaktivität wichtige Aminosäurereste offenbart. So hat sich zum Beispiel herausgestellt, dass N70 offenbar wichtig für den Umsatz von γ -Aminosäuren ist, da ein Austausch gegen Glutamat zu einer verminderten Aktivität mit γ -Aminopentansäure führte.

Summary

Summary

In recent years, ω -transaminases have become increasingly important. Their wide range of substrates, which includes both amino acids and amines, makes them interesting for biotechnological applications. In contrast to α -aminotransferases, ω -aminotransferases are not limited to α -amino acids as amino donors or α -keto acids as amino acceptors. Some ω -transaminases are also able to aminate aldehydes or ketones. This makes them versatile. Since their discovery ω -transaminases have been identified in a variety of organisms. Many of these enzymes derive from fungi and bacteria. Since there is a constant need for new transaminases, various organisms have been examined for the presence of such enzymes. The yeast *Blastobotrys raffinosifermentans* is one of these organisms. A large number of biotechnological applications already exist for this yeast. To expand the spectrum of this strain, its genome was scanned for ORFs. The determined ORFs were translated and the theoretical proteins obtained in this way were stored in a protein data base. The entries in this data base were subjected to a hmmer scan (hmm is short for "hidden Markov model"). The proteins are assigned to so-called pfams, short for protein families. Three proteins have been assigned to family PF00202.21. This is the so-called Aminotran_3 family. In this family are eukaryotic ω -transaminases. The genes *brota1*, *brota2* and *brota3* code for these enzymes. One gene each was cloned into the vector XPLOR[®]3 so that the potential ω -transaminases in *B. raffinosifermentans* G1212 [*aleu2 atrp1:ALEU2*] [1] can be overexpressed. A special feature of BroTA1 is that it has a AAA domain in addition to the Aminotran_3 domain. Therefore, at about 85 kDa, it is also significantly larger than most ω -transaminases, which are usually between 45 and 50 kDa. BroTA2 and BroTA3 contain only the aminotran_3 domain. All three enzymes show low activity in the kinetic resolution of racemic β -amino acids.

In addition to the eukaryotic ω -transaminases, some bacterial enzymes have also been studied. A literature search and screening of the strain collection of the yeast genetics group of the Leibniz-institute for plant genetics and crop science led to several potential bacterial ω -transaminases. The enzyme from *Variovorax boronicumulans*, which was still described as a hypothetical protein at the beginning of this work, turned out to be an ω -transaminase. The enzyme was characterized in detail with regard to the substrate spectrum and its biochemical properties. It is an ω -transaminase with β -activity. This transaminase accepts

Summary

both aromatic and aliphatic β -amino acids as a substrate. Sequence comparisons of this enzyme with other ω -transaminases that only accept aliphatic amino acids led to deeper insights into conserved regions of these two groups of ω -transaminases.

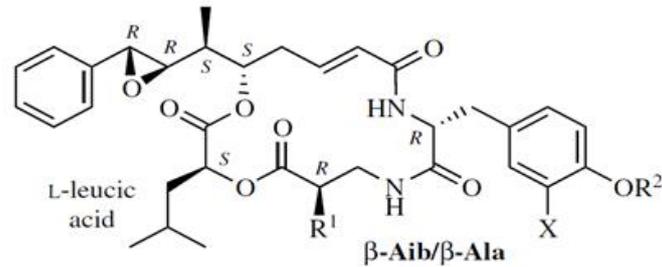
The third approach was the adaptation of a known ω -transaminase from the thermophilic bacterium *Sphaerobacter thermophilus* to a potential motif for aromatic ω -transaminases. This should increase the activity of the enzyme. This approach resulted in 7 variants of the enzyme with higher activity than the wild type. These experiments revealed some amino acid residues important for transferase activity. For example, it turned out that N70 is apparently important for the conversion of γ -amino acids, since replacing it with glutamate led to reduced activity with γ -aminopentanoic acid.

1. Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Verfahren zur enantiomerenreinen Produktion von β - und γ -Aminosäuren erweitert. Aminosäuren können in der (R) oder der (S) Form vorkommen. Da die Formen unterschiedliche physiologische Wirkungen haben können, ist es wichtig Aminosäuren enantiomerenrein zu synthetisieren. Das ist vor allem von Bedeutung, wenn die Aminosäuren als Bausteine für pharmazeutisch aktive Substanzen verwendet werden, da das falsche Enantiomer keine, oder eine unerwünschte Wirkung haben kann. Daher ist es notwendig das Spektrum verfügbarer Katalysatoren, in diesem Fall Enzyme, zu erweitern. Enzyme haben gegenüber der chemischen Synthese den Vorteil, dass sie spezifisch für ein Enantiomer sind, daher sind insbesondere ω -Transaminasen für die Produktion von enantiomerenreinen β - und γ -Aminosäuren von Interesse.

1.1. Ungewöhnliche Aminosäuren in der Natur

Neben den proteinogenen α -Aminosäuren kommen in der Natur weitere, nicht proteinogene Aminosäuren vor. Darunter finden sich viele β - und γ -Aminosäuren. Die in der Natur am häufigsten vorkommende β -Aminosäure ist β -Alanin, das in allen Lebewesen, zum Beispiel als Teil von Coenzym A, vorkommt [2]. Außerdem dient es in Form von Carnosin (ein Dipeptid aus β -Alanin und L-Histidin) und Anserin (ein β -Alanyl-3-methyl-L-histidin Dipeptid) als Fänger von freien Sauerstoffradikalen in Säugerzellen [3]. Eines der Produkte beim Abbau von Uracil ist β -Alanin. Der Abbau von Thymin führt zu einer dem β -Alanin strukturell ähnlichen Aminosäure, der (R)- β -Aminoisobuttersäure. Das (S) Enantiomer von Aminoisobuttersäure entsteht beim Abbau von L-Valin [4,5]. Beide Aminosäuren sind Teil verschiedener Cryptophycine, komplexe Strukturen (Abb. 1), die aus terrestrischen Cyanobakterien der Gattung *Nostoc* [6,7] und aus dem Schwamm *Dysidea arenaria* [8] isoliert wurden.



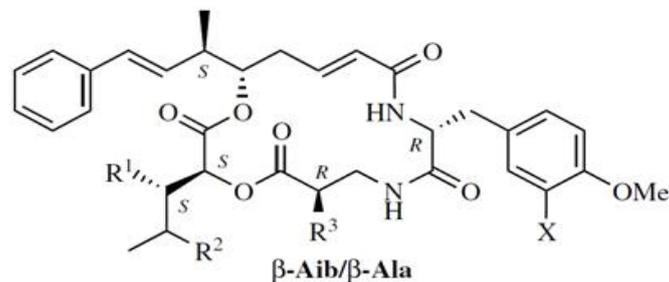
cryptophycin 1 (**94**): $R^1 = \text{Me}$, $R^2 = \text{Me}$, $X = \text{Cl}$

cryptophycin 2 (**95**): $R^1 = \text{Me}$, $R^2 = \text{Me}$, $X = \text{H}$

cryptophycin 16 (**96**): $R^1 = \text{Me}$, $R^2 = \text{H}$, $X = \text{Cl}$

cryptophycin 21 (**97**): $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{Me}$, $X = \text{Cl}$

cryptophycin 24 (**98**): $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{Me}$, $X = \text{H}$



cryptophycin 3 (**100**): $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{Me}$, $R^3 = \text{Me}$, $X = \text{Cl}$

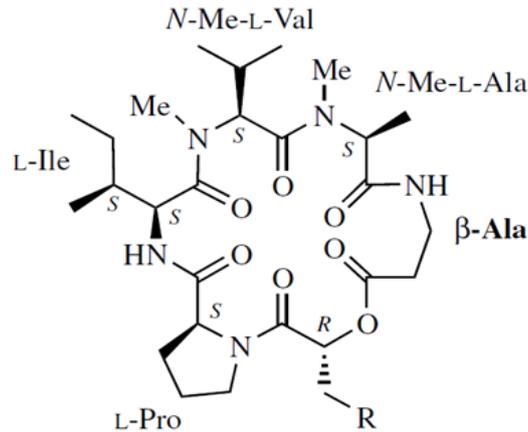
cryptophycin 4 (**101**): $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{Me}$, $R^3 = \text{Me}$, $X = \text{H}$

cryptophycin 18 (**102**): $R^1 = \text{Me}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{Me}$, $X = \text{Cl}$

cryptophycin 29 (**103**): $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{Me}$, $R^3 = \text{H}$, $X = \text{Cl}$

Abbildung 1: Strukturformeln einiger Cryptophycine. β -Aib: β -Aminoisobutyrat, β -Ala: β -Alanin. Oben: wenn $R^1 = \text{H}$ dann ist β -Alanin Bestandteil des Moleküls, ist R^1 eine Methylgruppe ist β -Aminoisobutyrat ein Baustein. Das gleiche gilt für R^3 in dem unteren Teil der Abbildung [9].

Eine weitere Klasse komplexer Moleküle, die β -Alanin enthalten, sind die Destruixine, die erstmals 1961 aus dem entomopathogenen Pilz *Metarrhizium anisopliae* (vormals *Oopstra destructor*) isoliert wurden. In Abb. 2 sind Strukturen verschiedener Destruixine abgebildet. Nach ihrer Entdeckung wurde ihre Struktur aufgeklärt [10,11]. In anderen Pilzen wurden weitere Destruixine entdeckt. Einige der Organismen, aus denen diese zyklischen Peptide isoliert wurden sind *Trichotecium roseum* TT103 [12], *Ophiosphaerella herpotricha* [13] und *Alternaria brassicae* [14]. Destruixine zeigen eine starke insektizide Wirkung, weshalb untersucht wurde, ob sie für den biologischen Pflanzenschutz in Betracht kommen [15]. Es hat sich aber herausgestellt, dass sie auch eine starke phytotoxische Wirkung, insbesondere in der Familie der Brassicaceae, zeigen [16], weshalb es nie zu einer kommerziellen Anwendung gekommen ist.



destruxin A (**9**): R = $-\text{CH}=\text{CH}_2$

destruxin B (**10**): R = *i*-Pr

destruxin C (**11**): R = $-\text{CHMeCH}_2\text{OH}$

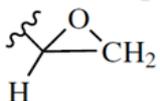
destruxin E (**12**): R = 

Abbildung 2: Strukturen verschiedener Destruxine, zyklischer Peptide, die β -Alanin enthalten [9].

Auch Pflanzen produzieren β -Aminosäuren. So wird zum Beispiel β -Aminobuttersäure, eine andere Bezeichnung für β -Homoalanin, zur Abwehr gegen Fressfeinde produziert [17]. Eine weitere Rolle spielt β -Homoalanin in der Pathogenabwehr in Kartoffeln (*Solanum tuberosum*). Es hat einen Einfluss auf die DNA-Methylierung der Pflanze, was eine Resistenzantwort auf eine Infektion mit dem Pilz *Phytophthora infestans* zur Folge hat [18]. Auch andere nichtproteinogene Aminosäuren dienen der Abwehr von Fressfeinden. In einigen Fabaceen wurden zum Beispiel Analoga der Aminosäure Prolin, nämlich Homoprolin und Homopipercolinsäure (Abb. 3), nachgewiesen [19]. Es wird angenommen, dass sie toxisch auf Bakterien und Tiere wirken, indem sie als Konkurrenten für α -Prolin dienen. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zum Prolin können sie durch die gleichen Transporter aufgenommen werden und so die Transportkapazität für α -Prolin herabsenken. Außerdem ist es möglich, dass sie fälschlicherweise von tRNA-Synthetasen erkannt und auf die Prolin-tRNA übertragen werden. Das führt dazu, dass diese Aminosäureanaloga in Proteine eingebaut werden, wodurch diese eine verminderte Funktion aufweisen können [20]. In Reis (*Oryza sativa*) wurden β -Tyrosin [21] und β -Phenylalanin [22] nachgewiesen. Beide Aminosäuren werden von der Pflanze mittels Aminomutasen aus den jeweiligen α -

Einleitung

Aminosäuren produziert. Ersterer wird eine Rolle in der Allopathie zugesprochen, da es das Wachstum von Dicotyledonen hemmt [23].

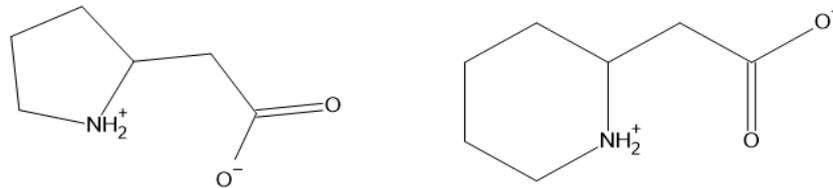


Abbildung 3: Strukturformeln von Homoprolin (links) und Homopipicolinsäure (rechts) [19].

Ein weiteres Beispiel für das Vorkommen von β -Phenylalanin im Reich der Pflanzen ist Paclitaxel, das 1971, damals noch als Taxol bezeichnet, aus der Rinde und den Nadeln der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) isoliert wurde [24]. Später wurde es in weiteren Arten der Gattung *Taxus*, *T. baccata*, *T. cuspidata* und *T. media*, nachgewiesen [25]. Nachdem Paclitaxel und verwandte Moleküle in mehreren Eibenspezies nachgewiesen werden konnten, wurden diese Stoffe auch in Pilzen nachgewiesen, die in Symbiose mit den Bäumen leben [26–28]. Angespornt durch die Nachweise von Paclitaxel in Pilzen wurden auch Bakterien gesucht, die diese Art von Wirkstoff produzieren. Dabei stießen Caruso et al. auf das endophytisch lebende Bakterium *Kitasatospora* sp. [29]. Da es unwahrscheinlich ist, dass so ein komplexes Molekül wie Paclitaxel (Abb. 4) mehrfach in der Evolution entstanden ist, wird davon ausgegangen, dass die Gene, die für die nötigen Proteine kodieren, über horizontalen Gentransfer auf die verschiedenen Organismen gelangt sind [30]. Es ist ungeklärt, welcher Organismus der ursprüngliche Entwickler dieses Genclusters ist, da einige Eigenschaften der Proteine wie z. B. eine Lokalisierungssequenz für Chloroplasten für einen pflanzlichen Ursprung sprechen, aber ein bakterieller Ursprung wahrscheinlicher ist, da hier alle Gene in einem Cluster vorkommen und nicht wie bei Eukaryoten im Genom verteilt sind. Daher wäre bei einem bakteriellen Ursprung nur ein Transfer des gesamten Clusters nötig, während ein eukaryotischer Ursprung mehrere Gentransfers voraussetzen würde [31].

Einleitung

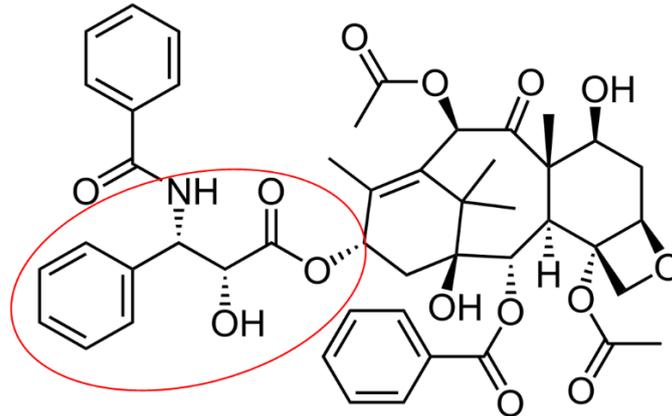


Abbildung 4: Struktur von Paclitaxel. Das rote Oval markiert einen modifizierten β -Phenylalaninrest als zentralen Baustein.

Als Bestandteil von komplexeren Strukturen kommt β -Phenylalanin z.B. in Andrimid und Moiramiden vor. Das sind von Mikroorganismen produzierte Sekundärmetaboliten.

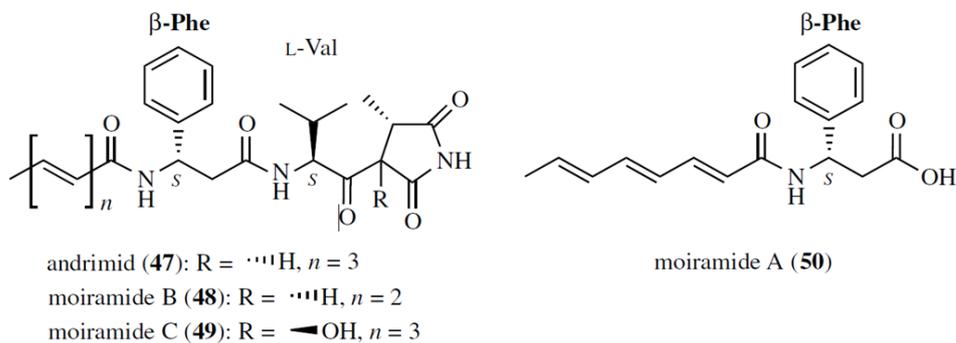


Abbildung 5: Strukturformeln von Andrimid, sowie den Moiramiden A, B und C. β -Phe: β -Phenylalanin [9].

Andrimid (Abb. 5) wurde aus einem intrazellulären Symbionten der braunrückigen Reiszikade (*Nilaparvata lugens*) isoliert. Es zeigt eine starke antimikrobielle Wirkung gegen den Erreger der Bakterienfäule in Reis, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* [32,33]. Die Moiramide, die aus *Pseudomonas fluorescens* isoliert wurden, zeigen eine starke antibiotische Wirkung gegen *Haemophilus influenzae* und *Staphylococcus aureus*, sogar gegen Methicillin resistente Stämme [34].

Einleitung

Die Gruppe der Edeine ist eine weitere Klasse der antibiotisch wirksamen Peptide, die β -Phenylalanin oder β -Tyrosin enthalten. Sie wurden bereits 1959 aus *Bacillus brevis* isoliert [35,36]. Diese Peptide blockieren die Proteinsynthese in Organismen, sowohl bakteriellen als auch eukaryotischen, indem sie mit der kleinen Untereinheit der Ribosomen interagieren und so die Translationsinitiation inhibieren [37].

1.2. Pharmazeutische Anwendungen für nicht proteinogene Aminosäuren

Nicht proteinogene, ungewöhnliche Aminosäuren wie β - und γ -Aminosäuren gewinnen immer mehr Bedeutung für die pharmazeutische Industrie [38,39]. Sie sind wie andere primäre Amine wichtige Bausteine für pharmazeutisch wirksame Moleküle [40–42]. So werden sie für die Synthese von Peptidomimetika verwendet. Das sind Peptide, die aus β -Aminosäuren bestehen. Sie falten sich in ähnliche Sekundärstrukturen wie ihre α -Aminosäureanaloge [43–47]. Diese Peptide werden als Therapeutika in der Krebstherapie verwendet [48]. Der Vorteil der Peptidomimetika gegenüber klassischen, aus α -Aminosäuren hergestellten Peptiden ist die höhere Resistenz gegenüber dem Abbau durch Peptidasen [49–52], wodurch ihre Halbwertszeit verlängert wird. Dadurch verbleiben sie länger im Organismus und können länger wirken um bessere Therapieerfolge zu erzielen. Es wurde eine Methode entwickelt, mit der β -Aminosäuren haltige Peptide *in vitro* hergestellt werden können. Dazu werden zunächst tRNAs *in vitro* mit den gewünschten Aminosäuren, das können β - oder γ -Aminosäuren oder auch D-Aminosäuren sein, beladen. Für die Synthese sind modifizierte Ribosomen nötig, die eine veränderte 23S-rRNA beinhalten. Diese Ribosomen können mit *E. coli* produziert und aus den Zellen isoliert werden. Zusammen mit den tRNAs und einer mRNA werden die modifizierten Ribosomen für eine zellfreie Proteinsynthese verwendet [53].

Kurze Peptide werden nicht nur für die Krebstherapie verwendet. Es gibt auch Anwendungen als Antagonist für Neurorezeptoren. Ein Beispiel hierfür ist das MCH, das „melanin concentrating hormone“. Im Rattenmodell wurde gezeigt, dass dieses Hormon eine Rolle in der Regulation der Nahrungsaufnahme und so indirekt bei der Gewichtszunahme spielt [54]. Auch könnte es an der Entwicklung von Adipositas beteiligt sein. Diese Krankheit ist vor allem in den westlichen Industrieländern eine der größten Gesundheitsgefahren, die sich

Einleitung

zunehmend ausbreitet [55–57]. Ein künstliches Peptid, das β -Leucin (in der Quelle β -Homovalin genannt) enthält, fungiert hier als Antagonist für MCH. Adipöse Mäuse, die eine hochkalorische Diät bekamen und nach einigen Wochen mit diesem Peptid behandelt wurden, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikanten Gewichtsverlust [58].

Die zuvor bereits erwähnten Cryptophycine (Abb. 1) wurden ursprünglich bei einem Screening verschiedener Naturstoffe als Therapeutikum gegen Infektionen mit *Cryptococcus* sp. entdeckt. *In vitro* erwiesen sie sich als wirksam, stellten sich aber als zu toxisch für eine Behandlung der Pilzinfektionen heraus [59]. In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass Cryptophycine eine starke anti-tumor Wirkung aufweisen [6,60,61]. Die Wirkung beruht auf einer der stärksten bekannten Hemmungen des mitotischen Spindelapparats durch Binden an Tubulin. Diese Wirkung tritt bereits bei pikomolaren Konzentrationen auf, was Cryptophycine zu den stärksten bekannten Inhibitoren der Mikrotubuli-Dynamik macht [62]. Viele Krebsarten haben Exporter, die Wirkstoffe wieder aus den Zellen heraus transportieren. Diese erkennen aber nicht alle Cryptophycine, was ihre Wirksamkeit erhöhen dürfte [63]. Aufgrund der komplizierten Synthese und der starken Nebenwirkungen sind trotz fortgehender Untersuchungen noch keine kommerziellen Wirkstoffe erhältlich (Stand 2014) [64,65]. Bei den Cryptophycinen (Abb. 1) 97, 98 und 103 ist β -Alanin ein Baustein. Deswegen fällt an dieser Stelle ein Chiralitätszentrum weg.

Paclitaxel (Abb. 4) ist ebenfalls ein natürlich vorkommendes Molekül, das Potential in der Krebstherapie aufweist. Im Gegensatz zu den Cryptophycinen gibt es bereits kommerzielle Paclitaxel-Präparate. Ein Beispiel hierfür ist der Wirkstoff im Arzneimittel Abraxane[®], ein Präparat zur Herstellung einer Infusionslösung. Das Arzneimittel wird zur Bekämpfung von metastasierten Mammakarzinomen eingesetzt [66]. Paclitaxel kommt in der Natur in sehr geringen Mengen vor. So wird die Rinde von 12 Bäumen benötigt um 1 g des Wirkstoffs zu isolieren [67]. Deshalb und wegen des hohen Zeitaufwands, der für die Isolation nötig ist, wird Paclitaxel mittlerweile teilsynthetisch aus dem wesentlich häufiger vorkommenden Baccatin III synthetisiert. Seit einigen Jahren ist eine biotechnologische Synthese von Baccatin III verfügbar, so dass eine Extraktion aus den Bäumen nicht mehr notwendig ist. Zuerst wurde ein Verfahren in dem Pilz *Flammulina velutipes* entwickelt [68], später folgte eine Möglichkeit zur Synthese in *E. coli* [69]. Auch die Extraktion von Paclitaxel aus Zellkulturen von *Taxus brevifolia* ist eine gängige Methode [70].

Einleitung

Andrimid und die strukturell verwandten Moiramide (Abb. 5) sind nicht ribosomale Hybride aus einem Peptid und einem Polyketid. Von Andrimid ist bekannt, dass es indirekt die Fettsäuresynthese von Bakterien hemmt, indem es die bakterielle Acetyl-CoA Carboxylase blockiert [71]. Dadurch wird das Wachstum der Bakterien gehemmt. Für Moiramid B wurde eine ähnliche Wirkung nachgewiesen, d.h. es hemmt ebenfalls die Acetyl-CoA Carboxylase. Dabei scheint der Schwanz, der einer ungesättigten Fettsäure ähnelt, für den Eintritt in das aktive Zentrum vonnöten zu sein [72].

1.3. Synthesewege für β - und γ -Aminosäuren

Die Synthese von Aminosäuren kann chemisch durch reduktive Aminierung von Ketosäuren durchgeführt werden. Die Doppelbindung zum Sauerstoff der Carbonylgruppe bedeutet, dass sie ein sp^2 hybridisiertes Kohlenstoffatom beinhaltet, weswegen hier noch keine Chiralität vorliegt. Das Molekül wird prochiral genannt, da es nach der Reaktion ein Chiralitätszentrum aufweist. Aufgrund der Gruppe ist das Molekül an dieser Stelle planar. Das hat zur Folge, dass bei der Aminierung ein nucleophiler Angriff von oben oder von unten möglich ist. Nach Ablauf der Reaktion ist das vormals sp^2 hybridisierte Kohlenstoffatom in einen sp^3 Hybridzustand übergegangen. Das Kohlenstoffatom trägt nun vier unterschiedliche Substituenten, wodurch es asymmetrisch, also chiral wird.

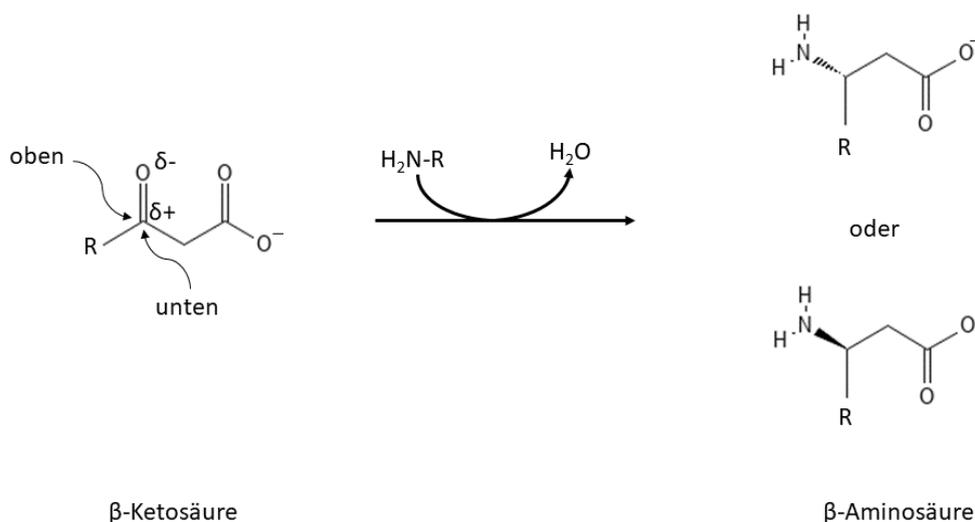


Abbildung 6: Aminierung durch nucleophile Substitution am Beispiel einer β -Ketosäure. $\delta+$ und $\delta-$ zeigen die relevanten Partialladungen, oben bzw. unten markieren die Richtungen, aus der ein Nucleophil (z.B. Ammoniak oder ein Amin) die planare Ketosäure angreifen kann. Bei dem Angriff wird eine Aminogruppe auf die Ketosäure übertragen und Wasser

Einleitung

abgespalten. An der Stelle, an der vorher die Ketogruppe war ist das Molekül nun nicht mehr planar, der Kohlenstoff bildet jetzt einen Tetraeder. Je nachdem ob der Angriff von oben oder unten erfolgt ist, tritt die Aminogruppe aus der Ebene heraus oder in sie hinein, markiert durch den massiven und den gestrichelten Keil.

Da beide Angriffe mit der gleichen Wahrscheinlichkeit erfolgen, liegt am Ende der Aminierung eine Mischung der (R) und der (S) Form in einem Verhältnis von 1:1 vor. Diese Gemische werden Racemate genannt. Meist ist allerdings ein reines Produkt einer Form gewünscht. Beide Enantiomere sehen zwar ähnlich aus. Sie sind jedoch Spiegelbilder. Dadurch können sie deutliche Unterschiede in der Wirkung haben. Im günstigsten Fall hat eines der Enantiomere einfach nur eine geringere oder keine Wirkung. Es kann aber auch vorkommen, dass ein Enantiomer die gewünschte Wirkung erzielt, während das andere schwere Schäden im Patienten verursacht. Ein bekannter Fall, in dem ein Medikament, das als Racemat vorlag, schwere Schäden verursacht hat, ist Thalidomid. Es wurde 1954 entwickelt und als Schlaf- und Beruhigungsmittel unter dem Markennamen Contergan vermarktet. Im Tierversuch wurden nur nicht trächtige Tiere verwendet, bei denen es keine Schäden verursachte. Daher nahm man an, dass es harmlos sei. Ursprünglich sollte es als Therapie für Epilepsie verwendet werden, zeigte da aber keine Wirkung. Die Testpersonen berichteten aber von einer schlafanstoßenden Wirkung, daher wurde es als Schlafmittel vermarktet. Eine weitere Wirkung von Thalidomid war das Lindern der Schwangerschaftsübelkeit, weswegen es gerade für Schwangere empfohlen wurde [73,74]. Erst später stellte sich die stark teratogene Wirkung des (S)-Enantiomers heraus, die auf eine Interaktion mit Cereblon zurückgeführt wird [75]. Diese Interaktion wird als Hauptursache für die Missbildungen angesehen, da das Zielprotein, ein Teil der Ubiquitin Ligase E3, an der Gliedmaßenentwicklung in der Embryonalphase beteiligt ist [76–79]. Das (R)-Enantiomer dagegen hat die gewünschte Wirkung [80]. Das zeigt, wie bedeutsam die Enantiomerenreinheit von medizinisch verwendeten Substanzen ist, damit sich ein solcher Fall nicht wiederholt.

Die Produktion enantiomerenreiner Aminosäuren ist chemisch sehr aufwendig und erfordert kostenintensive stereoselektive Katalysatoren [81–83]. Stehen solche Katalysatoren nicht zur Verfügung, müssen die Racemate aufwändig getrennt werden. Dazu müssen die beiden Isomere zunächst stereoselektiv derivatisiert werden, damit sie unterschiedliche Retentionszeiten bekommen. Dann kann eine chromatografische Auftrennung erfolgen. Im

Einleitung

Anschluss daran müssen die Derivatisierungsreagenzien wieder restlos entfernt werden, was weitere Reinigungsschritte erfordert. Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde in den letzten Jahrzehnten nach alternativen Produktionswegen gesucht. Besonders die enzymatische Produktion mit ω -Transaminasen rückte dabei in den Fokus des Interesses [84].

Eine Möglichkeit enantiomerenreine β - oder γ -Aminosäuren zu produzieren, ist die kinetische Auflösung eines zuvor chemisch produzierten racemischen Gemisches einer Aminosäure. Dafür werden ω -Transaminasen verwendet [85–90]. Diese Enzyme desaminieren selektiv eines der Stereoisomere, im Idealfall bis unter die Nachweisgrenze, das andere wird nicht abgebaut. Die Aminogruppe des abgebauten Enantiomers wird dabei auf einen Aminoakzeptor übertragen. Dadurch wird die Trennung mittels stereoselektiver Derivatisierung unnötig. Auch das Entfernen des chiralen Derivatisierungsreagenz entfällt. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass ein Enantiomer dabei verloren geht. Dadurch wird die Ausbeute der chemischen Synthese um 50 % gemindert. Das Reaktionsschema ist beispielhaft für β -Aminosäuren in Abb. 7 dargestellt, die Reaktion läuft mit γ -Aminosäuren gleich ab.

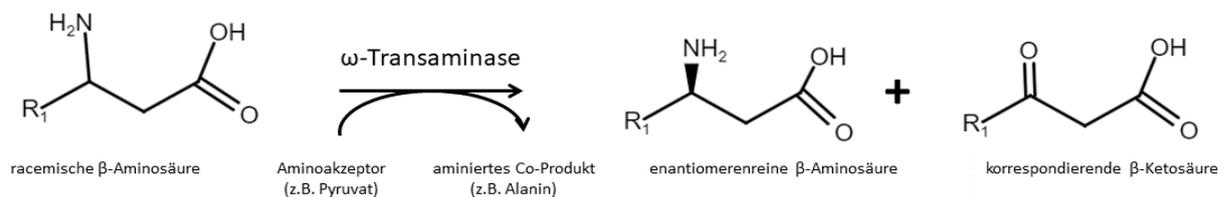


Abbildung 7: Reaktion der kinetischen Auflösung von β -Aminosäuren mit Hilfe von ω -Transaminasen.

Eine weitere Methode der enantiomerenreinen Produktion ist den letzten Schritt der Synthese nicht chemisch, sondern enzymatisch durchzuführen. Dieser Vorgang wird asymmetrische Synthese genannt. Auch hier können ω -Transaminasen verwendet werden. Im Falle der Aminosäureproduktion wird dabei von einer prochiralen Ketosäure ausgegangen. Prochiral bedeutet, dass das Vorläufermolekül eine funktionelle Gruppe an der Stelle trägt, an der sich später ein Chiralitätszentrum befindet. In diesem Fall handelt es sich um eine Ketogruppe, die durch reduktive Aminierung zu einer Aminogruppe wird. Auf die Ketogruppe dieser Säure wird die Aminogruppe eines Aminodonors übertragen. Aufgrund

Einleitung

der Stereoselektivität der Enzyme wird nur ein Enantiomer gebildet. Auch diese Methode hat gewisse Nachteile, es sind zwar theoretisch Ausbeuten von 100 % möglich, praktisch liegt das Gleichgewicht aber auf der Seite der Edukte, selbst bei einem zehnfachen Überschuss an Aminodonor [91].

Es gibt verschiedene Ansätze das Gleichgewicht zu verschieben, ein Beispiel hierfür ist die Verwendung von 2-Aminopropan als Aminodonor. Durch das Entfernen der Aminogruppe wird daraus Dimethylketon, welches leicht in die Gasphase übergeht, wenn die Reaktion im Unterdruck durchgeführt wird [92]. Eine weitere Methode ist der Mehrphasenansatz, dabei wird dem Reaktionsgemisch eine hydrophobe Phase zugegeben, darüber befindet sich eine weitere Phase mit anderem pH-Wert. Das produzierte Amin, welches auch als Inhibitor für die Reaktion fungiert, wandert in die obere Phase, da es bei dem pH-Wert besser löslich ist. So ist es für eine Rückreaktion nicht mehr verfügbar und kann auch nicht mehr als Inhibitor wirken [93].

Eine dritte Methode ist die Verwendung eines Aminodonors, der nach der Desaminierung polymerisiert und ausfällt [94]. Die erste und die dritte Methode haben gemeinsam, dass der Aminodonor, der durch die Transaminierung zu einem potenten Aminoakzeptor wird, dem System nach der Reaktion entzogen wird und so einer möglichen Rückreaktion nicht mehr zur Verfügung steht. Ein weiteres Problem der asymmetrischen Synthese betrifft die Produktion von β -Aminosäuren. Der prochirale Ausgangsstoff ist in diesem Fall eine β -Ketosäure, diese sind in wässriger Lösung allerdings instabil und tendieren dazu die Carboxylgruppe abzuspalten. Daher muss in diesem Fall ein entsprechender Ester eingesetzt werden. Zusätzlich wird eine Lipase benötigt, die den Ester spaltet und so kurzfristig für die Synthese verfügbar macht. Es wurde auch von einer ω -Transaminase berichtet, die in der Lage ist, den Ester einer β -Ketosäure zu aminieren, so dass der Ester nach der Reaktion hydrolysiert werden kann [95]. Das Reaktionsschema für die asymmetrische Synthese von β -Aminosäuren nach der Esterhydrolyse ist in Abb. 8 dargestellt.

Einleitung

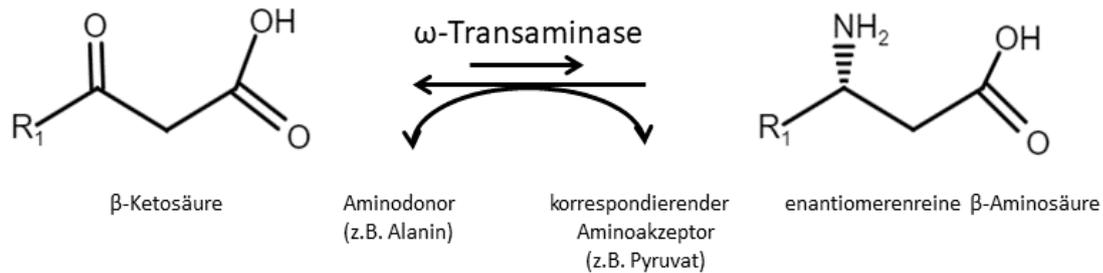


Abbildung 8: Reaktionsschema der asymmetrischen Synthese am Beispiel von β -Aminosäuren. Die β -Ketosäure muss direkt vor der Reaktion bereitgestellt werden, damit vor sie der Aminierung nicht decarboxylieren kann. Da das Gleichgewicht auf der Seite der Edukte liegt, ist der Pfeil der Hinreaktion kürzer als der Pfeil der Rückreaktion dargestellt.

Neben den ω -Transaminasen gibt es noch die Möglichkeit α -Aminosäuren in β -Aminosäuren umzuwandeln. Dazu werden Aminomutasen verwendet. Diese Enzyme sind in der Lage die Aminogruppe ihrer Substrate reversibel von der α -Position in die β -Position zu verschieben. Neben Aminosäuren können auch andere Amine mit ω -Transaminasen hergestellt werden. Einer der ersten erfolgreichen Versuche, eine ω -Transaminase für die Synthese eines komplexen Amins zu modifizieren, wurde bereits im Jahr 2010 von dem Pharmakonzern Merck & Co, Inc. durchgeführt. Dabei wurde ein Enzym von *Arthrobacter* sp. so modifiziert, dass es den letzten Schritt der Synthese von Sitagliptin durchführen kann [96]. Sitagliptin ist ein Medikament gegen Diabetis Mellitus Typ 2.

1.4. ω -Transaminasen

Wie andere Transaminasen gehören auch ω -Transaminasen in die Enzymklasse 2.6.1.X. Im Gegensatz zu α -Transaminasen sind sie nicht strikt an α -Ketosäuren bzw. α -Aminosäuren als Substrat angewiesen. Sie verwenden β - oder γ -Ketosäuren als Aminoakzeptor, aber meist auch Pyruvat oder Glutamat. Einige Enzyme akzeptieren sogar β - und γ -Ketosäuren bzw. Aminosäuren als Substrate. Ein weiterer Unterschied ist, dass Transaminasen häufig auch Amine als Substrat akzeptieren, die von α -Transaminasen nicht verwertet werden können [40]. Den α -Transaminasen gemein haben die ω -Transaminasen die Abhängigkeit von Pyridoxalphosphat (PLP). Das PLP ist kovalent an einen Lysinrest des Enzyms gebunden. Dieses Lysin ist für die Katalyse verantwortlich. Die meisten ω -Transaminasen liegen als Homodimer vor. Die Enzyme haben zwei aktive Zentren, die sich an den Kontaktflächen der

Monomere befinden. Neben dem einem Lysinrest, der die Katalyse durchführt, gehören noch zwei Hohlräume, Taschen genannt, zu einem aktiven Zentrum. Eine Tasche befindet sich auf der Seite des Phosphatrestes vom PLP, daher wird sie P-Tasche genannt. In dieser Region befindet sich ein Argininrest, der eine Salzbrücke zu der Carboxylgruppe einer als Substrat gebundenen β - oder γ -Aminosäure ausbildet. Auf der Seite mit der Carbonylgruppe des PLPs befindet sich die O-Tasche. Sie wird aufgrund des Sauerstoffs der Carbonylgruppe so genannt. Hier wird die Seitenkette von Aminosäuren gebunden. Im ruhenden Enzym ist das PLP kovalent über eine Schiff'sche Base an den katalytischen Lysinrest gebunden. Dieser Zustand wird inneres Aldimin genannt. Während der Katalyse tritt ein Aminodonor ein und das innere Aldimin wird zu einem äußeren Aldimin. Die Schiff'sche Base bildet sich nun zwischen dem PLP und dem eingetretenen Amin bzw. der Aminosäure. Das katalytische Lysin entzieht dem Aldimin ein Wasserstoffatom, wodurch das Aldimin über eine chinoide Struktur in ein Ketimin übergeht. Das Proton wird an den Ring des Pyridoxals zurückgegeben und die Aminogruppe des Substrates wird hydrolytisch auf das PLP übertragen, so dass sich ein Pyridoxamin bildet. Beim Übertragen der Aminogruppe auf den Aminoakzeptor läuft der Mechanismus genau anders herum [97]. Die Stereospezifität kommt dadurch zustande, dass sowohl das katalytische Lysin, als auch das PLP nicht frei beweglich sind, sondern fest im Enzym gebunden sind. Außerdem wird auch das Substrat über verschiedene Wechselwirkungen mit anderen Aminosäuren wie z.B. dem Arginin in der O-Tasche und weiteren Resten in der P-Tasche fixiert. Daher kann die Aminogruppe nur aus einer Richtung übertragen werden.

1.5. Die Donororganismen

Es wurden ω -Transaminasen aus drei mesophilen und einem thermophilen Bakterium, sowie aus einer dimorphen, ascomycetalen Hefe gewonnen. Diese Organismen werden im Folgenden vorgestellt.

1.5.1. *Variovorax boronicumulans*

V. boronicumulans ist ein mesophiles, aerobes Bakterium, das ursprünglich aus Bodenproben in Tokyo, Japan isoliert wurde. Es ist stäbchenförmig, gramnegativ und bildet dementsprechend keine Sporen. Die Zellen sind peritrich begeißelt. *V. boronicumulans* gehört zu den Betaproteobacteria [98]. Es wächst bei Temperaturen von 4 – 37 °C, die Optimaltemperatur beträgt 30 °C [99]. Bei Temperaturen ≥ 45 °C ist kein Wachstum mehr zu beobachten. Der pH Bereich, in dem *V. boronicumulans* wachsen kann, erstreckt sich von pH 5-7 mit einem Optimum bei pH 7. Bei höheren oder niedrigeren pH-Werten wächst dieses Bakterium nicht mehr. Das Genom ist etwa 6,7 MB groß. Der Typenstamm hat einen GC Gehalt von 71,2 % [100]. Da *V. boronicumulans* H₂ nicht als Energiequelle verwerten kann, gehört es zum Biotyp II innerhalb der Gattung [101], was bedeutet, dass es rein chemoheterotroph ist. Wie für die Gattung *Variovorax* üblich [102], und wie der Name schon sagt, kann auch *V. boronicumulans* eine Vielzahl an C-Quelle verwerten. Darunter finden sich u. a. Arabinose, Mannitol, Citrat, Malat und Caprinsäure (Decansäure) [100].

1.5.2. *Sphaerobacter thermophilus*

Sphaerobacter thermophilus ist ein thermophiles Bakterium, das aus Klärschlamm eines Münchener Klärwerks isoliert wurde [103]. Die Art wurde ursprünglich in die Gruppe der Actinomycetes gestellt [104]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass es der Klasse Thermomicrobia zuzuordnen ist [105]. Bis heute ist es die einzige bekannte Art der Gattung *Sphaerobacter*. Ihr Genom hat eine Größe von etwa 4 MB und einem GC Gehalt von 68,1 % [106]. *S. thermophilus* ist grampositiv, produziert aber keine Sporen. Die optimale Wachstumstemperatur ist 55 °C, der Organismus wächst aber auch bei höheren Temperaturen. Isoliert wurde er bei 60 °C. Der optimale pH-Wert liegt bei 8,5. Die Zellen sind stäbchenförmig und nicht motil. *S. thermophilus* ist obligatorisch aerob [104].

1.5.3. *Lysinibacillus sphaericus*

Lysinibacillus sphaericus [107] wurde bis 2007 als *Bacillus sphaericus* [108] bezeichnet. Diese Art ist grampositiv und stäbchenförmig. Sie ist in der Lage Sporen zu bilden. Es ist eine terrestrische Art, die natürlicherweise in Böden vorkommt. Besonderheiten dieser Spezies sind die hohe Resistenz gegen Schwermetalle und die Pathogenität für viele Insekten [109,110]. Letzteres ergab eine kommerzielle Nutzung als Schutz gegen Mücken, da die vegetativen Zellen schädlich für die Gelbfiebermücke *Aedes aegypti* und die Stechmücke *Culex quinquefasciatus* sind. Die Stechmücke wird auch durch die Sporen von *L. sphaericus* gehemmt [111,112]. Die optimale Wachstumstemperatur beträgt 30 °C [113].

1.5.4. *Priestia megaterium*

Priestia megaterium wurde 1884 als *Bacillus megaterium* beschrieben, wurde 2020 aber aufgrund phylogenetischer Analysen in die Gattung *Priestia* gestellt [114]. Die Art ist grampositiv, stäbchenförmig und bildet Sporen. Im Vergleich zu anderen Bakterien ist es sehr groß. Die Zellen werden bis zu 2 µm breit und 5 µm lang [115]. Die optimale Wachstumstemperatur beträgt 30 °C [116].

1.5.5. *Blastobotrys raffinosifermentans*

Blastobotrys raffinosifermentans ist eine ascomycetale, dimorphe Hefe. Sie wurde 1983 erstmals in den Niederlanden aus Bodenproben eines Hühnergeheges isoliert [117] und ursprünglich als Isolat TOA-3 bezeichnet. Aufgrund weiterer Untersuchungen zur Charakterisierung des Isolates, unter anderem zur Fähigkeit des Isolats Adenin als alleinige C- N- und Energiequelle zu verwenden, wurde das Isolat 1984 als *Trichosporon adeninovorans* CBS 8244T klassifiziert [118]. Dieser Stamm zeichnet sich durch sein Potential aus, verschiedene Amine und Purine wie Adenin als C- und N-Quelle zu assimilieren. Im gleichen Jahr wurden weitere *T. adeninovorans* Stämme isoliert. Drei aus Maissilage in den Niederlanden [119], weitere vier aus humusreichen Böden in Südafrika [120] und der Stamm

Einleitung

LS3, welcher physiologische Ähnlichkeiten zu CBS 8244T aufweist, aus Holzhydrolysaten in Sibirien. LS3 wurde zunächst als *Trichosporon* spec. LS3 bezeichnet. Genomvergleiche zeigten, dass der Stamm LS3 aufgrund von starken Homologien zum Typenstamm CBS 8244T ebenfalls zur Art *T. adenivorans* zuzuordnen ist [121]. Im Jahr 1990 wurde schließlich *Arxula* als Gattungsname für xerotolerante, ascomycetale anamorphe Hefen, die ein Arthroconidium bilden und zur Nitratassimilation fähig sind, vorgeschlagen [120], so dass aus *Trichosporon adenivorans* LS3 *Arxula adenivorans* LS3 wurde, d.h. der Gattungs- und Artnamen wurden geändert. Im Jahr 2006 führten erneute phylogenetische Analysen der drei Kladen *Trichomonascus*, *Wickerhamiella* und *Zygoascus* mit den zugehörigen anamorphen Gattungen *Arxula*, *Blastobotrys*, *Sympodiomyces* und *Trigonopsis* zu einer weiteren Neuklassifizierung des Stammes LS3. Untersucht wurden dabei die DNA Sequenzen der rDNA der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit und der Cytochrom Oxidase II. Diese Sequenzvergleiche führten dazu, dass die Gattungen *Arxula*, *Blastobotrys* und *Sympodiomyces* in die Klade *Trichomonascus* gestellt wurden. Der Gattung *Blastobotrys* wurde dabei Priorität zugeordnet [122]. Das führte dazu, dass der Stamm LS3 2019 als *Blastobotrys adenivorans* klassifiziert wurde. In tiefergehenden Genotypisierungen von *B. adenivorans* und *B. raffinosifermentans* mittels der Vergleiche von Spacer DNA zwischen den rDNA Genen und anschließendem AluI Verdau (IGSAF-Technik), einer Methode, die schon zuvor zur Klassifizierung nahe verwandter Hefespezies verwendet wurde [123,124], stellte sich heraus, dass der Stamm LS3 nicht zur Art *B. adenivorans* sondern zur Art *B. raffinosifermentans* gehört [125,126]. Diese Einteilung ist bis zum heutigen Datum gültig.

Neben anderen Spezies wie *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* oder *Hansenula polymorpha* wird auch *B. raffinosifermentans* LS3 zu sogenannten nicht-konventionellen Hefen gezählt. Diese Organismen finden vielfältige Anwendungen in der Biotechnologie [127–130]. *B. raffinosifermentans* LS3 weist besonders viele für die Biotechnologie interessante Eigenschaften auf. Eine dieser Eigenschaften ist die hohe Thermotoleranz und der große Temperaturbereich, in dem der Stamm wachsen kann. Der Bereich, in dem Wachstum möglich ist, erstreckt sich von 30-48 °C. Interessanterweise tritt bei höheren Temperaturen ein Wandel der Zellmorphologie ein. Wachsen die Zellen bei 30 °C zeigen sie eine typische Hefemorphologie; runde Zellen, die sich durch Knospung vermehren. Mit steigender Temperatur werden die Zellen länger, bis sie bei 42 °C in ein Hyphen bildendes Stadium übergehen. Dieser Übergang ist reversibel, d.h. sinkt die

Einleitung

Temperatur wieder, kehren die Zellen zurück zum einzelligen Stadium. Bis 48 °C ist es den Zellen möglich zu wachsen, Temperaturen bis zu 55 °C überleben sie für einige Stunden [131]. Falls nötig kann die Hyphenform auch durch Anwesenheit von Cd²⁺ Ionen und Tocopherol bei niedrigeren Temperaturen induziert werden, das einzellige Stadium wird durch NaCl und Tunicamycin stabilisiert. Mit dem Wechsel der Zellmorphologie geht auch eine Änderung im Proteinexpressionsmuster einher, wodurch eine temperaturinduzierte Expression von Zielproteinen denkbar ist. Außerdem verändern sich zum Teil auch die posttranslationalen Modifikationen der Proteine [132,133]. Es ist mittlerweile auch ein *B. raffinosifermentans* Stamm verfügbar, der aufgrund einer natürlichen Mutation auch bei niedrigen Temperaturen in der Hyphenform wächst. Dieser Stamm wird als *B. raffinosifermentans* 135 bezeichnet.

Zusätzlich zu der hohen Thermotoleranz weist *B. raffinosifermentans* auch eine hohe Halotoleranz auf, was für einige biotechnologische Prozesse von Vorteil ist. Konzentrationen bis zu 10 % NaCl im Medium beeinflussen *B. raffinosifermentans* nicht. NaCl Konzentrationen von 10-20 % werden zwar toleriert, führen aber zu langsamerem Wachstum und einer niedrigeren Zellzahl in der stationären Phase. Erreicht wird diese Toleranz durch eine Akkumulation von Glycerin in den Zellen während der exponentiellen Phase. Die hohen Salzkonzentrationen führen allerdings zu einem verändertem Sekretionsverhalten. So werden zum Beispiel Glucoamylase und Invertase nur in Medien mit weniger als 10 % NaCl sekretiert [134].

Intensive genetische Untersuchungen in den vergangenen 30 Jahren haben ergeben, dass *B. raffinosifermentans* einen für ascomycetale Hefen üblichen DNA-Gehalt von etwa 25 fg pro Zelle aufweist. Das Genom hat eine Größe von etwa 11,8 MB und ist auf 4 Chromosomen verteilt. *B. raffinosifermentans* ist haploid. Das Genom wurde 2014 sequenziert [135].

Das Genom codiert für drei potentielle ω -Transaminasen. Eine Charakterisierung dieser Enzyme könnte das ohnehin schon große biotechnologische Potential dieser Hefe erweitern. Aufgrund ihres breiten physiologischen Spektrums ist sie bereits jetzt sehr interessant für die Biotechnologie [136,137]. So wurden zum Beispiel die Purin- und n-Butanol-Stoffwechselwege aufgeklärt, wodurch sich Möglichkeiten für die Produktion von an Purin bzw. Harnsäure armen Nahrungsmitteln ergeben [138–141], was besonders für Personen mit Neigung zu Gicht interessant ist. Einige Untersuchungen des n-Butanol Stoffwechsels

haben zu Anwendungen von *B. raffinosifermentans* Stämmen für die Butanol-Produktion geführt [142–144]. Neben der n-Butanolsynthese wurden auch Stämme konstruiert, die 3-Hydroxybutyrat produzieren, was für die Herstellung von biologischen Kunststoffen verwendet wird [145,146]. Auch andere, sekundäre Alkohole können mit *B. raffinosifermentans* als Ganzzellkatalysator oder mit Enzymen dieser Hefe enantiomerenrein produziert werden [147–150]. Weitere Anwendungen findet *B. raffinosifermentans* als biologische Komponente von Biosensoren, die Xenobiotika, Pharmazeutika, Hormone und hormonähnliche Substanzen nachweisen [151–157].

Neben all diesen unterschiedlichen Anwendungen scheint *B. raffinosifermentans* auch in der Lage zu sein ω -Transaminasen zu produzieren, da drei der Proteine von *B. raffinosifermentans* der PF00202.21, also der Familie AMINOTRAN_3 [158], zugeordnet werden konnten. Dadurch könnte sie auch in der Produktion enantiomerenreiner β - oder γ -Aminosäuren eingesetzt werden.

1.6. Zielstellung der Arbeit

Mikroorganismen wie Bakterien und Hefen haben in den letzten Jahrzehnten ein enormes Potential in der Synthese verschiedener organischer Substanzen gezeigt. Die stetig wachsende Anzahl an bekannten und kultivierbaren Mikroorganismen vergrößert das Repertoire an verfügbaren Enzymen, die für verschiedene Synthesen verwendet werden können. Viele dieser Proteine sind bislang nur theoretisch annotiert. Somit ist die Festlegung des Leserahmens und die Funktion nicht experimentell bestätigt. Ein Ziel dieser Arbeit ist zu versuchen, die Richtigkeit für einige dieser rechnergestützten Vorhersagen zu bestätigen.

Auch die Hefe *B. raffinosifermentans*, insbesondere der Stamm LS3, hat ein großes biotechnologisches Potential und wird schon für eine breite Palette an Anwendungen verwendet [151-157]. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es zu prüfen, ob *B. raffinosifermentans* LS3 auch ω -Transaminasen produziert und so für den Einsatz in der Produktion von ungewöhnlichen Aminosäuren oder auch von Aminen in Frage kommt. Dazu werden die als AMINOTRAN_3 eingruppierten Proteine auf ihre ω -Transaminaseaktivität getestet und, falls sie aktiv sind, biochemisch charakterisiert. Im Proteom von *B.*

Einleitung

raffinosisfermentans LS3 konnten drei Proteine der Pfam PF00202.21 zugeordnet werden, das ist die Nummer der AMINOTRAN_3 Familie. Daher ist es wahrscheinlich, dass *B. raffinosisfermentans* LS3 in der Lage ist ω -Transaminasen zu produzieren. Diese Proteine werden auf ω -Transaminaseaktivität geprüft.

Um diese Ziele zu erreichen werden Überexpressionsmutanten erstellt die rekombinante Versionen dieser Proteine produzieren. Die rekombinanten Varianten der Enzyme tragen einen C-terminalen His-tag, mit dem sie mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatografie aus dem Zellextrakt extrahiert werden können. Für die prokaryotischen Enzyme wurde *E. coli* BL21DE3 als Expressionssystem gewählt. Die potentiellen ω -Transaminasen von *B. raffinosisfermentans* wurden in einer Deletionsmutante, die auxotroph für Tryptophan ist produziert. Es handelt bei dieser Mutante um *B. raffinosisfermentans* G1212 [*aleu2 atrp1:ALEU2*] [1].

Als dritte Zielstellung wird eine bekannte ω -Transaminase modifiziert, um zum einen die Aktivität des Enzyms zu erhöhen, und um zum anderen durch die Modifikationen eine Einsicht in die Rolle einzelner Aminosäurereste des Proteins zu erhalten. Insgesamt werden 17 Varianten des Enzyms hergestellt, die wie die anderen Proteine, die im Laufe dieser Arbeit produziert werden, einen C-terminalen His-tag tragen. Bei 15 Modifikationen handelt es sich um Anpassungen an ein potentiell Motiv für aromatische ω -Transaminasen. Die beiden anderen Modifikationen sind Veränderungen des aktiven Zentrums. Da es sich bei dem ursprünglichen Enzym um ein Protein eines Bakteriums handelt, wurden das Wildtypenzym und dessen Varianten ebenfalls mit *E. coli* BL21DE3 produziert.

Die gereinigten Enzyme wurden hinsichtlich ihrer Aktivität mit verschiedenen β - und γ -Aminosäuren getestet. Enzyme, die Aktivität zeigten, wurden dann weiter hinsichtlich pH und Temperaturoptimum und Temperaturstabilität getestet.

Für eine biotechnologische Anwendung ist es notwendig, große Mengen der Enzyme zu produzieren. Dazu werden verschiedene Fermentationsstrategien getestet, um herauszufinden wie die Proteinausbeute erhöht werden kann.

2. Material und Methoden

2.1. Bakterienstämme

Für die Plasmidamplifikation wurde *E. coli* XL1 blue (Genotyp *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIQΔM15 Tn10 (Tetr)*]) von Stratagene verwendet. Die Proteinexpression erfolgte in *E. coli* BL21DE3 (Genotyp F-*ompT hsdSB (rB-, mB-) gal dcm* (DE3)), ebenfalls von Stratagene.

V. boronicumulans wurde bei der DSMZ (Bestellnummer 21722) erworben, ebenso *Paraburkholderia phytofirmans* (Bestellnummer 17436) und *P. graminis* (Bestellnummer 17151).

2.2. Hefestämme

Für die Vortests und als Donororganismus für die DNA-Isolation wurde der Wildtyp *B. raffinosifermentans* LS3 verwendet. Als Produktionsstamm für die rekombinanten Hefeproteine wurde die für Tryptophan auxotrophe Mutante *B. raffinosifermentans* LS3 G1212 [*aleu2 atrp1:ALEU2*] [1] verwendet.

2.3. Medien für die Kultivierung

Sämtliche *E. coli* Stämme wurden bei 37 °C in LB-Medium (20 g L⁻¹, Carl Roth, Katalognummer: X964.4) kultiviert. Bei Kultivierungen von Stämmen, die den pET21b (+) Vektor enthielten, wurden 50 µg L⁻¹ Ampicillin zum LB-Medium gegeben. *E. coli* Stämme, die den XPLOR®3 Vektoren enthielten, wurden mit 50 µg L⁻¹ Kanamycin im Medium kultiviert.

Die *Bacillus*-Stämme der Stammsammlung wurden ebenfalls in LB-Medium, allerdings ohne Antibiotikum, kultiviert.

Für die Produktion größerer Enzymmengen wurden die *E. coli* BL21DE3 Stämme in einem Fermenter in 3 L LB-Medium angezogen. Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase

Material und Methoden

wurde LB haltige Glukoselösung (Tab. 1) zugefüttert, um das Wachstum wieder anzuregen und die Zellzahl zu erhöhen.

Tabelle 1: Zusammensetzung der LB haltigen Glukoselösung.

Medienbestandteil	Menge
Glukose	400 g
LB-Medium	20 g
A. dest.	ad 1000 ml

Nach dem Zusammengeben der Bestandteile wurden die Glukose und das LB-Medium über Nacht bei 30 °C unter Rühren gelöst und anschließend sterilfiltriert.

Die Kultivierung von *V. boronicumulans*, *Paraburkholderia phytofirmans* sowie *P. graminis* erfolgte aufgrund der Empfehlung der DSMZ in sogenanntem 535 Medium (Tab. 2).

Tabelle 2: Zusammensetzung von Medium 535. Der pH-Wert wurde auf 7,3 eingestellt.

Medienbestandteil	Menge
tryptische Sojabröhe (Oxoid CM129)	30,0 g
A. dest.	1000 ml

M. loti wurde in Medium 98, wieder eine Empfehlung der DSMZ, angezogen.

Tabelle 3: Zusammensetzung Medium 98. Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

Medienbestandteil	Menge
Hefeextrakt	1,0 g
Mannitol	10,0 g
Bodenextrakt (siehe Tab. 4)	200,0 ml
A. dest.	800,0 ml

Material und Methoden

Tabelle 4: Zusammensetzung des Bodenextrakts für Medium 98.

Medienbestandteil	Menge
luftgetrocknete Gartenerde	80,0 g
Na ₂ CO ₃	0,2 g
A. dest.	200,0 ml

Der Extrakt wurde eine Stunde bei 121 °C autoklaviert und anschließend filtriert, um die unlöslichen Bestandteile der Erde zu entfernen. Im Anschluss daran wurde der pH-Wert auf 7,2 eingestellt.

B. raffinosifermentans LS3 wurde im Hefeminimalmedium (HMM, Tab. 5) kultiviert.

Tabelle 5: Zusammensetzung HMM.

Medienbestandteil	Menge
NaNO ₃	43,5 mmol l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	49,6 mmol l ⁻¹
K ₂ HPO ₄	10,0 mmol l ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4,1 mmol l ⁻¹
Spurenelemente (Tab. 6)	0,1 % (v/v)
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	84,7 μmol l ⁻¹
FeCl ₃ ·6H ₂ O	7,4 μmol l ⁻¹

Das Ca(NO₃)₂ wurde als Stammlösung (20 g L⁻¹) angesetzt, das FeCl₃ lag als 2 g L⁻¹ Lösung vor.

Material und Methoden

Tabelle 6: Zusammensetzung der Spurenelemente für das HMM.

Medienbestandteil	Menge
H ₃ BO ₃	8,1 mmol l ⁻¹
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,4 mmol l ⁻¹
KI	0,6 mmol l ⁻¹
MnSO ₄ ·4H ₂ O	1,8 mmol l ⁻¹
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,4 mmol l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,8 mmol l ⁻¹
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,4 mmol l ⁻¹

Tabelle 7: Vitaminmix für das HMM. Der Vitaminmix wurde sterilfiltriert, nicht autoklaviert.

Medienbestandteil	Menge
Biotin	16,4 µmol l ⁻¹
Ca-D-Pantothenat	1,7 mmol l ⁻¹
Inosit	22,2 mmol l ⁻¹
Nikotinsäure	0,8 mmol l ⁻¹
Pyridoxin	2,4 mmol l ⁻¹
Thiamindichlorid	1,2 mmol l ⁻¹

Nach dem Autoklavieren des HMM wurden 0,5 % (v/v) Vitaminmix und als C-Quelle 2 % (w/v) Glukose zugegeben. Die Glukose wurde als 20 %ige Stammlösung angesetzt und sterilfiltriert.

Es wurden Wachstumsversuche mit *B. raffinosifermentans* durchgeführt, um zu untersuchen ob die Hefe β -Aminosäuren als N-Quelle verwenden kann. Dazu wurde die Hälfte des NaNO₃ und des Ca(NO₃)₂ durch die entsprechenden Chloride ersetzt. Diese HMM-Variante wird als 0,5 N bezeichnet. Für weitere Versuche wurde der fehlende Stickstoff durch äquimolare Mengen an β -Phenylalanin bzw. β -Homoalanin ergänzt.

SOC-Medium

Nach der Transformation der *E. coli* Stämme XL1 und BL21DE3 wurde SOC Medium für die Regeneration der Zellen benötigt. Dazu wurde zunächst SOB-Medium (Carl Roth, Katalognummer: AE27.1) nach Herstellerangaben angesetzt. Nach dem Autoklavieren wurden 20 mmol L⁻¹ Glukose zugegeben.

2.4. Kultivierung von *E. coli* XL1

Nach der Transformation wurden die Transformationsansätze in eine 50 µl und eine 150 µl Portion aufgeteilt und auf LB-Platten ausgestrichen. Je nachdem, ob mit dem pET-21b+ Vektor oder dem XPLO^R3 Vektor transformiert wurde, enthielten die Platten 50 µg ml⁻¹ Ampicillin bzw. 50 µg ml⁻¹ Kanamycin als Selektionsmarker. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet.

Am nächsten Tag wurden 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer Kolonie angeimpft und wieder über Nacht bei 37 °C und 180 UPM bebrütet. 1 ml der Kultur wurde für eine Glycerinkultur verwendet. Dazu wurde 1 ml steriles Glycerin zu 1 ml Kultur gegeben und durch mehrfaches Invertieren miteinander vermischt. Anschließend lagerten die Glycerinkulturen bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung. Die übrigen 2 ml Kultur wurden für eine Plasmidisolierung verwendet.

2.5. Kultivierung weiterer Bakterien- und Hefestämme

Da für die Vortests nur geringe Enzymmengen nötig waren, wurden zunächst alle Stämme in kleinem Maßstab in ihren entsprechenden Medien angezogen. 2 ml Medium wurden mit 100 µl Glycerinkultur angeimpft und über Nacht geschüttelt. Mit diesen Vorkulturen wurden dann 20 ml Hauptkulturen auf eine OD_{600nm} angeimpft. Die OD wurde stündlich bestimmt. Dazu wurden 100 µl Kultur in 900 µl frischem Medium verdünnt und anschließend photometrisch bei 600 nm gemessen. Beim Erreichen der stationären Phase wurden die Zellen geerntet und mit einer Kugelmühle aufgeschlossen. Dazu wurde 1 ml Kultur zusammen mit 500 µl Glasperlen (0,5 mm Durchmesser, Katalognummer N034.1, Carl Roth,

Karlsruhe) in ein 2 ml Gefäß gegeben. Der Aufschluss erfolgte in einer Schwingmühle (Retsch MM 400, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) für 30 s bei 30 Hz. Die Röhrchen befanden sich dabei in einem Adapter, der vor dem Aufschluss bei -20 °C gelagert wurde. Mit den Rohextrakten wurden erste Aktivitätstests durchgeführt, um festzustellen, ob überhaupt ω -Transaminaseaktivität vorliegt. Da bekannt ist, dass *P. phytofirmans* und *P. graminis* ω -Transaminasen produzieren [159], wurden diese Extrakte als Positivkontrolle verwendet, um zu zeigen, dass der Test funktioniert. Die Aktivität wurde wie in Abschnitt 2.6 beschrieben mit den Rohextrakten nachgewiesen.

2.6. Aktivitätstest für ω -Transaminasen

Die Aktivität der ω -Transaminasen wurde kolorimetrisch nachgewiesen. Dies geschah durch die Quantifizierung des nach der kinetischen Auflösung verbleibenden Aminoakzeptors. Da die eingesetzte Menge an Aminoakzeptor bekannt war und der Akzeptor mit dem Aminodonor im Verhältnis 1:1 reagiert (vgl. Abb. 9), kann nach der Quantifizierung des verbleibenden Akzeptors auch auf die umgesetzte Menge des Donors geschlossen werden.

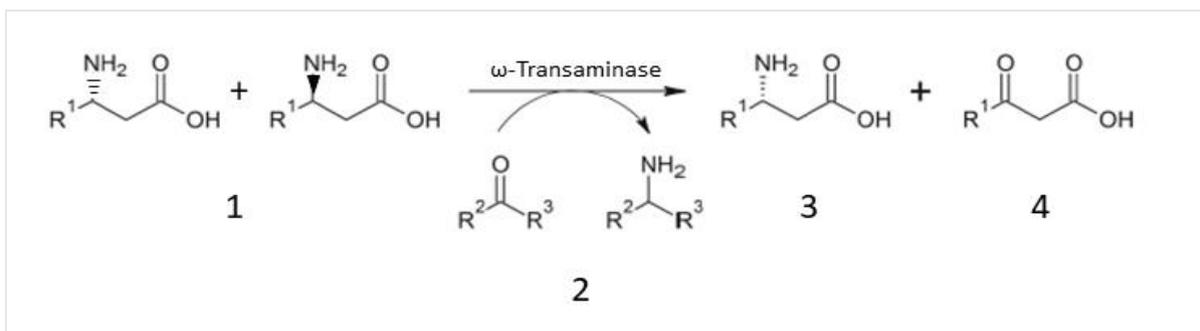


Abbildung 9: Reaktionsschema der kinetischen Auflösung am Beispiel einer β -Aminosäure. 1: Racemat des Aminodonors. 2: Aminoakzeptor. 3: verbleibendes Enantiomer des Aminodonors. 4: korrespondierende β -Ketosäure.

In den ersten Aktivitätstests, den Vortests, wurden die Rohextrakte in zwei Versuchen mit unterschiedlichen Aminodonoren, einmal β -Phenylalanin, dann 4-Aminopentansäure, auf ω -Transaminaseaktivität untersucht. Als Positivkontrolle dienten die Extrakte von *P. phytofirmans* und *P. graminis*. Zur Negativkontrolle wurde einmal der Rohextrakt gegen

Material und Methoden

Wasser ausgetauscht und in einem weiteren Ansatz wurde der Aminodonor durch Wasser ersetzt.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Ansätze zur Aktivitätsbestimmung mit verschiedenen Aminodonoren. Dieser Ansatz wird im Folgenden als Standardtest bezeichnet.

Bestandteil	Volumen bzw. Endkonzentration
Aminoakzeptor	2 mM
β -Phenylalanin oder 4-Aminopentansäure	4 mM
PLP	0,1 mM
Puffer pH 8	10 mM
Enzymextrakt	10 μ l
A. dest.	ad 100 μ l

Ein positives Ergebnis im Vortest diene als Hinweis auf eine ω -Transaminase in dem Extrakt. Bei einem positiven Vortest eines Rohextrakts wurde die Proteinliste (FASTA) des entsprechenden Organismus mittels Homologiensuche nach potentiellen ω -Transaminasen durchsucht.

2.7. Gensynthese

Die Synthese des Gens für StoTA in Form von Genfragmenten wurde extern bei Eurofins Genomics GmbH in Auftrag gegeben. Dabei handelt es sich um überlappende Fragmente, die zunächst mittels Ligase zu einem vollständigen Gen zusammengefügt werden. Nach der Ligation kann dieses Gen wie üblich in einen Vektor kloniert werden.

Aufgrund von Problemen bei der Ligation der überlappenden Fragmente des *StoTA*-Gens wurde das Gen, das für VboTA codiert als vollständiges Gen, ebenfalls bei Eurofins geordert. Geliefert wurde es subkloniert im pEX-Vektor.

Beide Gene wurden mittels eines Onlinetools (während des Bestellvorgangs auf <https://eurofinsgenomics.eu/de/ecom/molekularbiologie/gene-synthesis/> verfügbar) an das

Codon Usage von *E. coli* angepasst. Außerdem wurden die Gene mit entsprechenden Schnittstellen versehen, um sie in den pET-21b (+) Vektor klonieren zu können.

2.8. Plasmidkonstruktion

Als Ausgang für die Produktion der bakteriellen ω -Transaminasen wurde der pET21b (+) Vektor verwendet. Die bestellten Gensequenzen enthielten am 5' Ende eine NdeI Schnittstelle und am 3' Ende eine XhoI Schnittstelle. Diese kommen auch in der Multicloningsite des Vektors vor. Die XhoI Schnittstelle des Vektors befindet sich direkt vor einer Sequenz, die für einen His-Tag codiert. Dadurch werden sechs Histidinreste an die Enzyme gehängt, mit denen die spätere Aufreinigung erfolgt. Außerdem enthält der Vektor eine Ampicillinresistenz, damit positive Transformanten selektiert werden können.

Das Gen für VboTA wurde durch Restriktion mit NdeI (FastDigest NdeI, Thermo Fisher, Katalognummer: FD0584) und XhoI (FastDigest XhoI, Thermo Fisher, Katalognummer: FD0694) aus dem pEX-Vektor isoliert. Die Restriktion erfolgte nach Herstellerangaben. Der pET21b (+) Vektor wurde unter gleichen Bedingungen linearisiert. Zusätzlich zu den Restriktionsenzymen enthielt der Ansatz mit dem Vektor auch eine Phosphatase (1 μ l Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), Thermo Fisher, Katalognummer: 783901000UN), um eine Religation zu verhindern.

2.9. Isolation der DNA Fragmente und des linearisierten Vektors

Nach erfolgter Restriktion wurden die verdauten DNA Stücke mittels Agarose-Gelelektrophorese von Enzymen, Puffer und unerwünschten DNA Teilen gereinigt. Dazu wurde ein 0,8 %iges Agarosegel verwendet. Für den Größenvergleich der Banden wurde die Gene Ruler 1 kb Plus DNA Leiter (Thermo Fisher, Katalognummer: SM1331) verwendet. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Banden aus dem Gel mit einem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Katalognummer 740609.250) nach Herstellerangaben eluiert.

Material und Methoden

Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte mit einem Nanodrop (Nanodrop 2000, Thermo-Fisher).

2.10. Ligation der Gene und des Vektors

Die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe einer T4-Ligase (T4 DNA Ligase, Thermo-Fisher, Katalognummer: EL0016) in den linearisierten Vektor ligiert. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben. Die Ligationsansätze wurden ohne weitere Reinigung für die Transformation von kompetenten *E. coli* XL1 Zellen verwendet.

2.11. Transformation von *E. coli* XL1

Zu 100 µl gefrorener kompetenter Zellen wurden 10 µl Ligationsansatz gegeben. Die Zellen tauten anschließend 30 min lang auf Eis auf. Dem Schritt folgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C. Dem Hitzeschock folgte ein Kälteschock, 2 min auf Eis. Im Anschluss wurden 500 µl SOC Medium zu den Transformationsansätzen gegeben und die Ansätze schüttelten 30 min bei 37 °C im Thermomixer. Nach dieser Regenerationsphase wurden die Zellen bei 2000 xg bis zur Pelletbildung abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet wurde in 100 µl frischem SOC Medium sehr vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden auf Antibiotika haltigen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.12. Selektion positiver Transformanden

Einzelne Kolonien wurden von den Platten gepickt und in 2 ml LB-Ampicillin (50 µg ml⁻¹) übergeführt. Die Röhren schüttelten über Nacht bei 37 °C und 180 UpM. Im Anschluss wurden die Zellen mittels Zentrifugation (15.000 xg, 5 min) geerntet.

2.13. Plasmidisolation aus *E. coli* XL1

Die Zellen einer 2 ml Übernachtskultur wurden 3 min bei 16.000 xg abzentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Pellets wurden in 200 µl, auf 4 °C gekühlten, P1 (Tab. 9) mittels Vortexer resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl P2 (RT, Tab. 10) zugegeben und durch mehrfaches Invertieren gemischt. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl P3 (4 °C, Tab. 11) und mehrfaches Invertieren. Die Ansätze wurden abermals 10 min bei 4 °C und 16.000 xg zentrifugiert. Vom klaren Überstand wurden 500 µl in ein neues Gefäß überführt. Zu dem Überstand wurden 1,5 ml 96 %igem Ethanol gegeben, gefolgt von Invertieren. Die Plasmide wurden mindestens 1 h (bis ÜN) bei 4 °C gefällt. Im Anschluss an die Fällung wurden die Plasmide bei 16.000 xg und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, es folgten drei Waschschrte mit 500 µl 70 %igem Ethanol, jeweils gefolgt von einem Zentrifugationsschritt mit 16.000 xg bei 4 °C für 3 min. Die Überstände wurden verworfen. Nach dem letzten Waschschrte trockneten die Pellets bei 50 °C bis kein Ethanolgeruch mehr wahrzunehmen war. Im letzten Schritt wurden die Pellets in 50 µl destilliertem Wasser aufgenommen.

Tabelle 9: Zusammensetzung von P1. Der pH-Wert wird mit HCl auf 8 eingestellt. Die Lagertemperatur des Puffers beträgt 4 °C.

Bestandteil	Menge
Tris	6,1 g
EDTA Dinatriumsalz *2H ₂ O	3,7 g
RNase A	100 µg ml ⁻¹
A. dest.	ad 1000 ml

Tabelle 10: Zusammensetzung von P2. Der Puffer wird bei Raumtemperatur gelagert.

Bestandteil	Menge
NaOH	8,0 g
10 % SDS Lösung	100 ml
A. dest.	ad 1000 ml

Material und Methoden

Tabelle 11: Zusammensetzung von P3. Zuerst wird das Kaliumacetat in 500 ml A. dest. gelöst und mit der Essigsäure auf pH 5,5 eingestellt. Dann wird der Puffer auf 1 l aufgefüllt. Der Puffer wird bei Raumtemperatur gelagert.

Bestandteil	Menge
Kaliumacetat	294 g
Essigsäure	110 ml
A. dest.	ad 1000 ml

2.14. Messung der Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentrationen der Plasmide und DNA-Fragmente wurde mit einem Nanodrop (Nanodrop 2000, Thermo Fisher) bestimmt. Dazu wurde 1 µl der Nukleinsäurelösungen verwendet. Die Messungen erfolgten in drei Replikaten.

2.15. Überprüfen der Sequenzen

Zur Sequenzüberprüfung wurden Proben der isolierten Plasmide an Eurofins oder Microsynth zur Sangersequenzierung geschickt. Dabei wurden die Anforderungen des Anbieters befolgt.

2.16. Transformation von *E. coli* BL21DE3

Bei positivem Sequenziererergebnis wurde *E. coli* BL21DE3 nach dem gleichen Protokoll wie *E. coli* XL1 mit dem Plasmid transformiert. Als Selektionsmarker diente wieder Ampicillin.

2.17. Enzymproduktion mit *E. coli* BL21DE3

Zunächst wurden 5 ml LB mit 50 µg/ml Ampicillin mit einer Kolonie der Expressionsstämme *E. coli* BL21DE3 angeimpft. Diese Kulturen schüttelten über Nacht bei 180 UPM und 37 °C. Die Vorkulturen wurden in ersten Versuchen für das Animpfen von 60 ml Hauptkulturen verwendet. Die 60 ml Hauptkulturen wurden auf eine OD von 0,075 angeimpft und 2 h bei 37 °C und 180 UPM geschüttelt. Nach dieser Zeit wurde die Kultur in 2 Kulturen zu je 30 ml geteilt. In einer der Kulturen erfolgte die Induktion mit 0,5 mmol L⁻¹ IPTG (Endkonzentration). Die andere Kultur diente als Negativkontrolle. Es folgten weitere 2 h Schütteln unter den gleichen Bedingungen wie zuvor. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (15 min, 7.500 xg) vom Überstand getrennt und mit 500 µl BugBuster™ (Novagen) aufgeschlossen.

2.18. Fermentation zur Produktion größerer Enzymmengen

Der VboTA Produktionsstamm wurde in größerem Maßstab in einem Fermenter angezogen, um eine größere Proteinmenge zu produzieren. Alle Fermentationen wurden mit einem Fermenter BIOSTAT Bplus (Sartorius, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die Kulturen wurden in 5 L Doppelmantelgefäßen (ebenfalls Sartorius) angezogen. Als Grundmedium diente LB. Das Startkulturvolumen betrug 3 L. Im ersten Ansatz wurde insgesamt 1 L 20 %ige (w/v) wässrige Glukoselösung zugefüttert. Im zweiten Ansatz wurde stattdessen 1 L 40 % (w/v) Glukose in LB zum Füttern verwendet. Bei beiden Ansätzen wurde 1 N HCl zum Herunterregeln des pH-Wertes und 12,5 %ige Ammoniaklösung zum Heben des pH-Wertes verwendet. Es wurde Ammoniak statt NaOH verwendet, um einem Stickstoffmangel bei hohen Zellkonzentrationen vorzubeugen.

Material und Methoden

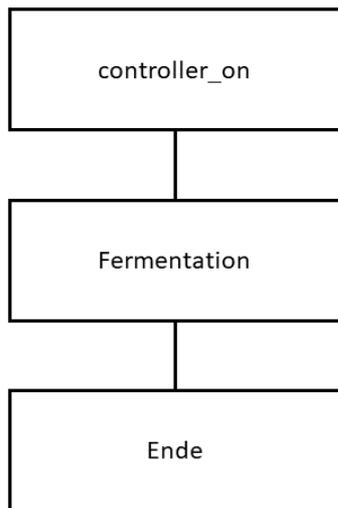


Abbildung 10: Übergeordnete Struktur der Fermentationsrezepte. In der Startphase, hier „controller_on“ genannt, werden die Sollwerte aller Parameter, wie pH-Wert, O₂-Sättigung und die Temperatur, ebenso wie die Werte, ab denen das System einen Alarm auslöst, eingestellt. Fermentation bezeichnet die Phase in der die eigentliche Fermentation abläuft. Diese Phase wird in den nachfolgenden Abbildungen näher beschrieben. In der Endphase wird die Fermentation beendet, alle Kontrollen werden eingestellt und das System wird heruntergefahren.

Im ersten Fermentationsversuch (Abb. 11) wurde 15 min nach dem Animpfen mit dem Zufüttern der 20 %igen Glukoselösung begonnen. Die Glukose sollte den Zellen ein weiteres Wachstum ermöglichen, damit eine höhere Zellzahl als mit reinem LB erreicht werden kann. Eine höhere Zellzahl sollte auch eine größere Enzymausbeute bedeuten, da mehr produzierende Zellen vorhanden sind. Während der Fermentation wurden Proben genommen, um den Glukosegehalt des Mediums zu bestimmen. Es wurden je Messpunkt zwei Proben genommen.

Material und Methoden

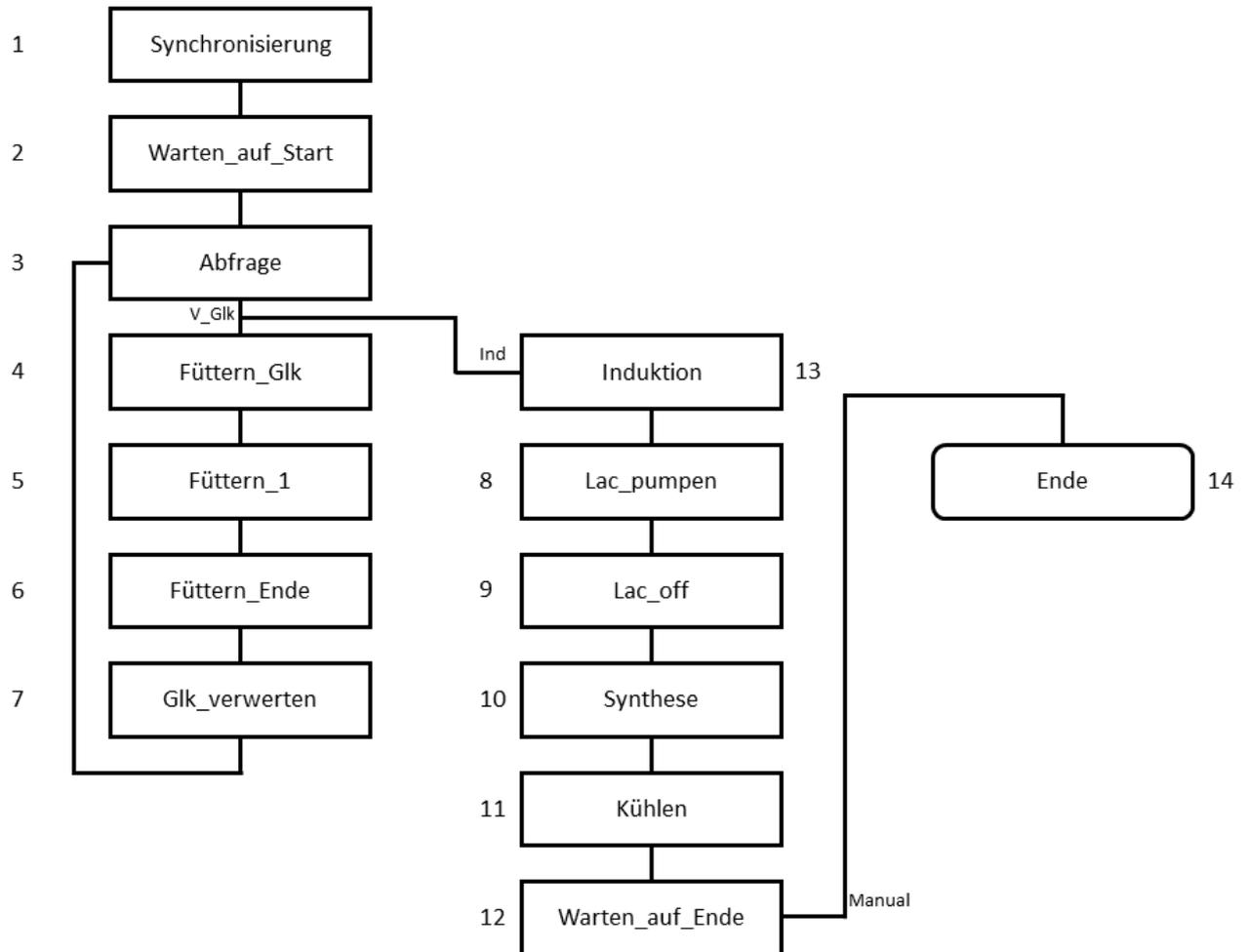


Abbildung 11: Rezept für die Enzymproduktion mit *E. coli*. Sobald die „contoller_on“ Phase (Abb. 10) beendet ist, wird dieses Protokoll gestartet. 1: Während dieser Phase wird angeimpft und das Alter der Batch auf 0 gesetzt. 2: Eine 15 min Wartephase, während der sich das System an die Anwesenheit der Zellen anpasst. 3: Zähler der zugeführten Menge an Glukoselösung. Solange das Volumen < 1000 ml ist, wird in Phase 4 übergegangen, ist das Volumen ≥ 1000 ml wird als nächstes Phase 8 durchgeführt. 4: Eine Parameterphase in der die Geschwindigkeit von Pumpe A auf 1 % gestellt wird. 5: Während dieser Phase wartet das System 10 min während Pumpe A läuft. 6: Pumpe A wird ausgestellt. 7: Eine weitere 15 min Wartephase, in der die Zellen die Glukose verwerten können. 8: Die Geschwindigkeit von Pumpe B wird auf 10 % gestellt. 9: Die Laktoselösung wird 15 min lang in das Fermentationsgefäß gepumpt. 10: Pumpe B wird abgestellt. 11 Während dieser Wartephase haben die Zellen 3 h Zeit, um die ω -Transaminasen zu synthetisieren. 12: Die Solltemperatur wird auf 15 °C gesetzt. Sobald diese erreicht wird, beginnt die nächste Phase. 13: In dieser Phase wartet das System auf ein manuelles Übergehen in die Endphase. Während dieser Phase werden die Zellen geerntet. 14: Endphase, diese Phase beendet das Fermentationsprotokoll und leitet die Endphase des Rezepts (Abb. 10) ein.

Um die Zellzahl noch weiter zu erhöhen, wurde das Protokoll etwas verändert (Abb. 12). In einem Gefäß wurde der Sollwert der Sauerstoffsättigung auf 30 % erhöht. Dadurch sollte eine bessere Verwertung der Glukose erzielt werden. In dem zweiten Gefäß wurde der Sollwert für den pH-Wert auf 6,5 gesenkt, da *E. coli* bei diesem pH-Wert besser wächst. Auch die Konzentration der zugegebenen Glukoselösung wurde erhöht. Statt 20 % Glukose in LB wurden jetzt 40 % Glukose in LB verwendet. Da die Menge an zugeführter Glukose größer

war als in der ersten Fermentation, wurde die Verwertungszeit auf 30 min verdoppelt. Das Zufüttern der Glukose wurde über den Verbrauch der Ressourcen im Medium gesteuert. Solange ausreichend Kohlenhydrate als C-Quellen im Medium vorhanden waren, produzierten und sekretierten die Zellen diverse organische Säuren, wodurch der pH-Wert des Mediums sank. Der Fermenter steuerte mit einer Base gegen, in diesem Fall Ammoniaklösung (25 %, Fisher Scientific, Katalognummer 12686667), um den pH-Wert stabil zu halten. Waren die Kohlenhydrate aufgebraucht, wurden die produzierten Säuren wieder aufgenommen und als C- und Energiequelle verwendet. Dadurch stieg der pH-Wert und der Fermenter steuerte mit Säurezugabe gegen. Sobald das geschah, wurde mit dem Füttern begonnen. Über 5 Minuten verteilt wurden 10 ml der Glukoselösung zugegeben. Dem Fütterungsschritt folgte eine 30-minütige Verwertungszeit, nach der die Fütterung wiederholt wurde. Das Volumen der zugegebenen Glukoselösung wurde gemessen und sobald es ≥ 1000 ml betrug, erfolgte die Induktion nach einem letzten Verwertungsschritt. Die Induktion erfolgte mit Laktose. Dazu wurden 500 ml einer 20 %igen Laktoselösung in die Fermentationsgefäße gepumpt. Die Laktose inhibierte den Lac-Repressor, der den T7 Promotor des Vektors daraufhin nicht mehr blockieren konnte, woraufhin die Enzymproduktion begann. Um zu verhindern, dass die Zellen nach dem Verbrauchen aller Ressourcen anfangen das Enzym wieder abzubauen, wurde das Medium nach vierstündiger Induktion auf 15 °C heruntergekühlt. Dadurch verlangsamt sich der Stoffwechsel der Zellen, so dass sie bis zur Ernte kaum Ressourcen verbrauchten. Das Kühlen war eine Vorsichtsmaßnahme, falls die Induktion zu einem Zeitpunkt stattfand, an dem eine schnelle Ernte nicht möglich war.

Material und Methoden

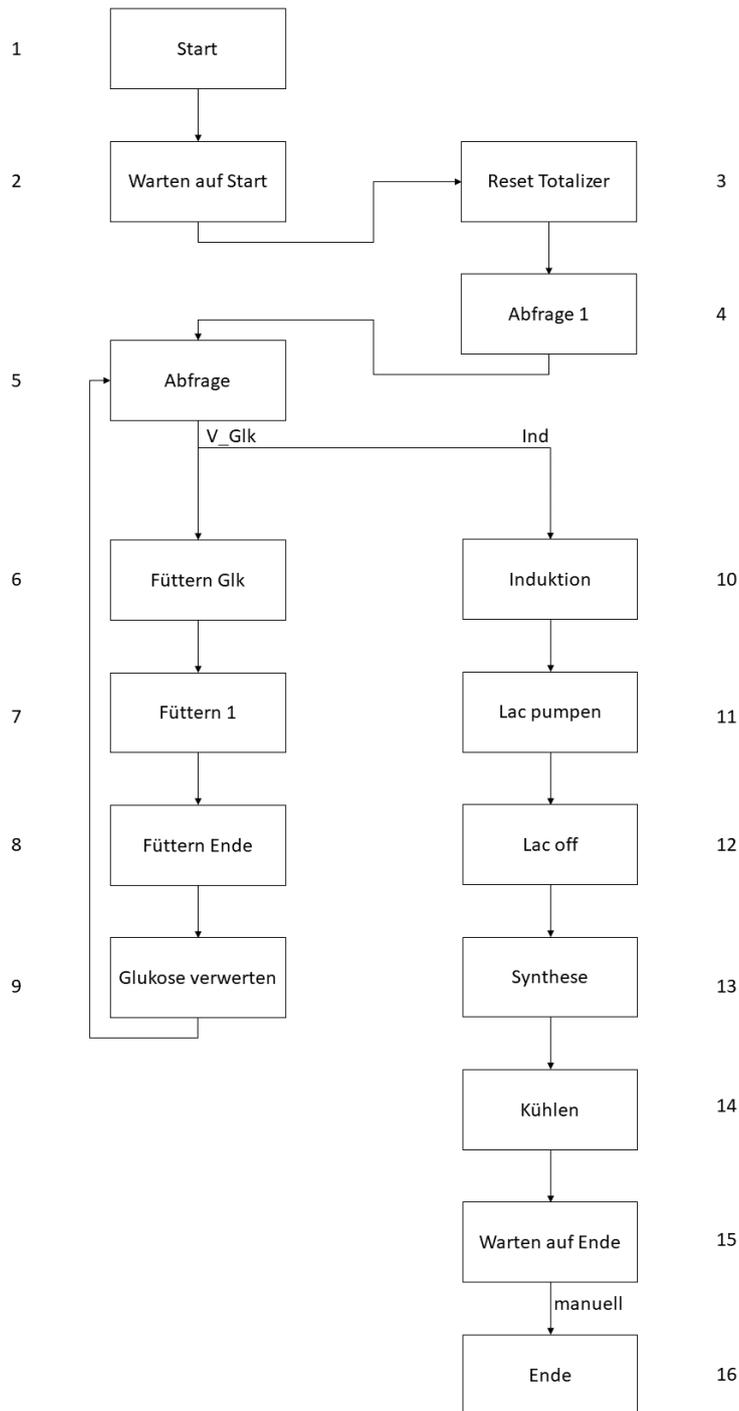


Abbildung 12: Rezept für die Enzymproduktion mit *E. coli*. Sobald die „controller_on“ Phase (Abb. 10) beendet ist, wird dieses Protokoll gestartet. 1: Während dieser Phase wird angeimpft und das Alter der Batch auf 0 gesetzt. 2: Eine 15 min Wartephase, während der sich das System an die Anwesenheit der Zellen anpasst. 3: Die Zähler für die zugeführte Menge an Säure und Base werden wieder auf 0 gesetzt. 4: Sobald das System anfängt Säure zuzugeben wird in Phase 5 übergegangen. 5: Zähler der zugeführten Menge an Glukoselösung. Solange das Volumen < 1000 ml ist, wird in Phase 6 übergegangen, ist das Volumen ≥ 1000 ml wird als nächstes Phase 10 durchgeführt. 6: Eine Parameterphase in der die Geschwindigkeit von Pumpe A auf 5 % gestellt wird. 7: Während dieser Phase wartet das System 5 min während Pumpe A läuft. 8: Pumpe A wird ausgestellt. 9: Eine weitere 30 min Wartephase, in der die Zellen die Glukose verwerten können. 10: Die Geschwindigkeit von Pumpe B wird auf 10 % gestellt. 11: Die Laktoselösung wird 15 min lang in das Fermentationsgefäß gepumpt. 12: Pumpe B wird abgestellt. 13: Während dieser Wartephase haben die Zellen 4 h Zeit, um die ω -Transaminasen zu synthetisieren. 14: Die Solltemperatur wird auf 15 °C gesetzt. Sobald diese erreicht wird, beginnt die nächste Phase. 15: In dieser Phase wartet das System auf ein manuelles Übergehen in die Endphase. Während dieser Phase werden die Zellen geerntet. 16: Endphase, diese Phase beendet das Fermentationsprotokoll und leitet die Endphase des Rezepts (Abb. 10) ein.

Neben den Versuchen mit Zufütterungen während der Kultivierung wurde auch ein Versuch mit einem Autoinduktionsmedium [160] (Tab. 12 und 13) durchgeführt, ebenfalls im 3 L Maßstab. In diesem Medium sind verschiedene C-Quellen enthalten, die nacheinander verbraucht werden. Zuerst wird die im Medium enthaltene Glukose verwertet. Sobald diese aufgebraucht ist, wird die Aufnahme der Laktose nicht mehr gehemmt. So wird die Proteinsynthese aktiviert. Zusätzlich zur Laktose ist noch Glycerin im Medium enthalten, das als C-Quelle dient, damit die Laktose nicht abgebaut wird und weiter den Lac-Inhibitor hemmt.

Tabelle 12: Zusammensetzung des Autoinduktionsmedium. Dieser Teil des Mediums wird autoklaviert.

Komponente	Masse pro 1 L
Phosphatpuffer (pH 7,2)	6 g Na ₂ HPO ₄ / 3 g KH ₂ PO ₄
Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g

Tabelle 13: Kohlenhydrate für Autoinduktionsmedium. Dieser Teil des Mediums wird sterilfiltriert.

Komponente	Menge für 200 ml
Glycerin	30 ml
Laktose	10 g
Glukose	2,5 g

Zu 3 L des Mediums werden unter sterilen Bedingungen 120 ml der Kohlenhydratlösung gegeben.

2.19. Bestimmung des Glukosegehaltes der Fermenterproben

Während der Fermentation wurden Proben genommen, um die im Überstand enthaltene Glukosemenge zu bestimmen. Dadurch sollte kontrolliert werden, ob die Wartezeit für die Glukoseverwertung lang genug ist. Für die Bestimmung wurde das D-Glucose-Kit (GOPOD Format) von Megazyme (Bestellnummer K-GLUC) nach Herstellerangaben verwendet.

2.20. Amplifikation der Transaminase-Gene und Konstruktion des XPLO^R3 Vektors

Die entsprechenden Gene der Proteine, die eine Aminotran₃-Domäne enthalten, wurden aus genomischer DNA von *B. raffinosifermentans* amplifiziert. Die verwendeten Primer sind in Tab. 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Liste der Primer, mit denen potenzielle ω -Transaminasen aus dem Genom von *B. raffinosifermentans* amplifiziert werden konnten. Die reversen Primer sind so gestaltet, dass den Genen eine Sequenz, die für einen His-Tag codiert, angehängt wurde.

Accession Nummer	Primer vorwärts	Primer revers
ARAD1C43516g	atggcaggtgcagctttatgg	ttagtgatggtgatggtgatgagagaatgcctcttctatcttcttctctaatt
ARAD1D16258g	atgagcacaatcacatctgcac	Ttagtgatggtgatggtgatggtgctggcgtagggg
ARAD1D29502g	atgcagtcattactcgaactgttg	ttagtgatggtgatggtgatgctcaaatactgactcaagaatgtcca

Im Folgenden werden ARAD1C43516g BroTA1 (für *B. raffinosifermentans* ω -Transaminase 1), ARAD1D16258g BroTA2 und ARAD1D29502g BroTA3 genannt.

In einem weiteren PCR-Schritt wurden die erhaltenen Amplifikate um insgesamt 36 Basenpaare erweitert. Dadurch wurde jeweils ein 18 Basenpaarüberhang am Anfang und am Ende der Gene angehängt. Diese Überhänge sind komplementär zu der Sequenz, die sich um die PacI Schnittstelle des XPLO^R3 Vektors befindet. Die verwendeten Primer sind in Tab. 15 aufgeführt.

Material und Methoden

Tabelle 15: Primer mit denen die Gene der potentiellen ω -Transaminasen von *B. raffinosifermentans* an den Enden um 18 Basenpaare verlängert wurden.

Accession Nummer	Primer vorwärts	Primer revers
ARAD1C43516g	aacataatcaacattaatatggcaggtgcagcttta	aatgagtagtggttccttagtgatggtgatggtgatg
ARAD1D16258g	aacataatcaacattaatatgagcacaatcacatct	aatgagtagtggttccttagtgatggtgatggtgatg
ARAD1D29502g	aacataatcaacattaatatgcagtcatttactcga	aatgagtagtggttccttagtgatggtgatggtgatg

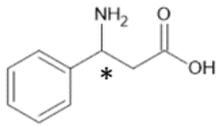
Die Linearisierung des Vektors erfolgte mit *PacI* (FastDigest *PacI*, Thermo Fisher, Katalognummer: FD2204), auch *SgsI* genannt, nach Herstellervorschrift. Um eine Religation des Vektors zu verhindern, enthielten die Ansätze neben dem Restriktionsenzym auch 1 μ l Phosphatase (Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), Thermo Fisher, Katalognummer: 783901000UN).

2.21. Isothermales Assembly der Transaminase-Gene und des Vektors

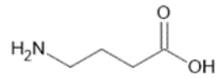
Die Gene, die für BroTA1-3 codieren, wurden mittels isothermalem Assembly nach Gibson [161,162] in den linearisierten XPLOR[®]3 Vektor gebracht. Dieser Vektor trägt ein Gen für ein Protein, das eine Kanamycin-Resistenz vermittelt. Diese Resistenz dient als Selektionsmarker für positiv transformierte *E. coli* XL1 Zellen. Außerdem trägt es das Gen der Tryptophan-Synthesekaskade, da der Produktionsstamm *B. raffinosifermentans* G1212 [*aleu2 atrp1:ALEU2*] [1] auxotroph für Tryptophan ist. Für die Integration des entsprechenden Genfragments in den linearisierten Vektor wurde das NEBuilder Kit[®] HiFi DNA Assembly Cloning Kit (New England Biolabs, Katalognummer: E5520S) verwendet. Die Integration erfolgte nach Herstellervorschrift, wobei darauf geachtet wurde, dreimal mehr Fragment als Vektor zu verwenden. Die Assembly-Ansätze wurden ohne weiteren Reinigungsschritt für die Transformation verwendet.

2.22. Aktivitätstest mit verschiedenen Aminodonoren

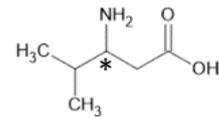
Der Aktivitätstest wurde mit einer Reihe verschiedener Aminosäuren (siehe Abb. 13) durchgeführt.



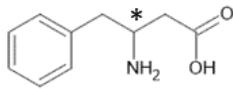
β -Phenylalanin



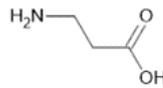
γ -Aminobuttersäure



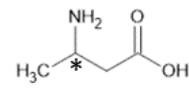
β -Leucin



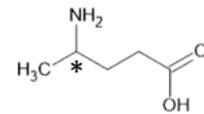
β -Homophenylalanin



β -Alanin



β -Homoalanin



γ -Aminopentansäure

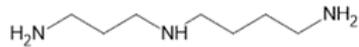
Abbildung 13: Liste der als Aminodonoren verwendeten Aminosäuren. Ein * markiert Chiralitätszentren.

Neben den Aminosäuren wurden auch einige Amine auf Aktivität mit VboTA getestet (Abb. 14).

Material und Methoden



Spermin



Spermidin



Putrescin

Abbildung 14: Liste der als Aminodonor verwendeten Amine.

Tabelle 16: Zusammensetzung der Ansätze zur Aktivitätsbestimmung mit verschiedenen Aminodonoren. Dieser Ansatz wird im Folgenden als Standardtest bezeichnet. In den verschiedenen Versuchen wurden unterschiedliche Puffer verwendet, die Art des verwendeten Puffers ist in den jeweiligen Beschreibungen angegeben.

Bestandteil	Volumen bzw. Endkonzentration
Aminoakzeptor	2 mmol L ⁻¹
Aminodonor	4 mmol L ⁻¹
PLP	0,1 mmol L ⁻¹
Puffer	10 mmol L ⁻¹
Enzymextrakt	10 µl
A. dest.	Ad 100 µl

Zusätzlich zu den Ansätzen wurden zwei Negativkontrollen mitgeführt, d.h. einmal wurde das Enzym gegen Wasser ausgetauscht, bei der anderen Kontrolle wurde der Aminodonor gegen Wasser ausgetauscht. Je Ansatz wurden drei Replikate durchgeführt.

Die Ansätze inkubierten in einer Mikrotiterplatte 30 min lang bei 30 °C (VboTA) bzw. 40 °C (StoTA). Anschließend wurden je Ansatz 10 µl entnommen und zu 60 µl A. dest. gegeben. Diese Verdünnung wurde mit 70 µl Dinitrophenylhydrazin (DNPH, 1 mM in 1 M HCl) gemischt. Das DNPH reagiert mit α-Ketosäuren zu einem Hydrazon (Abb. 15). Dadurch wird die enzymatische Reaktion gestoppt und das entstandene Hydrazon färbt sich im basischen

Material und Methoden

Bereich braun und kann quantitativ gemessen werden. Um die Färbung zu erreichen wurden nach 20 min Inkubation des Ansatzes/DNPH-Gemisches bei 20 °C 70 µl einer 4 M NaOH zu den Ansätzen gegeben.

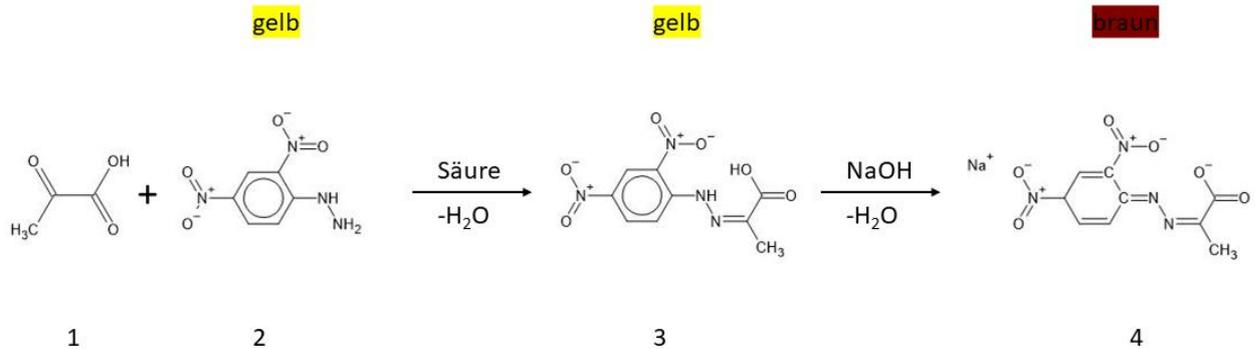


Abbildung 15: Reaktion einer α -Ketosäure, hier Pyruvat als Beispiel, mit DNPH und anschließender Behandlung mit Natronlauge. 1: Pyruvat, 2: DNPH, 3: Hydrazone, 4: Hydrazoniumion.

Das entstandene Hydrazoniumion (Struktur 4 in Abb. 15) konnte photometrisch mit einem Mikrotiterplattenleser (Tecan Infinite 200) bei 570 nm quantifiziert werden. Anhand der gemessenen Absorption der Negativkontrollen wurde die Menge an umgesetztem Aminoakzeptor berechnet.

2.23. Bestimmen des optimalen Aminoakzeptors für VboTA

Da VboTA eine Bindestelle für α -Ketoglutarat besitzt und sequenzielle Ähnlichkeit zu StoTA hat, welche zur Familie der Aspartat-Aminotransferasen gehört, wurden α -Ketoglutarat und Oxalacetat als Aminoakzeptor ausgewählt. Zusätzlich zu diesen beiden sollte Pyruvat als weiterer, kostengünstiger Akzeptor getestet werden.

2.24. Bestimmung des pH Optimums

Um das pH-Optimum der zu untersuchenden Enzyme zu bestimmen, wurden unterschiedliche Puffer während des Aktivitätsassays verwendet. Die untersuchte pH-Wert Spanne reichte von pH 2 bis pH 10. Die verwendeten Puffer sind in Tab. 17 aufgeführt. Alle Puffer wurden in einer 100 mmol L⁻¹ Konzentration angesetzt. Die Tests wurden in drei Parallelen durchgeführt.

Tabelle 17: Liste und Zusammensetzung der für die Bestimmung des pH-Optimums verwendeten Puffer. Die angegebenen Mengen beziehen sich auf 1 l Lösung. Die Puffer wurden mit 1 N HCl bzw. 1 N KOH justiert.

pH	Puffer	Zusammensetzung
2	Citrat/HCl	5,88 g Citronensäure + 3,58 g Kaliumchlorid + 82 ml Salzsäure (c = 0,1 mol l ⁻¹)
3	Citrat/Kaliumhydroxid	7,74 g Citronensäure + 3,49 g Kaliumchlorid + 206 ml Kaliumhydroxid (c = 0,1 mol l ⁻¹)
4	Citrat/Kaliumhydroxid	10,75 g Citronensäure + 2,57 g Kaliumchlorid + 68 ml Kaliumhydroxid (c = 1 mol l ⁻¹)
5	Kaliumacetat	1,95 ml Essigsäure + 6,87 g Kaliumacetat
6	Kaliumacetat	11,0 g Kaliumdihydrogenphosphat + 3,33 g Dikaliumhydrogenphosphat
7	Kaliumphosphat	3,52 g Kaliumdihydrogenphosphat + 8,57 g Dikaliumhydrogenphosphat
8	Kaliumphosphat	0,07 g Kaliumdihydrogenphosphat + 16,48 g Dikaliumhydrogenphosphat
9	Kaliumborat	61,83 g Borsäure mit Salzsäure (c = 0,1 mol l ⁻¹) auf pH 9 titrieren
10	Natriumcitrat	6,47 g Dinatriumhydrogencitrat + 18,71 g Natriumcitrat

2.25. Bestimmen des Oligomerisierungsgrades von VboTA

Der Oligomerisierungsgrad von VboTA wurde mittels Größenausschluss-Chromatographie bestimmt. Für die Chromatographie wurde eine Superdex™ 200 Säule (Cytiva) verwendet. Als Standards dienten verschiedene Proteine, die in Tab. 18 aufgelistet sind. Als Laufpuffer wurde 50 mmol L⁻¹ Natriumphosphat-Puffer pH 8 + 0,15 mol L⁻¹ NaCl verwendet. Vor der Verwendung wurde der Puffer mittels Vakuumfiltration sterilfiltriert und gleichzeitig entgast.

Tabelle 18: Standardproteine für die Größenausschlusschromatographie. Die Proteine wurden auf zwei Ansätze aufgeteilt. Hochzahlen geben an, welches Protein in welchem Ansatz war. Das Ansatzvolumen betrug 2 ml.

Protein	Molekulare Massen	Menge für den Mix
Bluedextran	-	2 mg
Ferritin ¹	440 kDa	0,4 mg
Katalase ²	240 kDa	1 mg
BSA ²	66,43 kDa	10 mg
Ovalbumin ¹	42,8 kDa	10 mg

Im ersten Durchlauf wurde die Säule mit 0,5 ml Bluedextranlösung beladen. Nachdem das Bluedextran aus der Säule eluiert war, wurden 0,5 ml des ersten Ansatzes auf die Säule geladen. Im Anschluss daran wurden ebenfalls 0,5 ml des zweiten Ansatzes eingespritzt. Die Eluate wurden bei 280 nm gemessen.

2.26. Substrat/Produktinhibition von VboTA

Einige der verwendeten Substrate und Produkte wurden auf inhibitorische Effekte hin untersucht. Die untersuchten Edukte waren α -Ketoglutarat und β -Phenylalanin. Die Produkte D- und L-Glutamat wurden auf Inhibition von VboTA geprüft. Auf einen Test der Inhibition von VboTA durch 3-Keto-3-phenylpropionsäure, dem Produkt, das bei der Desaminierung von β -Phenylalanin entsteht, wurde verzichtet, da diese Verbindung in wässriger Lösung instabil ist und daher nicht mit dem Entstehen von Konzentrationen zu

rechnen ist, die hoch genug für eine Inhibition sind. Die zu testenden Verbindungen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen zu dem Standardtest gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 30 °C und pH 9 wurde die umgesetzte Menge an α -Ketoglutarat pro min und μg Enzym ermittelt. Für D- bzw. L-Glutamat erstreckte sich der Konzentrationsbereich von 4 bis 20 mmol L^{-1} , in 2 mmol L^{-1} Schritten. Bei β -Phenylalanin wurden 20-34 mmol L^{-1} und bei α -Ketoglutarat 10-20 mmol L^{-1} verwendet. Alle Messungen erfolgten in drei Replikaten.

2.27. Bestimmung der K_m -Werte von VboTA

Die K_m -Werte für α -Ketoglutarat, β -Phenylalanin, β -Homophenylalanin, β -Leucin und β -Homoalanin wurden bestimmt. Dazu wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen mit unterschiedlichen Akzeptor- bzw. Donor-Konzentrationen gemessen, indem die Menge an entstandenem Glutamat bestimmt wurde. Zunächst erfolgte die Bestimmung des K_m Wertes für α -Ketoglutarat. Hierbei fungierte β -Phenylalanin als Aminodonor. Die Anfangsgeschwindigkeit der Transaminierung wurde mit vier unterschiedlichen α -Ketoglutarat-Konzentrationen gemessen. Die Ansätze enthielten 2, 4, 6 bzw. 8 mmol L^{-1} α -Ketoglutarat und 10 mmol L^{-1} β -Phenylalanin. Zwei Proben mit Wasser anstelle von α -Ketoglutarat dienten als Negativkontrolle. Alle Ansätze wurden bis auf den Enzymextrakt angesetzt und auf 30 °C temperiert. Anschließend erfolgte die Aliquotierung zu je 90 μl in ebenfalls vorgewärmte 1,5 ml Röhrchen. Zu jedem Röhrchen wurden 10 μl vorgewärmter Enzymextrakt gegeben. Anschließend erfolgte eine 90 s Inkubation bei 30 °C. Nach dem Inkubationsschritt wurde VboTA durch 5 min Erhitzen auf 90 °C inaktiviert. Bis zur endgültigen Messung lagerten die Proben bei -20 °C. Die Quantifizierung des Glutamats erfolgte wie in Maytaet al. [163] beschrieben. Die Bestimmung der K_m -Werte für die Aminodonoren verlief analog zu der Bestimmung des K_m -Wertes für α -Ketoglutarat. Bei diesen Ansätzen wurde α -Ketoglutarat mit einer Konzentration von 5,2 mmol L^{-1} verwendet. Die Konzentrationen der Donoren variierten von 2 bis 10 mmol L^{-1} in 2 mmol L^{-1} Schritten. Auch bei diesen Proben erfolgte die Messung der Anfangsgeschwindigkeit über die Quantifizierung des entstandenen Glutamats. Für alle Proben wurden 5 Replikate durchgeführt.

2.28. Bestimmung des Temperaturoptimums

Die Ansätze zur Bestimmung des Temperaturoptimums erfolgten in einer PCR-Platte. Im Unterschied zum Standardansatz wurden die doppelten Konzentrationen von Aminodonor und Aminoakzeptor verwendet. Das Gesamtvolumen und die anderen Konzentrationen blieben unverändert. Auch der pH-Wert, der für den Standardtest verwendet wurde, blieb unverändert. Die Versuchsreihen wurden auf Eis angesetzt. Der Thermocycler (Eppendorf Eppgradient S Mastercycler) wurde im ersten Ansatz auf einen Temperaturgradienten von 20 – 40 °C eingestellt. Im folgenden Ansatz verlief der Temperaturgradient von 30 – 50 °C. Ein Gradient von 20 – 50 °C ließ sich bei dem Gerät nicht einstellen. Nach 30 min Inkubation der Platten kühlte der Thermocycler auf 4 °C herunter, um die Reaktion zu stoppen. Nach Ablauf der Reaktion wurden wieder 17,5 µl der Ansätze in eine Mikrotiterplatte überführt und für die Quantifizierung verwendet. Die Quantifizierung verlief ebenso wie bei dem Standardtest. Auch hier wurden wieder Ansätze ohne Enzym als Negativkontrolle verwendet.

2.29. Bestimmung der Temperaturstabilität

Um festzustellen, ob VboTA und die StoTA-Varianten sensitiv gegenüber höheren Temperaturen sind, wurden Aliquots der Extrakte für 60 min bei Temperaturen von 20 – 90 °C in 10 °C Schritten inkubiert. Im Anschluss an diese Inkubation erfolgte ein Aktivitätstest mit den Aliquots. Der Test verlief unter Standardbedingungen für die jeweiligen Enzyme. Als Negativkontrolle dienten wieder Ansätze, bei denen das Enzym durch Wasser ersetzt wurde. Ein Aliquot, das bei 4 °C gelagert wurde, diente als Referenzwert. Die Aktivität dieser Ansätze wurde als 100 % Wert der Aktivität verwendet. Die Restaktivitäten der Ansätze, die bei höheren Temperaturen lagerten, wurden in Relation zu den 100 % Werten der 4 °C Proben gesetzt.

2.30. Haltbarkeitstest VboTA

Die Haltbarkeit von VboTA wurde mit Hilfe verschiedener Ansätze festgestellt. Zwei Testreihen wurden durchgeführt. Eine wurde bei 4 °C gelagert, die andere bei -20 °C. Um festzustellen, ob Glycerin einen Einfluss auf die Haltbarkeit hat, gab es in beiden Versuchsreihen Ansätze mit unterschiedlichen Glycerinkonzentrationen. Die Ansätze enthielten 0, 10, 20 und 50 % Glycerin. Am Tag des Ansetzens (Tag 0) und dann regelmäßig im Abstand von mehreren Tagen erfolgten Aktivitätsbestimmungen der Proben. Die Aktivität an Tag 0 diente als Referenzwert (100 % Wert), zu dem die Messwerte der Folgetage in Relation gesetzt wurden. Die Messungen erfolgten so lange, bis keine nennenswerte Restaktivität mehr zu verzeichnen war. Falls eine Probe aufgebraucht war, bevor sie ihre Aktivität verloren hat, wurde dieser Ansatz neu angesetzt und einmal sofort auf Aktivität getestet. Danach wurde der Ansatz solange bei der entsprechenden Temperatur gelagert, bis die Messreihe fortgesetzt werden konnte. Eine erneute Messung nach kurzer Lagerung erfolgte nicht. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mit dem Standardtest für VboTA mit 4 mmol L⁻¹ β-Phenylalanin als Aminodonor und 2 mmol L⁻¹ α-Ketoglutarat als Aminoakzeptor. Die Ansätze inkubierten 30 min bei 30 °C.

2.31. Bioinformatische Analysen

2.31.1. Homologiensuche mittels BLAST

Die Homologien suchungen wurden auf der Seite NCBI der National Institutes of Health mit der BLAST (Basic local alignment search tool) Funktion durchgeführt (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINKLOCAL=blasthome) [164,165]. Die Proteindatenbanken im FASTA Format, die hier verwendet wurden, stammen ebenfalls von NCBI. Die Sequenz von StoTA wurde beim entsprechenden RCSB Eintrag (6k8h) heruntergeladen. Für die Sequenzvergleiche wurde die Option „align two or more sequences“ gewählt. Dadurch wurde die Sequenz der StoTA mit allen Sequenzen der der jeweiligen Proteindatenbanken verglichen. Bei dem Vergleich der StoTA mit dem Motiv wurde ebenso vorgegangen.

2.31.2. Identifikation potenzieller ω -Transaminasen in *B. raffinosifermentans*

Die Sequenzen bekannter ω -Transaminasen wurden mit der FASTA von *B. raffinosifermentans* verglichen, um so mittels Homologievergleich ähnliche Enzyme in der Proteindatenbank zu entdecken. Da dieser Vorgang zu keinem Ergebnis führte, wurden die Proteinsequenzen von *B. raffinosifermentans* einer Einteilung in Proteinfamilien unterzogen. Dazu wurde ein hmmer scan auf der Seite <https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>, HmmerWeb Version 2.41.1 durchgeführt [166–168]. Dieses Programm teilt die in der FASTA enthaltenen Proteine in Proteinfamilien ein, sogenannte Pfams [169,170]. Nach erfolgter Einteilung wurden die Ergebnisse nach der Pfam PF00202.21 [158] durchsucht, welche die Klasse 3 „Aminotransferase Protein Familie“ repräsentiert.

2.31.3. Sequenzvergleiche mittels COBALT

COBALT [171,172] ist ein Programm für multiple Sequenz-Alignments, das bei NCBI verfügbar ist. Sämtliche Sequenzen der zu vergleichenden Enzyme werden hier hochgeladen und automatisch miteinander verglichen. Im Anschluss an den Vergleich können identische Positionen farblich kenntlich gemacht werden. Im ersten Vergleich wurde eine Gruppe von drei ω -Transaminasen, die nur aliphatische Substrate akzeptieren, miteinander verglichen. Dafür fanden die Sequenzen von Enzymen von *Achromobacter denitrificans* [173] (NCBI Accessionnummer AAP92672.1), *Chromobacterium violaceum* [173] (NCBI Accessionnummer WP_011135573.1) und *Vibrio fluvialis* [173] (RCSB accession 5ZTX) Verwendung. Als zweite Gruppe von ω -Transaminasen wurden Enzyme verwendet, die sowohl aromatische als auch aliphatische Aminosäuren als Substrat verwenden. Hierfür wurden Enzyme von *Spaerobacter thermophilus* [174] (NCBI Accessionnummer WP_012871332.1), *Mesorhizobium* sp. LUK [175] (NCBI Accessionnummer ABL74379.1), VboTA und *Polaromonas* sp. JS666 [176] (NCBI Accessionnummer WP_041388512.1) verwendet. Diese beiden Vergleiche offenbarten konservierte Reste innerhalb der beiden Gruppen und an welchen Stellen sie sich voneinander abgrenzen. In einem abschließenden Sequenzvergleich wurden alle Sequenzen miteinander verglichen, um festzustellen, welche Aminosäurereste alle Enzyme gemeinsam

haben. Vor den Sequenz-Alignments wurden bei allen Sequenzen eventuell vorhandene Tags wie z.B. ein C-terminaler His-Tag bei VboTA sowie ein N-terminaler T7-Tag bei 5ZTX entfernt, damit sie den Sequenzvergleich nicht negativ beeinflussen.

2.31.4. Falten der StoTA-Varianten mittels AlphaFold

Da für die StoTA-Varianten keine Proteinstrukturen verfügbar sind, wurden sie *in silico* gefaltet. Für diese Vorhersagen wurde AlphaFold [177] auf einem Colab Notepad [178] (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/v1.2.0/AlphaFold2.ipynb>) verwendet. Die Standardeinstellungen wurden bis auf eine Ausnahme nicht verändert. Die einzige Einstellung, die nicht der Voreinstellung entsprach, war die Anzahl der Modelle, die berechnet werden sollten. Diese Anzahl wurde von 5 auf 4 gesenkt, da die zugeordnete Rechenzeit limitiert ist. Abhängig von der zugeteilten Recheneinheit (CPU oder GPU) reicht diese Zeit in der Regel nicht für 5 Modelle und ein Zwischenspeichern auf dem Notepad ist nicht möglich. Nach Abschluss der Berechnungen erstellte AlphaFold automatisch eine pdb-Datei für jedes errechnete Modell, mit der die Strukturen im Anschluss visualisiert werden können. Außerdem wurden Diagramme erstellt, die die Sicherheit der Positionen der einzelnen Aminosäuren darstellen. Um die Korrektheit der Modelle zu testen, wurde auch ein Modell für das unmodifizierte Enzym berechnet und mit der Kristallstruktur des Wildtyps (RCSB [179] Eintrag: 6K8H, NCBI Accessionnummer: WP_012871332.1) verglichen.

2.31.5. Visualisierung der 3D-Strukturen der Proteine

Die Visualisierung der dreidimensionalen Proteinstrukturen erfolgte mit ChimeraX [180]. Die verwendete Version war 1.4rc202205190126 (2022-05-19).

Die Abbildung, die die Wasserstoffbrücken im aktiven Zentrum der StoTA darstellt, ist mit mol* [181] erstellt worden.

3. Ergebnisse

Um neue ω -Transaminasen zu identifizieren, wurden drei verschiedene Ansätze verfolgt.

1: Literaturrecherche zu bekannten Produzenten von ω -Transaminasen, um mittels Homologievergleich weitere Enzyme dieser Klasse in verwandten Arten zu finden. Dazu wurden die Proteindatenbanken der potenziellen ω -Transaminase-Produzenten heruntergeladen und alle darin enthaltenen Sequenzen mit der Sequenz der bekannten ω -Transaminase StoTA verglichen. Die Ergebnisse dieser Methode sind in Abschnitt 3.1 beschrieben.

2: Ein bekanntes Enzym wurde modifiziert, um die Aktivität zu verbessern. Hierfür wurde ein Enzym von *S. thermophilus* verwendet. Das Protein wurde schrittweise an ein potenzielles Motiv für aromatische ω -Transaminasen angepasst und zum anderen wurde versucht, die Aktivität durch Modifikationen des aktiven Zentrums zu erhöhen. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 3.2 dargestellt.

3: Screenen der Organismen aus der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Hefegenetik auf ω -Transaminase Aktivität, um bislang unbekannte Produzenten von ω -Transaminasen zu entdecken. Dazu wurden verschiedene Stämme von Pilzen und Bakterien mit β -Phenylalanin im Medium kultiviert. Im Anschluss der Kultivierung wurde der Proteinrohextrakt der Stämme auf Aktivität bei der Desaminierung von β - und γ -Aminosäuren getestet. Hierbei hat sich *B. raffinosifermentans* als vielversprechend herausgestellt. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 3.3 dargestellt.

Die Arten *Paraburkholderia phytofirmans* und *P. graminis* sind als Produzenten für ω -Transaminasen bekannt. Rohextrakte dieser beiden Organismen dienten als Positivkontrolle für den Aktivitätstest. Abb. 16 zeigt, dass diese Extrakte in der Lage sind die Aminogruppe von β -Phenylalanin auf α -Ketoglutarat zu übertragen.

Ergebnisse

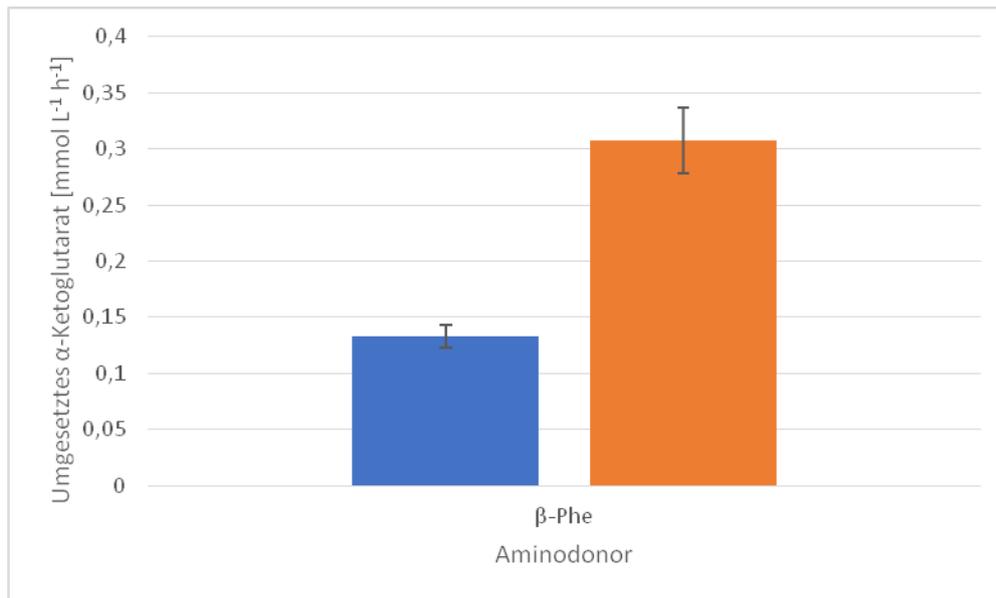


Abbildung 16: Positivkontrolle als Beweis, dass der Aktivitätstest funktioniert. Die Rohextrakte von *P. phytofirmans* (blau) und *P. graminis* (orange) wurden eingesetzt um die Aminogruppe von β -Phenylalanin auf α -Ketoglutarat zu übertragen. Dargestellt ist der Umsatz von α -Ketoglutarat in $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$, sowie die Standardabweichung. $N=2$.

Da der Test funktioniert, konnte er im weiteren Fortgang für die Quantifizierung der Aktivität von Enzymen bzw. Rohextrakten verwendet werden.

3.1. Ergebnisse der Literaturrecherche

3.1.1. Testen potenzieller Kandidaten

Das Durchsuchen von Literatur führte zu einer Vielzahl an Spezies, die ω -Transaminasen produzieren können. Unter anderem die Gattung *Mesorhizobium* enthält mindestens eine Spezies, die in der Lage ist, eine ω -Transaminase zu produzieren, die β -Phenylalanin umsetzt [175]. Ein Sequenzvergleich aller Proteine von *M. loti* mit der Sequenz von StoTA ergab mehr als 100 Treffer. Unter den 50 besten Ergebnissen befinden sich mehr als 10 Aminotransferasen. Daher wurde *M. loti* bestellt. Ein erster Aktivitätstest mit dem Rohextrakt verlief positiv. Der Extrakt zeigte Aktivität mit β -Homoalanin als Aminodonor und α -Ketoglutarat als Aminoakzeptor. Da aber bereits eine Publikation über einen Großteil dieser Enzyme existiert [182], wurde mit diesem Organismus nicht weiter gearbeitet.

Ergebnisse

Für das Bakterium *Microbacterium ginsengisoli* wurde ebenfalls eine ω -Transaminase beschrieben [183]. Der einzige verfügbare Vertreter dieser Gattung, *Microbacterium lacusdiani* (DSMZ Bestellnummer 29188), war nicht in der Lage, eine der in dieser Arbeit verwendeten β - oder γ -Aminosäuren umzusetzen.

Die Gattung *Variovorax* weist auch zumindest eine Spezies auf, *V. paradoxus*, die eine ω -Transaminase produziert [90,184]. Ein Abgleich der bei der DSMZ verfügbaren Stämme mit der Sequenzdatenbank von NCBI ergab, dass *V. boronicumulans* sowohl sequenziert, als auch verfügbar und unter S1 Bedingungen zu kultivieren war.

Um herauszufinden welches Protein von *V. boronicumulans* eine ω -TA sein könnte, wurde die Sequenz einer bekannten ω -TA von *S. thermophilus* (StoTA) [185] mit den Einträgen der Proteindatenbank verglichen, die sämtliche Proteinsequenzen von *V. boronicumulans* im Einbuchstaben-Code enthält. Das beste Ergebnis (Abb. 17) wurde im zweiten Schritt mit einem potenziellen Motiv für aromatische ω -TAs [4] verglichen.

Ergebnisse

Range 1: 23 to 445

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
247 bits(630)	7e-82	Compositional matrix adjust.	156/428(36%)	227/428(53%)	33/428(7%)
Query 27		FEAQTRYMPGANSRSLFYAPFPLTIAKGEGASLWDADGHRYTDFIAEYTAGVYGHSAPE			86
Sbjct 23		FE R +PG N+R+ ++ AP+P A+G GA + DADG DF+ YTA ++GH+ P+ FERARRVLPGGNTRTTVYSAPYPPYAARGRGAVIVDADGEERLDFVMNYTALIHGHADPD			82
Query 87		IREAVIEAMQGGINLTGHMLLEGRLAQTICERFPQVEQLRFTNSGTEANLMALTAALRFT			146
Sbjct 83		I EAVI + G+ E LA+ + ER P ++Q+RFTNSGTEA +MA+ AA +T INEAVIRQLADGVAFAMPTEHEIALAELLTERVPSLQQVRFTNSGTEAVMMAIKAARAYT			142
Query 147		GRRKIVVFSGGYHGGVLGF-----GDQPSPTTVPF-----DFLVLPYND			185
Sbjct 143		GR +I F G YHG F G+ P P+ +VLP+ND GRPRIAKFDGCYHGS-YDFAEVSTQSSGKPGEDGFPVATPYTGGTPQAVLDSVVVLPFND			201
Query 186		ADTARAQIDEHGADIAAILVEPMQAGSGCIPGGREFLQTLRGGATRVGALLVFDEVMTSR			245
Sbjct 202		D I++H ++AA+L++P + G P FLQ LR G +L+FDEV++ R IDGTERLIEQHRDELA AVLIDPNRSLGLYPAEPAFLQRLREITRAYGIVLIFDEVISLR			261
Query 246		LGPHGLANGLGIRADLTTLGKYIGGGMSFGAFGGRADVMAQFDPRGTGA--LAHSGTFNNN			303
Sbjct 262		G+ + LG+ DLT +GK IGGG GA GG A+VM+ FDP G H GTFN N SDYGGMQSVLGVTPDLTAMGKIIGGGFPVGAVGGSAEVMVFDPTGGPPRAPHGGTFNAN			321
Query 304		VMTMAAGYAGLTQLFTPEAAAAAALAEERGEAMRSRLNALCEREGVAMQFTGVGSLMNAHFLR			363
Sbjct 322		+TM AG + +L TP LA G+ +R+ + + GV Q TG GSL + H + PVTMVAGLTAMRKL-TPAEFDRLATLGQQLRAGVEEVLRAGVPGQVTGYGSLFHIHLHQ			380
Query 364		GEVRRVAD-----LAAVDGRLRQLLFFHLLKEGIYTSPRGFVVLSLPLSAQDIDRYVA AV			418
Sbjct 381		R +AD L+A + + L+ GI+ +P F LS P+ +++ +V A ---RPLADYRNSVLSAQERAFVGRVHEALMGRGIFITPALFGCLSTPMGVPEVEAFVDAF			437
Query 419		GSFIEACR 426			
Sbjct 438		+ ++ R AAALQDAR 445			

Abbildung 17: Sequenzvergleich VboTA und StoTA. Query: Sequenz der möglichen ω -Transaminase von *V. boronicumulans*. Sbjct: Sequenz der StoTA. In der mittleren Zeile sind Aminosäuren angegeben, die in beiden Sequenzen identisch sind, ein „+“ markiert Stellen, an denen sich Aminosäuren mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften.

Ein Homologievergleich der Sequenz von VboTA (*V. boronicumulans* ω -Transaminase) mit der eines potentiellen Motivs für aromatische ω -Transaminasen [184] hat ergeben, dass VboTA sehr gut mit dem Motiv übereinstimmt (Abb. 18).

Ergebnisse

Range 1: 1 to 69

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
134 bits(336)	5e-44	Compositional matrix adjust.	61/69(88%)	64/69(92%)	0/69(0%)
Query 17	TDGNPESLRRFEAQTRYMPGANS		RSVLFYAPFPLTIAK	GEASLWDADGHRYTDFIAEY	T 76
Sbjct 1	TD NP S R+FEAQ RYMPGANS		RSVLFYAPFPLTIA+GEGA+LWDADGHRY	DFIAEY	T 60
Query 77	AGVYGHSA	85			
Sbjct 61	AGVYGHSA	69			

Abbildung 18: Vergleich von VboTA mit einem potentiellen Motiv von ω -Transaminasen. Query: Sequenz des Motivs. Sbjct: Ausschnitt der VboTA Sequenz. Die potentielle funktionelle Domäne des Motivs befindet sich in der Box. Grüne Pfeile markieren Grenzen der Sekundärstrukturen, rote Pfeile die konservierten Reste, die für die Funktion von aromatischen β -Transaminasen wichtig zu sein scheinen.

Da *V. boronicumulans* ein Protein enthält, das sowohl gut mit der Sequenz von StoTA übereinstimmt, als auch alle essentiellen Reste des potenziellen Motivs enthält, wurde der Stamm als Lyophilisat bei der DSMZ bestellt (Bestellnummer 21722) und unter den bei der DSMZ empfohlenen Bedingungen kultiviert.

Zusätzlich zu den Ergebnissen der Homologiesuchen wurde der Rohextrakt von *V. boronicumulans* auf Aktivität mit β -Phenylalanin, β -Homoalanin und 4-Aminopentansäure getestet. Da der Test positiv war (Abb. 19), wurde das Gen bestellt, das für das Protein mit der NCBI Accession-Nummer WP_095950167.1 codiert.

Ergebnisse

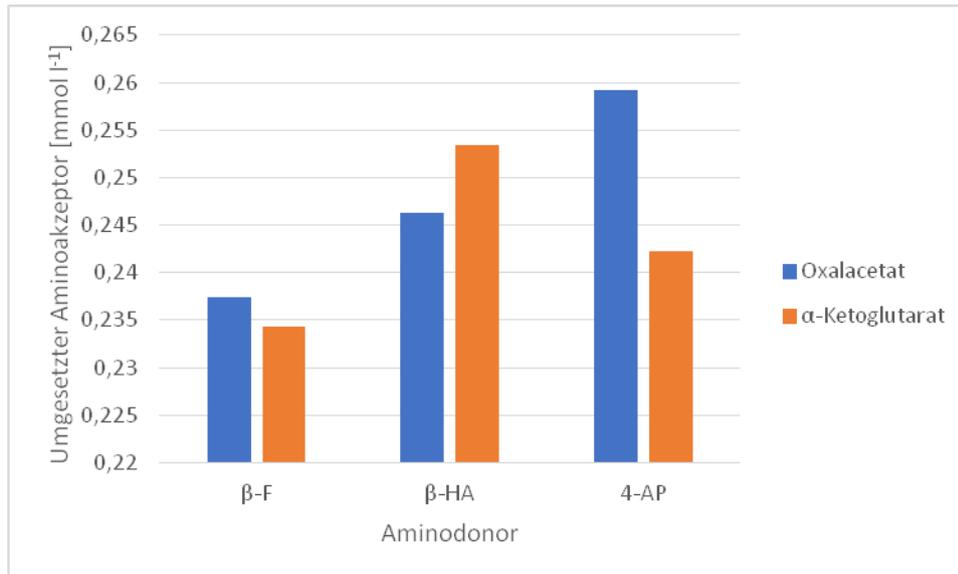


Abbildung 19: Aktivitätstest mit dem Rohextrakt von *V. boronicumulans*. Dargestellt ist die Menge an umgesetztem Aminoakzeptor in mmol L⁻¹ unter Verwendung verschiedener Aminodonoren nach einstündiger Inkubation bei 30 °C. β-F: β-Phenylalanin, β-HA: β-Homoalanin, 4-AP: 4-Aminopentansäure.

3.1.2. Klonierung und Expression von VboTA

Die Gensequenz, die für VboTA codiert, wurde bei Eurofins geordert. Die vollständige Sequenz ist im Anhang zu finden.

Die Sequenz wurde im pEX-Vektor geliefert und aus diesem mit Hilfe von NdeI und XhoI herausgeschnitten und anschließend in den pET 21 b (+) Vektor gebracht (Abb. 20), damit die Enzymproduktion mittels Laktose oder IPTG induzierbar ist und das Enzym mit einem His-Tag versehen wird.

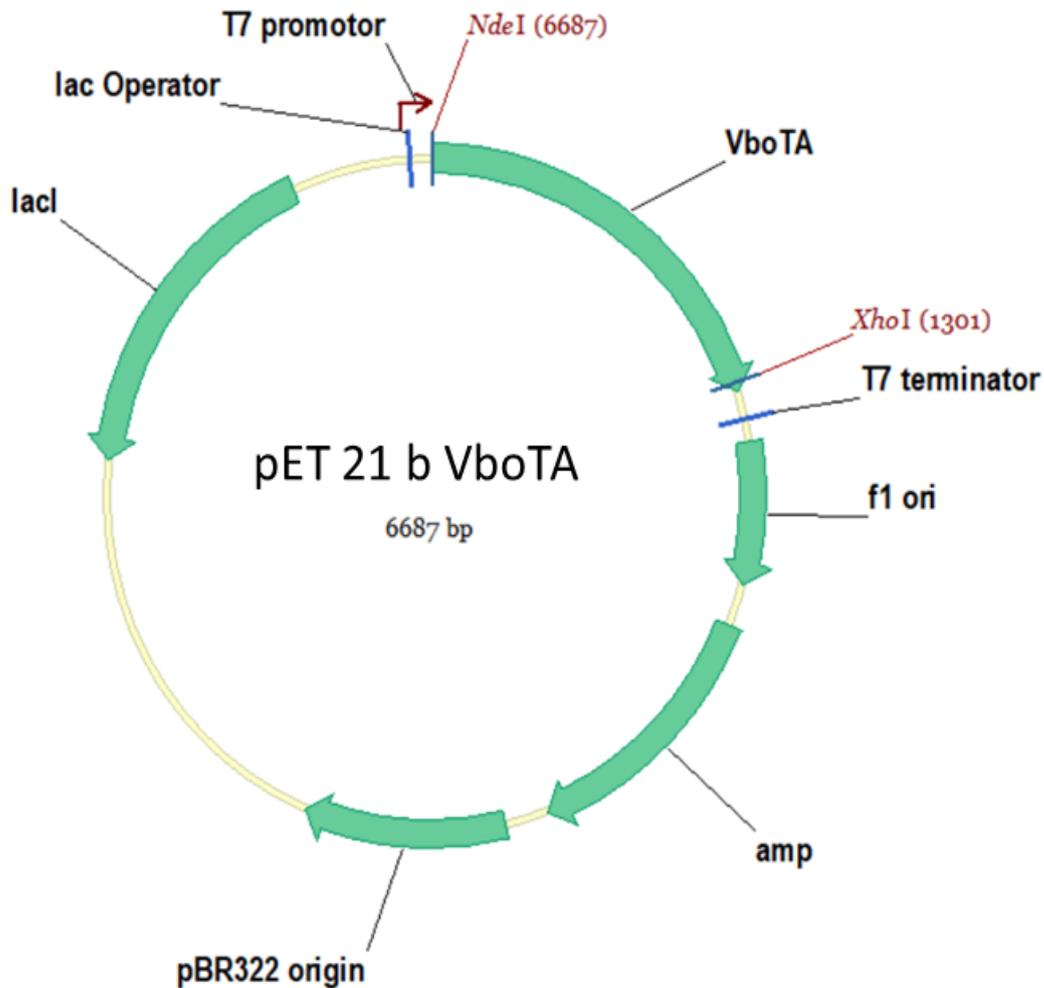


Abbildung 20: Vektorkarte von *vboTA* in *pET 21 b (+)*.

Nach der Klonierung wurde *E. coli* XL1 blue mit dem Konstrukt transformiert, um das Plasmid zu amplifizieren. Die Sequenz der Plasmide wurde mittels Sanger-Sequenzierung auf Korrektheit überprüft. *E. coli* DE3 wurde anschließend mit Plasmiden mit fehlerfreier Sequenz transformiert und zur Proteinproduktion verwendet.

Zunächst wurde in einem kleinen Versuch getestet, ob die Produktion des funktionsfähigen Enzyms in *E. coli* BL21 DE3 möglich ist. Dazu wurde eine 60 ml Kultur des Produktionsstammes angeimpft, der mit dem Plasmid (Abb. 20) transformiert wurde. Nach 2 Stunden Wachstum wurde diese Kultur in zwei 30 ml Kulturen geteilt. Eine wurde mit 0,5 mmol L⁻¹ IPTG induziert, die andere nicht. Die Zellen wurden zwei weitere Stunden später geerntet (Abb. 21). Der Stamm wird im Folgenden *E. coli* BL21 DE3 VboTA genannt.

Ergebnisse

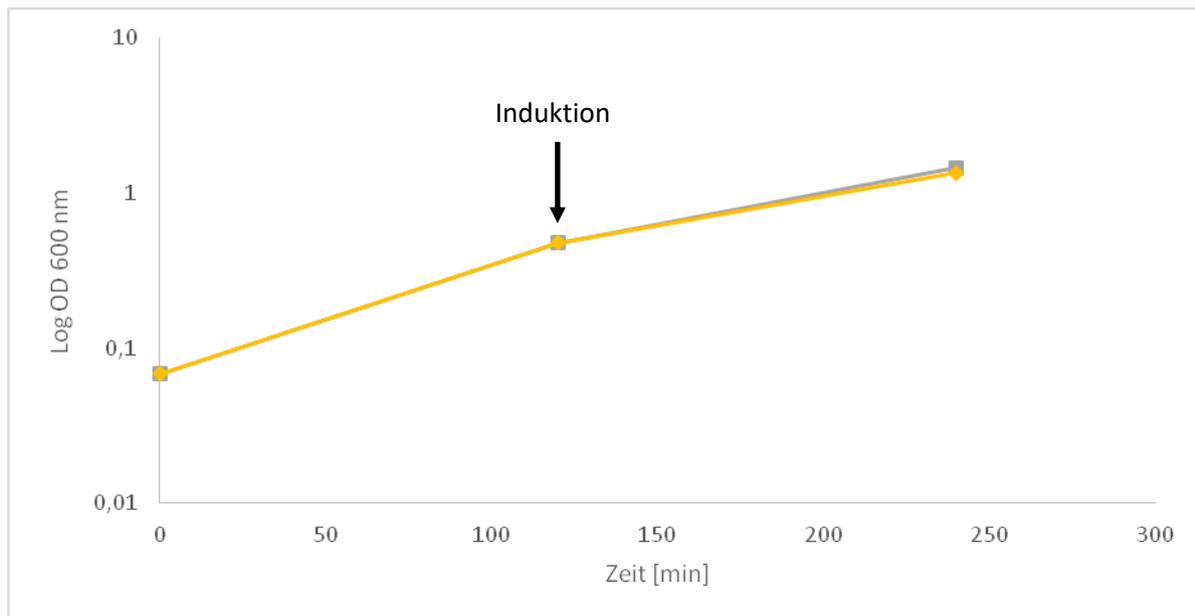


Abbildung 21: Wachstumskurven *E. coli* BL21 DE3 VboTA, induziert und nicht induziert. Gelb: induziert, grau: nicht induziert.

Abb. 21 zeigt, dass die Produktion des Enzyms das Wachstum nicht behindert. Im Anschluss an die Ernte wurden die Zellen aufgeschlossen, um zu prüfen, ob VboTA von den Zellen produziert wurde. Um sicherzustellen, dass die Aktivität in den nachfolgenden Tests von VboTA stammt und nicht von einem Enzym von *E. coli*, das zufällig produziert wird, wurde ein weiterer Stamm konstruiert, der mit dem pET 21 b Vektor transformiert wurde. Dieser Vektor enthielt nicht das Gen *vboTA*, das für VboTA codiert. Dieser Stamm wurde unter den gleichen Bedingungen wie die Produktionsstämme kultiviert und induziert. Der Extrakt dieses Kontrollstammes zeigte keine ω -Transaminaseaktivität.

Ergebnisse

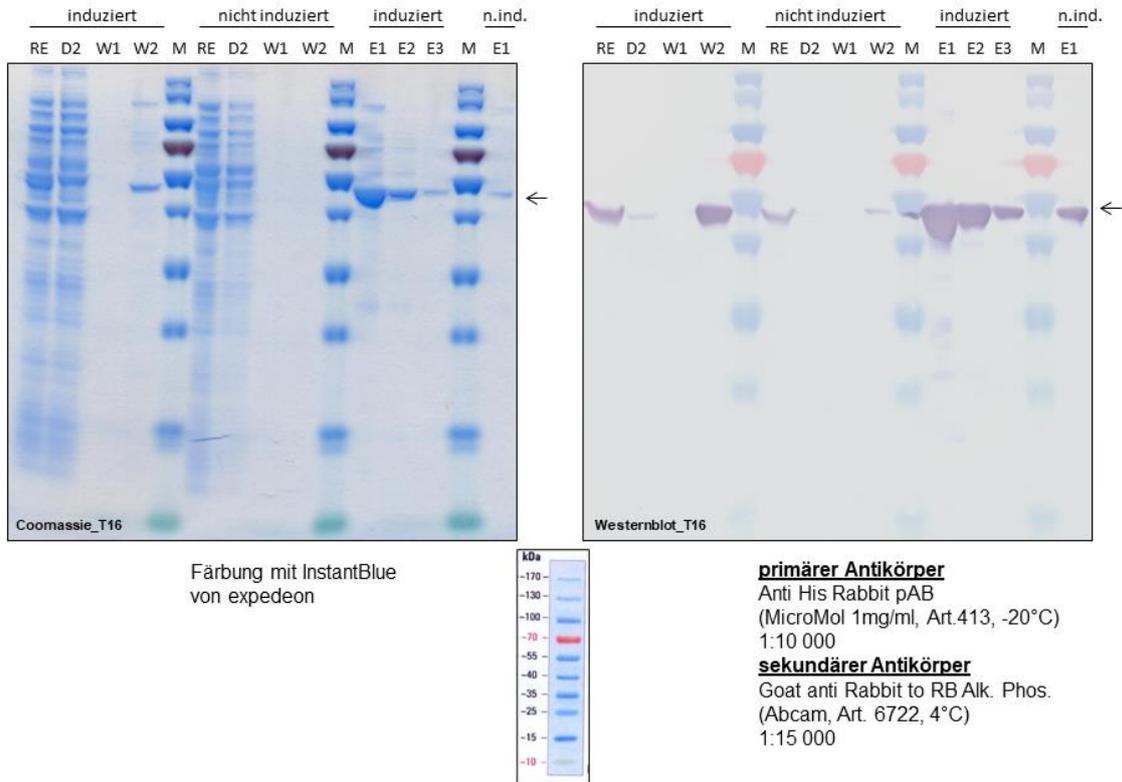


Abbildung 22: 1D SDS-Gel (links) und entsprechender Westernblot (rechts) der verschiedenen Reinigungsschritte von VboTA. Ein Monomer des Enzyms wiegt inklusive His-Tag etwa 47,2 kDa. RE: Rohextrakt, D2: zweiter Durchlauf durch die Ni-NTA-Agarose, W1, W2: Waschschrirte 1+2, M: Marker, E1-3: Eluat 1-3. Die Pfeile markieren die Banden mit passender Größe.

Ein Monomer von VboTA hat inklusive His-Tag ein Molekulargewicht von etwa 47,2 kDa. Auf dem 1D-Gel sind Banden mit passender Größe zu sehen (Abb. 22, links). Da VboTA C-terminal einen His-Tag enthält, konnte das Enzym im Westernblot spezifisch mit einem Anti-His Antikörper (Anti His Rabbit pAB, MicroMol, Katalognummer 413) gebunden und anschließend mit einem sekundären Antikörper (Goat anti Rabbit, Katalognummer 6722, Abcam, Cambridge, UK) markiert werden, der eine alkalische Phosphatase trägt und spezifisch an den ersten Antikörper bindet. Durch Zugabe von NBT/BCIP (NBT/BCIP-Gebrauchsfertige Tabletten, Katalognummer 11697471001, Roche, Basel, Schweiz) nach Herstellerprotokoll färbten sich die Bereiche violett, an denen der sekundäre Antikörper gebunden hat. Die gefärbten Banden, die auch die passende Größe haben, zeigen, dass sowohl die Expression in *E. coli* DE3 als auch die anschließende Reinigung funktionieren (Abb. 22, rechts).

Das gereinigte Enzym konnte für Aktivitätstests verwendet werden. Zunächst wurde festgestellt, welcher der verfügbaren Amino-Akzeptoren am besten geeignet ist. Da VboTA

Ergebnisse

zu der Aspartat-Familie gehört und eine Glutamat-Bindedomäne besitzt, wurden neben Pyruvat, einem Standard-Akzeptor, Oxalacetat und α -Ketoglutarat als Akzeptoren verwendet. Zeitgleich wurde geprüft, ob ein höherer oder ein niedrigerer pH-Wert einen positiven Einfluss auf die Aktivität hat.

3.1.3. Aktivitätstests mit VboTA

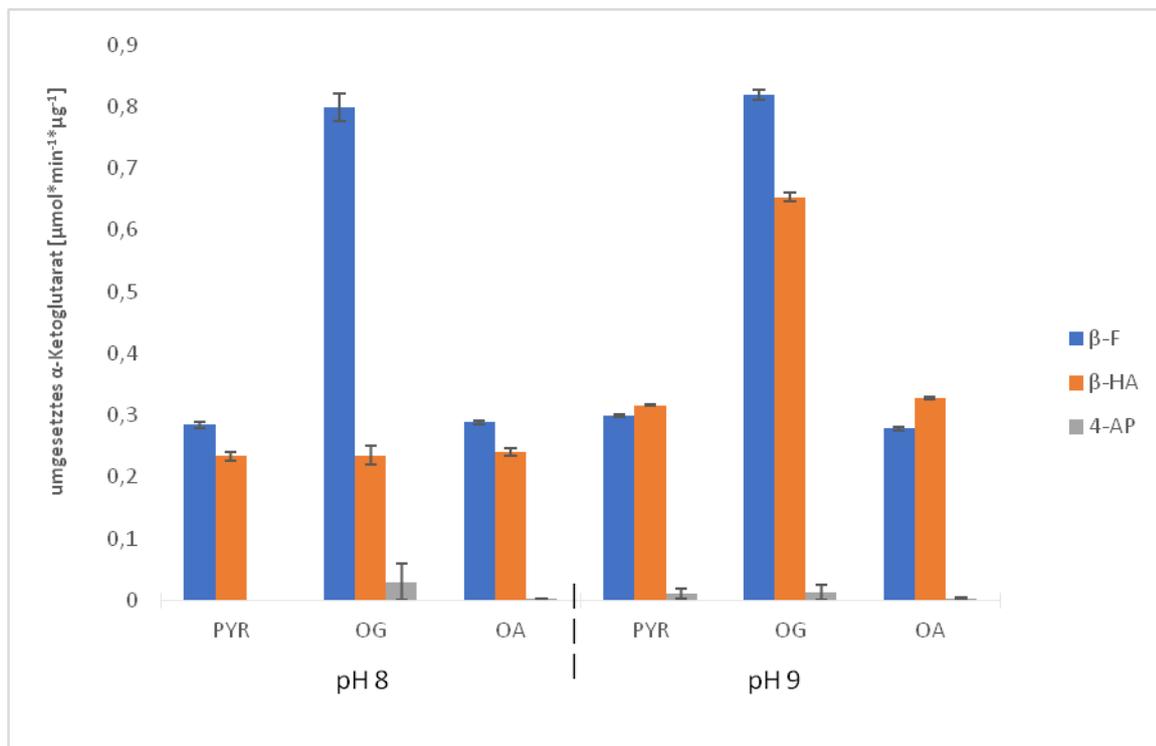


Abbildung 23: Aktivität von VboTA in $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ Enzym nach 1 h bei 30 °C und pH 8.0 bzw. 9.0 unter Verwendung von verschiedenen Aminoakzeptoren und mit β -F und β -HA als Aminodonoren. Jede Bedingung wurde in Duplikaten durchgeführt, die Standardabweichung ist ebenfalls angegeben. PYR: Pyruvat, OG: α -Ketoglutarat, OA: Oxalacetat. β -F: β -Phenylalanin, β -HA: β -Homoalanin, 4-AP: 4-Aminopentansäure.

Der erste Aktivitätstest hat ergeben, dass VboTA β -Aminosäuren desaminieren kann (Abb. 23). Bei Verwendung von β -Homoalanin ist pH 9 von Vorteil, da hier eine etwa dreifach höhere Aktivität zu messen ist, $0,65 \text{ U} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ im Gegensatz zu $0,23 \text{ U} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ bei pH 8. Außerdem hat sich herausgestellt, dass α -Ketoglutarat der beste Aminoakzeptor ist. Bei beiden pH-Werten wurde bei Verwendung von β -Phenylalanin als Donor eine etwa 2,5-fach höhere Aktivität als mit Pyruvat oder Oxalacetat gemessen. Mit β -Homoalanin als Donor und α -Ketoglutarat als Akzeptor ist nur bei pH 9 ein Unterschied im Umsatz zu messen. Hier ist die

Ergebnisse

Aktivität etwa doppelt so hoch wie bei den beiden anderen Akzeptoren, Pyruvat und Oxalacetat. Mit der getesteten γ -Aminosäure, 4-Aminopentansäure, konnte mit keinem Akzeptor Umsatz gemessen werden, weder bei pH 8 noch bei pH 9.

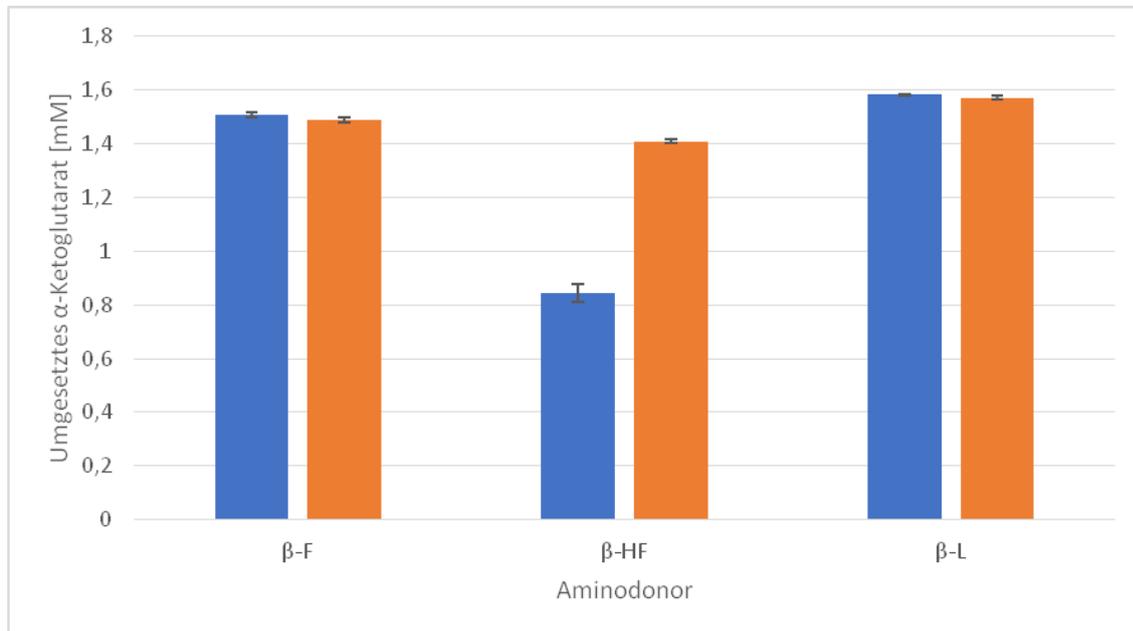


Abbildung 24: Von VboTA umgesetztes α -Ketoglutarat, nach 1 h bei 30 °C und pH 9 (blau), und nach 3 h bei 30 °C und pH 9 (orange). Die Menge an umgesetztem α -Ketoglutarat in mM mit verschiedenen Aminodonoren ist angegeben. β -F: β -Phenylalanin, β -HF: β -Homophenylalanin, β -L: β -Leucin. Jede Messung erfolgte in Triplikaten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Nachdem feststand, dass α -Ketoglutarat der beste Akzeptor ist und bei pH 9 bessere Umsätze erzielt werden, wurden β -Homophenylalanin und β -Leucin unter diesen Bedingungen als Donoren verwendet. Der Umsatz von β -Leucin erfolgte ähnlich schnell wie der von β -Phenylalanin. Beide Substrate erzielten ihren maximalen Umsatz innerhalb einer Stunde, der auch nach längerer Inkubation nicht mehr gestiegen ist. Der Umsatz von β -Homophenylalanin war deutlich langsamer (Abb. 24). Hier wurde nach 3 h ein höherer Umsatz festgestellt als nach 1 h.

Um zu testen, ob VboTA nur eine β -Aktivität zeigt, wurde auch α -Alanin als Aminodonor eingesetzt. Außerdem wurden β -Alanin und die Amine Spermin, Spermidin und Putrescin als potenzielle Aminodonoren getestet. Weder mit α - noch mit β -Alanin konnte Aktivität festgestellt werden. Die getesteten Amine Spermin, Spermidin und Putrescin wurden ebenfalls nicht desaminiert.

3.1.4. Bestimmung von Temperatur und pH Optimum sowie der Thermostabilität

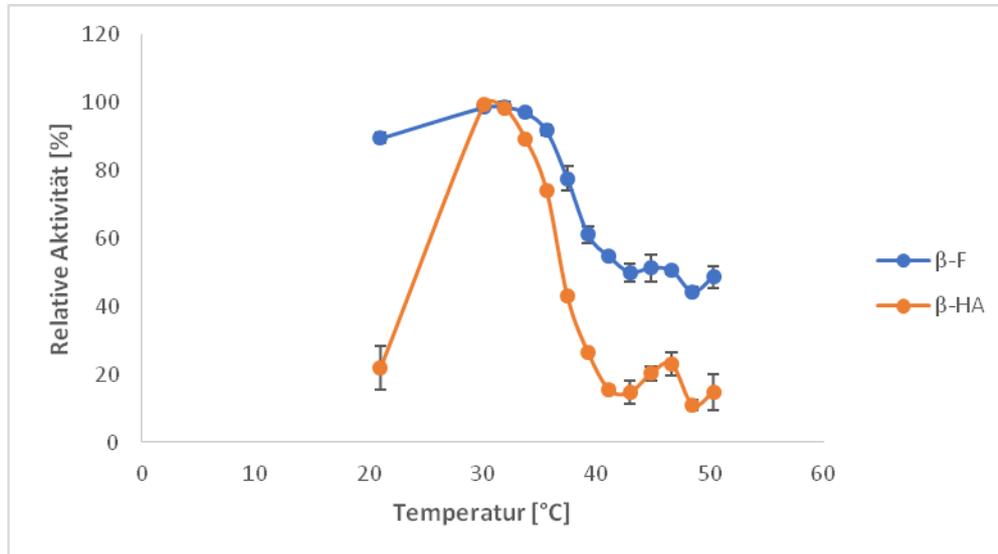


Abbildung 25: Relative Aktivität von VboTA mit verschiedenen Aminodonoren (blau: β -Phenylalanin, orange: β -Homoalanin) bei Temperaturen zwischen 20 und 50 °C. Als Aminoakzeptor wurde α -Ketoglutarat verwendet. Der höchste Aktivitätswert wurde als 100 % Wert verwendet. Alle anderen Werte wurden in Relation gesetzt. Die Berechnung wurde für jede Messreihe separat durchgeführt. Jede Messung erfolgte in Triplikaten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die Aktivitätsbestimmung bei Temperaturen zwischen 20 und 50 °C haben ergeben, dass das Temperaturoptimum für den Umsatz von β -Phenylalanin bei etwa 32 °C und das für β -Homoalanin bei 30 °C liegt (Abb. 25). Allerdings liegen die relativen Aktivitäten für beide Donoren bei diesen Temperaturen zwischen 98,8 und 99,5 % sehr nah beieinander, so dass die zwei Grad Temperaturunterschied kaum merklich sind. Die Bestimmung des Temperaturoptimums hat auch ergeben, dass die Aktivität mit β -Phenylalanin generell deutlich höher ist, als mit β -Homoalanin. Auch zeigt der Kurvenverlauf für β -Homoalanin einen schärferen Peak als der für β -Phenylalanin.

Ergebnisse

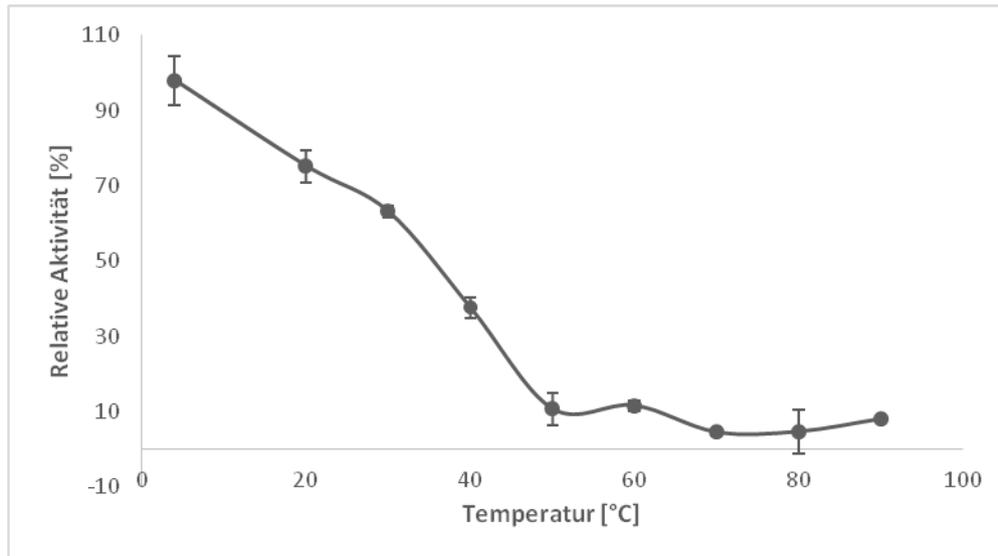


Abbildung 26: Relative Aktivität von VboTA mit β -Phenylalanin, nach einstündiger Inkubation des Enzyms bei Temperaturen zwischen 20 und 90 °C. Die Probe, die bei 4 °C gelagert wurde, diente als 100 % Wert. Die Aktivitäten der übrigen Proben wurden in Relation zu dem 100 % Wert gesetzt. Jede Messung erfolgte in Triplikaten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die Messung der Temperaturstabilität hat ergeben, dass VboTA sehr temperaturanfällig ist. Schon eine Stunde bei Raumtemperatur führt zu einem Aktivitätsverlust von etwa 25 % im Vergleich zu bei 4 °C gelagertem Enzym. Ein Aliquot, das eine Stunde bei 50 °C gelagert wurde, hat nur noch 10 % Restaktivität (Abb. 26).

3.1.5. Produkt- und Eduktinhibition

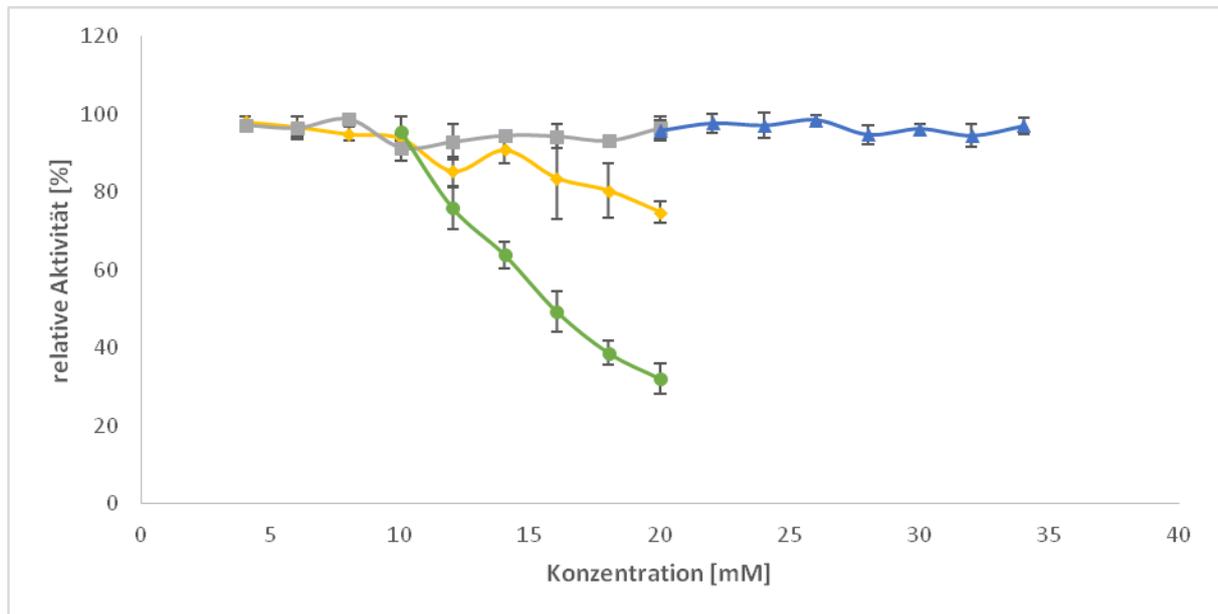


Abbildung 27: Substrat/Produkt Inhibition. Die Aktivität von VboTA bei pH 9 und 30 °C, in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von L-Glutamat (gelb), D-Glutamat (grau), α-Ketoglutarat (grün) und β-Phenylalanin (blau) wurde bestimmt. Die höchste Aktivität jedes Ansatzes wurde als 100 % Wert verwendet, die anderen Werte wurden in Relation gesetzt. Jede Messung wurde in Triplikaten durchgeführt, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

VboTA kann sowohl durch ein Edukt (α -Ketoglutarat) als auch durch ein Produkt (L-Glutamat) inhibiert werden (Abb. 27). Die Inhibition durch α -Ketoglutarat ist stärker als die von L-Glutamat. Bei der höchsten getesteten Konzentration (20 mmol L^{-1}) hat α -Ketoglutarat die Aktivität von VboTA um 67,9 % gesenkt. Der inhibitorische Effekt durch L-Glutamat beschränkte sich auf 25,1 %. D-Glutamat zeigte keine Hemmung. Eine Edukt-Hemmung durch β -Phenylalanin wurde bis zu einer Konzentration von 34 mmol L^{-1} nicht beobachtet. Eine Inhibition durch das Produkt der Desaminierung von β -Phenylalanin, 3-Keto-3-phenylpropionsäure, wurde nicht untersucht, da es nach der Desaminierung zu einer spontanen Decarboxylierung kommt und das Molekül somit nicht mehr für eine Inhibition zur Verfügung steht.

3.1.6. Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von VboTA

Um den Oligomerisierungsgrad von VboTA zu bestimmen, wurden zunächst die Retentionszeiten von Proteinen mit bekannter Größe mittels Größenausschlusschromatographie gemessen. Um das Säulenvolumen zu bestimmen, wurde Blue Dextran eingespritzt, da es einen scharfen Peak liefert. Das Eluat wurde bei 280 nm gemessen, da aromatische Aminosäuren bei dieser Wellenlänge absorbieren.

Die Messung von Blue-Dextran ergab ein Porenvolumen von 8,77 ml.

Als nächstes wurden zwei Enzymmischungen über die Säule aufgetrennt. Mischung 1 enthielt Ferritin (440 kDa) und Ovalbumin (42,8 kDa), Mischung 2 Katalase (240 kDa) und BSA (66,4 kDa). Auch hier wurde das Eluat wieder bei 280 nm gemessen. Die gemessenen Retentionszeiten wurden für das Erstellen einer Standardkurve zur Bestimmung der molekularen Masse der nativen VboTA verwendet.

Der Peak der Katalase erscheint bei 12,41 ml. Das Ovalbumin liefert einen Peak bei 15,23 ml. Der Ferritinpeak erscheint bei 10,57 ml, BSA eluiert nach 14,04 ml.

Ergebnisse

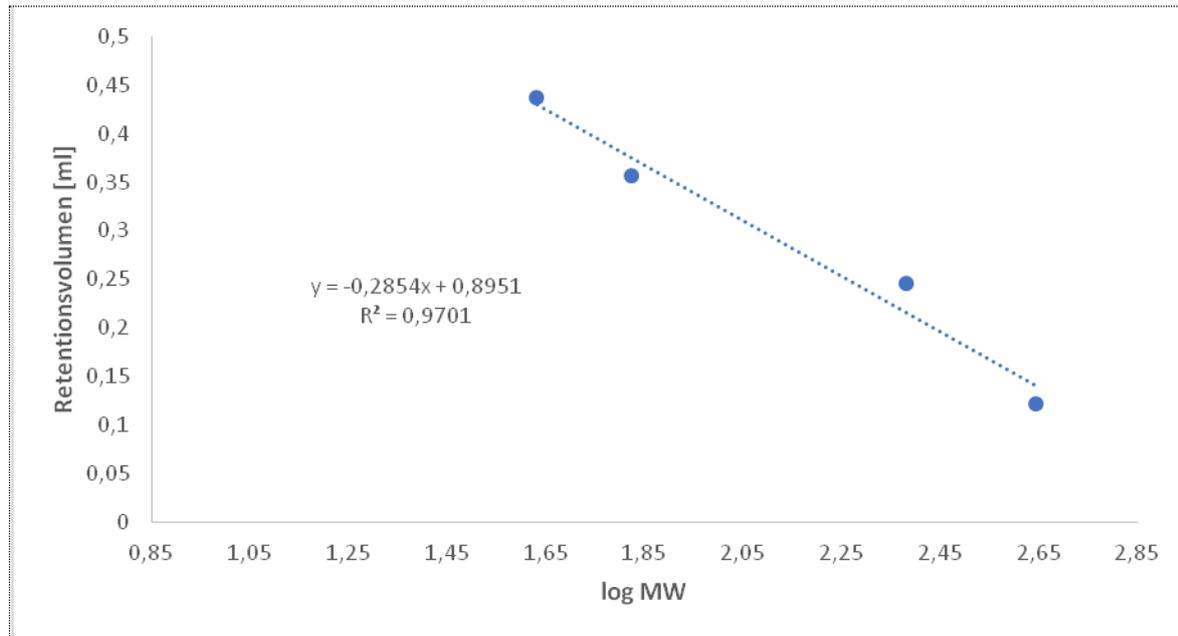


Abbildung 28: Messung der Standards zur Bestimmung des Molekulargewichts der nativen VboTA. Dargestellt ist die Retentionszeit in Abhängigkeit des Molekulargewichtes (logarithmische Skala) der Standardproteine. Log MW: logarithmisches Molekulargewicht.

Die Standards lieferten eine Gerade mit der Gleichung $y = -0,2854x + 0,8951$ (Abb. 28). In diese Gleichung wird der Messwert für VboTA eingesetzt, um das Molekulargewicht des nativen Proteins zu bestimmen.

Das Einsetzen der Messwerte für den VboTA Peak in die Geradengleichung ergibt für die erste Messung ein Molekulargewicht von etwa 127,57 kDa.

Die Messung liefert den Oligomerisationsgrad:

$$127,57 \text{ kDa} / 47,2 \text{ kDa} = 2,70$$

Eine weitere Messung lieferte 1,38 als Oligomerisationsgrad.

Der Oligomerisationsgrad konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Der erhaltene Wert deutet eher auf ein Dimer als auf ein Monomer hin, was auch zur Literatur passt, da die meisten ω -Transaminasen als Dimer vorliegen [186].

Ergebnisse

3.1.7. Bestimmen kinetischer Konstanten von VboTA

Für die Substrate α -Ketoglutarat, β -Homophenylalanin, β -Leucin, β -Homoalanin und β -Phenylalanin wurde der K_m -Wert, V_{max} , k_{cat} und der E-Wert bestimmt. K_m und V_{max} für α -Ketoglutarat wurde mit Phenylalanin als Aminodonor bestimmt. Für die Bestimmung von k_{cat} wird von einem Dimer ausgegangen.

Tabelle 19: Kinetische Konstanten von VboTA.

Substrat	K_m [mmol L ⁻¹]	V_{max} [μ mol min ⁻¹]	k_{cat} [s ⁻¹]	E (k_{cat}/K_m) [L mmol ⁻¹ s ⁻¹]
α -Ketoglutarat	2.1 \pm 0.4	24.9 \pm 2.0	34.2 \pm 2.7	16.2 \pm 1.3
β -Homophenylalanin	0.7 \pm 0.2	1.1 \pm 0.05	1.6 \pm 0.07	2.2 \pm 0.1
β -Leucin	44.7 \pm 1.2	48.5 \pm 1.2	66.5 \pm 7.1	1.5 \pm 0.2
β -Homoalanin	4.4 \pm 0.3	1.4 \pm 0.2	2.0 \pm 0.2	0.45 \pm 0.05
β -Phenylalanin	24.7 \pm 3.8	20.5 \pm 2.4	28.1 \pm 3.3	1.1 \pm 0.1

Die gemessenen kinetischen Konstanten passen zu den gemessenen Umsätzen (vgl. Abb. 23 und 24). So wird β -Leucin gefolgt von β -Phenylalanin mit der höchsten V_{max} umgesetzt (Tab. 19). Die Maximalgeschwindigkeit von α -Ketoglutarat wurde mit β -Phenylalanin bestimmt. Daher passen die Werte der anderen Aminodonoren nicht zu dem von α -Ketoglutarat.

Ergebnisse

Tab. 20: Mit VboTA erzielte Enantiomeren-Überschüsse (ee) der angegebenen Enantiomere, sowie die Endkonzentrationen der verbleibenden Enantiomere nach 24 h, α -KG: α -Ketoglutarat.

Substrat	(S)- β -Homophenylalanin		(R)- β -Leucin		(S)- β -Homoalanin		(R)- β -Phenylalanin	
	ee [%]	c [mM]	ee [%]	c [mM]	ee [%]	c [mM]	ee [%]	c [mM]
Pyruvat	46.7 \pm 0.9	25.7 \pm 0.1	\geq 99.9	26.2 \pm 0.2	\geq 99.9	24.8 \pm 0.7	\geq 99.9	25.6 \pm 0.6
α -KG	61.6 \pm 1.4	25.5 \pm 0.2	56.8 \pm 0.2	25.7 \pm 0.2	65.6 \pm 0.5	25.1 \pm 0.0	62.1 \pm 2.4	25.8 \pm 0.1

Bei höheren Substratkonzentrationen hat sich Pyruvat als besserer Aminoakzeptor herausgestellt. Nach 24 h konnte mit Pyruvat ein Enantiomeren-Überschuss von $>99,9$ % mit drei von vier Aminodonoren erreicht werden. Der höchste Überschuss mit α -Ketoglutarat nach dieser Zeit beträgt 65,6 %. Einzig mit β -Homophenylalanin konnte mit α -Ketoglutarat ein höherer Enantiomeren-Überschuss erzielt werden (61,6 \pm 1,4 % statt 46,7 \pm 0,9 %) (Tab. 20). VboTA desaminiert das (R)-Enantiomer von β -Homophenylalanin und β -Homoalanin. Von β -Leucin und β -Phenylalanin wird das (S)-Enantiomer desaminiert. Das bedeutet, dass das Enzym D-spezifisch ist.

3.1.8. Stabilitätstest von VboTA

Zur Untersuchung der Aktivität über die Zeit bei unterschiedlichen Lagertemperaturen wurden Aliquots des gereinigten Enzyms mit 0, 10, 20 und 50 % v/v Glycerin versetzt und anschließend bei 4 und -20 °C gelagert. Über einen Zeitraum von etwa 26 Wochen wurde die Aktivität der Aliquots gemessen. Die Bestimmung der Aktivität wurde durch den Umsatz von α -Ketoglutarat bei pH 9 und 30 °C nach 30 min gemessen. Als Aminodonor diente β -Phenylalanin.

Ergebnisse

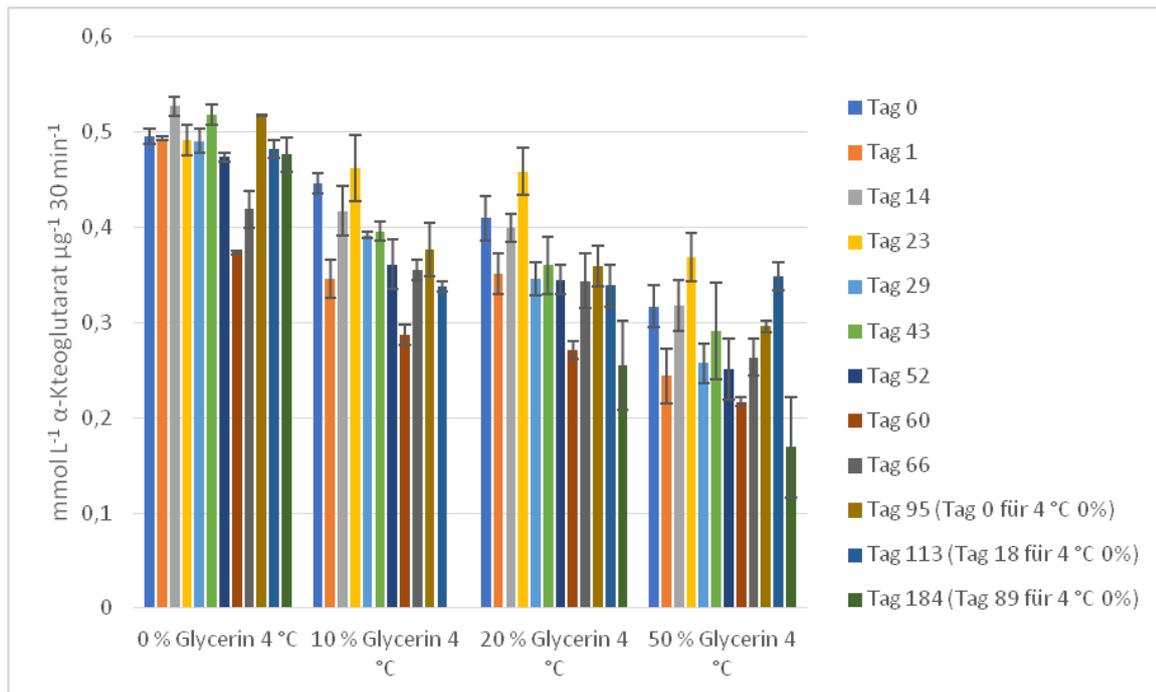


Abbildung 29: Zeitverlauf der Aktivitätsabnahme von VboTA. Die Proben enthielten 0, 10, 20 und 50 % v/v Glycerin und wurden über mehrere Monate bei 4 °C im Dunkeln gelagert und wiederholt auf Restaktivität getestet. Dargestellt ist die Menge umgesetztes α -Ketoglutarat [mmol L^{-1}] pro μg Enzym nach 30 min, mit Standardabweichung. $N=3$. Ab Tag 95 wurde für die Probe ohne Glycerin neuer Extrakt verwendet, da der alte aufgebraucht war.

Der Stabilitätstest hat ergeben, dass VboTA bei 4 °C lange haltbar ist und nur langsam an Aktivität verliert (Abb. 29). Glycerin, das als Schutz vor dem Einfrieren bei den -20 °C Proben wichtig ist, scheint hier zu stören. Am besten hat der Ansatz ohne Glycerin abgeschnitten. Die Aktivität ist hier am höchsten und die Schwankungen sind niedriger als bei den Glycerin-haltigen Proben. Auch die Restaktivität ist bei der Glycerin-freien Probe höher als bei den Glycerin-haltigen. Selbst nach 52 Tagen sind bei der Glycerin-freien Probe noch mehr als 95 % Restaktivität zu messen. Bei den Glycerin-haltigen Proben war nach derselben Zeit weniger Restaktivität zu verzeichnen. Die 10 und 20 % Glycerin-Proben lieferten ein ähnliches Ergebnis mit 81 bzw. 84 % Restaktivität, bei Anwesenheit von 50 % Glycerin lagen nach 52 Tagen nur noch 79 % der Ursprungsaktivität vor. Die absoluten Aktivitäten der Glycerin-haltigen Proben sind ebenfalls niedriger als bei der Glycerin-freien Probe. Das lässt sich durch die niedrigere Enzymkonzentration erklären, da bei allen Tests 10 μl der Enzymlösungen eingesetzt wurden. Die Ursprungsaktivitäten der verschiedenen Ansätze passen zu den Konzentrationen, so hat die 10 % Glycerin-haltige Probe 90 % der Ursprungsaktivität der Glycerin-freien Probe, die 20 % Probe liefert etwa 80 % Aktivität der

Ergebnisse

unverdünnten Probe. Nur die 50 % Glycerin-Probe liefert mit 64 % Aktivität einen deutlich höheren Wert als zu erwarten war.

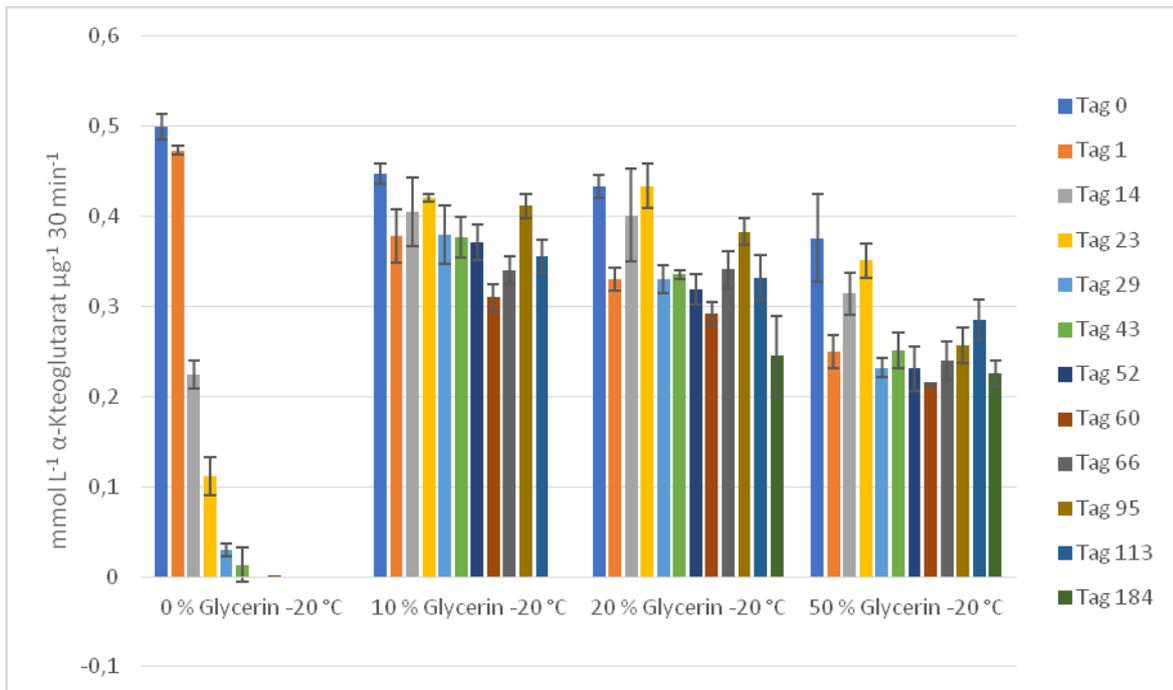


Abbildung 30: Zeitverlauf der Aktivitätsabnahme von VboTA. Die Proben enthielten 0, 10, 20 und 50 % v/v Glycerin und wurden über mehrere Monate bei -20 °C im Dunkeln gelagert und wiederholt auf Restaktivität getestet. Dargestellt ist die Menge umgesetztes α -Ketoglutarat [mmol L^{-1}] pro μg Enzym nach 30 min, mit Standardabweichung. $N=3$.

Der Langzeittest bei -20 °C hat ergeben, dass wiederholtes Einfrieren und Auftauen des Enzyms ohne Glycerin schnell zu einem vollständigen Aktivitätsverlust führt. Glycerin als Frostschutz führt dazu, dass die Aktivität lange Zeit erhalten bleibt. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen hat hier keinen großen Effekt. Selbst nach etwa 26 Wochen war bei den Glycerin-haltigen Proben noch mehr als 50 % der ursprünglichen Aktivität vorhanden. Dabei scheint die Menge an zugesetztem Glycerin unerheblich zu sein, da der Trend bei allen drei eingesetzten Konzentrationen ähnlich ist. Die höchste Konzentration, 50 % v/v, scheint sogar eher hinderlich zu sein, da hier die Aktivitäten etwas niedriger sind als bei den anderen Konzentrationen und die Schwankungen größer sind (Abb. 30).

3.1.9. Ergebnisse der Enzymproduktionen im Fermenter

Im ersten Fermentationsansatz wurden die Zellen kurz nach dem Animpfen mit 20 %iger Glukoselösung gefüttert. Es wurden über 10 min verteilt 23 ml der Glukoselösung zugegeben, das entspricht etwa 4,6 g Glukose. Dann erfolgte eine 10-minütige Pause, in der die Glukose verwertet werden sollte. Das Nasszellgewicht bei dem ersten Versuch betrug nur 24,7 g. Das könnte daran liegen, dass neben den C-Quellen auch andere Nährstoffe im Medium limitierend waren.

In einer Wiederholung des Versuchs wurde das gleiche Rezept verwendet (Abb. 11). Nur das Medium für die Fütterung wurde geändert, statt 20 % Glukose in Wasser wurden 40 % Glukose in LB verwendet. Diese Fermentation lieferte ein Nasszellgewicht von 42,7 g. Allerdings zeigten Messungen des Glukosegehalts in den Proben, dass noch viel Glukose im Medium war (siehe 3.1.10.), weswegen in weiteren Versuchen die Verwertungszeit erhöht wurde.

Mit einer Abwandlung des bisher verwendeten Rezepts wurden zwei weitere Versuche mit leichten Veränderungen durchgeführt (Abb. 12). Einmal in Prozesseinheit 1 (PU1) wurde die O₂-Sättigung auf 30 % erhöht und im zweiten Ansatz in PU2 wurde der pH-Wert auf 6,5 gesenkt. Die Fütterung erfolgte wieder mit 40 % Glukose in LB, startete aber erst, nachdem die Kohlenhydrate im Medium verbraucht waren. Die Verwertungszeit betrug bei beiden Versuchen 30 min. Die längere Verwertungszeit führte zu etwas höheren Zellausbeuten. In PU1 konnte ein Nasszellgewicht von 49,5 g erhalten werden. PU2 lieferte ein Pellet von 48,3 g. Die VboTA Ausbeute betrug 29,7 mg in PU1 und 28,9 mg in PU2. Pro g Zellpellet wurden bei beiden Ansätzen etwa 600 µg des Enzyms erhalten.

Der Versuch mit Autoinduktionsmedium war noch erfolgreicher, es konnte ein 65,7 g schweres Pellet gewonnen werden. 1 g dieses Pellets lieferte 860 µg VboTA.

3.1.10. Ergebnisse der Glukosemessungen

Nach dem ersten Fermentationsversuch wurde die verbleibende Glukosemenge in den genommenen Proben bestimmt, um zu prüfen, ob die Verwertungszeit lang genug gewählt

Ergebnisse

wurde. Da eine hohe Glukosekonzentration das Wachstum und die Proteinproduktion von *E. coli* hemmt, ist es wichtig, die Zellen nicht zu überfüttern. Die Proben wurden vor und nach der Fütterung genommen, um zu vergleichen, wie hoch die Konzentration vor der Zugabe war und wie stark sie durch die Fütterung erhöht wurde.

Der Test hat ergeben, dass der Glukosegehalt bei allen Proben in der Sättigung war. Die Zeit für die Verwertung war also deutlich zu kurz. Daher wurde die Glukose in nachfolgenden Fermentationsansätzen langsamer zugefüttert und die Fütterung über den Sauerstoffverbrauch gesteuert, da so nur zugefüttert wird, wenn die bisherige Glukose verbraucht ist.

3.1.11. Strukturelle Vergleiche zweier Gruppen von ω -Transaminasen

Es wurde untersucht, ob es konservierte Bereiche gibt, die ω -TAs wie VboTA, die aromatische und aliphatische Aminosäuren als Substrat akzeptieren, von anderen ω -TAs unterscheiden, die nur aliphatische Aminosäuren als Substrat akzeptieren. Dazu wurden multiple Alignments für die Sequenzvergleiche erstellt (Abb. 31, 32 + 35). Anschließend wurden konservierte Aminosäurereste identifiziert und in den 3D-Strukturen markiert (Abb. 33 und 34).

Zunächst wurden drei Sequenzen von ω -Transaminasen, die nur aliphatische Aminosäuren als Substrat akzeptieren, miteinander verglichen um konservierte Bereiche zu finden (Abb. 31).

Ergebnisse

Query_10001	1	MSAAKL---PDL---SHLWMPFTANRQFKANPRLAS-AKGMYYTSFDGRQILDGTAGLWCVNAGHCREEIVSAIASQAG	73
Query_10002	1	MQKQRTtsqWRELDAAHHLHPFTDTASLNQAGARVMTREGVYLWDSEGNKIIDGMAGLWCNVNGYGRKDFAEARRQME	80
Query_10003	1	MNKPQS---WEARAETYSLYGFTDMPSLHQRGTVVVTHGEGPYIVDVNGRRYLDANSGLWNMVAGFDHKGLIDAAKAQYE	77
Query_10001	74	VM-DYAPGFQGLGHPLAFAEATAVAGLMPQGLDRVFFTNSGSESVDTALKIALAYHRARGEAQRTRLIGRERGYHGVGFGG	152
Query_10002	81	ELPFYNTFFKTTTHPAVVELSLLAEVTPAGFDRVFFYTNSSGSESVDTMIRMVRRYWDVQKPEKKTLLGRWNGYHGSTIGG	160
Query_10003	78	RFPGYHAFVFRMSDQTVMLSEKLVEVSPFDSDGRVFFYTNSSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKPKRKKILTRWNAYHGVTVAVS	157
Query_10001	153	ISVGGISPNRKTFsGALLPAVDHLPHTHSLEHNAFTRGQPEWGAHLADELERIIALHDASTIAAVIVEPMAGSTGVLVPP	232
Query_10002	161	ASLGGMKYMHEQG-DLPIPGMAHIEQPWWYKHGK-DMTPDEFGVVAARWLEEKILEIGADKVAAFVGEPIQGAGGVIVPP	238
Query_10003	158	ASMTG-KPYNVSF-GLPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEVPMGAGGVIPPA	235
Query_10001	233	KGYLEKLEITARHGILLIFDEVI TAYGRLGEATAAAYFGVTPDLITMAKGVSNAAVPAGAVAVRREVHDAIVNGPQGGI	312
Query_10002	239	ATYWPEIERICRKYDVLVADEVICGFGRTEWFGHQHFGFQDDLFTAAGLSSGYLPIGAVFVGKRVAEGLIAGG----	314
Query_10003	236	KGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTEGNTWGCVTYDFTPDIISSKNLTAGFFPMGAVILGPELSKRLETAIEAIE	315
Query_10001	313	EFFHGYTYSAHPLAAAVALATLDIYRREDLFARA-RKLSAAFEAAHSLKGA-PHVIDVRNIGLVAGIELSPREGAPG--	388
Query_10002	315	DFNHGFTYSGHPVCAAVAHANVAALRDEGIVQRVkdDIDGYPMQKRWRETFSRfEHVDDVRGVMVQAFTLVKNKAKRELF	394
Query_10003	316	EFPHGFTASGHPVGCATALKAIDVVMNEGLAENV-RRLAPRFEERLKHIAER-PNIGEYRIGCFMWALEAVKDKASKTFF	393
Query_10001	389	----ARAAEAFQKCFDT GLMVRTGDILAVSPPLIVDENQIQIFE----GIGKVLKEVA-----	440
Query_10002	395	PDF----GEIGTLCRDI [4] NLIMRACGDHIVSAPPLVMTRAEVDEMLAVAERCLEEFQTLKARGLA	459
Query_10003	394	DGNLSVSEERIANCTDL GLICRPLGQSVVLCPPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDKVFAEVA AAAALE	458

Abbildung 31: Alignment von ω -Transaminasen, die nur aliphatische Aminosäuren als Substrat akzeptieren. Aminosäurereste, die in allen Sequenzen identisch sind, sind rot gefärbt. Ausgegraute Aminosäuren markieren Stellen, an denen es in einer oder mehreren Sequenzen Lücken gibt. Query_10001: Sequenz von *Achromobacter denitrificans* [187]. Query_10002: Sequenz von *Chromobacterium violaceum* [188]. Query_10003: Sequenz von *Vibrio fluvialis*. [87].

Im Anschluss erfolgte ein Sequenzvergleich von vier ω -Transaminasen, die aliphatische und aromatische Aminosäuren umsetzen können. Auch hier wurden identische Aminosäuren markiert (Abb. 32).

Ergebnisse

Query_10001	1	MSSGSRGG-----	-----NVYREPGSAAADL	FERARRVLP	GGNTR	TRTVYSAPY	PPYAARGR	AVIVDADGEER	64																																																																					
Query_10002	1	MNEPIGEPGrsp	ASD[5]QAIAAARNT	FARDNPVS	SAGHHERARRSM	PGGNTR	SILFHRFP	PLVIAQGT	GSRFQD	DVGHAY	82																																																																			
Query_10003	1	MT-----T-----	AID	QALAAQAHQR	FTDGNPESL	RRFEAQ	TRYMPGAN	SRSVLFYAP	PLTIAKGE	GASLWDADGHRY	68																																																																			
Query_10004	1	MHSATGT-----	ALD	SALAE	TARYRARNP	GSERLLRKA	ADVLPAGN	TRSVLFYTP	FFLYMARGE	GCHLWDADGHRY	72																																																																			
Query_10001	65	LDFVN	NYTALIHGHAD	PDINEAV	IRQLADGV	AFAMPTE	HEIALAELL	TERVPSL	QQVRFTNSG	TEAVMMAIKAA	RAYTGR	144																																																																		
Query_10002	83	VNFLGEY	TAGLFGHSH	PVIRAA	VERALAV	GLNLSTQ	TENEALFAE	AVCDR	FPSIDL	VRFTNSG	TEANLMALATATAITGR	162																																																																		
Query_10003	69	TDFIAEY	TAGVYGHS	AFEIREA	VIEMQGG	INLTGHN	LEGLAQT	CERFP	QVQLRFTNSG	TEANLMALTAAL	RFTGR	148																																																																		
Query_10004	73	LDALGE	FTAGIYGHS	NPIRQA	IVAALQD	GLSLSSHT	AREAAAL	AHEIQ	RFRPGMALL	RFTNSG	TEANLMALAAATAHTGR	152																																																																		
Query_10001	145	PRIAK	FDGCYHGSY	DFA[10]	GEDGFP	VATPY[10]	SVVVL	PFND	IDGTER	LIEQHR	DELA	AAVLID	PNPR	SIG	LPAEPA	236																																																														
Query_10002	163	KTVLA	FDGGYHGG	LLNF	ASGH	APT	NAPY	HVV	LG	VND	VEGTAD	LLKR	HG	DCAA	IL	VEP	MLGAGG	CVPAERA	234																																																											
Query_10003	149	RKIVV	FSGGYHGG	VLG	FD	QPS	PTTV	PF	DFL	V	LP	YND	AD	TARA	Q	I	D	E	H	G	ADIA	AIL	VEP	MG	AG	GCIP	GGRE	220																																																		
Query_10004	153	RKVLV	FNGAYHGG	VLSF	GGGS	P	VNV	PH	DFV	V	AP	YND	LD	AVR	GLV	Q	T	H	G	P	Q	L	A	IL	VEP	MLGAGG	GCIP	PAEPA	224																																																	
Query_10001	237	FLQRL	REITRAY	GIVL	I	F	DEVIS	LS	RS	DY	GG	M	Q	S	V	L	G	V	T	P	D	L	T	A	M	G	K	I	G	G	G	F	P	V	G	A	V	G	S	A	E	V	M	S	V	F	D	P	T	G	G	P	P	R	A	P	H	G	316																			
Query_10002	235	FLDL	LR	A	E	A	S	R	C	G	A	L	I	F	D	E	V	M	T	S	R	L	S	G	G	A	Q	E	M	L	G	I	S	A	D	L	T	L	G	K	Y	I	G	G	M	S	F	G	A	F	G	R	R	D	L	M	E	R	F	D	P	A	R	D	G	A	F	A	H	A	G	313						
Query_10003	221	FLQT	LR	G	G	A	T	R	V	G	A	L	L	I	F	D	E	V	M	T	S	R	L	G	P	H	L	A	N	L	G	I	R	A	D	L	T	L	G	K	Y	I	G	G	M	S	F	G	A	F	G	R	A	D	V	M	A	Q	F	D	P	R	T	G	A	L	A	H	S	G	298							
Query_10004	225	FLHGL	RALAD	AC	G	A	L	L	I	L	D	E	V	M	T	S	R	L	S	G	G	R	Q	A	L	L	G	L	K	P	D	L	T	L	G	K	Y	F	G	G	L	S	F	G	A	F	G	R	R	V	D	M	S	R	F	D	P	R	R	A	D	A	L	G	H	A	G	303										
Query_10001	317	TFNAN	P	V	T	M	V	A	G	L	T	A	M	R	K	L	T	P	A	E	F	D	R	L	A	T	L	G	Q	L	R	A	G	V	E	E	V	L	R	E	A	G	V	P	G	Q	V	T	G	Y	G	S	L	F	H	I	H	L	H	Q	R	P	L	A	D	Y	R	N	S	V	L	S	A	Q	E	395		
Query_10002	314	TFN	N	I	L	T	M	S	A	G	H	A	A	L	T	Q	I	Y	T	R	Q	A	S	D	L	S	A	S	G	D	R	F	R	A	N	L	R	I	A	V	E	N	Q	A	P	L	Q	F	T	G	L	S	L	G	T	I	H	F	S	R	A	P	I	R	S	A	G	D	--	V	R	A	A	D	391			
Query_10003	299	TFN	N	N	V	M	T	M	A	A	G	Y	A	G	L	T	Q	L	F	T	P	E	A	A	A	L	A	E	R	G	E	A	M	R	S	R	L	N	A	L	C	E	R	E	G	V	A	M	Q	F	T	G	V	G	S	L	M	N	A	H	F	L	R	G	E	V	R	R	V	A	D	--	L	A	A	V	D	376
Query_10004	304	TFN	N	N	T	L	T	M	A	A	G	L	A	G	L	T	Q	V	L	T	P	A	A	L	D	A	L	N	Q	R	G	E	R	L	R	E	R	L	N	G	V	F	K	R	H	A	V	G	L	Q	F	T	G	L	S	V	M	Q	L	H	A	T	D	R	P	L	R	N	A	A	D	--	L	A	G	A	D	381
Query_10001	396	RAFV	GRV	H	E	A	L	M	G	R	G	I	F	I	T	P	A	L	F	G	C	L	S	T	P	M	G	V	P	E	V	E	A	F	V	D	A	F	A	A	L	Q	D	A	R	G	-----	446																														
Query_10002	392	QQLK	E	L	F	F	F	H	M	L	R	K	G	I	Y	L	A	P	R	G	M	A	L	S	L	E	I	A	D	A	G	R	D	A	F	A	E	A	L	A	D	F	I	G	E	Q	R	A	L	L	M	---	445																									
Query_10003	377	GRLR	QL	L	F	F	H	L	L	K	E	G	I	Y	T	S	P	R	G	F	V	V	L	S	L	P	L	S	A	Q	D	I	D	R	V	A	A	V	G	S	F	I	E	A	C	R	P	L	L	S	A	G	433																									
Query_10004	382	DRV	K	A	L	L	F	F	D	L	L	E	R	G	I	F	L	A	R	R	G	L	V	A	L	S	L	P	F	G	D	A	E	A	E	F	V	A	A	L	D	A	V	T	A	R	H	A	L	L	P	V	A	G	438																							

Abbildung 32: Alignment von ω -Transaminasen, die sowohl aliphatische als auch aromatische Aminosäuren als Substrat akzeptieren. Aminosäurereste, die in allen Sequenzen identisch sind, sind rot gefärbt. Ausgegraute Aminosäuren markieren Stellen, an denen es in einer oder mehreren Sequenzen Lücken gibt. Query_10001: Sequenz von StoTA [174]. Query_10002: Sequenz von Mesorhizobium sp. LUK [189]. Query_10003: Sequenz von VboTA. Query_10004: Sequenz von Polaromonas sp. JS666 [158].

Die beiden Alignments wurden miteinander verglichen, um festzustellen, an welchen konservierten Stellen sich beide Gruppen unterscheiden. Die Unterschiede sind in den Abb. 33 und 34 in einer für jede Gruppe exemplarischen Struktur markiert.

Ein Sequenzvergleich von drei ω -Transaminasen, die nur aliphatische Substrate akzeptieren (Abb. 31), hat ergeben, dass diese Enzyme an 32 Stellen konservierte Aminosäuren besitzen, die sie von anderen ω -Transaminasen unterscheiden. Die Aminosäuren sind: F14(36), T20(37), Y40(59), G55(74), L56(75), W57(76), R110(124), F112(126), S118(132), D122(136), T123(137), G136(144), R146(154), H178(-), A202(185), L205(188), E206(189), I209(192), A214(197), V231(214), P234(217), Y238(221), G263(244), S324(301), H326(303), E343(320),

Ergebnisse

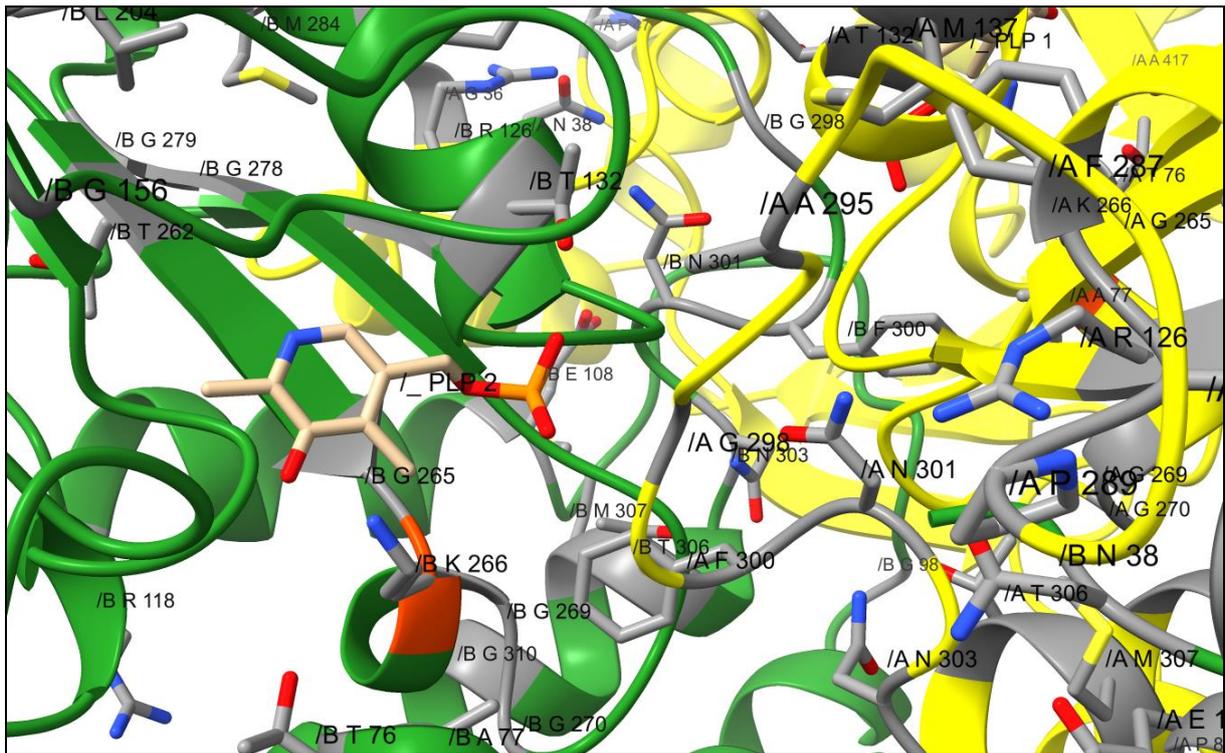


Abbildung 34: Ausschnitt der Struktur von VboTA. Dargestellt ist ein aktives Zentrum. Gelb: Monomer A, Grün: Monomer B, Orange: katalytischer Lysinrest (K266). Aminosäuren, die in Enzymen konserviert sind, die aliphatische und aromatische Substrate akzeptieren, sind grau dargestellt und mit Namen und Position markiert.

Nach den Vergleichen der beiden Transaminasegruppen für sich wurde ein weiterer Sequenzvergleich erstellt, in dem alle sieben hier untersuchten Sequenzen miteinander verglichen werden, um festzustellen, an welchen Stellen beide Gruppen Gemeinsamkeiten haben (Abb. 35).

Ergebnisse

Query_10001	1	MSA	AKL-[1]-----DL---SHLWMPFTANRQ--F-KANPRLASAKGMYTTSFDGRQILDGTAGLWCVN	56
Query_10002	1	MQK	QRTT[3]-----RELDAHHLHPFDDTAS--LNQAGARVMTRGEGVYLWDSBGNKIDGMAGLWCVN	63
Query_10003	1	MNK	-----PQSWEARAETYSLYGFTDMP--LHQRGTVVVTHGEGPYIVDVNGRRYLDANSGLWNMV	60
Query_10004	1	MSS	GSRR[2]NVYREPSSAAADLFEARRVLPGGNTRRTTVYSAPYPYAAARGGAVIVDADGEERLDFVNNYTAI	75
Query_10005	1	MNE[9]	ASDT[11]NTFARDNPVSAGHHERARRSMPGGNTRSILFHRFPFLVIAQGTGSRFQDVGHAYVNFLEGEYTAGL	93
Query_10006	1	MT-	---T[10]QRFTDGNPESLRRFEAQTRYMPGANSRSLVYAPFPLTIAKGGASLWDADGHRYTDFIAEYTAGV	79
Query_10007	1	MHS	ATGT[10]ARYRARNPGSERLLRKAADVLPAGNTRSILFYTPFPLYMARGEGCHLWDADGHRYLDALGEFTAGI	83
Query_10001	57		AGHCREEIVSAIASQAGVM[3]PGFQLGHPLAFEAAATAVAGLMPqGLDRVFFTNSGSESVDTALKIAL[6]GEAQRTLI	139
Query_10002	64		VGYGRKDFAEARRQMEEL[4]TFFKTHPAVVELSSLLAEVTPaGFDRVFYNSGSESVDTMIRMVR[6]GKPEKTLI	147
Query_10003	61		AGFDHKGLIDAAKAQYERF[4]AFFGRMSDQTVMLSEKLEVEVPfDSGRVFYNSGSEANDTMVKMLW[6]GKFPQKRIL	144
Query_10004	76		HGHADPDINEAVIRQLADG VAFAMPTHEHEIALAELLTERVP-SLQQVRFNSGTEAVMMAIKAAR AYTGRPRIA	148
Query_10005	94		FGHSHPVIRAAVERALAVG LNLSTQTENEALFAEAVCDRFP-SIDLVRFTNSGTEANLMALATAT AITGRKTVL	166
Query_10006	80		YGHSAPEIREAVIEAMQGG INLTGHNLEGRLAQTCICERFP-QVEQLRFTNSGTEANLMALTAAL RFTGRRKIV	152
Query_10007	84		YGHSNPVIRQAIVAALQDG LSLSHTAREAAALAEIQRRFP-GMALLRFTNSGTEANLMALAAAT AHTGRRKVL	156
Query_10001	140		GREGRYHGVGFGG-isVGGISPNRKTfSGALLPAVDHLEHT---HSL[11]WGAHLADELERIALHDASTIAAVIVEFM	222
Query_10002	148		GRWNGYHGSTIGG-asLGGMKYMHEQG-DLPIPGMAHIEQP---WWY[10]FGVVAARWLEEKILEIGADKVAAFVGEPI	228
Query_10003	145		TRWNAHYGVTAVS---ASMTGKPYNSVFLPLPGFVHLTCP---HYW[11]FVARLARELEETIQREGADTIAGFFAEVP	225
Query_10004	149		KFDGCGYHGSYDFAeVsTQSSGKPGEDGFVPATPYTGGTPQAVLGSVV VLPFNDIDGTERLIEQHRDELAAVLIDPN	224
Query_10005	167		AFDGGYHGLLNF-----ASGHAPTNPY-----HVV LGVYNDVEGTADLLKRHHGDCAAAILVEPM	222
Query_10006	153		VFSGGYHGVVLF-----GDQPSPTVPF-----DFL VLPYNDADTARAQIDEHGADIAAILVEPM	208
Query_10007	157		VFNGAYHGVVLSF-----GGGSPVNVPH-----DFV VAPYNDLDAVRGLVQTHGPQLAAILVEPM	212
Query_10001	223		AGSTGLVPPKGYLEKLEITARHGILLIFDEVITayGRLGEATAAAAYFGVTPDLITMAKGVSNaaVPAGAVAVRREVHD	302
Query_10002	229		QGAGGIVVPPATYWEIERICRKYDVLVADEVICgGRTGEWFGHQHFGFPDLFTAAKGLSSGyLPIGAVFVGRVAE	308
Query_10003	226		MGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICgGRTGNTWGCVTYDFTPDAAISSKNLTAIGfFPMGAVILGPESLK	305
Query_10004	225		PRSLGLYPAAEPAFLQRLREITRAYGIVLIFDEVIS--LRSDYGGMQSVLGVTPDLTAMGKIIGGG-FPVGAVGGSAEVMS	301
Query_10005	223		LGAGGCVPAERAFLDLLRAEASRCGALLIFDEVMT--SRLSGGGAQEMLGISADLTTLGKYIGGG-MSFGAFGGRDLME	299
Query_10006	209		QGASGCIPIGGREFLQTLRGGATRVGALLVFDEVMT--SRLGPHGLANGLGIRADLTTLGKYIGGG-MSFGAFGGRADVMA	285
Query_10007	213		LGAGGCIPIAEPAFHLGLRALADACGALLILDEVMT--SRLSGGGRQALLGLKPLDITLGKYFGGG-LSFGAFGGRVDVMS	289
Query_10001	303		AIVNGPqGGIEFFHGTYSAHPLAAAVALTLDIYRREDLFARA-RKLSAAFEAAHSLKGA-PHVIDVRNIGLVAGIEL	380
Query_10002	309		GLIAGG---DFNHGFTYSGHPVCAAVAHANVAALRDEGIVQRVkdDIGPYMQKRWRETFSRFEHVDVVRGVMVQAFTL	384
Query_10003	306		RLETAIeAIEEFPHGFTASGHVPVCAIALKAIDVMMNEGLAENV-RLAPRFEERLKHIAER-PNIGEYRGIQFMWALEA	383
Query_10004	302		VFDPTG-GPPRAPHGFTFNANPVTMVAGLTAMRKLTPAEF-DRL-ATLQQLRAGVEEVREAGVPGVQVYGYGSLFHIHL	378
Query_10005	300		RFDPARdG--AFAHAGTFNNNLTMSAGHAALTYITRQAASDL-SASGDRFRANLNRIAVENQAPLQFTGLGSLGTIHF	376
Query_10006	286		QFDPRT-G-ALA-HSGTFNNVMVTMAAGYAGLQFTPEAAAL-AERGEAMRSRLNALCEREGVAMQFTGVGSLMNAHF	361
Query_10007	290		RFDPRR-ADALG-HAGTFNNNTLTMAAGLAGLQVLTPAALDAL-NQRGERLRERLNGVFKRHAVGLQFTGLGSLVMQLHA	366
Query_10001	381		SPREGAPG-----ARAAEFQKCFDT---GLMVRVYTDLIVSPoliVDENIQGIFE---GIGKVLKEVA-----	440
Query_10002	385		VKNKAKRELFpdF---GEIGTLCRDIFFRNNLIMRACGDHIVSAPcIvMTRAEVDEMLVAEFCLEEFQOTLKARGLa	459
Query_10003	384		VKDKASKTpfDqNLSVSEKRIANTCTDL---GLICRPLGQSVVLCPofILTEAQMDQEMFDKLEKALDKVFAEVAaAAle	458
Query_10004	379		HORFLADYRNsvLSAQERAFVGRVHEALMGRGIFITPALFGCLSTP---MGVPEVEAFVDAFAAALQDARG-----	446
Query_10005	377		SRAPIRSGD--VRAADQQKELFFFHMLRKGIYLAPRGYALSLE---IADAGRDAFAEALADFIGEQRALLM-----	445
Query_10006	362		LRGEVRRVAD--LAAVDGRLRQLLFFHLLKEGIYTSRPGFVVLSP---LSAQDIDRYVAAVGSFIEACRPLLLSAG--	433
Query_10007	367		TDRPLRNAAD--LAGADRRVALLFFDLLEKIFLARRGLVALSLP---FGDAEAEFVAALDAVVATARHALLFPVAG--	438

Abbildung 35: Alignment aller sieben ω -Transaminasen aus den vorherigen Vergleichen. Aminosäurereste, die in allen Sequenzen identisch sind, sind rot gefärbt. Ausgegraute Aminosäuren markieren Stellen, an denen es in einer oder mehreren Sequenzen Lücken gibt. Query_10001: Sequenz von *Achromobacter denitrificans* [187]. Query_10002: Sequenz von *Chromobacterium violaceum* [188]. Query_10003: Sequenz von *Vibrio fluvialis*. [87]. Query_10004: Sequenz von *StoTA* [174]. Query_10005: Sequenz von *Mesorhizobium* sp. LUK [189]. Query_10006: Sequenz von *VboTA*. Query_10007: Sequenz von *Polaromonas* sp. JS666 [158].

Ergebnisse

Ein Sequenzvergleich aller sieben Proteine ergab 29 konservierte Aminosäuren (Abb. 35), die in allen Enzymen identisch sind: 1M, 57G, 65G, 81G, 90A, 120P, 128T, 129N, 130S, 131G, 133E, 158Y, 159H, 160G, P175, 201A, 207P, 213G, 239D, 240E, 241V, 245R, 260D, 266K, 275G, 276A, 296H, 299T und 354G. Die Zahlen geben die Positionen in VboTA an.

3.2. Ergebnisse der Untersuchungen der StoTA

3.2.1. Bestimmen der zu verändernden Aminosäuren in StoTA

Eine ω -Transaminase von *S. thermophilus* [174] (NCBI Accession >WP_012871332.1) wurde verändert um ihre Aktivität zu erhöhen. Um die Aktivitätserhöhung zu erreichen wurde das Enzym schrittweise an ein postuliertes Motiv [184] angepasst. Das Enzym besteht aus zwei Monomeren mit je 446 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von etwa 47,4 kDa. StoTA ist ein Homodimer. Es hat zwei aktive Zentren, in denen, wie bei anderen ω -Transaminasen auch, jeweils ein Molekül Pyridoxalphosphat über eine Schiff'sche Base an einen Lysinrest gebunden ist. Dieses Lysin (K282) vermittelt dem Enzym seine katalytische Aktivität.

Die Sequenz des Genes *stota* befindet sich im Anhang. Das Gen wurde in Form von Genfragmenten geliefert und vor dem Klonieren mittels PCR assembliert. Anschließend wurde das Fragment in den Expressionsvektor pET21b (+) überführt, damit die Enzymproduktion mittels Laktose oder IPTG induziert werden kann und das Enzym mit einem C-terminalen His-Tag versehen wird.

```
TAST 13  REPGSAAADL FERARRVLPGGNTRTTVYSAPYPPYAARGRGAVIVDADGEERLDFVNNYTALIHGHADP 81
          FE  R  +PG N+R+  ++ AP+P  ARG GA  +  DADG  DF+  YTA ++GH+ P
Motif 01  TDANPASQRQFEAQARYMPGANSRSMVLFYAPFPLTIARGEGAALWDADGHRYADFIAEYTAGVYGHSA 69
          *          *          - -          - *          -          *          -          *
```

Abbildung 36: Vergleich der Sequenzen von StoTA und dem potenziellen Motiv für aromatische ω -TAs [184]. Identische und positive (+) Reste stehen in der mittleren Zeile. Reste, die unterstrichen sind, scheinen wichtig für die ω -TA Aktivität zu sein. Sternchen (*) markieren Reste, die Sekundärstrukturen begrenzen. Boxen beinhalten Aminosäuren, welche ausgetauscht werden müssen um StoTA an das Motiv anzupassen.

Ergebnisse

Der Sequenzvergleich von StoTA mit dem Motiv für aromatische ω -Transaminasen (Abb. 36) hat ergeben, dass StoTA an vier essentiellen Stellen von dem Motiv abweicht. Die Abweichungen sind: S17P, T38V, Y47T und N70E, wobei der vordere Buchstabe die Aminosäure in StoTA und der hintere die im Motiv angibt.

Neben den Anpassungen an das Motiv wurde auch das aktive Zentrum von StoTA modifiziert. Zum einen wurde Threonin 317 durch Valin ersetzt, da es über eine Wasserstoffbrücke mit dem katalytischen Lysin interagiert und dieses möglicherweise vom Substrat wegzieht. Außerdem wurde an den Stellen 283 und 284 Isoleucin durch Glutamin ausgetauscht, um die Umgebung von K282 basischer zu machen, mit dem Ziel die Nucleophilie der katalytischen Aminosäure zu erhöhen. Die Nachbarschaft um das katalytische Lysin inklusive der Wasserstoffbrücken zwischen den Aminosäureresten innerhalb von 5 Å ist in Abb. 37 abgebildet.

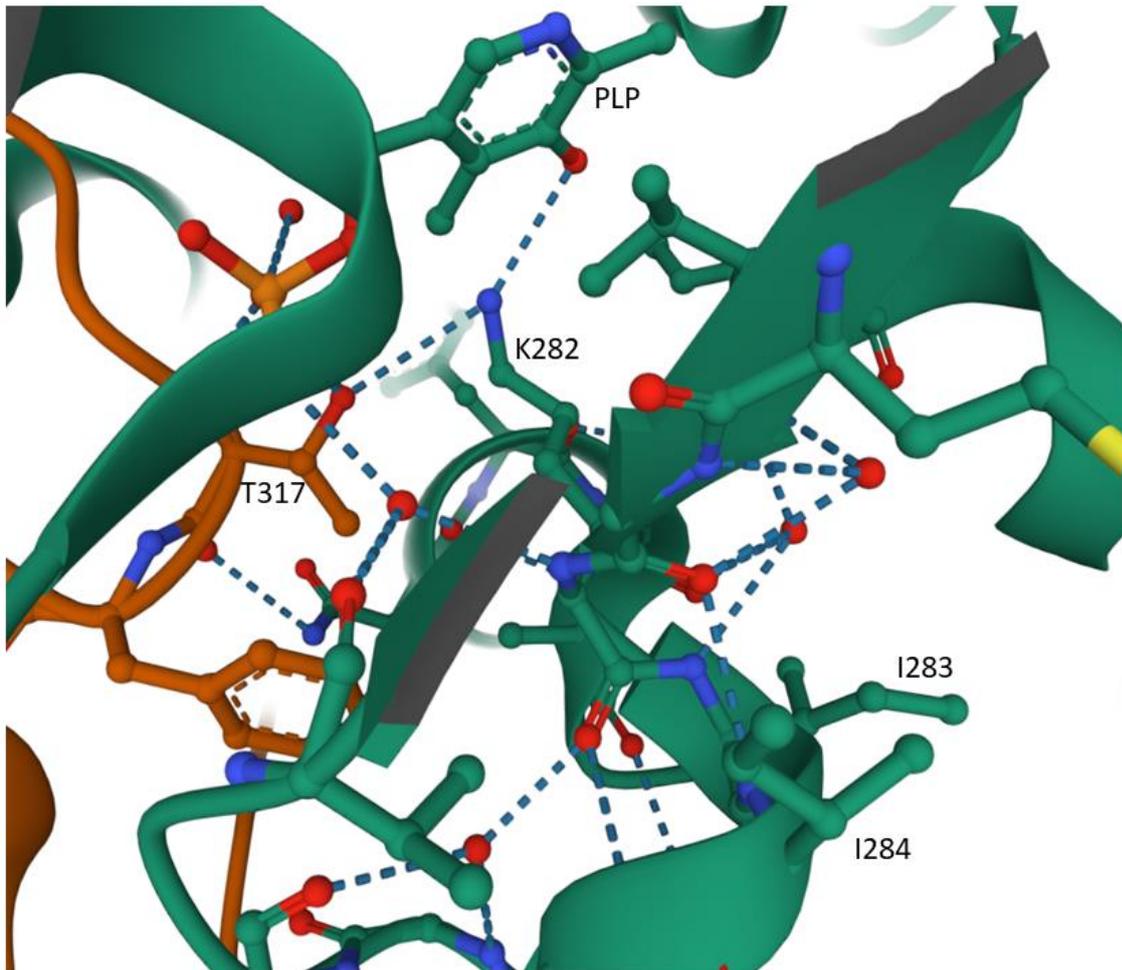


Abbildung 37: Detailaufnahme des aktiven Zentrums von StoTA. Dargestellt ist die Umgebung innerhalb von 5 Å um Lysin 282 (K282). Die gestrichelten Linien stellen Wasserstoffbrücken dar. Ebenfalls benannt sind sowohl die auszutauschenden Aminosäuren I283, I284 und T317, als auch der Co-Faktor PLP. Die Abbildung wurde mit dem mol* Viewer [181] erstellt.

3.2.2. Ergebnisse des Vortests mit Rohextrakten

Zunächst wurde die Aktivität der verschiedenen Varianten in einem Vortest mit Rohextrakt durchgeführt. Alle Produktionsstämme wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert und induziert. Als Kontrolle diente die nicht modifizierte StoTA, in analoger Weise in *E. coli* BL21 DE3 produziert.

Ergebnisse

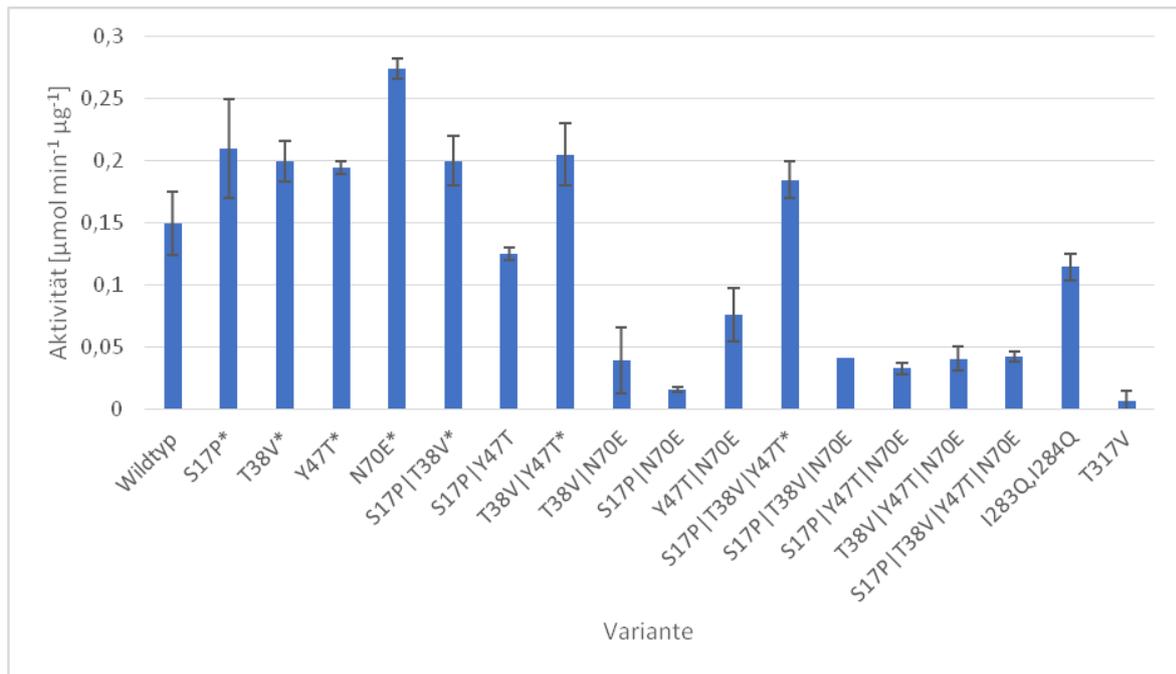


Abbildung 38: Aktivitäten der StoTA-Varianten. Dargestellt ist die Menge an umgesetztem β -Homophenylalanin pro Minute und μg Rohextrakt. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Insgesamt wurden 17 Varianten des Enzyms erstellt, 15 im Rahmen der Motivanpassung und 2 mit verändertem aktivem Zentrum. Von diesen Varianten weisen 7 eine erhöhte Aktivität mit β -Homophenylalanin auf (Abb. 38). Mit dem Wildtyp und den 7 Varianten mit höherer Aktivität als der Wildtyp wurde weitergearbeitet. Die aktiveren Mutanten sind die Einzelmutanten S17P, T38V, Y47T, N70E, die Doppelmutante S17P|T38V, T38V|Y47T und die Dreifachmutante S17P|T38V|Y47T. Im Fortgang wurden gereinigte Proteine verwendet.

3.2.3. Klonierung und Expression der StoTA Mutanten

Der Wildtyp und die erstellten Varianten wurden ebenso wie VboTA produziert. Die Varianten wurden in den Vektor pET21b (+) kloniert und in *E. coli* BL21 DE3 transformiert. Folgende Klone wurden untersucht: Der Wildtyp mit der Klonnummer 13, die Einfachmutanten S17P, Klonnummer 45, T38V, Klonnummer 15; Y47T, Nummer 104; N70E, Nummer 48; die Doppelmutanten S17P|T38V, Nummer 53; S17P|Y47T, Nummer 102; T38V|Y47T, Nummer 112 sowie die Dreifachmutante S17P|T38V|Y47T mit der Nummer 124.

Ergebnisse

Als Negativkontrolle diente ein *E. coli* BL21 DE3 Stamm, der mit dem Vektor pET21b (+), der kein Genfragment enthielt, transformiert wurde.

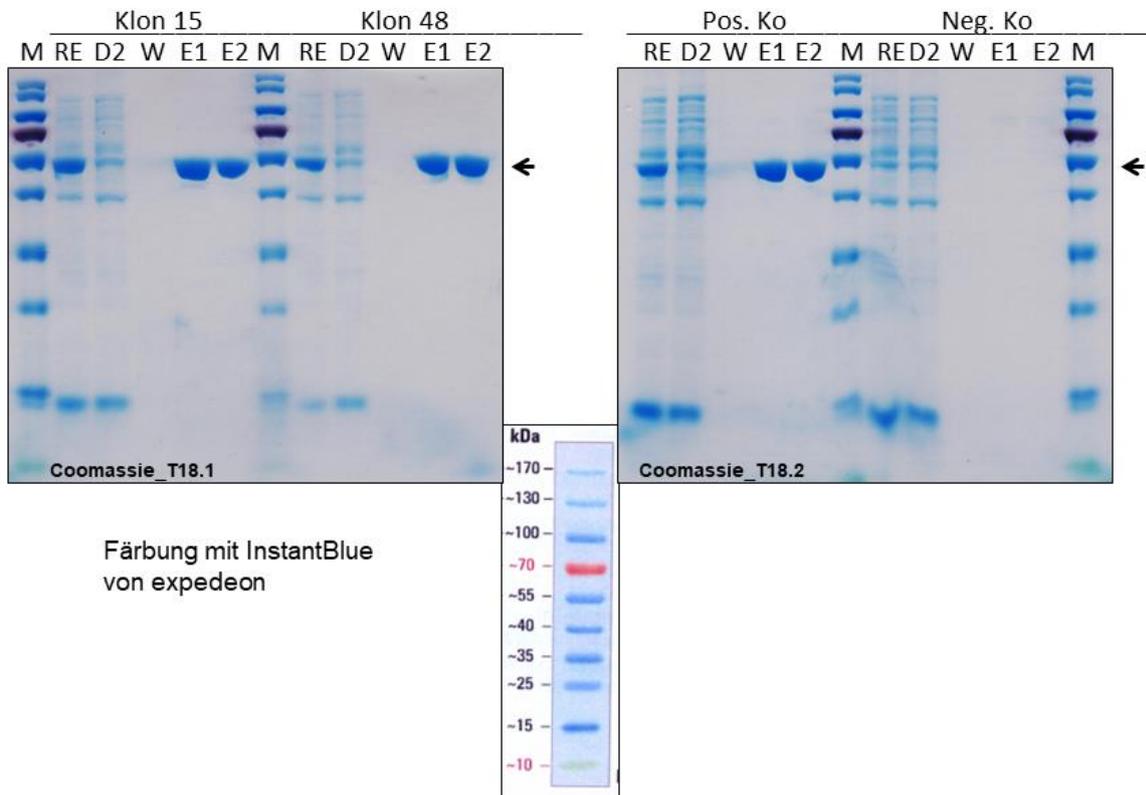


Abbildung 39: 1D SDS-Gel der verschiedenen Reinigungsschritte von zwei StoTA-Varianten und dem Wildtyp. Ein Monomer des Enzyms wiegt inklusive His-Tag etwa 48,4 kDa. RE: Rohextrakt, D2: zweiter Durchlauf durch die Ni-NTA-Agarose, W: Waschschrift, M: Marker, E1+2: Eluate 1+2. Die Pfeile markieren die Banden mit passender Größe. Klon 15 und 48 sind interne Bezeichnungen für die Varianten T38V (15) und N70E (48). Als positiv Kontrolle diente der Wildtyp des Enzyms. Für die negative Kontrolle wurde *E. coli* BL21DE3 mit einem pET21b (+) Vektor ohne eingefügtes ω -Transaminasegen transformiert.

Ergebnisse

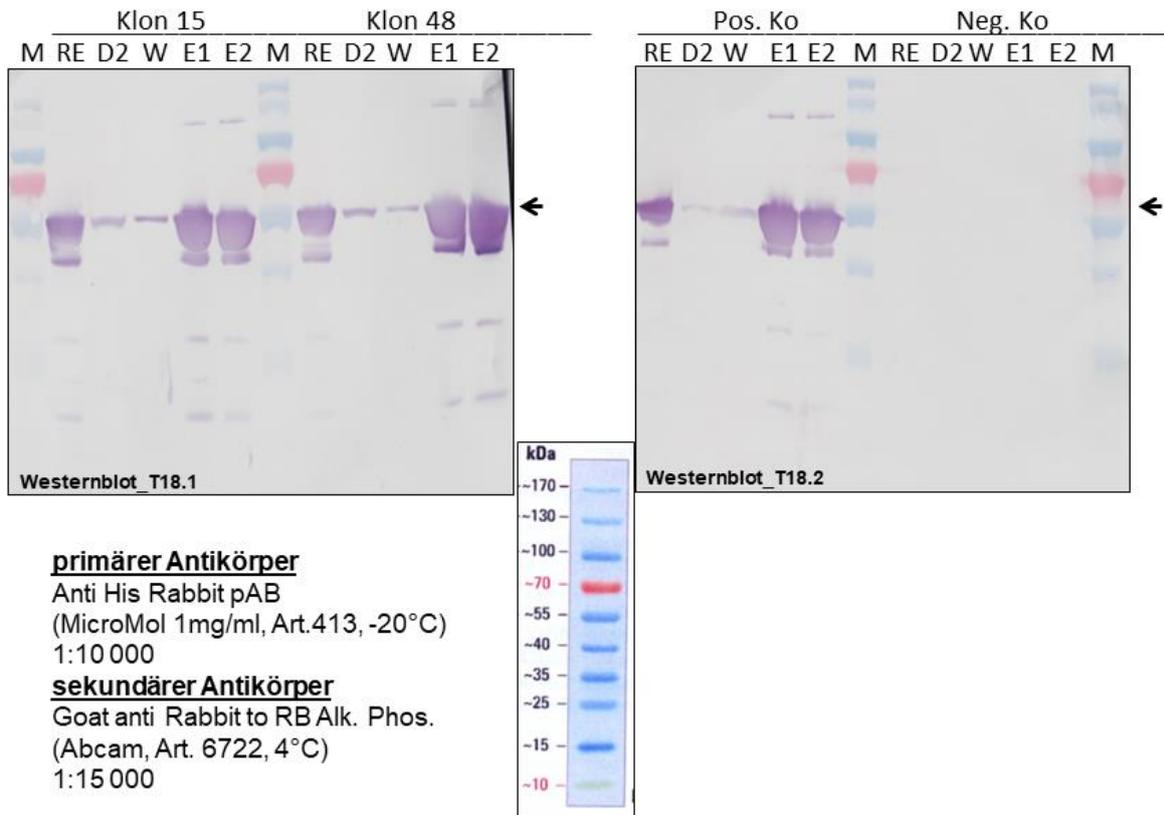


Abbildung 40: Westernblot der verschiedenen Reinigungsschritte von zwei StoTA-Varianten und dem Wildtyp. Ein Monomer des Enzyms wiegt inklusive His-Tag etwa 48,4 kDa. RE: Rohextrakt, D2: zweiter Durchlauf durch die Ni-NTA-Agarose, W: Waschschrift, M: Marker, E1+2: Eluate 1+2. Die Pfeile markieren die Banden mit passender Größe. Klon 15 und 48 sind interne Bezeichnungen für die Varianten T38V (15) und N70E (48). Als positiv Kontrolle diente der Wildtyp des Enzyms. Für die negative Kontrolle wurde *E. coli* BL21DE3 mit einem pET21b (+) Vektor ohne eingefügtes ω -Transaminasegen transformiert.

Die Expression und Reinigung der StoTA Varianten in *E. coli* BL21DE3 hat funktioniert, wie Abb. 39 und 40 exemplarisch für die Varianten T38V, N70E und den Wildtyp zeigen.

3.2.4. Bestimmung der Aktivität und kinetischer Konstanten von StoTA

Für den Wildtyp und die 7 besten Varianten, S17P, T38V, Y47T, N70E, die Doppelmutante S17P|T38V, T38V|Y47T und die Dreifachmutante S17P|T38V|Y47T, sind die biochemischen Eigenschaften in Tab. 21 und die spezifischen Aktivitäten in Tab. 22 angegeben.

Ergebnisse

Tabelle 21: Biochemische Eigenschaften von StoTA. Die Temperaturstabilität gibt die Temperatur an, bei der StoTA nach einstündiger Inkubation noch mehr als 80 % der Ursprungsaktivität aufweist.

Variante	pH-Optimum	Temperatur-Optimum	Temperatur-Stabilität
WT	8,0	60 °C	<60 °C
T38V	7,0	60 °C	<50 °C
S17P	7,0	40 °C	<50 °C
N70E	8,0	40 °C	<60 °C
S17P T38V	8,0	40 °C	<50 °C
T38V Y47T	8,0	46 °C	<50 °C
Y47T	8,0	48 °C	<50 °C
S17P T38V Y47T	8,0	40 °C	<50 °C

Tabelle 22: Die spezifischen Aktivitäten [$\mu\text{mol mol}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$] der Varianten für verschiedene Aminodonoren sind angegeben. β -HF: β -Homophenylalanin, β -HA: β -Homoalanin, 4-AP: 4-Amiopentansäure, β -L: β -Leucin, β -F: β -Phenylalanin. Als Aminoakzeptor diente Pyruvat. N=3

Variante	β -HF	β -HA	4-AP	β -L	β -F
WT	0.600 ± 0.029	0.300 ± 0.010	0.125 ± 0.015	0.130 ± 0.020	0.186 ± 0.060
T38V	0.610 ± 0.053	0.251 ± 0.015	0.106 ± 0.004	0.191 ± 0.000	0.251 ± 0.017
S17P	0.591 ± 0.035	0.388 ± 0.017	0.176 ± 0.008	0.093 ± 0.003	0.234 ± 0.003
N70E	0.802 ± 0.018	0.317 ± 0.005	0.114 ± 0.003	0.379 ± 0.001	0.362 ± 0.007
S17P T38V	3.211 ± 0.009	2.226 ± 0.208	1.146 ± 0.037	1.056 ± 0.008	1.390 ± 0.021
T38V Y47T	2.305 ± 0.026	1.591 ± 0.112	0.737 ± 0.014	1.369 ± 0.080	1.227 ± 0.025
Y47T	3.007 ± 0.017	1.981 ± 0.043	0.871 ± 0.168	0.736 ± 0.125	1.141 ± 0.169
S17P T38V Y47T	0.869 ± 0.016	0.429 ± 0.012	0.127 ± 0.003	0.386 ± 0.025	0.342 ± 0.033

3.2.5. Ergebnisse struktureller Analysen

Um zu erkennen, ob strukturelle Ursachen an den Unterschieden in der Aktivität beteiligt sind, wurden die Strukturen der Varianten mit AlphaFold [177,178] errechnet. Zum Überprüfen der Qualität der Vorhersage wurde der Wildtyp *in silico* gefaltet und mit der Kristallstruktur verglichen (Abb. 41 und 42).

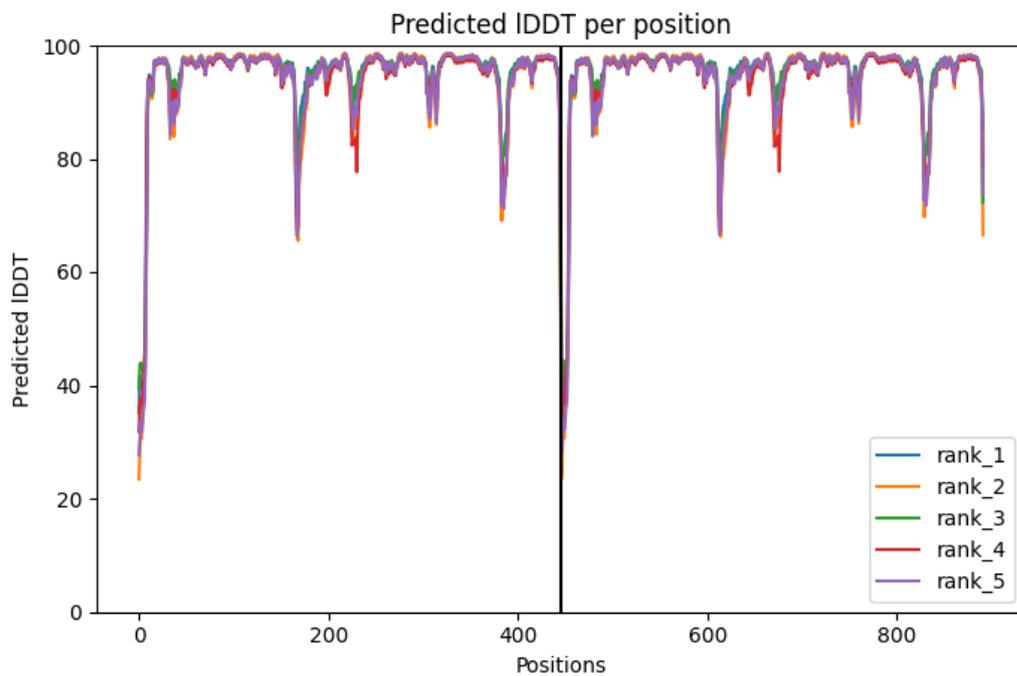


Abbildung 41: LDDT (Local Distance Difference Test) Scores für die einzelnen Aminosäuren von StoTA, das nicht-modifizierte Enzym wurde gefaltet. Die schwarze Linie in der Mitte trennt die Graphen der beiden Monomere voneinander. Für die Sequenz wurden fünf Modelle berechnet und nach der Qualität aufgelistet (Rank 1-5).

Für den Vergleich mit der Kristallstruktur wurde das Modell mit dem besten Rang verwendet, auch wenn die Unterschiede zwischen den errechneten Strukturen minimal sind. Die Kristallstruktur und die *in silico* gefaltete Struktur wurden mit ChimeraX übereinander gelegt, um zu prüfen, ob die Quartärstrukturen beider Varianten übereinstimmen.

Ergebnisse

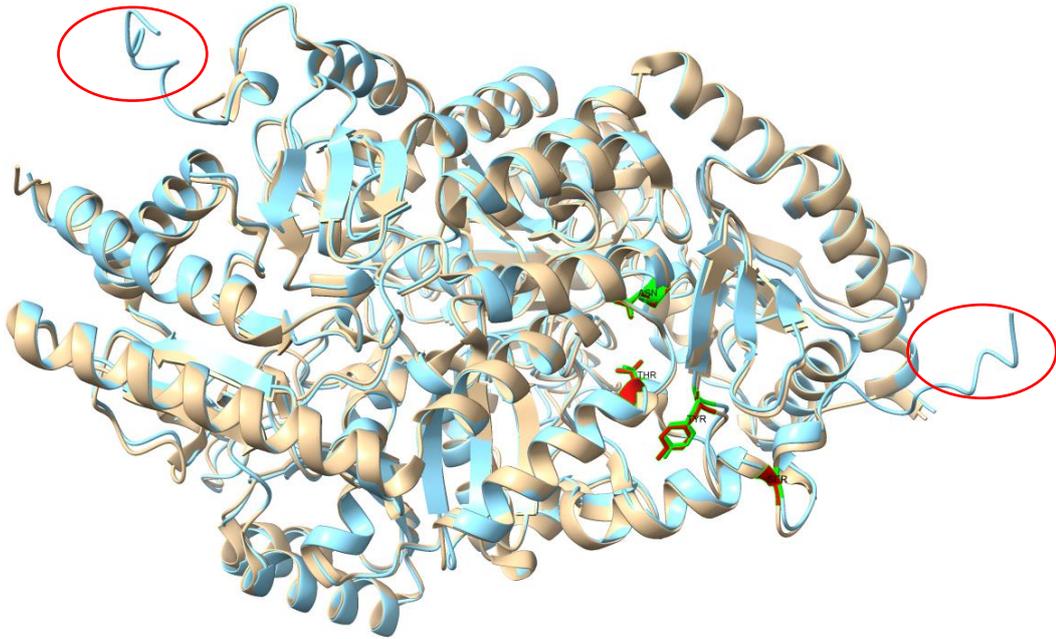


Abbildung 42: Vergleich der 3D-Strukturen des Wildtyps von StoTA. Braun: Kristallstruktur (RCSB Eintrag 6k8h). Blau: Strukturvorhersage von AlphaFold. Die Seitenketten der Aminosäuren, die zur Anpassung an das Motiv ausgetauscht wurden, sind farblich (rot: Kristallstruktur, grün: AlphaFold Vorhersage) dargestellt und benannt. Die roten Ovale markieren die N-termini der Monomere, diese fehlen in der Kristallstruktur, bei dieser sind die ersten acht Aminosäuren nicht enthalten.

Die theoretische Vorhersage der Struktur passt gut zu der gemessenen Kristallstruktur. Die fehlenden Teile in der Kristallstruktur (vgl. rote Ovale - Abb. 42) sind für einen Vergleich der Strukturen nicht essentiell, da die *in silico* Faltung an der Stelle eine große Unsicherheit aufweist (Abb. 41) und ein Vergleich somit sinnlos wäre. Da die Struktur von AlphaFold gut zu der Kristallstruktur passt, wurden die Varianten mit dieser Struktur verglichen. Im Folgenden werden die Mutanten mit Aktivitätsgewinnen in Nahaufnahme dargestellt. Es wurden wieder die Modelle mit dem jeweils besten Rang verwendet.

Ergebnisse

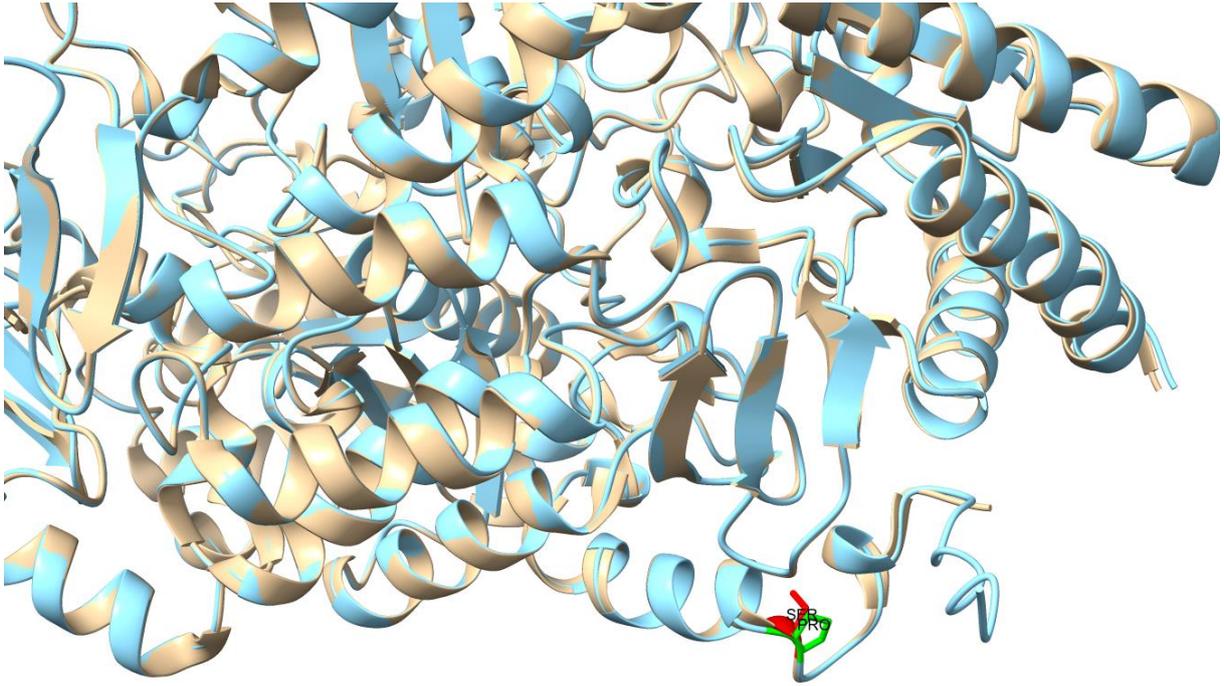


Abbildung 43: Vergleich der 3D-Strukturen des Wildtyps von StoTA und der Variante S17P. Braun: Kristallstruktur (RCSB Eintrag 6k8h), Blau: Strukturvorhersage von AlphaFold. Die Seitenketten der Aminosäuren, die zur Anpassung an das Motiv ausgetauscht wurden und die ursprünglichen des Wildtyps, sind farblich (rot: Kristallstruktur, grün: AlphaFold Vorhersage) dargestellt und benannt.

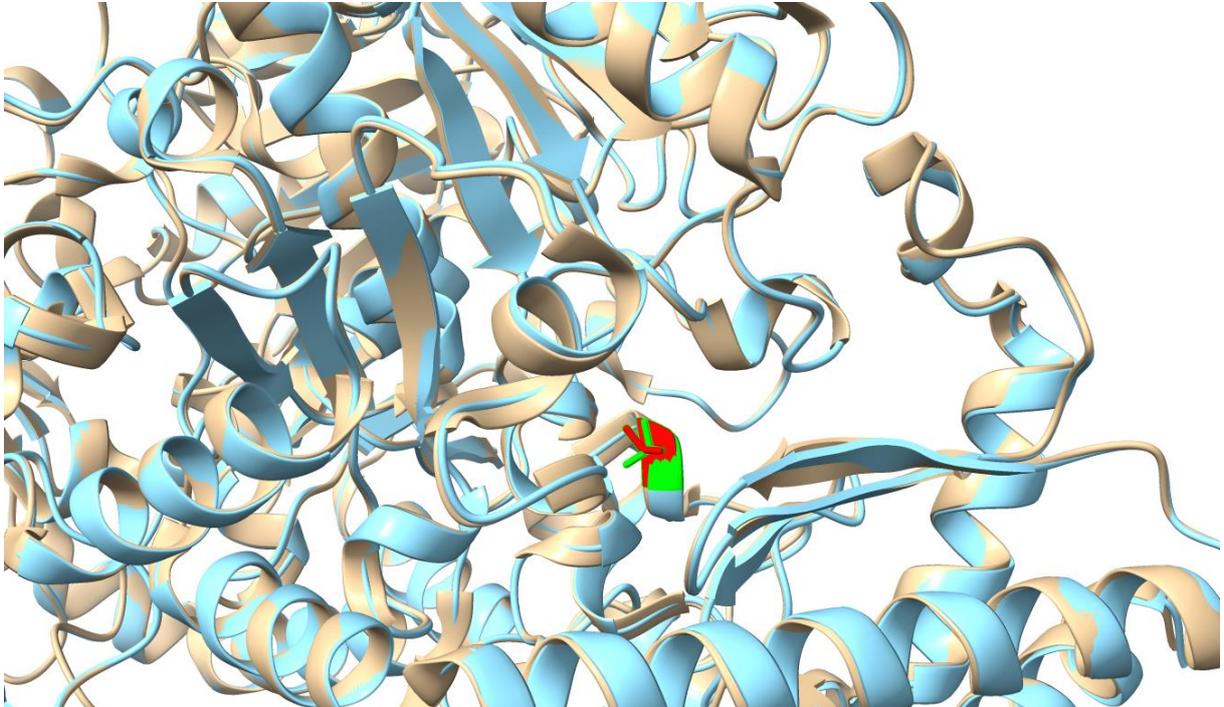


Abbildung 44: Vergleich der 3D-Strukturen des Wildtyps von StoTA und der Variante T38V. Braun: Kristallstruktur (RCSB Eintrag 6k8h), Blau: Strukturvorhersage von Alpha-Fold. Die Seitenketten der Aminosäuren, die zur Anpassung an das Motiv ausgetauscht wurden und die ursprünglichen des Wildtyps, sind farblich (rot: Kristallstruktur, grün: Alpha-Fold Vorhersage) dargestellt. Auf eine Bezeichnung der Seitenketten wurde verzichtet, da es nicht möglich war die Abbildung so zu drehen, dass die Labels nicht übereinander liegen.

Ergebnisse

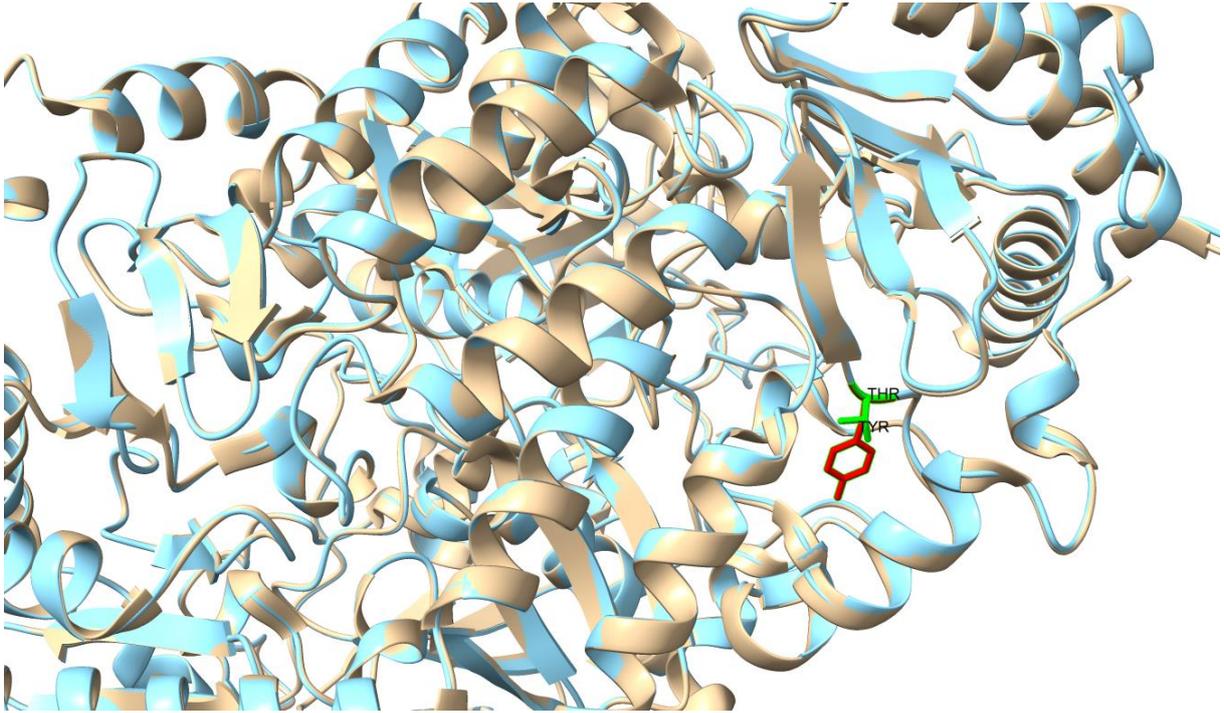


Abbildung 45: Vergleich der 3D-Strukturen des Wildtyps von StoTA und der Variante Y47T. Braun: Kristallstruktur (RCSB Eintrag 6k8h), blau: Strukturvorhersage von AlphaFold. Die Seitenketten der Aminosäuren, die zur Anpassung an das Motiv ausgetauscht wurden und die ursprünglichen des Wildtyps sind farblich (rot: Kristallstruktur, grün: Alpha-Fold Vorhersage) dargestellt und benannt.

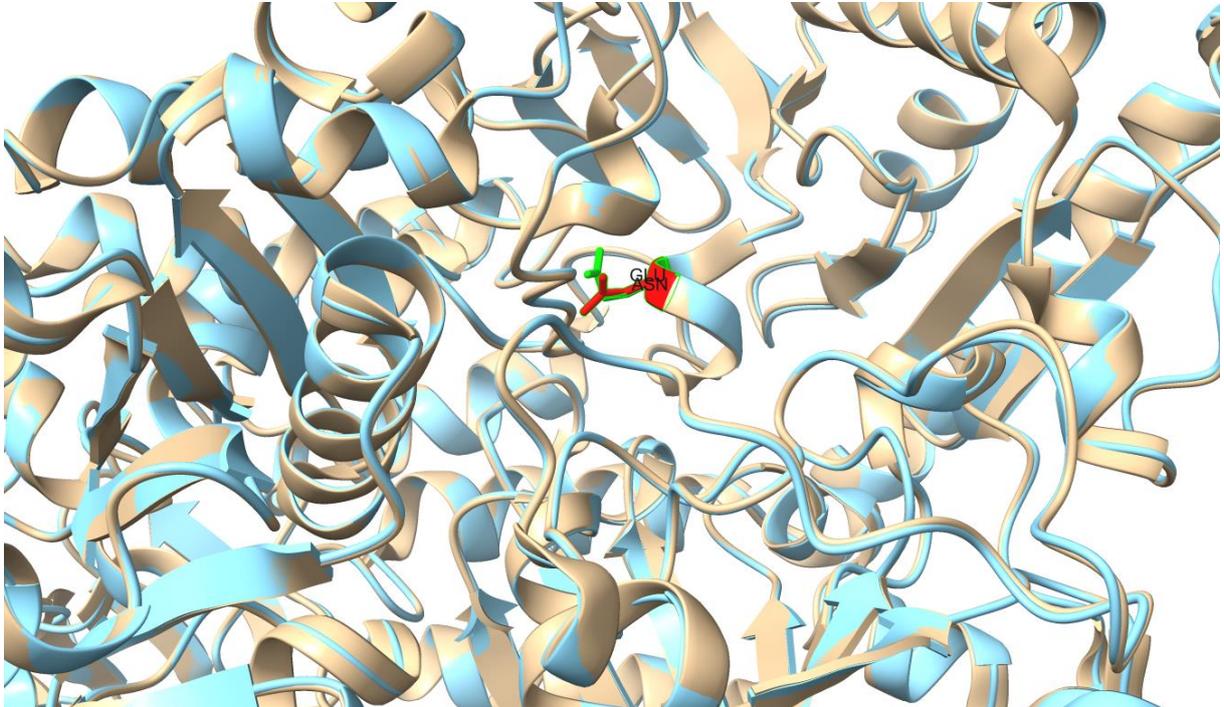


Abbildung 46: Vergleich der 3D-Strukturen des Wildtyps von StoTA und der Variante N70E. Braun: Kristallstruktur (RCSB Eintrag 6k8h), blau: Strukturvorhersage von AlphaFold. Die Seitenketten der Aminosäuren, die zur Anpassung an das Motiv ausgetauscht wurden und die ursprünglichen des Wildtyps sind farblich (rot: Kristallstruktur, grün: Alpha-Fold Vorhersage) dargestellt und benannt.

Ergebnisse

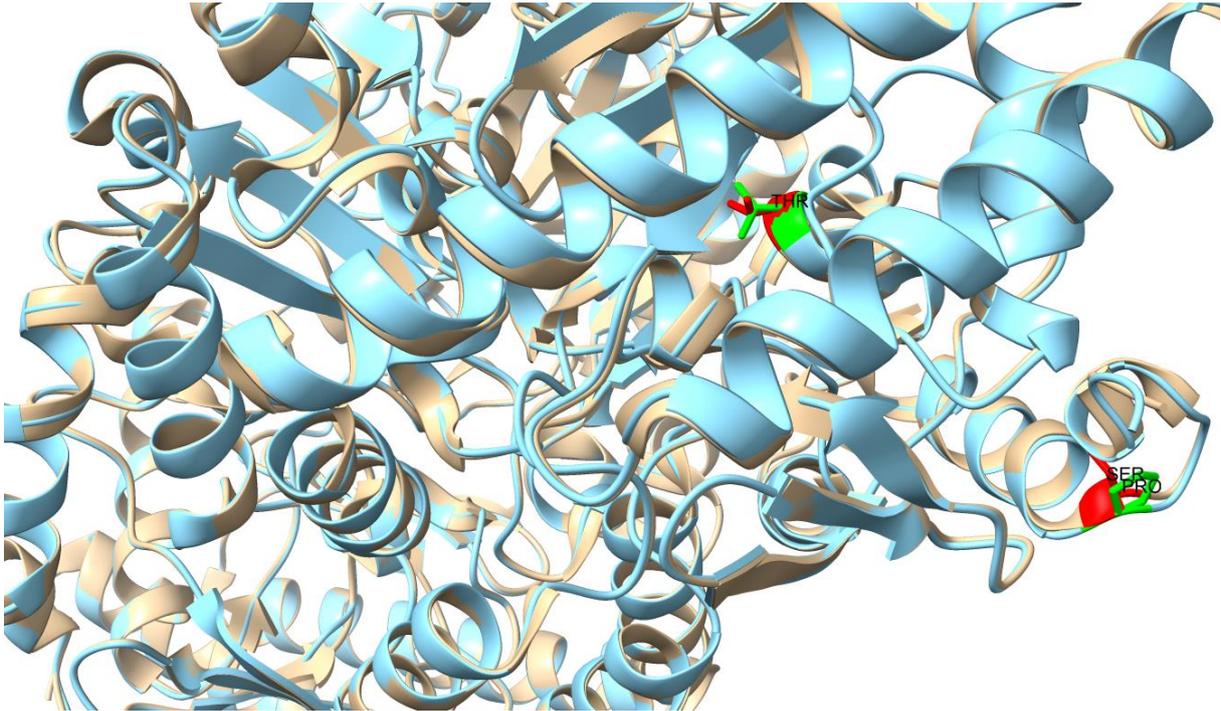


Abbildung 47: Vergleich der 3D-Strukturen des Wildtyps von StoTA und der Variante S17PT38V. Braun: Kristallstruktur (RCSB Eintrag 6k8h), blau: Strukturvorhersage von Alpha-Fold. Die Seitenketten der Aminosäuren, die zur Anpassung an das Motiv ausgetauscht wurden und die ursprünglichen des Wildtyps sind farblich (rot: Kristallstruktur, grün: Alpha-Fold Vorhersage) dargestellt und benannt. Auf die Bezeichnung von V38 in der Variante wurde verzichtet, da es nicht möglich war die Abbildung so zu drehen, dass die Label nicht übereinanderliegen.

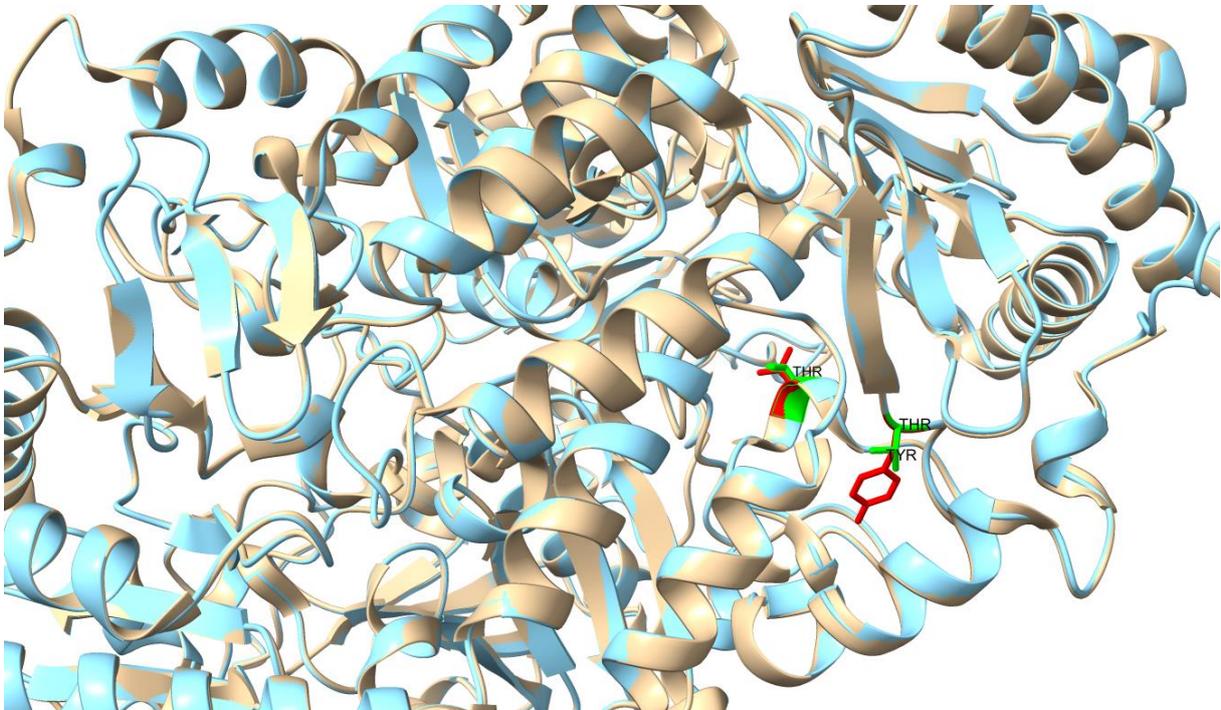


Abbildung 48: Vergleich der 3D-Strukturen des Wildtyps von StoTA und der Variante T38VY47T. Braun: Kristallstruktur (RCSB Eintrag 6k8h), blau: Strukturvorhersage von Alpha-Fold. Die Seitenketten der Aminosäuren, die zur Anpassung an das Motiv ausgetauscht wurden und die ursprünglichen des Wildtyps sind farblich (rot: Kristallstruktur, grün: Alpha-Fold Vorhersage) dargestellt und benannt. Auf die Bezeichnung von V38 in der Variante wurde verzichtet, da es nicht möglich war die Abbildung so zu drehen, dass die Label nicht übereinanderliegen.

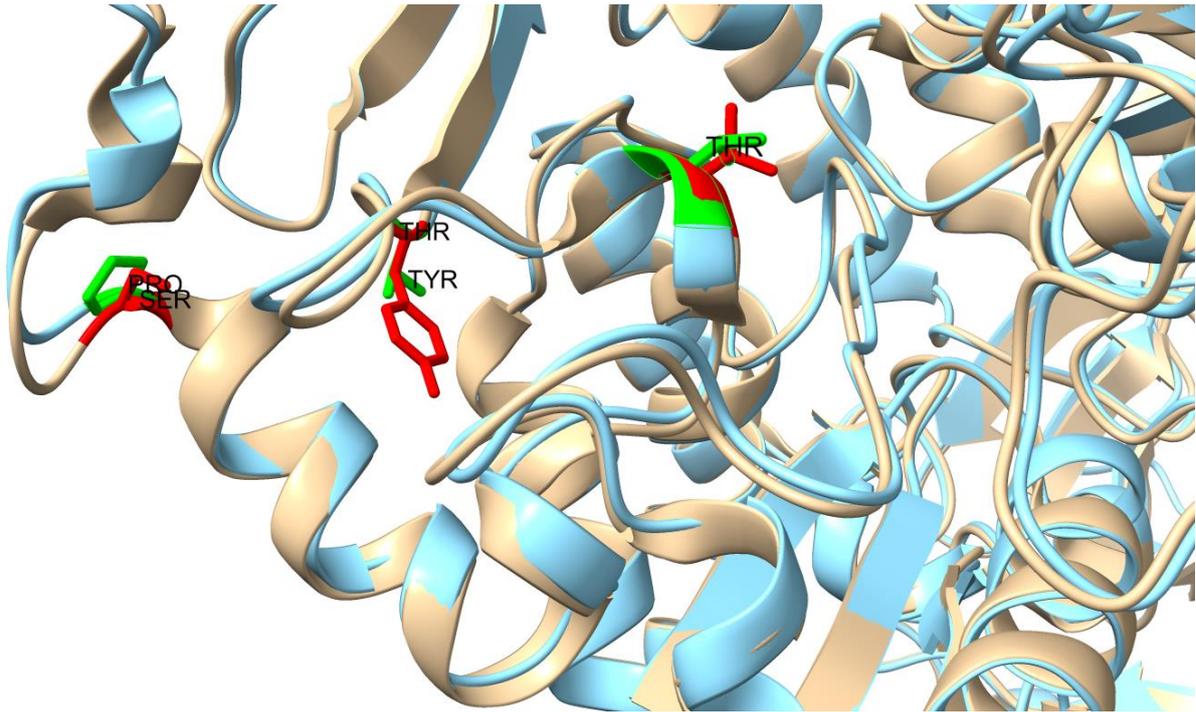


Abbildung 49: Vergleich der 3D-Strukturen des Wildtyps von StoTA und der Variante S17PT38VY47T. Braun: Kristallstruktur (RCSB Eintrag 6k8h), blau: Strukturvorhersage von Alpha-Fold. Die Seitenketten der Aminosäuren die zur Anpassung an das Motiv ausgetauscht wurden und die ursprünglichen des Wildtyps sind farblich (rot: Kristallstruktur, grün: Alpha-Fold Vorhersage) dargestellt und benannt. Auf die Bezeichnung von V38 in der Variante wurde verzichtet, da es nicht möglich war die Abbildung so zu drehen, dass die Label nicht übereinanderliegen.

Bei den Mutanten konnten keine Unterschiede in der Faltung festgestellt werden (Abb. 43-49). Vorausgesetzt, dass die *in silico* Faltung korrekt ist, können die Unterschiede in der Aktivität nicht auf Konformationsänderungen zurückgeführt werden.

3.3. Ergebnisse der Tests mit der Stammsammlung

3.3.1. Testen potenzieller Kandidaten

Die Hefen *B. raffinosifermentans*, *Pichia anomala*, *P. hansenii*, *Debaryomyces polymorphus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *P. pastoris* und *Hansenula polymorpha* sowie die Bakterien *Bacillus amyloliquefaciens* 10A4, *B. amyloliquefaciens* 10A3, *B. brevis*, *B. licheniformis* 14580, *B. subtilis*, *B. s. subtilis*, *B. pumilus*, *P. megaterium*, *Lysinibacillus sphaericus* (ehemals *B. sphaericus*), *B. licheniformis* 9789, *B. coagulans*, *Lactobacillus brevis* und *E. coli* BL21 DE3 wurden in Medien angezogen, die von der DSMZ für die jeweiligen Organismen

Ergebnisse

vorgeschlagen werden. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet und mit einer Kugelmühle aufgeschlossen. Anschließend erfolgte ein Test auf ω -Transaminase-Aktivität mit den Rohextrakten. Nur die Extrakte von *B. raffinosifermentans*, *B. megaterium* und *L. sphaericus* zeigten Aktivität. Um zu prüfen, ob die Synthese von ω -Transaminasen durch Anwesenheit einer β - oder γ -Aminosäure induziert werden kann, wurden die Organismen noch einmal mit β -Phenylalanin und ein weiteres Mal mit γ -Aminobuttersäure im Medium kultiviert. Wieder wurden die Rohextrakte auf Aktivität getestet. Auch bei diesem Versuch zeigten nur die Extrakte von *B. raffinosifermentans*, *P. megaterium* und *L. sphaericus* Aktivität. Daher wurde nur mit diesen Organismen weitergearbeitet.

3.3.2. Wachstumsversuche mit *B. raffinosifermentans*

Zusätzlich zu den Vortests mit den Rohextrakten wurden verschiedene Wachstumsversuche mit *B. raffinosifermentans* LS3 durchgeführt, um zu testen ob die Hefe β -Aminosäuren verwerten kann.

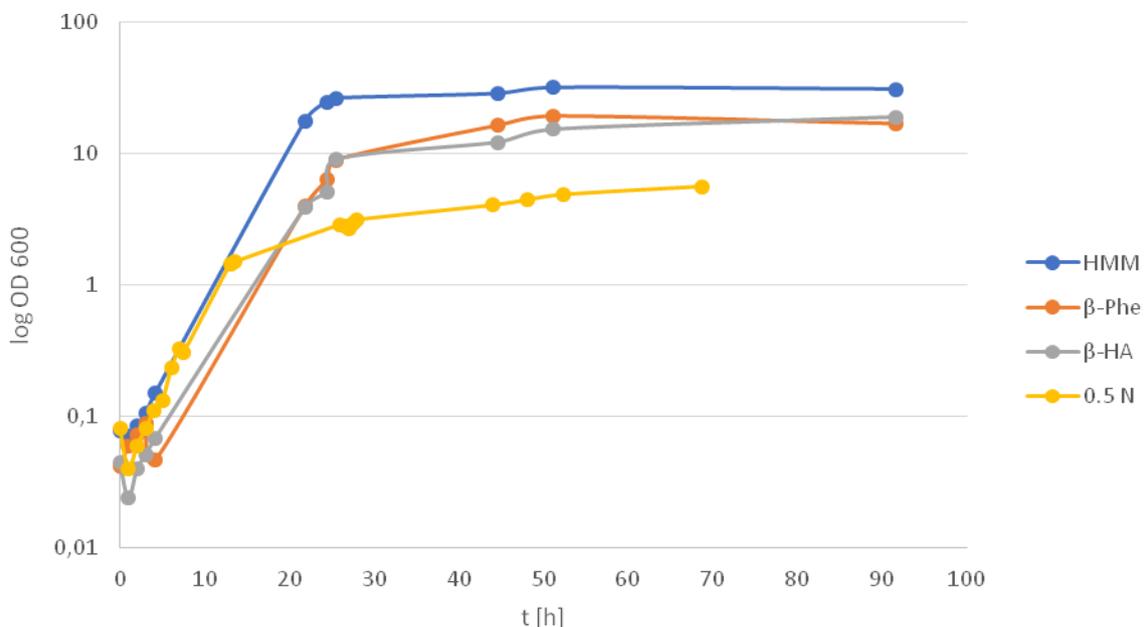


Abbildung 50: Wachstumskurven von *B. raffinosifermentans* LS3 in verschiedenen Medien. HMM: Hefeminimalmedium, β -Phe: HMM, in dem 50 % des Stickstoffs von β -Phenylalanin stammt, β -HA: HMM, in dem 50 % des Stickstoffs von β -Homoalanin stammt, 0,5 N: Hefeminimalmedium mit um 50 % reduziertem Stickstoffgehalt.

Ergebnisse

Die Wachstumsexperimente zeigen, dass *B. raffinosifermentans* β -Aminosäuren verwerten kann, da sowohl β -Phenylalanin als auch β -Homoalanin den Stickstoffmangel des 0,5 N Mediums zumindest teilweise wieder ausgleichen können. In Hefeminimalmedium (HMM) erreicht die Hefe eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 31,2, in HMM mit halbiertem Stickstoffgehalt wird nur noch eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 5,7 erreicht. Wird der reduzierte Stickstoffgehalt mit einer β -Aminosäure ausgeglichen, kann *B. raffinosifermentans* bis auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 17 (β -Phenylalanin) bzw. 19,1 (β -Homoalanin) wachsen (Abb. 50).

3.3.3. Ergebnisse der Sequenzvergleiche der *Bacillus*-Stämme

Ebenso wie bei *V. boronicumulans* wurde die Sequenz von StoTA mit den Einträgen in den Proteindatenbanken von *P. megaterium* bzw. *L. sphaericus* verglichen. Die jeweils besten Treffer wurden ebenso wie *vbota* als Gen bei Eurofins geordnet.

Ergebnisse

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
273 bits(697)	9e-92	Compositional matrix adjust.	159/426(37%)	238/426(55%)	21/426(4%)
Query 12	FEKAVDLMPPGGVNSPVRAFKSVNMDPIFMESGKGAMIKDIDGNEYIDYVLSWGPLILGHA				71
Sbjct 23	FEARRVLPGG-NTRTTVYSAPY--PPYAARGRGAVIVDADGEERLDFVNNYITALIHGHA				79
Query 72	DEDVEGIQRVAATGSSFGAPTAEENELAEVIDRVPSEIMIRMVSSGTEATMSALRLAR				131
Sbjct 80	DPDINEAVIRQLADGVAFAMPTHEIALAELLTERVPSLQQVRFNSGTEAVMMAIKAAR				139
Query 132	GYTGRNIIMKFEFCYHGHGDSLLI-----KAGSGVATLGLPDSPGVPESIARNTITVPY				185
Sbjct 140	AYTGRPRIAKFDGCYHGSYDFAEVSTQSSGKPGEDGFPVATPYTGGTPQAVLDSVWVLPF				199
Query 186	NDLESVKLAMNEYGDDIAALIVEPVAGNMGVWPPPEPGFLEGLRELTENGSLIFDEVMT				245
Sbjct 200	NDIDGTERLIEQHRDELA AVLIDPNRSLGLYPAEPALQLRLREITRAYGIVLIFDEVIS				259
Query 246	GFRVGYECAQGYVDVTPDITCLGKVIIGGGLPVGAYGGSKEIMSQIAPSGTVYQA---GTL				302
Sbjct 260	-LRSDYGGMQSVLGVTPDLTAMCKIIGGGFPVGA VGGSAEVMVDFDPTGGPPRAPHGGTF				318
Query 303	SGNPLAMTAGIETLKKLTPASYEYFNKLDQLEAGFREAAEKYNIPHTVNRAGSMIGFFF				362
Sbjct 319	NANPVTMVAGLTAMRKLTPAEFDRLATLGQQLRAGVEEVLREAGVPGQVTGYGSLFHIHL				378
Query 363	TNEKVVNYDKAKTSDLE--LFAEYRLMAEEGIFLPPSQFEGMFLSAAHTEEHIAKTVEA				420
Sbjct 379	HQRPLADYRNSVLSAQERAFVGRVHEALMGRGIFITPALF-GCLSTPMGVPE----VEA				432
Query 421	FHKVFA 426				
Sbjct 433	FVDAFA 438				

Abbildung 51: Vergleich LsoTA (NCBI Accession: WP_082295014.1) mit StoTA. Query: Sequenz der möglichen ω -Transaminase von *L. sphaericus*. Sbjct: Sequenz der StoTA. In der mittleren Zeile sind Aminosäuren angegeben, die in beiden Sequenzen identisch sind, ein „+“ markiert Stellen, an denen sich Aminosäuren mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften. Das rote Oval markiert das katalytische Lysin in StoTA und die Aminosäure von LsoTA an derselben Stelle.

Da LsoTA ebenfalls ein Lysin an der Stelle trägt, die bei StoTA der Stelle 282 entspricht und auch die Umgebung um dieses Lysin der von StoTA ähnelt (Abb. 51), wurde das Gen *Isota* an das Codonusage von *E. coli* angepasst und ebenfalls bei Eurofins geordert.

Ergebnisse

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
284 bits(727)	6e-96	Compositional matrix adjust.	166/447(37%)	243/447(54%)	22/447(4%)
Query 11	EKTKKSASL	FNKACEVIPGGVTANIKYFDPHPLMMEKGGKSKLFDVDGNEYIDYLLCYGA	70		
Sbjct 14	EPGSAAADL	FERARRVLPGGNTRTTVYSAPYPPYAARRGRGAVIVDADGEERLDFVNNYTA	73		
Query 71	LILGHGHPQVFEAVTKQMMESGTTIFGTPHKMETTMAEKLVELYPGIEMVRYTNSGLEAT	130			
Sbjct 74	LIHGHADPDINEAVIRQLADG--VAFAMPTEHEIALAELLTERVPSLQQVRFRTNSGTEAV	131			
Query 131	LLAIRTAVAYTGKEKIAKFEFGHYHGGYDQVLVSVNPDIDKAGEATIPKAVGESRGLPNYY	190			
Sbjct 132	MMAIKAAARAYTGRPRIAKFDGCGYHGSYDFAEVSTQ-SSGKPGEDGFPVATPYTGGTPQAV	190			
Query 191	LDNTVILPFDNLEATEKILKAHAHELAVILEPIQG--GFIPADQDFMTGLRKITEELDI	248			
Sbjct 191	LDSVVVLPFDNIDGTERLIEQHRDELA AVLIDPNRSLGLYPAEPAFLQRLREITRAYGI	250			
Query 249	VLIFDEVKTFRISLGGAQKTYGIKPDITALGKVLGGGFPVGAIGGKKDIMMISSARGGR	308			
Sbjct 251	VLIFDEVIS-LRSDYGGMQSVLGVTPDLTAMCKIIGGGFPVGAIVGGSAEVMSVFDPTGG-	308			
Query 309	DILTAGAENKNKQDPLYHSGTYNGHPTILAAGLATINVLEQKGTMDQLFANTQLLRDQLE	368			
Sbjct 309	-----PPRAP--HGTFNANPVTMVAGLTAMRKL-TPAEFDRLATLGQQLRAGVE	355			
Query 369	EVYKSHGLTMQTVMGSI FNII LGE GNIKNYRD--MSKADTKLREKIDYELLKLG VYTKP	426			
Sbjct 356	EVLREAGVPGQVTGYGSLFHIHLHQRPLADYRNSVLSAQERAFVGRVHEALMGRGIFITP	415			
Query 427	LNRYSMSV VHTKEDIRRTVA AHDEAIQ	453			
Sbjct 416	ALFGCLSTPMGVPEVEAFVDAFAAALQ	442			

Abbildung 52: Sequenzvergleich *PmoTA* (NCBI Accession: WP_098476556.1) mit *StoTA*. Query: Sequenz der möglichen ω -Transaminase von *B. megaterium*. Sbjct: Sequenz der *StoTA*. In der mittleren Zeile sind Aminosäuren angegeben, die in beiden Sequenzen identisch sind, ein „+“ markiert Stellen, an denen sich Aminosäuren mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften. Das rote Oval markiert das katalytische Lysin in *StoTA* und die Aminosäure von *PmoTA* an derselben Stelle.

Da *PmoTA* ebenfalls ein Lysin an der Stelle trägt, die bei *StoTA* K282 entspricht und auch die Umgebung um dieses Lysin der von *StoTA* ähnelt (Abb. 52), wurde das Gen *pmota* an das Codonusage von *E. coli* angepasst und von Eurofins synthetisiert. Die Sequenz befindet sich im Anhang.

Das Klonieren und die Synthese der Proteine *LsoTA* und *PmoTA* verlief analog zu der von *VboTA*.

3.3.4. Ergebnisse Sequenzvergleiche *B. raffinosifermentans*

Nach den positiven Wachstumsversuchen wurde versucht, mittels Sequenzvergleichen herauszufinden, welche Proteine von *B. raffinosifermentans* für die Verwertung der β -

Ergebnisse

Aminosäuren verwendet werden. Die Homologiesuchen verschiedener ω -Transaminasen (z.B. ein Enzym des Schimmelpilzes *Aspergillus terreus* oder einer ω -Transaminase von der Hefe *Scheffersomyces stipitis* [191,192]) gegen die Proteindatenbank von *B. raffinosifermentans* lieferte jedoch keine Treffer. Daher wurde die Datenbankeinträge einem hmmer scan (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>, HmmerWeb version 2.41.1) unterzogen. Damit wurden sämtliche 6145 Einträge der Datenbank in Proteinfamilien eingeordnet. Das Enzym mit der GenBank Accession ABF58893.1 [193] wurde ebenfalls gescannt. Es handelt sich hierbei um eine ω -Transaminase. Diesem Protein wurde die Pfam PF00202.21 zugeordnet. Der Name dieser Familie ist Aminotran_3. Die 21.000 Pfams, die der gesamten Proteindatenbank von *B. raffinosifermentans* zugeordnet wurden, wurden nach PF00202.21 durchsucht. Die Suche lieferte drei potenzielle ω -Transaminasen. Die Accession-Nummern dieser Proteine sind: >ARAD1C43516g (85,5 kDa, BroTA1, für *Blastobotrys raffinosifermentans* ω Transaminase 1), >ARAD1D16258g (46 kDa, BroTA2) und >ARAD1D29502g (45,6 kDa, BroTA3).

Dass BroTA1 deutlich größer ist als übliche ω -Transaminasen liegt daran, dass das Enzym noch eine zusätzliche AAA Domäne am N-Terminus hat (Abb. 53). BroTA2 und BroTA3 haben nur die Aminotran_3 Domäne.

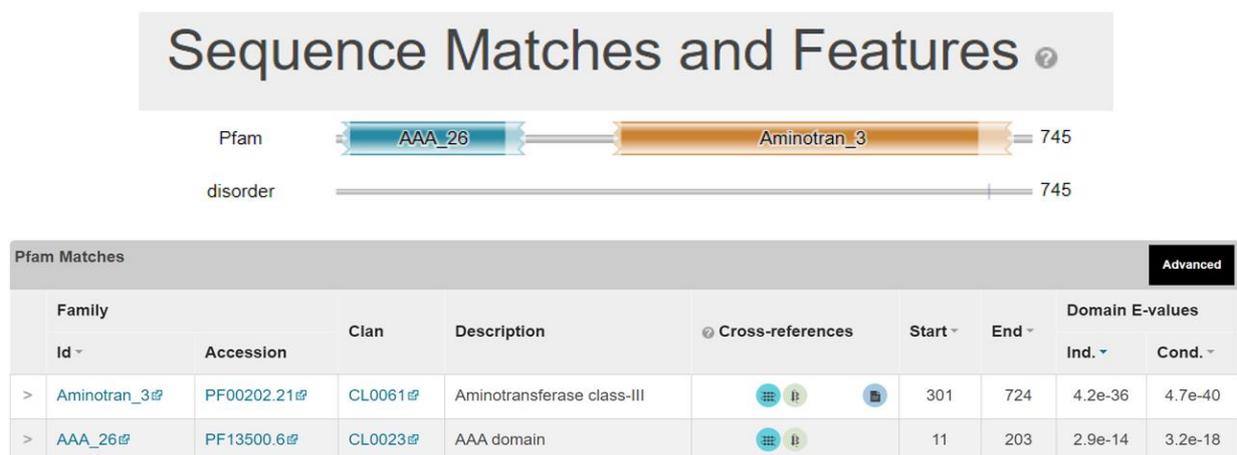


Abbildung 53: Funktionelle Domänen in BroTA1. Start und End geben die Aminosäurenummern an, an denen die Domäne beginnt bzw. endet.

Im nächsten Schritt wurde die Ähnlichkeit der drei potenziellen ω -Transaminasen mittels Sequenzalignment überprüft (Abb. 54).

Ergebnisse

Query_10001	1	[247]	LDNMSTDAE	KTIWY	PFSQHKE	INRDTIV	VDSAYK	DSFQTL	LRKGS	TEPSEN	ALASSF	DGSAS	WWTQ	GLGH	GNPKL	322																																																														
Query_10002	1		MSTITSAQA	-----	IELEEK	SAHNYH	PIPVV	FAKKG	GAHV	VDPEG	KQYLD	FLSAY	SAVN	QGH	CHPKI	63																																																														
Query_10003	1		MQSFTR	TVARSA	KRGYST	KSFLE	THNPF	SVTTY	ARPD	IVIRQ	GRGSH	LWDTD	GKKYI	DFTAG	IAVTGL	GHCDEV	75																																																													
Query_10001	323		ALTA	AHAAG	RYGHMI	LANTI	HEPALK	KLAK	KILE	VVNN	EKLRR	VFYSD	NGST	GIEV	AVKMAM	[5] YGW	---DVSDGS	398																																																												
Query_10002	64		IQAL	TEQA	QKLT	LSS-RAF	HNDV	FGQFA	KYVTE	YF--	-GYDM	VLP	MNTG	AEEV	ETAIK	LARK	WGYmk	KGIPVDQ	133																																																											
Query_10003	76		ADI	ITDQ	SKTL	IHAS-	NLYNE	WT	PRLQ	KAI	VE	TTLN	[4] HNAS	RVFL	ANS	GSEANE	AALK	FARK	HG---	NNISGEK	149																																																									
Query_10001	399		IGIL	GLKRS	YHGD	TIGSM	CSEPS	VYS	[35] E	LDSK	VFST	I	DEVY	DLSNR	DPG	PYKEY	IRKEL	QKLL	dkGL	KFGALLEP	509																																																									
Query_10002	134		ALV	L	SATEN	FHGR	T	LAVV	SM	ST	DPEAK	EYYG	PYLQ	NV	GP	TIPGS	NKPL	RYNN	IGD	LEEA	FAAA--	GDKIA	AF	LV	EP	207																																																				
Query_10003	150		TEI	V	SFNR	SFHGR	T	MGAL	T	TAN	PKYT	DPFR	PLIP	GV	-----	KHGN	VNDIE	AID	SLV	--	TDK	CA	VIV	EP	212																																																					
Query_10001	510		aLL	GAG	GMVAV	DPL	FOKAL	V	D	VVRE	[13] S	GLP	VIC	D	E	V	S	G	L	R	L	G	R	A	S	S	L	--	V	G	I	D	P	E	I	S	V	H	A	K	L	L	T	G	L	L	P	L	S	V	T	596																										
Query_10002	208		-IQ	E	A	G	I	V	V	P	D	D	A	L	Q	K	V	A	E	L	C	K	H	N	V	L	F	I	A	D	E	I	Q	T	G	I	A	R	T	G	K	M	L	A	V	D	H--	V	G	V	R	P	D	A	V	L	L	G	K	A	I	S	G	G	V	T	P	V	S	A	V	280						
Query_10003	213		-IQ	A	E	G	I	Y	V	C	D	A	D	F	L	V	A	L	K	R	C	S	V	G	A	L	L	I	Y	D	E	I	Q	C	L	G	R	T	G	K	L	W	A	H	O	W	l	p	K	E	A	H	P	D	I	L	T	M	A	K	A	L	G	N	G	-	Y	P	I	G	A	T	286					
Query_10001	597		I	A	S	E	I	F	Q	T	F	I	S	S	[6] H	G	S	Y	T	A	H	P	V	G	C	S	V	A	L	E	S	L	E	Q	L	Q	S	l	a	S	S	W	G	P	E	N	S	I	V	S	F	W	S	E	E	F	L	T	R	V	S	N	Y--	S	N	V	E	G	A	F	A	M	G	S	677			
Query_10002	281		L	A	D	R	V	M	L	C	I	Q	P	G	T	H	G	S	T	Y	G	G	N	P	L	S	C	A	V	A	I	A	A	L	E	V	V	K	E--	E	K	L	A	D	R	A	A	K	L	G	E	R	M	R	E	G	L	K	P	L	L	E	T--	G	I	V	T	E	V	R	G	R	G	L	353			
Query_10003	287		L	V	T	E	E	V	E	K	A	L	N	V	G	D	H	G	T	T	Y	G	G	N	P	L	G	C	R	V	A	H	H	V	L	S	R	L	A	S--	P	E	I	Q	O	N	V	N	T	V	S	Q	L	F	O	E	R	L	E	K	L	O	O	K	f	p	D	T	T	I	E	I	R	G	K	G	L	361
Query_10001	678		V	L	A	I	H	M	K	D	T	S	P	G	Y	T	S	T--	V	A	S	R	I	H	N	H	[16] S	V	L	Y	L	M	C	G	Q	T	T	I	-----	P	G	E	V	R	K	L	E	K	K	I	E	E	A	F	S	-	H	H	H	H	H	H	-	751														
Query_10002	354		L	N	A	I	V	D	S	S	K	A	N	G	R	S	A	W	D	L	C	M	L	M	K	D	O	G	V	L	A	K	P	T	H	E	N	I	R	L	A	P	P	L	V	I	S	E	E	D	V	D	K	G	L	E	V	I	K	D	C	V	S	[8] Q	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	432		
Query_10003	362		L	L	G	L	Q	L	S	K	D	P	A	-----	P	I	L	A	K	A	R	E	A	G	L	L	A	I	T	C	G	V	N	T	I	R	F	V	P	A	L	N	I	P	T	E	V	A	K	E	G	L	D	I	L	E	S	V	F-	E	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	424						

Abbildung 54: Sequenzvergleich der potenziellen ω -TAs von *B. raffinosifermentans*. Query_10001: Sequenz von BroTA1. Query_10002: Sequenz von BroTA2. Query_10003: Sequenz von BroTA3. Aminosäuren, die in allen drei Sequenzen identisch sind, wurden rot gefärbt.

Paarweise Sequenzvergleiche ergaben prozentuale Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen jeweils zwei Sequenzen (Tab. 23).

Tabelle 23: Homologie-Vergleiche zwischen den drei potenziellen ω -Transaminasen von *B. raffinosifermentans*. Angegeben sind der Anteil identischer (% Identities) und ähnlicher (% positives) Aminosäuren und den Lücken (% gaps) zwischen den verglichenen Sequenzen.

query: subject	% identities	% positives	% gaps
BroTA1: BroTA2	28	51	7
BroTA1: BroTA3	30	48	8
BroTA2: BroTA3	30	50	7

Die Proteine haben nur etwa 30 % identische Reste und rund 50 % ähnliche Sequenzabschnitte (Tab. 23). Die Anzahl an Aminosäureresten, die in allen drei Sequenzen

Ergebnisse

identisch sind, ist recht niedrig (Abb. 54). Das lässt vermuten, dass die Enzyme unterschiedliche biochemische Eigenschaften haben.

Die Gensequenzen der potenziellen ω -Transaminasen von *B. raffinosifermentans* sind im Anhang zu finden.

Diese drei Proteine scheinen nur im Reich der Pilze vorzukommen. Ein Vergleich dieser drei Proteine mit den Sequenzen von NCBI Nr. lieferte in den Top 100 Ergebnissen nur Proteine pilzlichen Ursprungs. Eine Wiederholung der Datenbanksuche gegen NCBI Nr. ohne die Einträge des Taxons *fungi* lieferte keine Treffer. Interessanterweise hat eine Homologiesuche mit verschiedenen ω -Transaminasen unterschiedlicher Pilze, sowohl Hefen als auch mycelbildender Pilze, in der Proteindatenbank von *B. raffinosifermentans* zu keinem Ergebnis geführt.

3.3.5. Klonierung und Expression der potenziellen ω -Transaminasen von *B. raffinosifermentans*

Die einzelnen Gene wurden mittels PCR aus genomischer DNA amplifiziert. In einem weiteren PCR-Schritt wurden die amplifizierten Fragmente an beiden Enden mit Überhängen versehen, die 18 Basen lang waren. Diese Überhänge waren komplementär zu den Bereichen um die *PacI* Schnittstelle im XPLOR3® Vektor.

Für die Expression wurde der XPLOR3® Vektor verwendet. Die Transformation wurde so durchgeführt, dass der Vektor in eine Kopie des 25S rDNA Gens inserierte.

3.3.6. Ergebnisse der Aktivitätstests

Die Tests erfolgten mit gereinigten Enzymen, da unter Verwendung des Rohextrakts im Vortest schon qualitativ Umsätze gemessen wurden. Außerdem haben die Wachstumsversuche gezeigt, dass *B. raffinosifermentans* β -Aminosäuren verwerten kann. Durch das Verwenden von gereinigten Enzymen kann ausgeschlossen werden, dass

Ergebnisse

eventuelle Aktivität von unbekanntem Enzymen stammt. Des Weiteren kann so gemessene Aktivität dem richtigen Enzym zugeordnet werden.

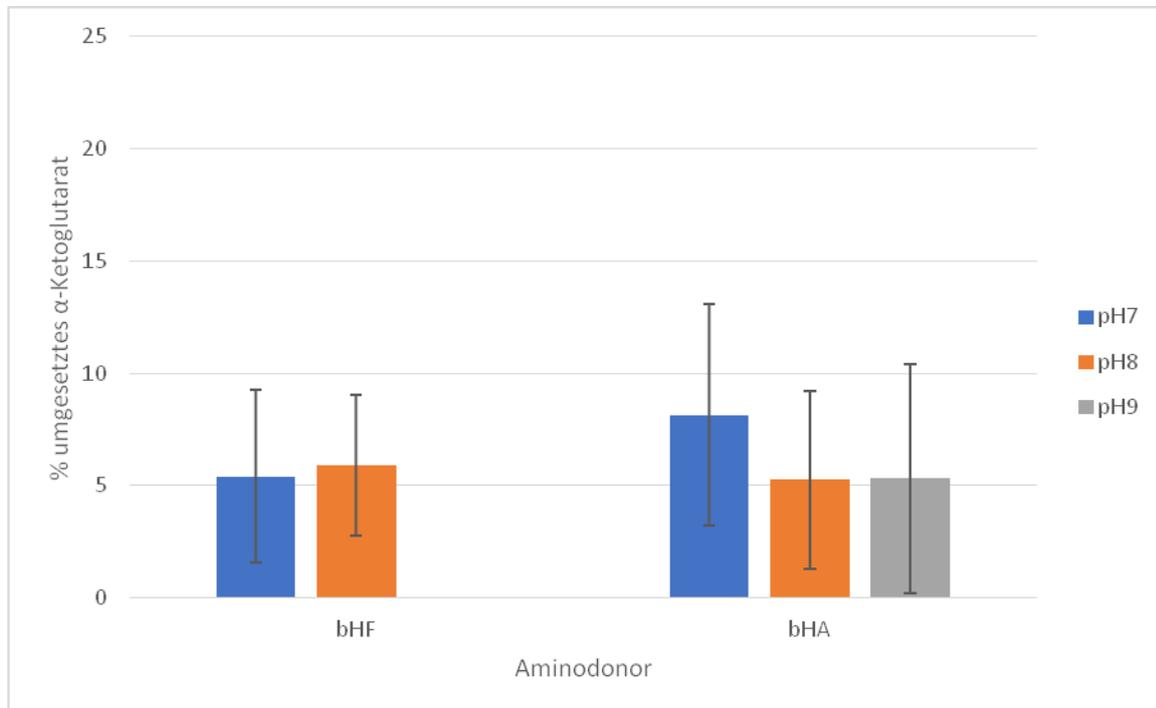


Abbildung 55: Aktivität von BroTA1 mit α -Ketoglutarat als Aminoakzeptor und β -Homophenylalanin (bHF) bzw. β -Homoalanin (bHA) als Aminodonor bei verschiedenen pH-Werten. Dargestellt ist der prozentuale Anteil des eingesetzten α -Ketoglutarats, der nach 75 min aminiert wurde, mit Standardabweichung. N=3.

BroTA1 zeigt bei den verwendeten Bedingungen eine nur sehr geringe Aktivität mit großer Standardabweichung. Daher wurde das Enzym für die nächsten Tests nicht mehr verwendet (Abb. 55). Das Donoren-Spektrum für die Tests mit BroTA2 und BroTA3 wurde um β -Leucin und GABA erweitert. Das pH-Spektrum wurde ebenfalls erweitert, um zu prüfen, ob ein niedrigerer pH-Wert zu höheren Umsätzen führt.

Ergebnisse

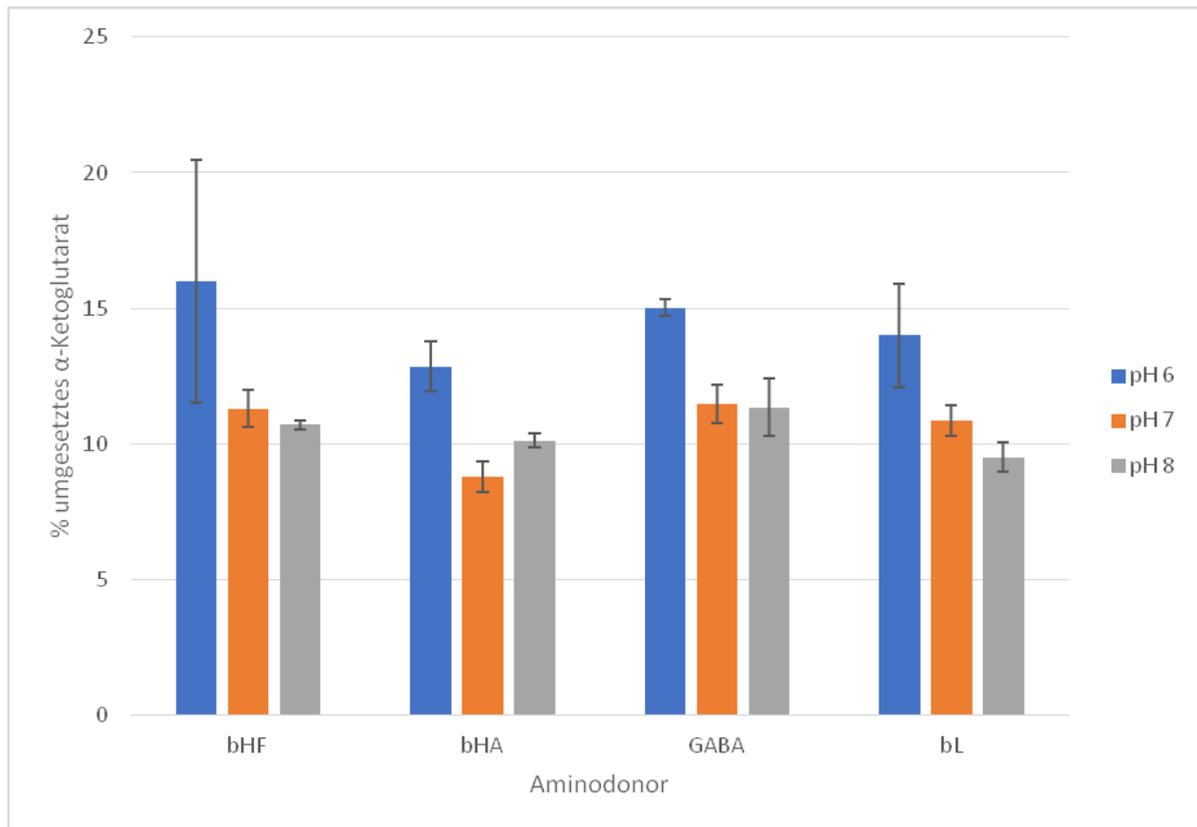


Abbildung 56: Aktivität von BroTA2 mit α -Ketoglutarat als Aminoakzeptor und β -Homophenylalanin (bHF), β -Homoalanin (bHA), γ -Aminobuttersäure (GABA) und β -Leucin (bL) als Aminodonor bei verschiedenen pH-Werten. Dargestellt ist die Menge an umgesetztem α -Ketoglutarat nach 75 min in % vom eingesetzten α -Ketoglutarat. N=2, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Erste Versuche mit BroTA2 zeigen, dass das Enzym alle eingesetzten Substrate umsetzen kann. Bei allen Substraten wird pH 6 bevorzugt (Abb. 56). Ein noch niedrigerer pH-Wert oder ein anderer Aminoakzeptor könnten möglicherweise dazu beitragen bessere Umsätze zu erzielen.

Ergebnisse

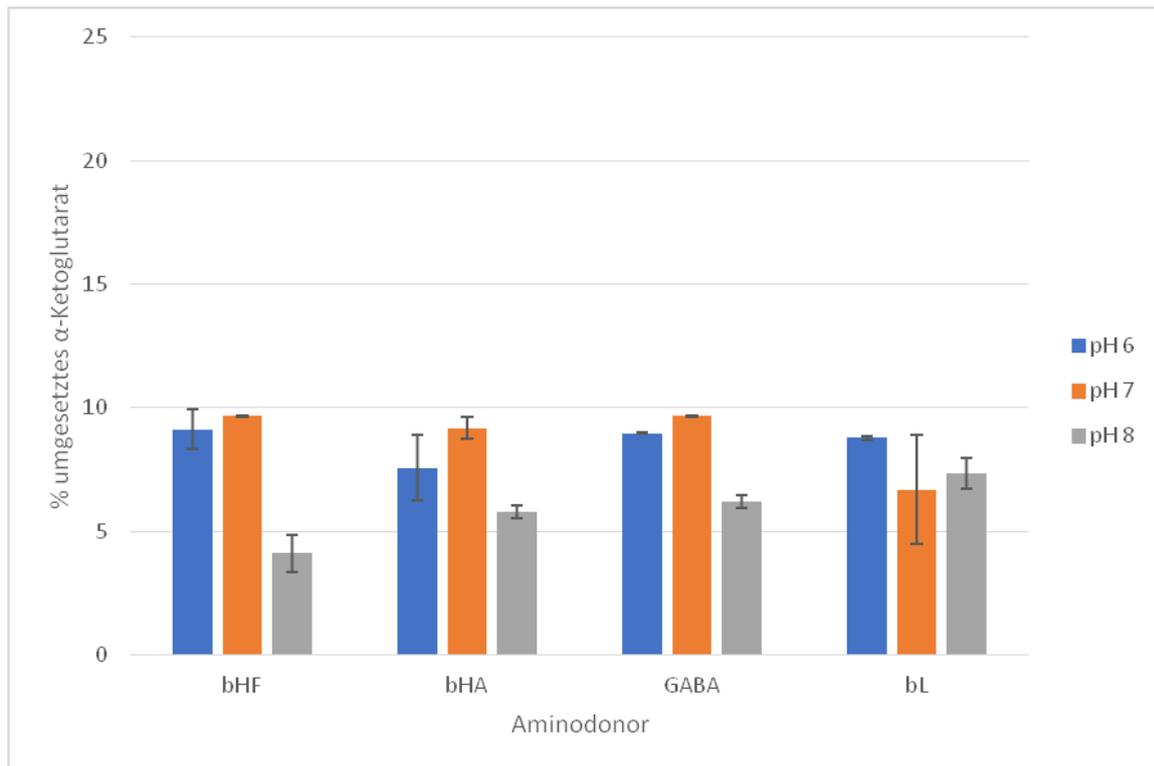


Abbildung 57: Aktivität von BroTA3 mit α -Ketoglutarat als Aminoakzeptor und β -Homophenylalanin (bHF), β -Homoalanin (bHA), γ -Aminobuttersäure (GABA) und β -Leucin (bL) als Aminodonor bei verschiedenen pH-Werten. Dargestellt ist die Menge an umgesetztem α -Ketoglutarat nach 75 min in % vom eingesetzten α -Ketoglutarat. N=2, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Auch BroTA3 kann alle eingesetzten Aminodonoren umsetzen (Abb. 57), allerdings weniger Effizient als BroTA2. Auch ein Trend bezüglich des pH-Werts lässt sich hier nicht erkennen. Es scheint so, als ob das pH-Optimum Substratabhängig ist.

Die ersten Versuche mit den Enzymen von *B. raffinosifermentans* zeigen geringe Aktivität (Abb. 55-57). Möglicherweise kann die Aktivität mit anderen Reaktionsbedingungen, wie z.B. dem pH-Wert oder einem anderen Akzeptor verbessert werden. Dazu sind weitergehende Experimente notwendig. Vor allem BroTA2 ist sehr vielversprechend, da es von allen Enzymen die höchste Aktivität aufweist.

Die beiden potentiellen ω -Transaminasen LsoTA und PmoTA zeigten mit den in dieser Arbeit verwendeten β - und γ -Aminosäuren keine Aktivität.

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Ergebnisse der *V. boronicumulans* ω -Transaminase

Um neue ω -Transaminasen für die Produktion verschiedener β - und γ -Aminosäuren oder anderen Aminen zu erhalten, wurden drei Ansätze verfolgt. Im ersten Ansatz wurde einschlägige Literatur nach potenziellen Produzenten von ω -Transaminasen durchsucht. Dabei hat sich *V. boronicumulans* als vielversprechender Kandidat herausgestellt. *V. boronicumulans* ist ein gramnegatives, stäbchenförmiges Bakterium. Es wurde 2008 in Japan aus Bodenproben isoliert. Eine Besonderheit dieses Organismus ist, wie der Name *boronicumulans* schon sagt, dass er Bor akkumuliert, in Form von Borat. Dabei werden Konzentrationen von 728 ± 88.3 nmol Borat pro Gramm Trockengewicht erreicht [100], was in etwa dem 13-fachen der oralen LD₅₀ für Ratten entspricht [194]. Die Proteinsequenzen von *V. boronicumulans* sind bei NCBI verfügbar. Daher konnten alle Proteine dieser Art mit einer bekannten ω -Transaminase (StoTA) und einem potenziellen Motiv für aromatische ω -Transaminasen verglichen werden. Das Protein, das die höchste Homologie zu der Sequenz von StoTA hat, war zu Beginn dieser Arbeit noch als „putative protein“ gelistet, während der Arbeit wurde es durch die procaryotic genome annotation pipeline (pgap) [195,196] *in silico* als „aminotransferase class III-fold pyridoxal phosphate-dependent enzyme“ klassifiziert. Für die Richtigkeit dieser theoretischen Vorhersage liegen nun durch die vorliegende Arbeit auch experimentelle Beweise vor.

Das Motiv für aromatische ω -Transaminasen [184] passt zu der Sequenz von VboTA (vgl. Abb. 18 Kapitel 3). Die Aktivitätsversuche haben ergeben, dass VboTA tatsächlich eine ω -Transaminase ist, wodurch die theoretische Vorhersage experimentell bestätigt werden konnte. Zusätzlich wurde festgestellt, dass das Substratspektrum des Enzyms nicht auf aromatische β -Aminosäuren beschränkt ist. Die verzweigte Aminosäure β -Leucin wird sogar am besten umgesetzt, während β -Homophenylalanin, eine aromatische Aminosäure, am langsamsten umgesetzt wird. Die Fähigkeit, nur aromatische β -Aminosäuren umzusetzen, scheint selten zu sein. Die beschriebenen Enzyme, die aromatische β -Aminosäuren umsetzen, können auch aliphatische und verzweigte β -Aminosäuren verwerten. So sind neben VboTA zum Beispiel Enzyme von *S. thermophilus* (StoTA) [174], *Mesorhizobium* sp.

LUK [189], *Mesorhizobium loti* [182] und *Polaromonas* sp. JS666 [85] bekannt, die aromatische und aliphatische Aminosäuren desaminieren.

Auf der anderen Seite sind einige ω -Transaminasen beschrieben, die nur aliphatische β - oder γ -Aminosäuren umsetzen, aber keine aromatischen Aminosäuren. Beispiele hierfür sind bei *Achromobacter denitrificans* [187], *Chromobacterium violaceum* [188,197] oder *Vibrio fluvialis* [87] zu finden. Möglicherweise haben die weniger substratspezifischen Enzyme eine größere o-Tasche, in der die Seitenketten der Aminosäuren gebunden werden. Dadurch wären diese Enzyme in der Lage, sowohl Aminosäuren mit kleinen Seitenketten, als auch welche mit sperrigen Seitenketten zu binden. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass es in der o-Tasche flexible Reste gibt, die die Tasche je nach Platzbedarf des Substrates vergrößern oder verkleinern, indem sie in die Tasche hineinreichen oder aus ihr herausklappen. Einen ähnlichen Mechanismus zur Substratbindung bildet das sogenannte „flipping arginine“. Dieses Arginin kann in die Bindetasche hineinreichen oder herausklappen, dadurch ändert sich die Größe der Tasche. Munsberg et al. haben mehrere Transaminasen miteinander verglichen und dabei festgestellt, dass die Enzyme mit geringem Substratspektrum dieses Arginin nicht besitzen und sich dadurch von den flexibleren Transaminasen unterscheiden [198]. Diese Theorie wird durch einen Strukturvergleich von VboTA mit der ω -Transaminase von *V. fluvialis* mit der RCSB Accession 5ZTX gestützt (Abb. 59). Der Vergleich zeigt, dass das substratbindende Arginin in VboTA (R40) mit einem Glutamat (E74) interagiert. Beide Aminosäuren befinden sich in der Nähe des Co-Faktors PLP und sind somit nah an der katalytischen Stelle des aktiven Zentrums. Bei dem *V. fluvialis* Enzym befindet sich an den entsprechenden Stellen ein Arginin (R28) und ein Glycin (G55), wie das Alignment in Abb. 58 zeigt. Das Arginin in dem *V. fluvialis* Enzym befindet sich sehr weit vom Co-Faktor und dem katalytischen Lysin entfernt. Außerdem gibt es das Glutamat nicht, mit dem Arginin 40 in VboTA interagiert (Abb. 59). Daher scheint es den flipping Arginin-Mechanismus in diesem Enzym nicht zu geben, was eine Begründung für das engere Substratspektrum sein könnte.

Diskussion

```

Query_10001 1  MTTAID-QALAQAHQR--FTDGNPESLRRFEAQTRYMPGANSRSVLFYAPFPLTIAKGEGASLWDADGHRYTDFIAEYTA 77
Query_10002 1  MNKQSWEARAETYSLYGFTD-----MPSLHQRGTV-----VVTHGEGPYIVDVGRRYLDANSGLWN 58

Query_10001 78  GVVGHSAPEIREAVIEAMQG--GINLTGH--NLLEGRLAQTICERFP-QVEQLRFTNSGTEANLMALTAAL-----RFT 146
Query_10002 59  MVAGFDHKGLIDAAKAQYERFPGYHAFFGRMSDQTVMLSEKLVESVSPFDSGRVFYTNSSGSEANDTMVKMLWFLHAAEGKP 138

Query_10001 147  GRRKIVVFSGGYHG---GVLGFGDQPSPTTVPF---DFLVL PYND-----ADTARAQIDEHGAD-IA 201
Query_10002 139  QKRKILTRWNAHYGVTAVSASMTGKPYNSVFGPLPGFVHLTCPHYWRYGEEGETEEQFVARLARELEETIQREGADTIA 218

Query_10001 202  AILVEPMQGASGCIPIGGREFLQTLRGGATRVGALLVFDEVMT--SRLGPHGLANGLGIRADLTTLCKYIGGG-MSFGAFG 278
Query_10002 219  GFFAEPVMGAGGVIPPAKGYFQAILPILRKYDIPVISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAIISKVNLTAGFFPMGAVI 298

Query_10001 279  GRADVMAQFDPRTGAL---AHSGTFNNVMTMAAGYAGLTQLFTPEAAAALAERGEAMRSRLNALCEREGVAMQFTGVGS 355
Query_10002 299  LGPELSKRLETAIEAIEEFPHGFTASGHFVGCALKAIDVVMNEGLAENVRRLAPRFEERLKHIAERPNIIG-EYRGIG- 376

Query_10001 356  LMNAHFLRGEVRRVADLAAVDGRLR--QLLFFHLLKEGIYTSRPGFVVLSLP--LSAQDIDRYVAAVGSFIEACRPLLL 430
Query_10002 377  FMWALEA--VKDKASKTPFDGNLSVSERIANTCTDLGLICRPLGQSVVLCPPFILTQAQMDMFDKLEKALDKVFAEVA 453

Query_10001 431  SAG-- 433
Query_10002 454  AAAL 458

```

Abbildung 58: Sequenzvergleich von VboTA (Query_10001) und 5ZTX (Query_10002). Die roten Ovale markieren die Reste, deren Seitenketten in Abb. 59 dargestellt sind. Aminosäurereste, die in beiden Sequenzen identisch sind, sind rot gefärbt. Ausgegraute Aminosäuren markieren Stellen, an denen es in einer der Sequenzen Lücken gibt.

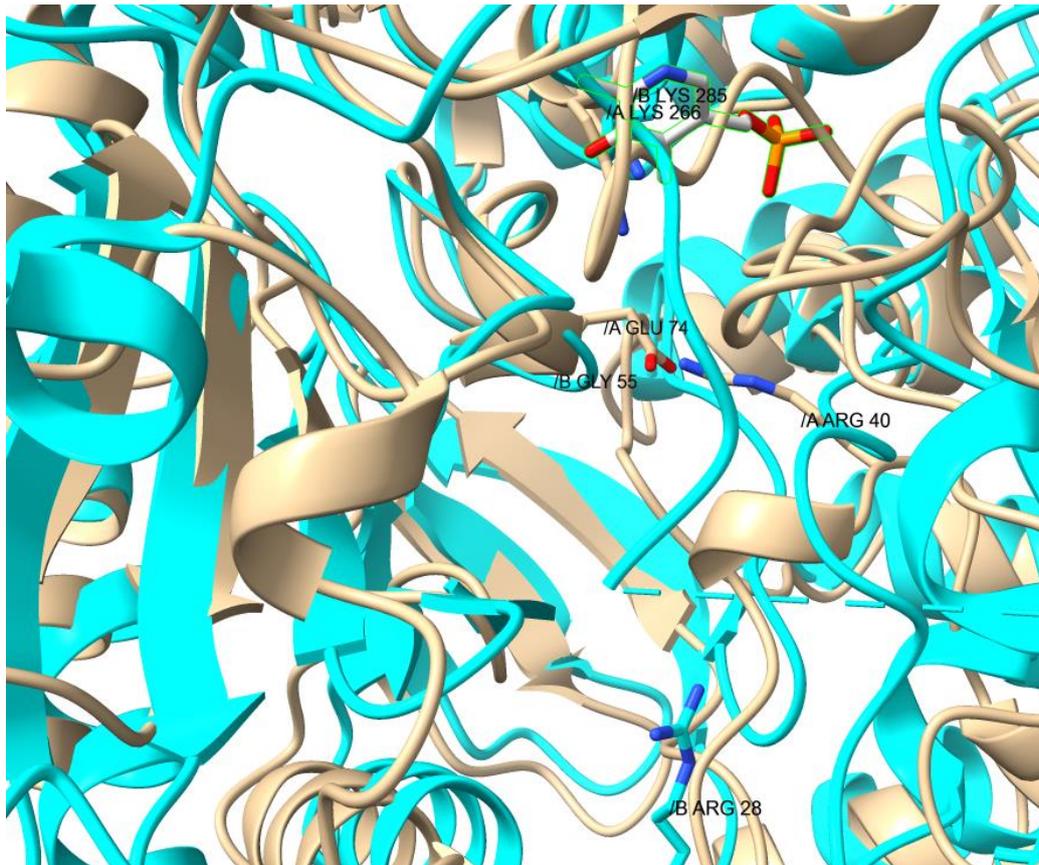


Abbildung 59: Nahaufnahme des aktiven Zentrums im Strukturvergleich von VboTA und 5ZTX. Braun: VboTA, Cyan: 5ZTX. Die Seitenketten der katalytischen Lysine sind dargestellt, K266 in VboTA und K285 in 5ZTX. Von VboTA sind ebenfalls die Reste R40 und E74, und von 5ZTX die Reste R28 und G55 zu sehen.

VboTA hat eine spezifische Aktivität von $0,82 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ mit β -Phenylalanin als Aminodonor und α -Ketoglutarat als Akzeptor. Das ist ein relativ hoher Wert. Im Vergleich dazu hat StoTA nur eine spezifische Aktivität von $0,29 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ mit β -Phenylalanin, allerdings mit Pyruvat als Akzeptor anstelle von α -Ketoglutarat. Auch mit aliphatischen Substraten ist VboTA mit einer spezifischen Aktivität $0,65 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ mit β -Homoalanin aktiver als StoTA mit $0,36 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Von *Polaromonas* sp. JS666 [158] ist eine ω -Transaminase (PowTA) beschrieben, die eine noch höhere Aktivität als VboTA aufweist. Es wurde für PowTA ein K_m -Wert von $0,83 \text{ mmol L}^{-1}$ für β -Phenylalanin und $47,4 \text{ mmol L}^{-1}$ für Pyruvat bestimmt. Weitere Werte sind nicht angegeben. VboTA hat dagegen einen K_m -Wert für β -Phenylalanin von $30,6 \text{ mmol L}^{-1}$. Für Pyruvat wurde der Wert nicht bestimmt.

In der kinetischen Auflösung erreicht VboTA sehr hohe Enantiomeren-Überschüsse, teils $>99,9 \%$. Diese hohen Werte wurden mit β -Leucin, β -Homoalanin und β -Phenylalanin erreicht (vgl. Tab. 20, Kapitel 3). Ebenso wurde nachgewiesen, dass das verbleibende

Diskussion

Enantiomer nicht abgebaut wurde. Dies belegt die hohe Enantiomeren-Selektivität des Enzyms. Einzig mit β -Homophenylalanin konnte ein so hoher Überschuss nicht erreicht werden. Da β -Homophenylalanin aber die Aminosäure mit der langsamsten Umsatzrate von allen getesteten ist, kann es sein, dass die Zeit nicht für einen vollständigen Abbau des (R)-Enantiomers ausreichte. VboTA hat selektiv das D-Enantiomer aller Substrate abgebaut. Aufgrund der Nomenklatur-Regeln werden bei einigen Substraten die (S)-Form und bei anderen die (R)-Form abgebaut. Interessanterweise wurden die Werte der Enantiomeren-Überschüsse mit Pyruvat als Akzeptor erreicht. Mit α -Ketoglutarat wurden deutlich niedrigere Werte erzielt, obwohl es in kleinerem Maßstab der bessere Akzeptor war. Das liegt wahrscheinlich daran, dass die Substratkonzentrationen höher waren, was im Falle von α -Ketoglutarat zu einer Edukt-Inhibition führt. Außerdem führt das entstehende Glutamat ebenfalls zu einer Inhibition. Die Tatsache, dass Pyruvat in größerem Maßstab der bessere Akzeptor ist, macht das Enzym interessant für biotechnologische Anwendungen, da Pyruvat günstiger ist als α -Ketoglutarat.

Die Bestimmung des Oligomerisationsgrades lieferte kein eindeutiges Ergebnis, eine Messung ergab ein 2,7-mer, eine weitere Messung lieferte ein 1,4-mer als Ergebnis. Diese Werte deuten auf ein Dimer hin, was zu den meisten bislang beschriebenen ω -Transaminasen passt. Die abweichenden Werte können unter Anderem durch starke Temperaturunterschiede im Labor zwischen den beiden Messungen erklärt werden. Zum einen verändert sich so eventuell das Bindevverhalten des Enzyms an der Säule. Außerdem ist es möglich, dass VboTA, trotz gekühltem Transport, während der Probenvorbereitung zumindest teilweise in Monomere zerfallen ist.

Das Enzym VboTA ist einem Enzym von *V. paradoxus* (RCSB Eintrag 4AOA) sehr ähnlich. Die Sequenzen haben zu 86 % gleiche Aminosäuren an gleichen Stellen. Werden Reste mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften berücksichtigt, beträgt die Ähnlichkeit sogar 92 %. Trotz der sehr hohen Homologie haben die Enzyme unterschiedliche Eigenschaften. So desaminiert VboTA die Substrate bei einem Temperaturoptimum von 32 °C, während das Enzym von *V. paradoxus* (VpAT) das Optimum bei 55 °C hat [184]. Bei dieser Temperatur verliert VboTA schon nach kurzer Zeit die Aktivität. Die niedrigere Optimaltemperatur macht VboTA für biotechnologische Prozesse interessant. Des Weiteren ist das Substratspektrum von VboTA größer. Zwar setzt VpAT neben β -Phenylalanin auch β -Leucin um, aber mit 48 %

der Geschwindigkeit, mit der β -Phenylalanin umgesetzt wird. VboTA kann beide Substrate mit ähnlicher Geschwindigkeit umsetzen. Neben diesen recht großen Substraten kann VboTA auch die kleinere β -Aminosäure β -Homoalanin mit 80 % der Umsatzgeschwindigkeit von β -Phenylalanin umsetzen. Diese Aminosäure wird von VpAT quasi nicht als Substrat akzeptiert. Hier wurde nur 1 % der Umsatzgeschwindigkeit mit β -Phenylalanin gemessen. Beiden Enzymen gemein ist der breite pH-Bereich, in dem sie aromatische β -Aminosäuren umsetzen. VpAT zeigt in einem pH-Bereich von 4 - 11,2 Aktivität, während VboTA von pH 3-11 aktiv ist. Im pH-Bereich von 6 – 10 zeigt VboTA über 80 % Aktivität, das Optimum mit 100 % Aktivität liegt bei pH 9, wenn ein Kaliumborat-Puffer verwendet wird. Unter Verwendung eines Carbonatpuffers mit pH 9 ist die Aktivität deutlich niedriger. Sie beträgt dann nur noch $37,8 \pm 2,9$ % der Aktivität mit dem Boratpuffer. Das lässt auf eine Anpassung des Enzyms an eine Borat-haltige Umgebung schließen. Diese Schlussfolgerung passt zu der Tatsache, dass *V. boronicumulans* Borat-haltige Lebensräume besiedelt und sogar Borat in der Zelle akkumuliert [100].

V. boronicumulans muss noch weitere Enzyme zum Umsatz von nicht-proteinogenen Aminosäuren haben, da der Vortest mit dem Rohextrakt von *V. boronicumulans* ergeben hat, dass auch 4-Aminopentansäure desaminiert werden kann. VboTA ist dazu allerdings nicht in der Lage. Daher ist dieser Organismus ein vielversprechender Donor für weitere ω -Transaminasen. Ein weiterer Hinweis auf das Vorhandensein anderer ω -Transaminasen ist die Tatsache, dass VboTA nicht in der Lage ist, GABA oder β -Alanin umzusetzen. Diese Aminosäuren sind allerdings Vorläufermoleküle für Bestandteile der Zelle. So ist β -Alanin ein Teil von Coenzym A, das an einer Vielzahl von Stoffwechselprozessen beteiligt ist. GABA wiederum ist ein Abbauprodukt von Putrescin, einem Polyamin, das als Stickstoffquelle oder Speicher genutzt werden kann. Da VboTA diese Substrate nicht nutzen kann, kommt dem Enzym wohl eine speziellere Rolle zu. Da *V. boronicumulans* in Japan, einem Land, in dem viel Reis angebaut wird, aus Bodenproben isoliert wurde, ist es möglich, dass VboTA zur Erschließung neuer Stickstoffquellen genutzt wird. Die Reispflanzen exportieren β -Phenylalanin in ihre Rhizosphäre um andere Pflanzen am Wachstum zu hindern. Es ist möglich, dass *V. boronicumulans* dieses β -Phenylalanin mittels VboTA als Stickstoffquelle nutzt. Eine andere Aufgabe für VboTA im Stoffwechsel von *V. boronicumulans* könnte in der Bereitstellung von β -Phenylalanin für die Produktion von Antibiotika darstellen. Das Antibiotikum Hitachimycin enthält einen β -Phenylalaninrest [199], daher ist es denkbar, dass

V. boronicumulans dieses oder ein ähnliches Antibiotikum produziert um sich gegen Konkurrenten durchzusetzen.

Die Produktion von VboTA im Fermenter hat zu kontinuierlich höheren Ausbeuten geführt. Interessant ist, dass die Kultivierung im Autoinduktionsmedium zu der höchsten Ausbeute führte, sowohl was die Masse an Zellen, als auch die Menge VboTA pro g Zellpellet angeht, obwohl es die niedrigste Menge an Glukose enthielt. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die im Medium verbleibende Menge an Glukose zu hoch war und so zu einer Inhibition des Wachstums und der Proteinproduktion führt. Wiederholungen der Fermentationen mit deutlich längeren Verwertungszeiten könnten zeigen, ob die niedrigeren Ausbeuten durch eine Hemmung durch die hohen Glukose-Konzentrationen verursacht wurden. Die hohen Glukose-Konzentrationen können zu einem Overflow-Metabolismus führen. Das ist ein Schutzmechanismus bei zu hohem Nährstoffangebot. Kommt es dazu, werden energiereiche Metaboliten wie unter anderem Acetat aus der Zelle exportiert. Dadurch wird verhindert, dass eine Energieladung von mehr als 0,8 in den Zellen vorliegt. Eine Ladung, die höher als 0,8 ist, führt dazu, dass die bei der Atmung freigesetzte Energie nicht mehr in Form von ATP gebunden werden kann und als Wärme freigesetzt wird. Das würde zu Zellschäden führen. Hohe Konzentrationen von Acetat im Medium sind allerdings auch toxisch für die *E. coli* Zellen [200]. Die zu hohe Glukosemenge kann auch die im Vergleich zu anderen Fermentationen von *E. coli* niedrigen Pelletmassen erklären. Es wurden deutlich höhere Zellausbeuten berichtet. So haben Matsui et al. eine Trockenmasse von 134 g L⁻¹ mit *E. coli* K12 erreicht [201]. Märkl et al. berichten sogar von 174 g L⁻¹ Trockenmasse. Hier wurde allerdings ein Dialysereaktor verwendet, bei dem über eine Membran frisches Medium zugegeben wurde und Hemmstoffe über die Membran aus der Kultur heraus diffundieren können [202].

4.2. Diskussion der Ergebnisse der *S. thermophilus* ω -Transaminase

Die StoTA-Variante, bei der Asparagin 70 durch Glutamat ausgetauscht wurde, hat beim Umsatz von γ -Aminosäuren an Aktivität verloren. Das lässt vermuten, dass N70 für deren Umsatz wichtig ist. Die Struktur von StoTA ist der von VboTA recht ähnlich (vgl. Abb. 60). VboTA hat an der Stelle, die bei StoTA N70 entspricht, einen Glutamat-Rest (E74). Die

Diskussion

Tatsache, dass sich hier ein Glutamat befindet und VboTA nicht in der Lage ist, γ -Aminosäuren umzusetzen, unterstreicht die Wichtigkeit von Asparagin für den Umsatz von γ -Aminosäuren an dieser Stelle. N70 in StoTA bzw. E74 in VboTA liegen sowohl in der Nähe der p-Tasche als auch in Nachbarschaft zu dem katalytischen Lysinrest (Vergrößerung in Abb. 60). Da die Carboxylgruppe des Substrates in der p-Tasche gebunden wird, ist es möglich, dass die Seitenketten von Asparagin bzw. Glutamat mit der Aminogruppe wechselwirken. Zwischen Asparagin und der γ -Aminogruppe des Substrates könnte es zu Abstoßungen aufgrund gleicher Ladung kommen, wodurch die Aminogruppe in Richtung des katalytischen Lysins gedrückt wird, welches zu dem Zeitpunkt des Reaktionszyklus desaminiert vorliegt, in dem die Aminosäure als Substrat gebunden wird. Bei Glutamat ist es genau anders herum. Da könne es zu einer Anziehung kommen, die die γ -Aminogruppe von dem Lysin wegzieht, weswegen es zu keiner Desaminierung von γ -Aminosäuren kommen kann. Es wäre interessant, in einer weiterführenden Arbeit eine E74N Mutante von VboTA zu erstellen, um zu überprüfen, ob das Enzym dann in der Lage ist, γ -Aminosäuren als Substrat zu erkennen.

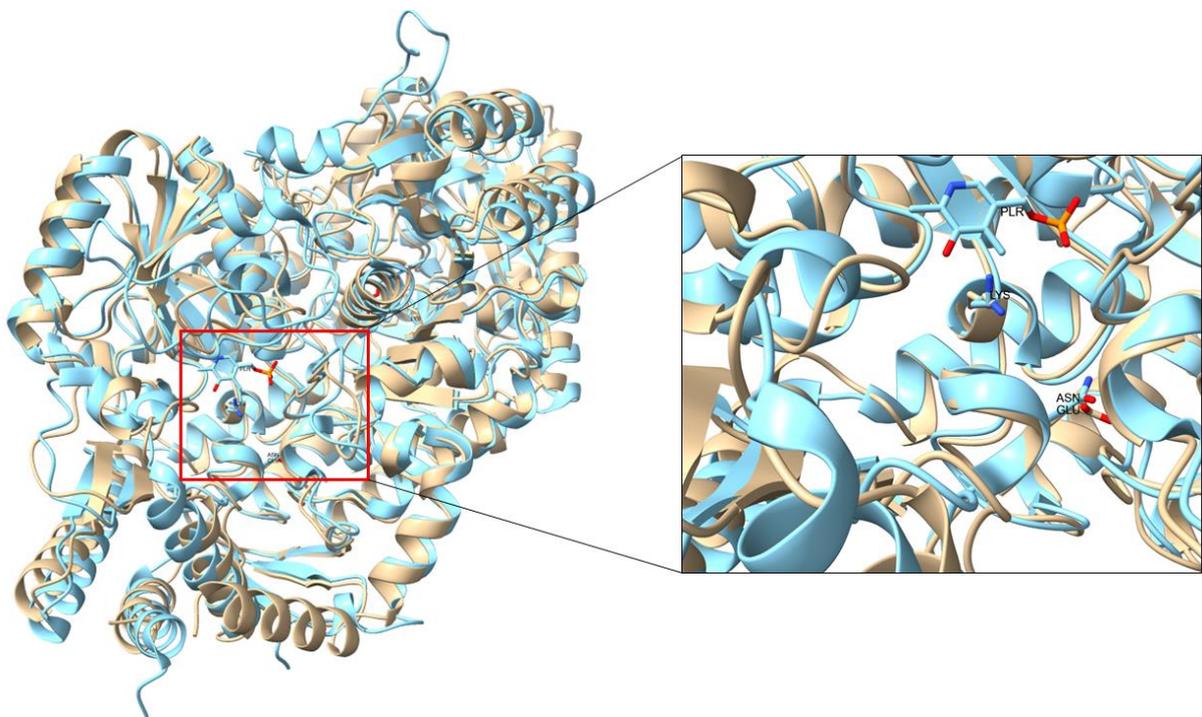


Abbildung 60: Strukturvergleich zwischen StoTA (blau) und VboTA (braun). N70 (StoTA) und E74 (VboTA) sowie die katalytischen Lysinreste sind markiert und benannt. In der Vergrößerung (rechts) ist zu sehen, dass sich N70 und E74 in der Nähe der p-Tasche und des katalytischen Lysins befinden. Die p-Tasche befindet sich auf Seite des Phosphatrestes (orange-rot) von PLP (mit PLR markiert).

Diskussion

Die zum Teil sehr großen Unterschiede in den Aktivitäten der StoTA Mutanten sind bei den Varianten, die an das Motiv angepasst wurden, nicht darauf zurückzuführen, dass sich die ausgetauschten Aminosäuren im aktiven Zentrum befinden und so einen direkten Einfluss auf die Katalyse haben. Die Stellen, an denen die Austausch vorgenommen wurden, liegen nahe am N-Terminus, relativ weit entfernt vom aktiven Zentrum. S17 und Y47 liegen auf der Außenseite des Enzyms. T38 liegt im Eingang in das aktive Zentrum, lediglich N70 befindet sich im Innern des Enzyms, aber nicht direkt im aktiven Zentrum. Es könnte sein, dass T38 am Eintritt des Substrates in das aktive Zentrum beteiligt ist und so einen Einfluss auf die Aktivität nimmt. Eine ähnliche Vermutung wurde nach einer Untersuchung bislang unbeschriebener ω -Transaminasen von *Mesorhizobium loti* aufgestellt. In der Arbeit wurden 10 Proteine mit ähnlicher Sequenz als ω -Transaminase vorhergesagt. Alle Vorhersagen waren zutreffend, die Proteine unterschieden sich nur an wenigen Aminosäureresten, die ebenfalls nicht im aktiven Zentrum lagen, aber am Eingang zu diesem. Auch diese Enzyme unterschieden sich stark in der Aktivität mit den verwendeten Substraten [182]. Die Erklärung dafür sollen Unterschiede in der Hydrophobizität des Eingangsbereichs sein. Von zweien der Enzyme sind die Oberflächenstrukturen des Eingangs in das aktive Zentrum abgebildet (Abb. 61).

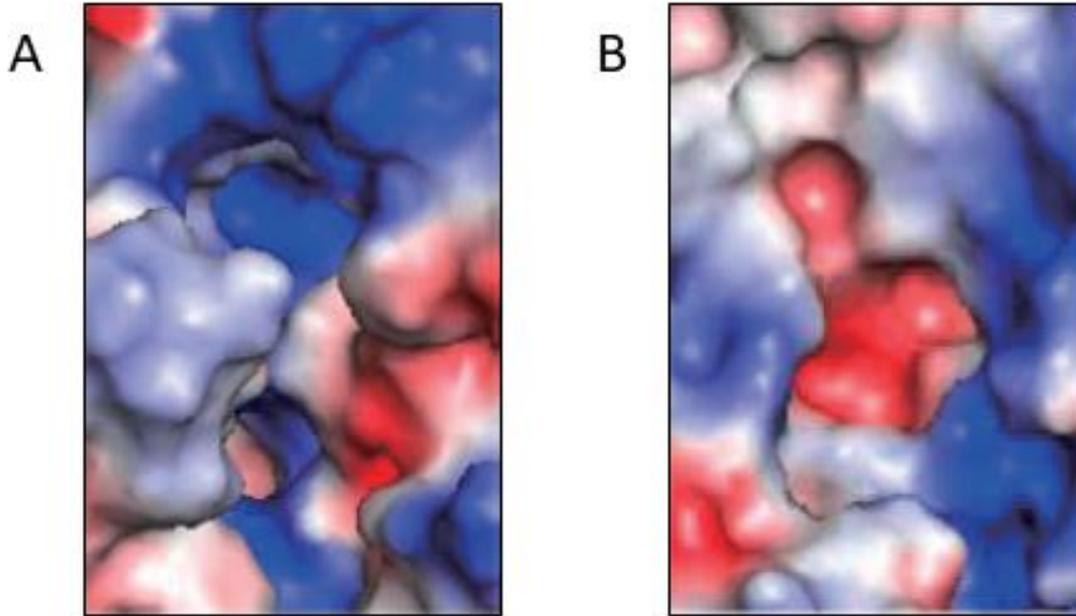


Abbildung 61: Vergleich der Hydrophobizität der Eingänge zweier ω -Transaminasen von *M. loti*. Rot zeigt eine negative, blau eine positive Ladung an. Weiße Flächen sind neutral. A: Ladungskarte von mll1632, B: Ladungskarte von mll3663. Abbildung modifiziert nach [182].

Der Eingang von mll1632 ist hydrophiler als der von mll3663 (Abb. 62) [182]. Das könnte einen Einfluss auf die Löslichkeit der Substrate haben und somit in einem Unterschied in der Aktivität resultieren. So zeigt das Enzym mll1632 deutlich geringere Aktivität mit aromatischen Aminen als mll3663. Dafür ist es in der Lage β -Homoalanin umzusetzen, wozu mll3663 nicht in der Lage ist. Ein ähnlicher Effekt könnte die Aktivitätsunterschiede in den StoTA Mutanten erklären. Im Folgenden werden die Oberflächenkarten der vier Einfachmutanten von StoTA mit dem Wildtyp verglichen. Dadurch sollen Unterschiede in der Polarität oder der Hydrophobizität zwischen den Varianten aufgedeckt werden. Diese könnten die Aktivitätsunterschiede erklären.

Diskussion

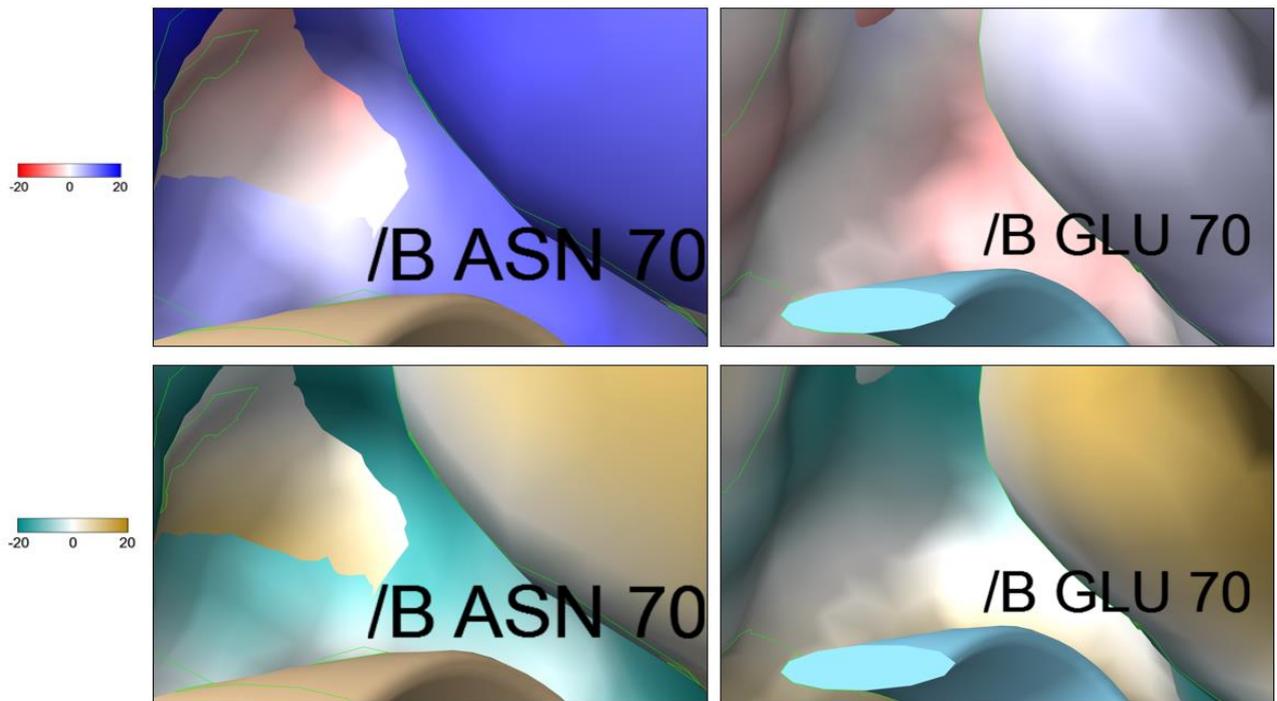


Abbildung 62: Unterschiede zwischen der Elektrostatik und der Hydrophobizität nach dem Aminosäureaustausch N70E. Die Beschriftung gibt das Monomer, die Bezeichnung der Aminosäure und die Position, an der die Aminosäure liegt, an. Oben: Elektrostatik in der Umgebung um N70 (WT, links) und der Mutante E70 (rechts). Die grünen Linien markieren die Grenze der Umgebung. Eine blaue Färbung bedeutet, dass der Bereich eine positive Ladung (basisch) trägt, rot markiert eine negative Ladung (sauer). Weiße Flächen sind ungeladen. Unten: Hydrophobizität der Umgebung um N70 (WT, links) und der Mutante E70 (rechts). Die grünen Linien markieren die Grenze der Umgebung. In Cyan gefärbte Bereiche sind hydrophil, gelbe Bereiche sind hydrophob. Die Werte sind dimensionslos.

Asparagin liegt im Innern des Enzyms. Daher musste sehr nah herangezoomt werden, um es abbilden zu können. Abb. 62 zeigt, dass die Umgebung um Position 70 im Wildtyp stärker elektrostatisch geladen ist und dadurch auch hydrophiler ist. In Abb. 60 ist die Lage von N70 im Innern des Enzyms zu sehen. In der Vergrößerung ist die Entfernung zum katalytischen Lysin zu erkennen. Aufgrund dieser Entfernung scheint ein direkter Einfluss auf die Katalyse der Transamination unwahrscheinlich. Da N70 aber auf der Seite der Phosphatgruppe des PLPs und somit in der p-Tasche des Enzyms liegt, könnte es einen Einfluss auf die Bindung der Carboxylgruppe des Substrats haben. Die Argininreste und N70 von StoTA sind in Abb. 64 dargestellt. Der Abbildung kann entnommen werden, dass sich N70 sehr nah an R36 befindet. Dieses Arginin befindet sich ebenfalls in der p-Tasche und könnte das Arginin sein, das die Carboxylgruppe der Substrate bindet. Ein Austausch der positiven Ladung des Asparagins durch die negative Ladung des Glutamats (N70E) dürfte die Position von R36 ändern, da es statt zu einer Abstoßung zu einer Anziehung kommt. Eine Positionsänderung von R36 kann den Aktivitätsverlust mit 4-Aminopentansäure erklären, da es möglich ist, dass

Diskussion

die Aminogruppe der γ -Aminosäure nun nicht mehr nah genug an K282 kommt, um den nucleophilen Angriff zu ermöglichen. In [184] wird postuliert, dass ein Glutamat-Arginin Paar für die Umsetzung von β -Aminosäuren notwendig ist. Dieses Modell muss erweitert werden, da StoTA ebenfalls in der Lage ist, β -Aminosäuren umzusetzen, an der entsprechenden Stelle aber ein Asparagin-Arginin Paar besitzt. Scheinbar wird das aktive Zentrum einer ω -Transaminase durch einen Asparaginrest anstelle eines Glutamatrestes flexibler und dadurch in die Lage versetzt, auch γ -Aminosäuren umzusetzen.

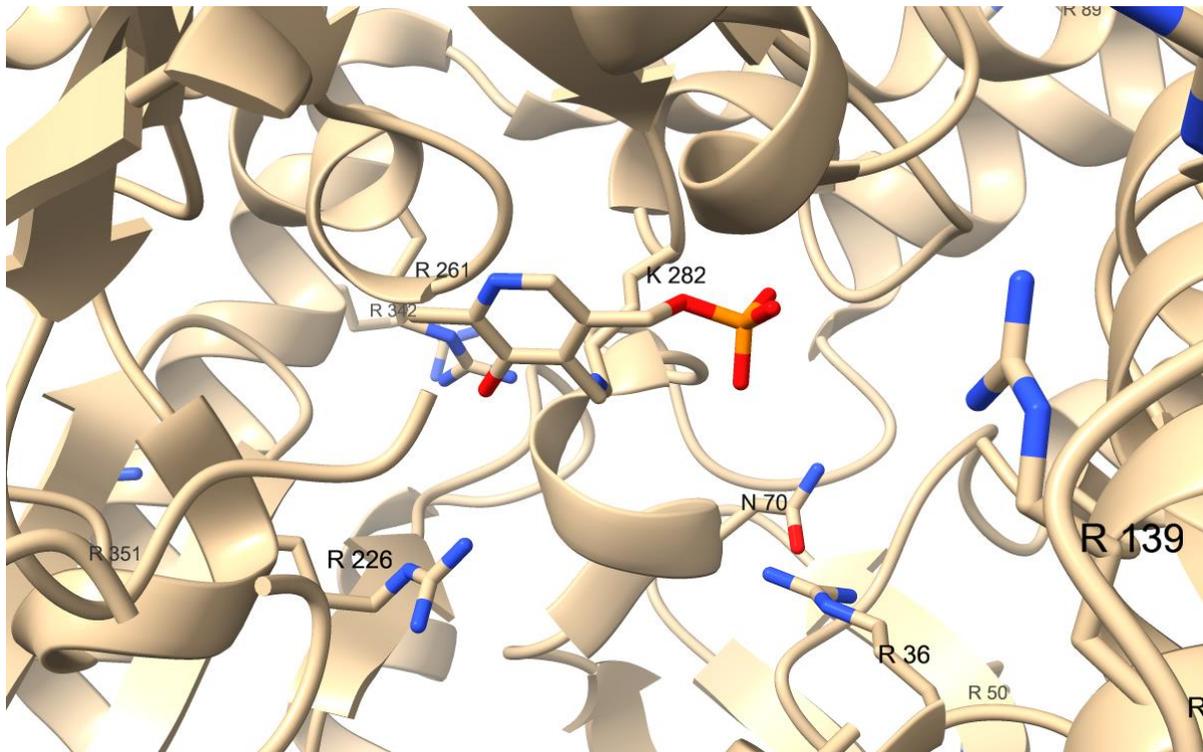


Abbildung 63: Detailaufnahme des aktiven Zentrums von StoTA zur Verdeutlichung der potenziellen Wechselwirkungen von N70 mit dem Arginin, das vermutlich die Carboxylgruppe des Substrates bindet. Die Seitenketten des katalytischen Lysins 282, N70 und sämtlicher Arginin Reste sind dargestellt und Namen und Positionsangaben versehen. Arginin 139 ist Teil von Monomer A, die übrigen markierten Aminosäuren liegen auf Monomer B.

Diese Theorie wird dadurch gestützt, dass es in VboTA eine ähnliche Struktur gibt. Auch hier interagiert ein Arginin, das sich an ähnlicher Stelle befindet wie R36 in StoTA, mit dem Glutamat an Position 74 (Abb. 64). Das R36 in StoTA wird als „flipping arginine“ bezeichnet, welches dafür verantwortlich ist, dass einige ω -Transaminasen ein breites Substratspektrum haben. Eine R36A Mutante von StoTA verlor 50 % der Aktivität mit β -Phenylalanin [174], was

die Vermutung unterstreicht, dass Arginin 36 in StoTA, bzw. R40 in VboTA an der Substratbindung beteiligt sind.

Eine weitere Erklärung für das unterschiedliche Reaktionsverhalten mit γ -Aminosäuren ist, dass Glutamat negativ geladen ist, während Asparagin eine positive Ladung trägt. Dadurch kommt es zu unterschiedlichen Interaktionen mit dem Substrat. Da die Kohlenstoffatome, an die in Aminosäuren die Aminogruppe gebunden sind, aufgrund des starken -I Effekts der Aminogruppe eine positive Partiaalladung tragen, kann es durch die positive Ladung des Asparagins zu einer Abstoßung kommen, die das Substrat in die richtige Position drückt. Diese Partiaalladung wird vom Glutamat angezogen, wodurch die γ -Aminosäure nicht richtig gebunden und so nicht richtig umgesetzt wird. Diese Anziehung bzw. Abstoßung kann bei β -Aminosäuren aufgrund des kürzeren Abstands zwischen der Aminogruppe und der Carboxylgruppe eine untergeordnete Rolle spielen, da beide Varianten β -Aminosäuren umsetzen können.

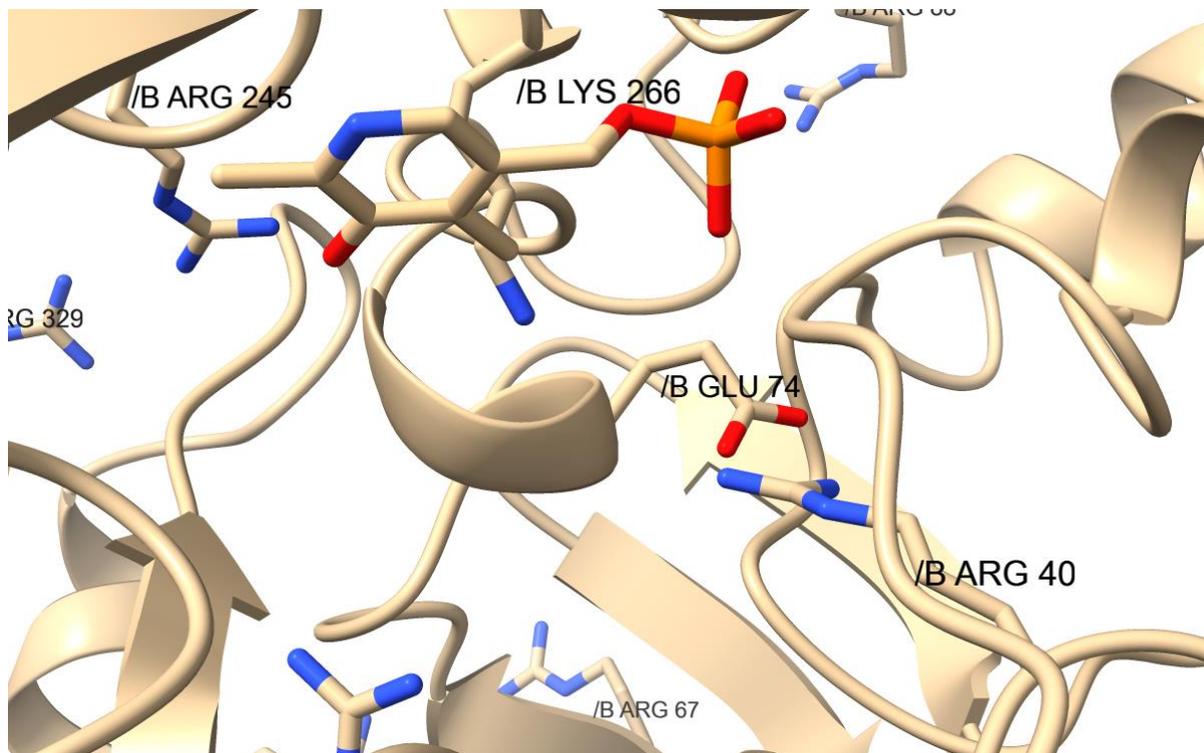


Abbildung 64: Detailaufnahme des aktiven Zentrums von VboTA zur Verdeutlichung der potenziellen Wechselwirkungen von E74 mit dem Arginin, das vermutlich die Carboxylgruppe des Substrates bindet. Die Seitenketten des katalytischen Lysins 266, E74 und sämtlicher Arginin-Reste sind dargestellt und mit Namen sowie Positionsangaben versehen.

Diskussion

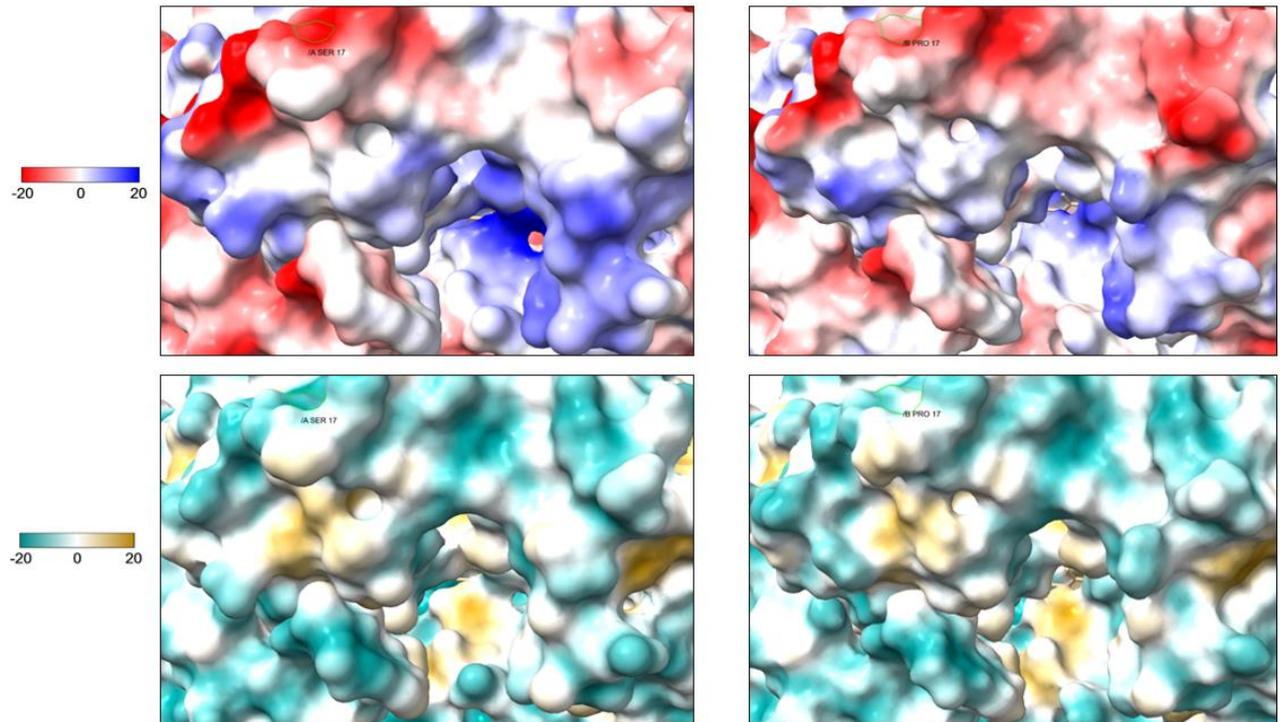


Abbildung 65: Unterschiede zwischen der Elektrostatik und der Hydrophobizität nach dem Aminosäureaustausch S17P. Die Beschriftung gibt das Monomer, die Bezeichnung der Aminosäure und die Position, an der die Aminosäure liegt, an. Oben: Elektrostatik in der Umgebung um S17 (WT, links) und der Mutante P17 (rechts). Die grünen Linien markieren die Grenze der Umgebung. Eine blaue Färbung bedeutet, dass der Bereich eine positive Ladung (basisch) trägt, rot markiert eine negative Ladung (sauer). Weiße Flächen sind ungeladen. Unten: Hydrophobizität der Umgebung um S17 (WT, links) und der Mutante P17 (rechts). Die grünen Linien markieren die Grenze der Umgebung. In Cyan gefärbte Bereiche sind hydrophil, gelbe Bereiche sind hydrophob. Die Werte sind dimensionslos. Die Struktur, die in der Mitte der Abbildungen zu sehen ist, ist ein Teil des Co-Faktors PLP.

Abb. 65 ist zu entnehmen, dass die Umgebung um die Aminosäure an Position 17 beim Wildtyp stärker negativ geladen ist als bei der S17P Mutante. Dadurch ist diese Region auch deutlich hydrophiler. Allerdings liegt diese Stelle nicht im Eingang zum aktiven Zentrum. Daher scheint ein Einfluss auf die Aufnahme der Substrate ausgeschlossen. Dazu passt, dass sich die Einzelmutante S17P nur wenig in der Aktivität des Wildtyps unterscheidet. Einige Substrate werden etwas schlechter umgesetzt, einige etwas besser.

Diskussion

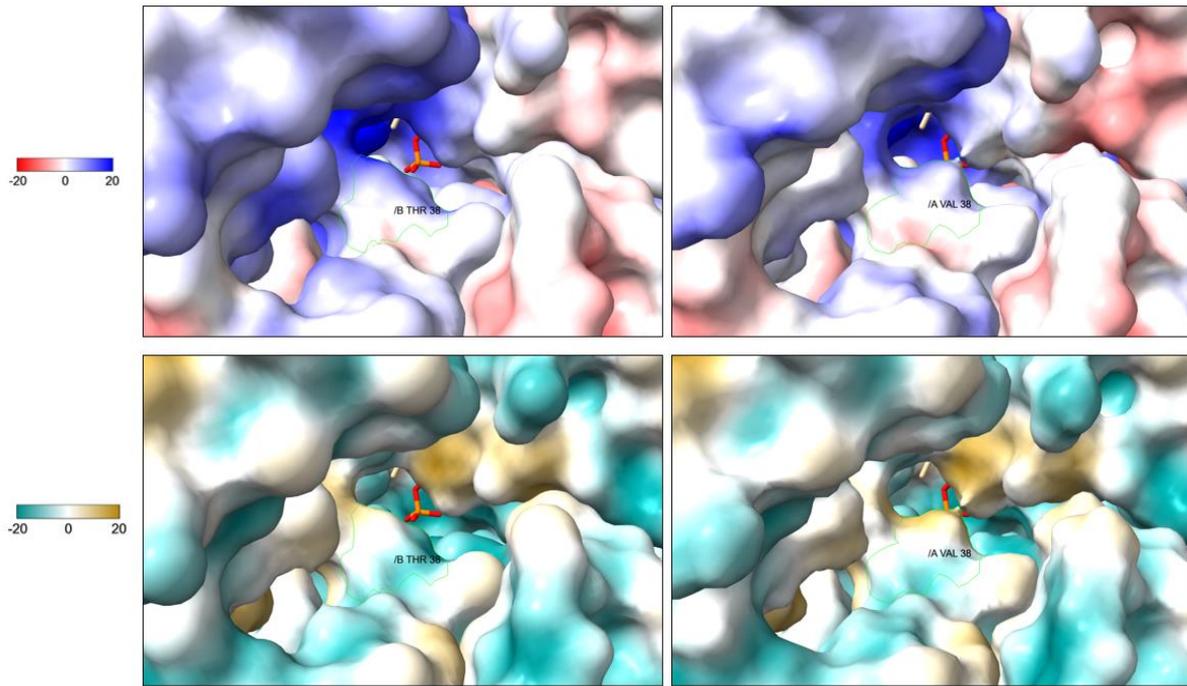


Abbildung 66: Unterschiede zwischen der Elektrostatik und der Hydrophobizität nach dem Aminosäureaustausch T38V. Die Beschriftung gibt das Monomer, die Bezeichnung der Aminosäure und die Position, an der die Aminosäure liegt, an. Oben: Elektrostatik in der Umgebung um T38 (WT, links) und der Mutante T38V (rechts). Die grünen Linien markieren die Grenze der Umgebung. Eine blaue Färbung bedeutet, dass der Bereich eine positive Ladung (basisch) trägt, rot markiert eine negative Ladung (sauer). Weiße Flächen sind ungeladen. Unten: Hydrophobizität der Umgebung um T38 (WT, links) und der Mutante T38V (rechts). Die grünen Linien markieren die Grenze der Umgebung. In Cyan gefärbte Bereiche sind hydrophil, gelbe Bereiche sind hydrophob. Die Werte sind dimensionslos. Die orange-rote Struktur in der Mitte der Abbildungen ist die Phosphatgruppe von PLP.

Hinsichtlich der Ladung unterscheiden sich das Wildtypenzym und die T38V-Variante kaum, der Wildtyp ist an dieser Stelle leicht positiv, während die Mutante neutral ist. Bei der Hydrophobizität ist der Unterschied deutlicher ausgeprägt, der Wildtyp ist neutral bis hydrophil, die Mutante eher neutral bis hydrophob (Abb. 66). Es ist deutlich zu sehen, dass Position 38 im Eingang in das aktive Zentrum liegt. Daher dürften sich die Unterschiede in der Hydrophobizität auch auf die Aufnahme der Substrate in das aktive Zentrum auswirken. Was auch erklärt, dass vier der Substrate, die zum Teil aufgrund von Phenylresten sehr hydrophob sind, von der Mutante T38V schlechter umgesetzt werden als vom Wildtypen.

Diskussion

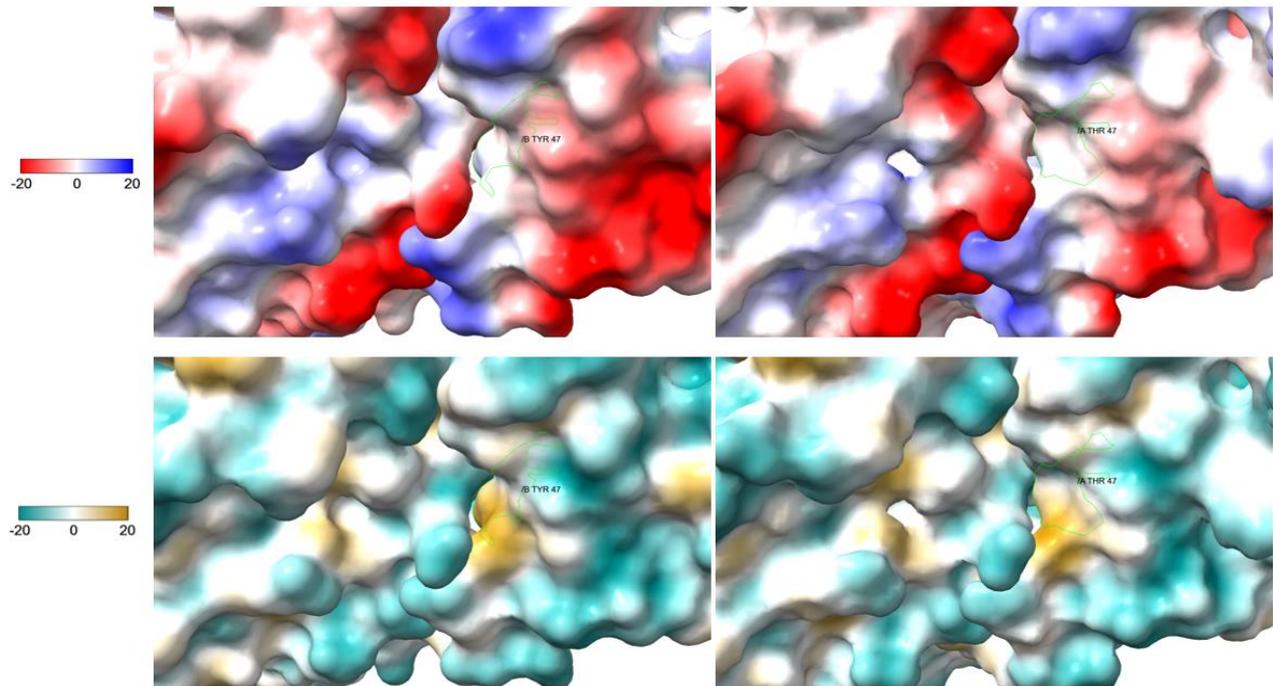


Abbildung 67: Unterschiede zwischen der Elektrostatik und der Hydrophobizität nach dem Aminosäureaustausch Y47T. Die Beschriftung gibt das Monomer, die Bezeichnung der Aminosäure und die Position, an der die Aminosäure liegt, an. Oben: Elektrostatik in der Umgebung um Y47 (WT, links) und der Mutante Y47T (rechts). Die grünen Linien markieren die Grenze der Umgebung. Eine blaue Färbung bedeutet, dass der Bereich eine positive Ladung (basisch) trägt, rot markiert eine negative Ladung (sauer). Weiße Flächen sind ungeladen. Unten: Hydrophobizität der Umgebung um Y47 (WT, links) und der Mutante Y47T (rechts). Die grünen Linien markieren die Grenze der Umgebung. In Cyan gefärbte Bereiche sind hydrophil, gelbe Bereiche sind hydrophob. Die Werte sind dimensionslos.

Bezüglich Elektrostatik und Hydrophobizität unterscheiden sich der Wildtyp und die Mutante Y47T kaum. Beide Enzyme sehen in Abb. 67 nahezu gleich aus. Position 47 befindet sich auch nicht im aktiven Zentrum oder im Eingang dazu, daher ist eine Auswirkung auf die Aufnahme oder Interaktion mit dem Substrat eher unwahrscheinlich. Allerdings befindet sich diese Region an der Interaktionsfläche zwischen den beiden Monomeren der Enzyme. Möglicherweise hat der Austausch von Tyrosin gegen Threonin einen Einfluss auf die Bildung des Holoenzym und daher einen Einfluss auf die Aktivität.

Die Darstellung der Zwei-, Drei- oder Vierfachmutanten in einer Abbildung war nicht möglich, da die Positionen, an denen Aminosäuren ausgetauscht wurden, an verschiedenen Stellen des Enzyms liegen, so dass in der Darstellung der Oberflächenkarten wie in den Abb. 62 und 65-67 immer nur eine ausgetauschte Aminosäure gut sichtbar ist. Daher wurde auf die Darstellungen verzichtet. Aufgrund der Entfernung der Aminosäuren zueinander ist eine direkte Interaktion der ausgetauschten Aminosäurereste mit ziemlicher Sicherheit auszuschließen. So liegt zum Beispiel S17 auf der Außenseite des Enzyms, während T38 im

Eingang in das aktive Zentrum liegt (Abbildungen 44 und 45). S17P und T38V alleine haben nur einen minimalen Aktivitätsgewinn bei wenigen Substraten. Die Doppelmutante, die beide Austausche enthält, zeigt dagegen den höchsten Aktivitätsgewinn aller Varianten bei vier von fünf Aminodonoren. Bei dem fünften Donor hat S17P|T38V immer noch die zweithöchste Aktivität aller Enzymvarianten. Die Unterschiede in den Aktivitäten der verschiedenen Mutanten müssen noch andere Gründe als veränderte Hydrophobizität bzw. Partiaalladungsverteilungen der Enzymoberfläche haben. In zukünftigen Untersuchungen muss noch ermittelt werden, warum die Einzelmutanten S17P und T38V nur einen sehr kleinen Effekt haben, während die Doppelmutante S17P|T38V einen sehr großen Effekt hat, obwohl beide Austauschstellen nicht in Verbindung zueinanderstehen. Interessant ist, dass sich die Doppelmutante T38V|Y47T anders verhält. Sie hat zwar im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich erhöhte Aktivität, aber die Einzelmutante Y47T ist mit den Aminodonoren β -Homophenylalanin, β -Homoalanin und 4-Aminopentansäure aktiver. Nur mit β -Leucin und β -Phenylalanin ist die Doppelmutante aktiver als Y47T. Auch hier liegen die Positionen zu weit auseinander um sich gegenseitig zu beeinflussen.

4.3. Diskussion der Ergebnisse von *B. raffinosifermentans*

Die Enzyme, die in *B. raffinosifermentans* als potenzielle ω -Transaminasen identifiziert wurden, zeigen unter den ersten Testbedingungen nur relativ wenig Aktivität mit den getesteten β -Aminosäuren und GABA. Da *B. raffinosifermentans* aber, wie durch die Wachstumsversuche (vgl. Abb. 50, Seite 89) gezeigt, durchaus in der Lage ist, diese β -Aminosäuren zu verwerten, müssten in zukünftigen Versuchen die Reaktionsbedingungen für den Aktivitätstest verändert werden, um zu prüfen, welche speziellen Parameter besonderen Einfluss auf die Aktivität während der Messung haben. Hier böte sich eine Änderung des pH-Werts an oder ein Temperaturwechsel. Die Versuche mit VboTA haben ergeben, dass auch ein anderer Aminoakzeptor zu einer Erhöhung der Aktivität führen könnte. Ein Wechsel von Oxalacetat zu α -Ketoglutarat hat dort bei einigen Akzeptoren etwa eine Verdopplung der spezifischen Aktivität gebracht. Die gewählten Bedingungen (Temperatur, pH-Wert) ähnelten denen der Kultivierung von *B. raffinosifermentans*. Daher wurden sie für den ersten Test verwendet. Es besteht auch die Möglichkeit, dass *B.*

raffinosisfermentans nur über schwach aktive ω -Transaminasen verfügt und der Abbau der β -Aminosäuren in den Wachstumsversuchen nicht über solche Enzyme verlief. Es ist bekannt, dass einige Pflanzen, z.B. einige Kultivare von *Oryza sativa*, β -Aminosäuren durch Aminomutasen herstellen [21,23,203]. Diese Enzyme verschieben die Aminogruppe von der α -Position in die β -Position oder zurück. Möglicherweise besitzt *B. raffinosisfermentans* ebenfalls solche Mutasen, die β -Aminosäuren in ihre α -Aminosäureanaloga umwandeln, welche dann über die Standardstoffwechselwege verwertet und als Stickstoffquelle verwendet werden können. Wachstumsversuche mit *B. raffinosisfermentans* Mutanten, bei denen eine oder mehrere der potenziellen ω -Transaminasen ausgeschaltet sind, würden Klarheit darüber bringen, ob diese Enzyme an der Verwertung der β -Aminosäuren beteiligt sind. Falls *B. raffinosisfermentans* ohne eines oder mehrere dieser Proteine nicht mehr mit β -Aminosäuren als N-Quelle wachsen kann, wäre das ein Hinweis darauf, dass es sich bei diesen Enzymen tatsächlich um ω -Transaminasen handelt. Falls diese *B. raffinosisfermentans* Mutanten weiterhin gut auf den β -Aminosäuren wachsen können, kann eine Beteiligung dieser drei Proteine am Abbau von β -Aminosäuren ausgeschlossen werden.

Ebenfalls zu erwähnen ist, dass die potenziellen ω -Transaminasen von *B. raffinosisfermentans* scheinbar nur im Reich der Pilze vorkommen. Ein Abgleich der Sequenzen gegen NCBI nr lieferte in den Top 100 Ergebnissen lediglich Treffer bei Proteinen pilzlichen Ursprungs. Eine Wiederholung der Suchen gegen NCBI nr ohne Einträge für das Reich der Pilze lieferte keine Proteine mit ähnlicher Sequenz.

Eine Besonderheit von BroTA1 ist, dass sie die einzige der drei potenziellen ω -Transaminasen von *B. raffinosisfermentans* ist, die noch einer weiteren Pfam mit der Nummer PF13500.6 zugeordnet wurde. Dass sie diese Pfam enthält, eine AAA Domäne, erklärt, warum BroTA1 mit 85,5 kDa etwa 40 kDa größer ist als andere ω -Transaminasen. Diese zusätzliche Domäne könnte durch Genfusion im Laufe der Evolution von *B. raffinosisfermentans* entstanden sein und die niedrige Aktivität erklären. Möglicherweise hat sich durch diese Fusion eine sehr spezielle Funktion herausgebildet und die Vielseitigkeit, wie sie viele ω -Transaminasen aufweisen, ging verloren.

5. Zusammenfassung

Insgesamt waren die drei bearbeiteten Ansätze zur Identifikation und anschließenden Modifikation von ω -Transaminasen erfolgreich. Die Literaturrecherche gekoppelt mit einer Datenbanksuche führte zu einer bis dahin nur theoretisch vorhergesagten ω -Transaminase, die zu Beginn dieser Arbeit noch als hypothetisches Protein bezeichnet wurde. Das Protein VboTA weist zwar eine hohe Sequenzhomologie zu einem Enzym von *V. paradoxus* auf, doch beide Enzyme unterscheiden sich in ihrem Reaktionsverhalten, vor allem bezüglich Temperaturoptimum und Substratspektrum.

Bei der Optimierung des *S. thermophilus* Enzyms hat sich gezeigt, dass das Anpassen an das Motiv sinnvoller war als die Versuche, das aktive Zentrum zu verändern. Hier wurden sieben Varianten erstellt, die eine höhere Aktivität aufweisen als das Wildtypenzym. Vor allem die Mutanten Y47T, S17P|T38V und T38V|Y47T haben stark erhöhte Aktivitäten bei ähnlicher Temperaturstabilität. Diese Varianten setzen β -Homophenylalanin je nach Variante etwa 4-6-mal schneller um als der Wildtyp. Außerdem hat sich herausgestellt, dass das Motiv, das ursprünglich für die Vorhersage aromatischer ω -Transaminasen verwendet werden sollte, nicht nur auf aromatische ω -Transaminasen passt, da sowohl VboTA als auch StoTA neben aromatischen Aminosäuren auch aliphatische Substrate akzeptieren. Die erhöhte Aktivität zusammen mit dem breiten Substratspektrum macht die Varianten interessant für biotechnologische Prozesse.

Auch die vollständige Durchmusterung der Stammsammlung durch Enzymaktivitätstests war erfolgreich. Es konnten drei potenzielle ω -Transaminasen in *B. raffinosifermentans* identifiziert werden. Hier bedarf es zwar noch weiterer Versuche zur Charakterisierung der Enzyme, es konnte aber trotzdem ein Einblick in bisher unbekanntes Stoffwechselfunktionen von *B. raffinosifermentans* erhalten werden. Ähnlich verhält es sich mit LsoTA und PmoTA. Diese Proteine sind der bekannten ω -Transaminase StoTA ähnlich, doch konnte mit den zur Verfügung stehenden Substraten keine Aktivität festgestellt werden. Auch hier bedarf es

Zusammenfassung

zusätzlicher Versuche mit weiteren Substraten, um nachzuweisen, ob es sich tatsächlich um ω -Transaminasen handelt.

6. Literatur

- [1] G. Steinborn, T. Wartmann, G. Gellissen, G. Kunze, Construction of an *Arxula adenivorans* host-vector system based on *trp1* complementation, *J. Biotechnol.* 127 (2007) 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.07.026>.
- [2] O.W. Griffith, β -amino acids: Mammalian metabolism and utility as α -amino acid analogues, *Annu. Rev. Biochem.* 55 (1986) 855–878. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.004231>.
- [3] A. Boldyrev, H. Abe, Metabolic transformation of neuropeptide carnosine modifies its biological activity, *Cell. Mol. Neurobiol.* 19 (1999) 163–175. <https://doi.org/10.1023/a:1006933028389>.
- [4] Kay. Fink, R.B. Henderson, R.M. Fink, β -aminoisobutyric acid in rat urine following administration of pyrimidines, *J. Biol. Chem.* 197 (1952) 441–452. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)55693-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)55693-3).
- [5] E. Solem, The absolute configuration of β -aminoisobutyric acid formed by degradation of thymine in man, *Clin. Chim. Acta.* 53 (1974) 183–190. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(74\)90097-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(74)90097-7).
- [6] G. Trimurtulu, I. Ohtani, G.M.L. Patterson, R.E. Moore, T.H. Corbett, F.A. Valeriote, L. Demchik, Total structures of cryptophycins, potent antitumor depsipeptides from the blue-green alga *Nostoc* sp. strain GSV 224, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 4729–4737. <https://doi.org/10.1021/ja00090a020>.
- [7] T. Golakoti, J. Ogino, C.E. Heltzel, T. Le Husebo, C.M. Jensen, L.K. Larsen, G.M.L. Patterson, R.E. Moore, S.L. Mooberry, T.H. Corbett, F.A. Valeriote, Structure determination, conformational analysis, chemical stability studies, and antitumor evaluation of the cryptophycins. Isolation of 18 new analogs from *Nostoc* sp. strain GSV 224, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 12030–12049. <https://doi.org/10.1021/ja00154a002>.
- [8] M. Kobayashi, S. Aoki, N. Ohyabu, M. Kurosu, W. Wang, I. Kitagawa, Arenastatin A, A potent cytotoxic depsipeptide from the okinawan marine sponge *Dysidea arenaria*, *Tetrahedron Lett.* 35 (1994) 7969–7972. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(94\)80024-3](https://doi.org/10.1016/0040-4039(94)80024-3).
- [9] P. Spiteller, F. von Nussbaum, β -amino acids in natural products, in: *enantioselective synth. β -amino acids*, John Wiley & Sons, Ltd, 2005: pp. 19–91. <https://doi.org/10.1002/0471698482.ch2>.
- [10] S. Tamura, S. Kuyama, Y. Kodaira, S. Higashikawa, The Structure of Destruxin B, A toxic metabolite of *Oospora destructor*, *Agric. Biol. Chem.* 28 (1964) 137–138. <https://doi.org/10.1080/00021369.1964.10858216>.
- [11] A. Suzuki, S. Kuyama, Y. Kodaira, S. Tamura, Structural elucidation of destruxin A, *Agric. Biol. Chem.* 30 (1966) 517–518. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.30.517>.
- [12] A. Tsunoo, M. Kamijo, N. Taketomo, Y. Sato, K. Ajisaka, Roseocardin, A novel cardiotonic cyclodepsipeptide from *Trichothecium roseum* TT103, *J. Antibiot. (Tokyo)*. 50 (1997) 1007–1013. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.50.1007>.
- [13] P. Venkatasubbaiah, N.A. Tisserat, W.S. Chilton, Metabolites of *Ophiosphaerella herpotricha*, a cause of spring dead spot of bermudagrass, *Mycopathologia.* 128 (1994) 155–159. <https://doi.org/10.1007/BF01138477>.

- [14] W.A. Ayer, L.M. Pena-Rodriguez, Metabolites produced by *Alternaria brassicae*, the black spot pathogen of Canola. Part 1, The Phytotoxic Components, ACS Publ. (2004). <https://doi.org/10.1021/np50051a010>.
- [15] M.S.C. Pedras, L. Irina Zaharia, D.E. Ward, The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity, *Phytochemistry*. 59 (2002) 579–596. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00016-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00016-X).
- [16] L. Buchwaldt, H. Green, Phytotoxicity of destruxin B and its possible role in the pathogenesis of *Alternaria brassicae*, *Plant Pathol.* 41 (1992) 55–63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1992.tb02316.x>.
- [17] T. Huang, G. Jander, M. de Vos, Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: Representative cases and opportunities for further functional analysis, *Phytochemistry*. 72 (2011) 1531–1537. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.03.019>.
- [18] D. Kuźnicki, B. Meller, M. Arasimowicz-Jelonek, A. Braszewska-Zalewska, A. Drozda, J. Floryszak-Wieczorek, BABA-Induced DNA methylome adjustment to intergenerational defense priming in potato to *Phytophthora infestans*, *Front. Plant Sci.* 10 (2019). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00650> (accessed September 13, 2022).
- [19] N. Gampe, L. Ladocsi, I. Fejős, I. Boldizsár, A. Darcsi, S. Béni, Enantioseparation and quantitative determination of two homologous beta amino acids found in Fabaceae plants, *J. Chromatogr. A.* 1675 (2022) 463089. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463089>.
- [20] K.C. da S. Rodrigues-Corrêa, A.G. Fett-Neto, Abiotic stresses and non-protein amino acids in plants, *Crit. Rev. Plant Sci.* 38 (2019) 411–430. <https://doi.org/10.1080/07352689.2019.1707944>.
- [21] Production of the non-protein amino acid β -tyrosine in rice | *The Plant Cell* | Oxford Academic, (n.d.). <https://academic.oup.com/plcell/article/27/4/949/6101474?login=true> (accessed July 13, 2022).
- [22] Full article: Identification of β -phenylalanine as a non-protein amino acid in cultivated rice, *Oryza sativa*, (n.d.). <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19420889.2015.1086045> (accessed July 13, 2022).
- [23] J. Yan, T. Aboshi, M. Teraishi, S.R. Strickler, J.E. Spindel, C.-W. Tung, R. Takata, F. Matsumoto, Y. Maesaka, S.R. McCouch, Y. Okumoto, N. Mori, G. Jander, The tyrosine aminomutase TAM1 is required for β -tyrosine biosynthesis in rice, *Plant Cell*. 27 (2015) 1265–1278. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00058>.
- [24] M.C. Wani, H.L. Taylor, M.E. Wall, P. Coggon, A.T. McPhail, Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 2325–2327. <https://doi.org/10.1021/ja00738a045>.
- [25] E.L.M. van Rozendaal, G.P. Lelyveld, T.A. van Beek, Screening of the needles of different yew species and cultivars for paclitaxel and related taxoids, *Phytochemistry*. 53 (2000) 383–389. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00094-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00094-1).
- [26] K. Shrestha, G.A. Strobel, S.P. Shrivastava, M.B. Gewali, Evidence for paclitaxel from three new endophytic fungi of himalayan yew of Nepal, *Planta Med.* 67 (2001) 374–376. <https://doi.org/10.1055/s-2001-14307>.

- [27] Isolation of endophytic fungi and Actinomycetes taxane producers.pdf, (n.d.). [https://www.researchgate.net/profile/Sergio-Quaroni/publication/228559875/links/61e569dc8d338833e376842f/Isolation of endophytic fungi and Actinomycetes taxane producers.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Sergio-Quaroni/publication/228559875/links/61e569dc8d338833e376842f/Isolation_of_endophytic_fungi_and_Actinomycetes_taxane_producers.pdf) (accessed September 9, 2022).
- [28] M.-J. Noh, J.-G. Yang, K.-S. Kim, Y.-M. Yoon, K.-A. Kang, H.-Y. Han, S.-B. Shim, H.-J. Park, Isolation of a novel microorganism, *Pestalotia heterocornis*, producing paclitaxel, *Biotechnol. Bioeng.* 64 (1999) 620–623. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990905\)64:5<620::AID-BIT13>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990905)64:5<620::AID-BIT13>3.0.CO;2-W).
- [29] Studies on a strain of *Kitasatospora* sp. Paclitaxel producer.pdf, (n.d.). [https://www.researchgate.net/profile/Sergio-Quaroni/publication/228554836/links/61e56a355779d35951b54296/Studies on a strain of *Kitasatospora* sp. Paclitaxel producer.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Sergio-Quaroni/publication/228554836/links/61e56a355779d35951b54296/Studies_on_a_strain_of_Kitasatospora_sp._Paclitaxel_producer.pdf) (accessed September 9, 2022).
- [30] J.D. Walton, Horizontal gene transfer and the evolution of secondary metabolite gene clusters in fungi: a hypothesis., *Fungal Genet. Biol.* 30 (2000) 167–171.
- [31] E. Leistner, Die Biologie der Taxane: Arzneimittel aus der Natur, *Pharm. Unserer Zeit.* 34 (2005) 98–103. <https://doi.org/10.1002/pauz.200400108>.
- [32] A. Fredenhagen, S.Y. Tamura, P.T.M. Kenny, H. Komura, Y. Naya, K. Nakanishi, K. Nishiyama, M. Sugiura, H. Kita, Andrimid, a new peptide antibiotic produced by an intracellular bacterial symbiont isolated from a brown planthopper, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 4409–4411. <https://doi.org/10.1021/ja00248a055>.
- [33] W. McWhorter, A. Fredenhagen, K. Nakanishi, H. Komura, Stereocontrolled synthesis of andrimid and a structural requirement for the activity, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1989) 299–301. <https://doi.org/10.1039/C39890000299>.
- [34] J. Needham, M.T. Kelly, M. Ishige, R.J. Andersen, Andrimid and moiramides A-C, metabolites produced in culture by a marine isolate of the bacterium *Pseudomonas fluorescens*: structure elucidation and biosynthesis, *J. Org. Chem.* 59 (1994) 2058–2063. <https://doi.org/10.1021/jo00087a020>.
- [35] Z. Kurylo-borowska, Isolation and properties of pure edeine, an antibiotic of the strain, *Bacillus brevis* Vm4 *Bull Inst Mar. Med Gdansk.* 10 (1959) 151–63.
- [36] Z. Czajgucki, R. Andruszkiewicz, W. Kamysz, Structure activity relationship studies on the antimicrobial activity of novel edeine A and D analogues, *J. Pept. Sci.* 12 (2006) 653–662. <https://doi.org/10.1002/psc.775>.
- [37] S. Altamura, J.L. Sanz, R. Amils, P. Cammarano, P. Londei, The antibiotic sensitivity spectra of ribosomes from the Thermoproteales: phylogenetic depth and distribution of antibiotic binding sites, *Syst. Appl. Microbiol.* 10 (1988) 218–225. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(88\)80004-3](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(88)80004-3).
- [38] B. Brucher, C. Syldatk, J. Rudat, Mikrobielle Umsetzung von β -Phenylalanin mittels neuer Transaminasen, *Chem. Ing. Tech.* 82 (2010) 155–160. <https://doi.org/10.1002/cite.200900110>.
- [39] T. Narancic, S.A. Almahboub, K.E. O'Connor, Unnatural amino acids: production and biotechnological potential, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 35 (2019) 67. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2642-9>.
- [40] M. Höhne, U.T. Bornscheuer, Biocatalytic routes to optically active amines, *ChemCatChem.* 1 (2009) 42–51. <https://doi.org/10.1002/cctc.200900110>.

- [41] D. Koszelewski, M. Göritzer, D. Clay, B. Seisser, W. Kroutil, Synthesis of optically active amines employing recombinant ω -Transaminases in *E. coli* cells, *ChemCatChem*. 2 (2010) 73–77. <https://doi.org/10.1002/cctc.200900220>.
- [42] M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, Industrial methods for the production of optically active intermediates, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (2004) 788–824. <https://doi.org/10.1002/anie.200300599>.
- [43] B.L. Iverson, Betas are brought into the fold, *Nature*. 385 (1997) 113–115. <https://doi.org/10.1038/385113a0>.
- [44] U. Koert, β -peptides: novel secondary structures take shape, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36 (1997) 1836–1837. <https://doi.org/10.1002/anie.199718361>.
- [45] D. Seebach, J.L. Matthews, β -peptides: a surprise at every turn, *Chem. Commun.* (1997) 2015–2022. <https://doi.org/10.1039/A704933A>.
- [46] D. Seebach, M. Overhand, F.N.M. Kühnle, B. Martinoni, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, β -peptides: synthesis by Arndt-Eistert homologation with concomitant peptide coupling. Structure determination by NMR and CD spectroscopy and by X-ray crystallography. Helical secondary structure of a β -hexapeptide in solution and its stability towards pepsin, *Helv. Chim. Acta.* 79 (1996) 913–941. <https://doi.org/10.1002/hlca.19960790402>.
- [47] T. Fujino, Y. Goto, H. Suga, H. Murakami, Ribosomal synthesis of peptides with multiple β -amino acids, *J. Am. Chem. Soc.* 138 (2016) 1962–1969. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b12482>.
- [48] C. Cabrele, T.A. Martinek, O. Reiser, Ł. Berlicki, Peptides containing β -amino acid patterns: challenges and successes in medicinal chemistry, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 9718–9739. <https://doi.org/10.1021/jm5010896>.
- [49] D.F. Hook, F. Gessier, C. Noti, P. Kast, D. Seebach, Probing the proteolytic stability of β -peptides containing α -fluoro- and α -hydroxy- β -amino acids, *ChemBioChem*. 5 (2004) 691–706. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300827>.
- [50] J. Frackenhohl, P.I. Arvidsson, J.V. Schreiber, D. Seebach, The outstanding biological stability of β - and γ -peptides toward proteolytic enzymes: an in vitro investigation with fifteen peptidases, *ChemBioChem*. 2 (2001) 445–455. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20010601\)2:6<445::AID-CBIC445>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20010601)2:6<445::AID-CBIC445>3.0.CO;2-R).
- [51] T. Hintermann, D. Seebach, The biological stability of β -peptides: no interactions between α - and β -peptidic structures?, *Chim. Int. J. Chem.* 51 (1997) 244–247.
- [52] H.N. Gopi, G. Ravindra, P.P. Pal, P. Pattanaik, H. Balaram, P. Balaram, Proteolytic stability of β -peptide bonds probed using quenched fluorescent substrates incorporating a hemoglobin cleavage site, *FEBS Lett.* 535 (2003) 175–178. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03885-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03885-1).
- [53] Expansion of the genetic code through the use of modified bacterial ribosomes | Elsevier Enhanced Reader, (n.d.). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167211>.
- [54] O. Della-Zuana, F. Presse, C. Ortola, J. Duhault, J.L. Nahon, N. Levens, Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague–Dawley rats, *Int. J. Obes.* 26 (2002) 1289–1295. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802079>.
- [55] F.J. García-García, A. Monistrol-Mula, F. Cardellach, G. Garrabou, Nutrition, bioenergetics, and metabolic syndrome, *Nutrients*. 12 (2020) 2785. <https://doi.org/10.3390/nu12092785>.
- [56] J. Byaruhanga, P. Atorkey, M. McLaughlin, A. Brown, E. Byrnes, C. Paul, J. Wiggers, F. Tzelepis, Effectiveness of individual real-time video counseling on smoking, nutrition,

- alcohol, physical activity, and obesity health risks: systematic review, *J. Med. Internet Res.* 22 (2020) e18621. <https://doi.org/10.2196/18621>.
- [57] B.A. Swinburn, G. Sacks, K.D. Hall, K. McPherson, D.T. Finegood, M.L. Moodie, S.L. Gortmaker, The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments, *The Lancet.* 378 (2011) 804–814. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60813-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60813-1).
- [58] J.A. Boutin, M. Jullian, L. Frankiewicz, M. Galibert, P. Gloanec, T. Le Diguarher, P. Dupuis, A. Ko, L. Ripoll, M. Bertrand, A. Pecquery, G. Ferry, K. Puget, MCH-R1 antagonist GPS18169, a pseudopeptide, is a peripheral anti-obesity agent in mice, *Molecules.* 26 (2021) 1291. <https://doi.org/10.3390/molecules26051291>.
- [59] R.E. Schwartz, C.F. Hirsch, D.F. Sesin, J.E. Flor, M. Chartrain, R.E. Fromtling, G.H. Harris, M.J. Salvatore, J.M. Liesch, K. Yudin, Pharmaceuticals from cultured algae, *J. Ind. Microbiol.* 5 (1990) 113–123. <https://doi.org/10.1007/BF01573860>.
- [60] M. Eggen, G.I. Georg, The cryptophycins: their synthesis and anticancer activity, *Med. Res. Rev.* 22 (2002) 85–101. <https://doi.org/10.1002/med.10002>.
- [61] M.A. Tius, Synthesis of the cryptophycins, *Tetrahedron.* 22 (2002) 4343–4367.
- [62] D. Panda, R.H. Himes, R.E. Moore, L. Wilson, M.A. Jordan, Mechanism of action of the unusually potent microtubule inhibitor cryptophycin 1, *Biochemistry.* 36 (1997) 12948–12953. <https://doi.org/10.1021/bi971302p>.
- [63] T.H.J. Niedermeyer, Biologisch aktive Naturstoffe aus Cyanobakterien der Gattung *Nostoc*: Mikrobe des Jahres 2014, *BIOspektrum.* 20 (2014) 151–153. <https://doi.org/10.1007/s12268-014-0420-7>.
- [64] J. Rohr, Cryptophycin anticancer drugs revisited, *ACS Chem. Biol.* 1 (2006) 747–750. <https://doi.org/10.1021/cb6004678>.
- [65] H. Bouchard, M.-P. Brun, A. Commercon, J. Zhang, Conjugates, preparation thereof, and therapeutic use thereof, US8952147B2, 2015. <https://patents.google.com/patent/US8952147B2/en> (accessed September 10, 2022).
- [66] abraxane-epar-product-information_de.pdf, (n.d.). https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/abraxane-epar-product-information_de.pdf (accessed September 14, 2022).
- [67] K.V. Rao, Taxol and related taxanes. I. Taxanes of *Taxus brevifolia* bark, *Pharm. Res.* 10 (1993) 521–524. <https://doi.org/10.1023/a:1018937700459>.
- [68] F. Han, L.-Z. Kang, X.-L. Zeng, Z.-W. Ye, L.-Q. Guo, J.-F. Lin, Bioproduction of baccatin III, an advanced precursor of paclitaxol, with transgenic *Flammulina velutipes* expressing the 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase gene, *J. Sci. Food Agric.* 94 (2014) 2376–2383. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6562>.
- [69] Molecular cloning of a 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli* | *PNAS*, (n.d.). <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.97.2.583> (accessed September 14, 2022).
- [70] A.-M.D.A. GmbH, Paclitaxel aus Fermentern, *Pharm. Ztg. Online.* (n.d.). https://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=pharm5_34_2002 (accessed September 14, 2022).
- [71] Andrimid producers encode an acetyl-CoA carboxyltransferase subunit resistant to the action of the antibiotic | *PNAS*, (n.d.). <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0806873105> (accessed September 9, 2022).

- [72] M.A. Silvers, S. Pakhomova, D.B. Neau, W.C. Silvers, N. Anzalone, C.M. Taylor, G.L. Waldrop, Crystal structure of carboxyltransferase from *Staphylococcus aureus* bound to the antibacterial agent moiramide B, *Biochemistry*. 55 (2016) 4666–4674. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00641>.
- [73] W.A. Silverman, The Schizophrenic Career of a “Monster Drug,” *Pediatrics*. 110 (2002) 404–406. <https://doi.org/10.1542/peds.110.2.404>.
- [74] T. and B. Stephens, *Dark Remedy: The impact of thalidomide and its revival as a vital medicine*, Eweb:227478. (2001). <https://repository.library.georgetown.edu/handle/10822/941034> (accessed September 15, 2022).
- [75] E.S. Fischer, K. Böhm, J.R. Lydeard, H. Yang, M.B. Stadler, S. Cavadini, J. Nagel, F. Serluca, V. Acker, G.M. Lingaraju, R.B. Tichkule, M. Schebesta, W.C. Forrester, M. Schirle, U. Hassiepen, J. Ottl, M. Hild, R.E.J. Beckwith, J.W. Harper, J.L. Jenkins, N.H. Thomä, Structure of the DDB1–CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide, *Nature*. 512 (2014) 49–53. <https://doi.org/10.1038/nature13527>.
- [76] T. Ito, H. Ando, H. Handa, Teratogenic effects of thalidomide: molecular mechanisms, *Cell. Mol. Life Sci.* 68 (2011) 1569–1579. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0619-9>.
- [77] T. Ito, H. Handa, Molecular mechanisms of thalidomide and its derivatives, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.* 96 (2020) 189–203. <https://doi.org/10.2183/pjab.96.016>.
- [78] T. Asatsuma-Okumura, T. Ito, H. Handa, Molecular mechanisms of the teratogenic effects of thalidomide, *Pharmaceuticals*. 13 (2020) 95. <https://doi.org/10.3390/ph13050095>.
- [79] T. Ito, H. Ando, T. Suzuki, T. Ogura, K. Hotta, Y. Imamura, Y. Yamaguchi, H. Handa, Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity, *Science*. 327 (2010) 1345–1350. <https://doi.org/10.1126/science.1177319>.
- [80] T. Eriksson, S. Björkman, B. Roth, P. Höglund, Intravenous formulations of the enantiomers of thalidomide: pharmacokinetic and initial pharmacodynamic characterization in man, *J. Pharm. Pharmacol.* 52 (2000) 807–817. <https://doi.org/10.1211/0022357001774660>.
- [81] M. Liu, M.P. Sibi, Recent advances in the stereoselective synthesis of β -amino acids, *Tetrahedron*. 58 (2002) 7991–8035. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)00991-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(02)00991-2).
- [82] B. Weiner, W. Szymański, D.B. Janssen, A.J. Minnaard, B.L. Feringa, Recent advances in the catalytic asymmetric synthesis of β -amino acids, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1656–1691. <https://doi.org/10.1039/B919599H>.
- [83] X.-X. Zhang, Y. Gao, X.-S. Hu, C.-B. Ji, Y.-L. Liu, J.-S. Yu, Recent advances in catalytic enantioselective synthesis of fluorinated α - and β -amino acids, *Adv. Synth. Catal.* 362 (2020) 4763–4793. <https://doi.org/10.1002/adsc.202000966>.
- [84] U.T. Bornscheuer, G.W. Huisman, R.J. Kazlauskas, S. Lutz, J.C. Moore, K. Robins, Engineering the third wave of biocatalysis, *Nature*. 485 (2012) 185–194. <https://doi.org/10.1038/nature11117>.
- [85] H.-S. Bea, H.-J. Park, S.-H. Lee, H. Yun, Kinetic resolution of aromatic β -amino acids by ω -transaminase, *Chem. Commun.* 47 (2011) 5894–5896. <https://doi.org/10.1039/C1CC11528F>.
- [86] B.-K. Cho, H.-Y. Park, J.-H. Seo, J. Kim, T.-J. Kang, B.-S. Lee, B.-G. Kim, Redesigning the substrate specificity of ω -aminotransferase for the kinetic resolution of aliphatic chiral amines, *Biotechnol. Bioeng.* 99 (2008) 275–284. <https://doi.org/10.1002/bit.21591>.

- [87] H. Yun, B.-K. Cho, B.-G. Kim, Kinetic resolution of (R,S)-sec-butylamine using omega-transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17 under reduced pressure, *Biotechnol. Bioeng.* 87 (2004) 772–778. <https://doi.org/10.1002/bit.20186>.
- [88] J.-S. Shin, B.-G. Kim, A. Liese, C. Wandrey, Kinetic resolution of chiral amines with ω -transaminase using an enzyme-membrane reactor, *Biotechnol. Bioeng.* 73 (2001) 179–187. <https://doi.org/10.1002/bit.1050>.
- [89] J.-S. Shin, B.-G. Kim, Kinetic resolution of α -methylbenzylamine with ω -transaminase screened from soil microorganisms: application of a biphasic system to overcome product inhibition, *Biotechnol. Bioeng.* 55 (1997) 348–358. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970720\)55:2<348::AID-BIT12>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970720)55:2<348::AID-BIT12>3.0.CO;2-D).
- [90] J. Mano, J. Ogawa, S. Shimizu, Microbial production of optically active β -phenylalanine through stereoselective degradation of racemic β -phenylalanine, *Biosci. Biotechnol. Biochem. advpub* (2006) 0607100016–0607100016. <https://doi.org/10.1271/bbb.60099>.
- [91] J.-S. Shin, B.-G. Kim, Asymmetric synthesis of chiral amines with ω -transaminase, *Biotechnol. Bioeng.* 65 (1999) 206–211. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19991020\)65:2<206::AID-BIT11>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19991020)65:2<206::AID-BIT11>3.0.CO;2-9).
- [92] E.-S. Park, J.-Y. Dong, J.-S. Shin, ω -Transaminase-catalyzed asymmetric synthesis of unnatural amino acids using isopropylamine as an amino donor, *Org. Biomol. Chem.* 11 (2013) 6929–6933. <https://doi.org/10.1039/C3OB40495A>.
- [93] H. YUN, B.-G. KIM, Asymmetric synthesis of (S)- α -methylbenzylamine by recombinant *Escherichia coli* co-expressing omega-transaminase and acetolactate synthase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72 (2008) 3030–3033. <https://doi.org/10.1271/bbb.80410>.
- [94] A.P. Green, N.J. Turner, E. O'Reilly, Chiral amine synthesis using ω -transaminases: an amine donor that displaces equilibria and enables high-throughput screening, *Angew. Chem.* 126 (2014) 10890–10893. <https://doi.org/10.1002/ange.201406571>.
- [95] O. Buß, M. Voss, A. Delavault, P. Gorenflo, C. Syldatk, U. Bornscheuer, J. Rudat, β -Phenylalanine ester synthesis from stable β -keto ester substrate using engineered ω -transaminases, *Molecules.* 23 (2018) 1211. <https://doi.org/10.3390/molecules23051211>.
- [96] C.K. Savile, J.M. Janey, E.C. Mundorff, J.C. Moore, S. Tam, W.R. Jarvis, J.C. Colbeck, A. Krebber, F.J. Fleitz, J. Brands, P.N. Devine, G.W. Huisman, G.J. Hughes, Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture, *Science.* (2010). <https://doi.org/10.1126/science.1188934>.
- [97] K.E. Cassimjee, M.S. Humble, V. Miceli, C.G. Colomina, P. Berglund, Active site quantification of an ω -transaminase by performing a half transamination reaction, *ACS Catal.* 1 (2011) 1051–1055. <https://doi.org/10.1021/cs200315h>.
- [98] G.M. Garrity, J.A. Bell, T. Lilburn, Class II. Betaproteobacteria class. nov., in: D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley (Eds.), *Bergey's Manual® Syst. Bacteriol. Vol. Two Proteobacteria Part C Alpha- Beta- Delta- Epsilonproteobacteria*, Springer US, Boston, MA, 2005: pp. 575–922. https://doi.org/10.1007/0-387-29298-5_2.
- [99] German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details, (n.d.). <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-21722> (accessed September 13, 2022).
- [100] H. Miwa, I. Ahmed, J. Yoon, A. Yokota, T. 2008 Fujiwara, *Variovorax boronicumulans* sp. nov., a boron-accumulating bacterium isolated from soil, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58 (2022) 286–289. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65315-0>.

- [101] D.H. DAVIS, M. DOUDOROFF, R.Y. STANIER, M. 1969 MANDEL, Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: taxonomic implications, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 19 (n.d.) 375–390. <https://doi.org/10.1099/00207713-19-4-375>.
- [102] A. Willems, J. De Ley, M. Gillis, K.Y. 1991 Kersters, NOTES: Comamonadaceae, a new family encompassing the acidovorans rRNA complex, including *Variovorax paradoxus* gen. nov., comb. nov., for *Alcaligenes paradoxus* (Davis 1969), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 41 (n.d.) 445–450. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-445>.
- [103] R. Hensel, W. Demharter, R. Hilpert, The microflora involved in aerobic-thermophilic sludge stabilization, *Syst. Appl. Microbiol.* 11 (1989) 312–319. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(89\)80030-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(89)80030-X).
- [104] W. Demharter, R. Hensel, J. Smida, E. Stackebrandt, *Sphaerobacter thermophilus* gen. nov., sp. nov. A deeply rooting member of the Actinomycetes subdivision isolated from thermophilically treated sewage sludge, *Syst. Appl. Microbiol.* 11 (1989) 261–266. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(89\)80023-2](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(89)80023-2).
- [105] P. Hugenholtz, E. 2004 Stackebrandt, Reclassification of *Sphaerobacter thermophilus* from the subclass Sphaerobacteridae in the phylum Actinobacteria to the class Thermomicrobia (emended description) in the phylum Chloroflexi (emended description), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (n.d.) 2049–2051. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.03028-0>.
- [106] A. Pati, K. LaButti, R. Pukall, M. Nolan, T. Glavina Del Rio, H. Tice, J.-F. Cheng, S. Lucas, F. Chen, A. Copeland, N. Ivanova, K. Mavromatis, N. Mikhailova, S. Pitluck, D. Bruce, L. Goodwin, M. Land, L. Hauser, Y.-J. Chang, C.D. Jeffries, A. Chen, K. Palaniappan, P. Chain, T. Brettin, J. Sikorski, M. Rohde, M. Göker, J. Bristow, J.A. Eisen, V. Markowitz, P. Hugenholtz, N.C. Kyrpides, H.-P. Klenk, A. Lapidus, Complete genome sequence of *Sphaerobacter thermophilus* type strain (S 6022T), *Stand. Genomic Sci.* 2 (2010) 49–56. <https://doi.org/10.4056/sigs.601105>.
- [107] I. Ahmed, A. Yokota, A. Yamazoe, T. 2007 Fujiwara, Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (n.d.) 1117–1125. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63867-0>.
- [108] V.B.D. Skerman, V. McGowan, P.H.A. Sneath, Approved lists of bacterial names., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30 (1980) 225–420.
- [109] L.C. Lozano, J. Dussán, Metal tolerance and larvicidal activity of *Lysinibacillus sphaericus*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29 (2013) 1383–1389. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1301-9>.
- [110] T.D. Peña-Montenegro, J. Dussán, Genome sequence and description of the heavy metal tolerant bacterium *Lysinibacillus sphaericus* strain OT4b.31, *Stand. Genomic Sci.* 9 (2013) 42–56. <https://doi.org/10.4056/sigs.4227894>.
- [111] C. Berry, The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen, *J. Invertebr. Pathol.* 109 (2012) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.11.008>.
- [112] J.C. Santana-Martinez, J.J. Silva, J. Dussan, Efficacy of *Lysinibacillus sphaericus* against mixed-cultures of field-collected and laboratory larvae of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*, *Bull. Entomol. Res.* 109 (2019) 111–118. <https://doi.org/10.1017/S0007485318000342>.
- [113] German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details, (n.d.). <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-28> (accessed September 13, 2022).

- [114] R.S. Gupta, S. Patel, N. Saini, S. 2020 Chen, Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70 (n.d.) 5753–5798. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>.
- [115] *Bacillus Megaterium* - an overview | ScienceDirect Topics, (n.d.). <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/bacillus-megaterium> (accessed September 13, 2022).
- [116] German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details, (n.d.). <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-32> (accessed September 13, 2022).
- [117] W.J. Middelhoven, J.A. van den Brink, M. Veenhuis, Growth of *Candida famata* and *Trichosporon cutaneum* on uric acid as the sole source of carbon and energy, a hitherto unknown property of yeasts, *Antonie Van Leeuwenhoek.* 49 (1983) 361–368. <https://doi.org/10.1007/BF00399316>.
- [118] W.J. Middelhoven, M.C.H.-T. Niet, N.J.W.K.-V. Rij, *Trichosporon adenivorans* sp. nov., a yeast species utilizing adenine, xanthine, uric acid, putrescine and primary n-alkylamines as the sole source of carbon, nitrogen and energy, *Antonie Van Leeuwenhoek.* 50 (1984) 369–378. <https://doi.org/10.1007/BF00394651>.
- [119] W.J. Middelhoven, I.M. de Jong, M. de Winter, Yeasts and fungi occurring in ensiled whole-crop maize and other ensiled vegetable crops, *Antonie Van Leeuwenhoek.* 57 (1990) 153–158. <https://doi.org/10.1007/BF00403949>.
- [120] J.P. Van der Walt, M.Th. Smith, Y. Yamada, *Arxula* gen. nov. (Candidaceae), a new anamorphic, arthroconidial yeast genus, *Antonie Van Leeuwenhoek.* 57 (1990) 59–61. <https://doi.org/10.1007/BF00400338>.
- [121] U. Gienow, G. Kunze, F. Schauer, R. Bode, J. Hofemeister, The Yeast Genus *Trichosporon* spec. LS3; molecular characterization of genomic complexity, *Zentralblatt Für Mikrobiol.* 145 (1990) 3–12. [https://doi.org/10.1016/S0232-4393\(11\)80001-6](https://doi.org/10.1016/S0232-4393(11)80001-6).
- [122] C.P. Kurtzman, C.J. Robnett, Multigene phylogenetic analysis of the *Trichomonascus*, *Wickerhamiella* and *Zygoascus* yeast clades, and the proposal of *Sugiyamaella* gen. nov. and 14 new species combinations, *FEMS Yeast Res.* 7 (2007) 141–151. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00157.x>.
- [123] H.-V. Nguyen, C. Gaillardin, C. Neuvéglise, Differentiation of *Debaryomyces hansenii* and *Candida famata* by rRNA gene intergenic spacer fingerprinting and reassessment of phylogenetic relationships among *D. hansenii*, *C. famata*, *D. fabryi*, *C. flareri* (= *D. subglobosus*) and *D. prosopidis*: description of *D. vietnamensis* sp. nov. closely related to *D. nepalensis*, *FEMS Yeast Res.* 9 (2009) 641–662. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00510.x>.
- [124] M. Cornet, B. Sendid, C. Fradin, C. Gaillardin, D. Poulain, H.-V. Nguyen, Molecular Identification of closely related *Candida* species using two ribosomal intergenic spacer fingerprinting methods, *J. Mol. Diagn.* 13 (2011) 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2010.11.014>.
- [125] S. Thomas, D.R.A. Sanya, F. Fouchard, H.-V. Nguyen, G. Kunze, C. Neuvéglise, A.-M. Crutz-Le Coq, *Blastobotrys adenivorans* and *B. raffinosifermentans*, two sibling yeast species which accumulate lipids at elevated temperatures and from diverse sugars, *Biotechnol. Biofuels.* 12 (2019) 154. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1492-x>.

- [126] native acyltransferase-coding genes DGA1 and DGA2 affect lipid accumulation in *Blastobotrys raffinosifermentans* differently when overexpressed | FEMS Yeast Research | Oxford Academic, (n.d.).
<https://academic.oup.com/femsyr/article/20/8/foaa060/5989697> (accessed September 30, 2022).
- [127] K. Wolf, *Nonconventional yeasts in biotechnology: a handbook*, Springer Science & Business Media, 2012.
- [128] K. Wolf, K.D. Breunig, G. Barth, *Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology: practical protocols*, Springer Science & Business Media, 2012.
- [129] G. Gellissen, G. Kunze, C. Gaillardin, J.M. Cregg, E. Berardi, M. Veenhuis, I. van der Klei, New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica*— A comparison, *FEMS Yeast Res.* 5 (2005) 1079–1096.
<https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2005.06.004>.
- [130] F. Bischoff, M. Giersberg, F. Matthes, T. Schwalenberg, S. Worch, G. Kunze, Selection of the optimal yeast host for the synthesis of recombinant enzymes, in: B. Gasser, D. Mattanovich (Eds.), *Recomb. Protein Prod. Yeast*, Springer, New York, NY, 2019: pp. 113–132. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9024-5_4.
- [131] Temperature-dependent dimorphism of the yeast *Arxula adenivorans* Ls3 | SpringerLink, (n.d.). <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00871818> (accessed September 3, 2022).
- [132] T. Wartmann, J. Erdmann, I. Kunze, G. Kunze, Morphology related effects on gene expression and protein accumulation of the yeast *Arxula adenivorans* LS3, *Arch. Microbiol.* 173 (2000) 253–261. <https://doi.org/10.1007/s002030000137>.
- [133] T. Wartmann, U.W. Stephan, I. Bube, E. Böer, M. Melzer, R. Manteuffel, R. Stoltenburg, L. Guengerich, G. Gellissen, G. Kunze, Post translational modifications of the AFET3 gene product—a component of the iron transport system in budding cells and mycelia of the yeast *Arxula adenivorans*, *Yeast.* 19 (2002) 849–862.
<https://doi.org/10.1002/yea.880>.
- [134] X.-X. Yang, T. Wartmann, R. Stoltenburg, G. Kunze, Halotolerance of the yeast *Arxula adenivorans* LS3, *Antonie Van Leeuwenhoek.* 77 (2000) 303–311.
<https://doi.org/10.1023/A:1002636606282>.
- [135] G. Kunze, C. Gaillardin, M. Czernicka, P. Durrens, T. Martin, E. Böer, T. Gabaldón, J.A. Cruz, E. Talla, C. Marck, A. Goffeau, V. Barbe, P. Baret, K. Baronian, S. Beier, C. Bleykasten, R. Bode, S. Casaregola, L. Despons, C. Fairhead, M. Giersberg, P.P. Gierski, U. Hähnel, A. Hartmann, D. Jankowska, C. Jubin, P. Jung, I. Lafontaine, V. Leh-Louis, M. Lemaire, M. Marcet-Houben, M. Mascher, G. Morel, G.-F. Richard, J. Riechen, C. Sacerdot, A. Sarkar, G. Savel, J. Schacherer, D.J. Sherman, N. Stein, M.-L. Straub, A. Thierry, A. Trautwein-Schult, B. Vacherie, E. Westhof, S. Worch, B. Dujon, J.-L. Souciet, P. Wincker, U. Scholz, C. Neuvéglise, The complete genome of *Blastobotrys* (*Arxula*) *adenivorans* LS3 - a yeast of biotechnological interest, *Biotechnol. Biofuels.* 7 (2014) 66. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-66>.
- [136] F. Bischoff, A. Chamas, K. Litwińska, F. Matthes, E. Böer, G. Kunze, Applications of *Blastobotrys* (*Arxula*) *adenivorans* in biotechnology, in: T. Satyanarayana, G. Kunze (Eds.), *Yeast Divers. Hum. Welf.*, Springer, Singapore, 2017: pp. 455–479.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-2621-8_18.

- [137] A. Malak, K. Baronian, G. Kunze, *Blastobotrys (Arxula) adenivorans*: a promising alternative yeast for biotechnology and basic research, *Yeast*. 33 (2016) 535–547. <https://doi.org/10.1002/yea.3180>.
- [138] D. a. Jankowska, A. Trautwein-Schult, A. Cordes, P. Hoferichter, C. Klein, R. Bode, K. Baronian, G. Kunze, *Arxula adenivorans* xanthine oxidoreductase and its application in the production of food with low purine content, *J. Appl. Microbiol.* 115 (2013) 796–807. <https://doi.org/10.1111/jam.12284>.
- [139] *Arxula adenivorans* recombinant urate oxidase and its application in the production of food with low uric acid content - Abstract - *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2013, Vol. 23, No. 6 - Karger Publishers, (n.d.). <https://www.karger.com/Article/Abstract/353847> (accessed September 4, 2022).
- [140] A. Trautwein-Schult, D. Jankowska, A. Cordes, P. Hoferichter, C. Klein, A. Matros, H.-P. Mock, K. Baronian, R. Bode, G. Kunze, *Arxula adenivorans* recombinant guanine deaminase and its application in the production of food with low purine content, *Microb. Physiol.* 24 (2014) 67–81. <https://doi.org/10.1159/000357674>.
- [141] D.A. Jankowska, A. Trautwein-Schult, A. Cordes, R. Bode, K. Baronian, G. Kunze, A novel enzymatic approach in the production of food with low purine content using *Arxula adenivorans* endogenous and recombinant purine degradative enzymes, *Bioengineered*. 6 (2015) 20–25. <https://doi.org/10.4161/21655979.2014.991667>.
- [142] J. Kasprzak, M. Rauter, J. Riechen, S. Worch, K. Baronian, R. Bode, F. Schauer, G. Kunze, Characterization of an *Arxula adenivorans* alcohol dehydrogenase involved in the metabolism of ethanol and 1-butanol, *FEMS Yeast Res.* 16 (2016) fow018. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow018>.
- [143] T. Zoll, Biotechnologische Stammoptimierung zur Steigerung der Syntheseleistung von n-Butanol in *Arxula adenivorans*, (2013). <https://monami.hs-mittweida.de/frontdoor/index/index/docId/5525> (accessed September 4, 2022).
- [144] M. Rauter, J. Kasprzak, K. Becker, J. Riechen, S. Worch, A. Hartmann, M. Mascher, U. Scholz, K. Baronian, R. Bode, F. Schauer, H. Matthias Vorbrodt, G. Kunze, Aadh2p: an *Arxula adenivorans* alcohol dehydrogenase involved in the first step of the 1-butanol degradation pathway, *Microb. Cell Factories*. 15 (2016) 175. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0573-9>.
- [145] M. Biernacki, J. Riechen, U. Hähnel, T. Roick, K. Baronian, R. Bode, G. Kunze, Production of (R)-3-hydroxybutyric acid by *Arxula adenivorans*, *AMB Express*. 7 (2017) 4. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0303-z>.
- [146] M. Biernacki, M. Marzec, T. Roick, R. Pätz, K. Baronian, R. Bode, G. Kunze, Enhancement of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) accumulation in *Arxula adenivorans* by stabilization of production, *Microb. Cell Factories*. 16 (2017) 144. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0751-4>.
- [147] M. Rauter, J. Kasprzak, K. Becker, K. Baronian, R. Bode, G. Kunze, H.-M. Vorbrodt, ADH from *Rhodococcus ruber* expressed in *Arxula adenivorans* for the synthesis of 1-(S)-phenylethanol, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 104 (2014) 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.02.015>.
- [148] J. Kasprzak, F. Bischoff, M. Rauter, K. Becker, K. Baronian, R. Bode, F. Schauer, H.-M. Vorbrodt, G. Kunze, Synthesis of 1-(S)-phenylethanol and ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutanoate using recombinant *Rhodococcus erythropolis* alcohol dehydrogenase produced by two yeast species, *Biochem. Eng. J.* 106 (2016) 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.11.007>.

- [149] M. Rauter, A. Prokoph, J. Kasprzak, K. Becker, K. Baronian, R. Bode, G. Kunze, H.-M. Vorbrodth, Coexpression of *Lactobacillus brevis* ADH with GDH or G6PDH in *Arxula adenivorans* for the synthesis of 1-(R)-phenylethanol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 4723–4733. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6297-z>.
- [150] M. Rauter, J. Kasprzak, S. Denter, K. Becker, K. Baronian, R. Bode, G. Kunze, H.-M. Vorbrodth, Reusability of ADH and GDH producing *Arxula adenivorans* cells and cell extract for the production of 1-(S)-phenylethanol, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 108 (2014) 72–76. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.06.008>.
- [151] H.T.M. Pham, A. Chamas, A. Nieter, M. Giersberg, T. Rutten, L. Gehrman, K. Hettwer, J. Tuerk, S. Uhlig, K. Simon, K. Baronian, G. Kunze, Determination of glucocorticoids using photometric (A-YGS) and spectrofluorometric (A-YGFS) bioassays based on modified *Arxula adenivorans* cells: applications in environmental analysis, *Sens. Actuators B Chem.* 223 (2016) 540–549. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.09.132>.
- [152] H.T.M. Pham, M. Giersberg, S. Uhlig, G. Hanke, K. Simon, K. Kunath, K. Baronian, G. Kunze, EstraMonitor – A monitor for amperometric detection of estrogenic activity with *Arxula adenivorans* yeast cells as the biocomponent, *Sens. Actuators B Chem.* 161 (2012) 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.09.085>.
- [153] H.T.M. Pham, K. Kunath, L. Gehrman, M. Giersberg, J. Tuerk, S. Uhlig, G. Hanke, K. Simon, K. Baronian, G. Kunze, Application of modified *Arxula adenivorans* yeast cells in an online biosensor for the detection of estrogenic compounds in wastewater samples, *Sens. Actuators B Chem.* 185 (2013) 628–637. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.05.065>.
- [154] H.T.M. Pham, M. Giersberg, L. Gehrman, K. Hettwer, J. Tuerk, S. Uhlig, G. Hanke, P. Weisswange, K. Simon, K. Baronian, G. Kunze, The determination of pharmaceuticals in wastewater using a recombinant *Arxula adenivorans* whole cell biosensor, *Sens. Actuators B Chem.* 211 (2015) 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.01.107>.
- [155] T. Gerlach, J. Knaust, C. Kaiser, M. Körner, K. Hettwer, S. Uhlig, K. Simon, K. Baronian, G. Kunze, Development and assessment of a novel *Arxula adenivorans* androgen screen (A-YAS) assay and its application in analysis of cattle urine, *Sci. Total Environ.* 490 (2014) 1073–1081. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.100>.
- [156] C. Kaiser, S. Uhlig, T. Gerlach, M. Körner, K. Simon, K. Kunath, K. Florschütz, K. Baronian, G. Kunze, Evaluation and validation of a novel *Arxula adenivorans* estrogen screen (nAES) assay and its application in analysis of wastewater, seawater, brackish water and urine, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 6017–6026. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.08.050>.
- [157] A. Chamas, A. Nieter, H.T.M. Pham, M. Giersberg, K. Hettwer, S. Uhlig, K. Simon, K. Baronian, G. Kunze, Development of a recombinant *Arxula adenivorans* cell bioassay for the detection of molecules with progesterone activity in wastewater, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 8109–8120. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8985-7>.
- [158] B.W. Shen, M. Hennig, E. Hohenester, J.N. Jansonius, T. Schirmer, Crystal structure of human recombinant ornithine aminotransferase, *J. Mol. Biol.* 277 (1998) 81–102. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1583>.
- [159] S. Mathew, H. Bea, S.P. Nadarajan, T. Chung, H. Yun, Production of chiral β -amino acids using ω -transaminase from *Burkholderia graminis*, *J. Biotechnol.* 196–197 (2015) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.011>.
- [160] A. Sivashanmugam, V. Murray, C. Cui, Y. Zhang, J. Wang, Q. Li, Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*, *Protein Sci.* 18 (2009) 936–948. <https://doi.org/10.1002/pro.102>.

- [161] D.G. Gibson, L. Young, R.-Y. Chuang, J.C. Venter, C.A. Hutchison, H.O. Smith, Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases, *Nat. Methods.* 6 (2009) 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>.
- [162] D.G. Gibson, Chapter fifteen - Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments, in: C. Voigt (Ed.), *Methods Enzymol.*, Academic Press, 2011: pp. 349–361. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385120-8.00015-2>.
- [163] M.L. Mayta, A.F. Lodeyro, J.J. Guiamet, V.B. Tognetti, M. Melzer, M.R. Hajirezaei, N. Carrillo, Expression of a plastid targeted flavodoxin decreases chloroplast reactive oxygen species accumulation and delays senescence in aging tobacco leaves, *Front. Plant Sci.* 9 (2018). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.01039> (accessed January 15, 2022).
- [164] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- [165] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- [166] R.D. Finn, J. Clements, S.R. Eddy, HMMER web server: interactive sequence similarity searching, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) W29–W37. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr367>.
- [167] R.D. Finn, J. Clements, W. Arndt, B.L. Miller, T.J. Wheeler, F. Schreiber, A. Bateman, S.R. Eddy, HMMER web server: 2015 update, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) W30–W38. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv397>.
- [168] S.C. Potter, A. Luciani, S.R. Eddy, Y. Park, R. Lopez, R.D. Finn, HMMER web server: 2018 update, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) W200–W204. <https://doi.org/10.1093/nar/gky448>.
- [169] S. El-Gebali, J. Mistry, A. Bateman, S.R. Eddy, A. Luciani, S.C. Potter, M. Qureshi, L.J. Richardson, G.A. Salazar, A. Smart, E.L.L. Sonnhammer, L. Hirsh, L. Paladin, D. Piovesan, S.C.E. Tosatto, R.D. Finn, The Pfam protein families database in 2019, *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) D427–D432. <https://doi.org/10.1093/nar/gky995>.
- [170] J. Mistry, S. Chuguransky, L. Williams, M. Qureshi, G.A. Salazar, E.L.L. Sonnhammer, S.C.E. Tosatto, L. Paladin, S. Raj, L.J. Richardson, R.D. Finn, A. Bateman, Pfam: The protein families database in 2021, *Nucleic Acids Res.* 49 (2021) D412–D419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>.
- [171] J.S. Papadopoulos, R. Agarwala, COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences, *Bioinforma. Oxf. Engl.* 23 (2007) 1073–1079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm076>.
- [172] COBALT:Multiple Alignment Tool, (2022). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi (accessed January 24, 2022).
- [173] J. Rudat, B.R. Brucher, C. Sylstatk, Transaminases for the synthesis of enantiopure beta-amino acids, *AMB Express.* 2 (2012) 11. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-11>.
- [174] S. Mathew, S.P. Nadarajan, T. Chung, H.H. Park, H. Yun, Biochemical characterization of thermostable ω -transaminase from *Sphaerobacter thermophilus* and its application for producing aromatic β - and γ -amino acids, *Enzyme Microb. Technol.* 87–88 (2016) 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.02.013>.
- [175] G.G. Wybenga, C.G. Crismaru, D.B. Janssen, B.W. Dijkstra, Structural determinants of the β -selectivity of a bacterial aminotransferase *, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 28495–28502. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.375238>.

- [176] C.G. Crismaru, G.G. Wybenga, W. Szymanski, H.J. Wijma, B. Wu, S. Bartsch, S. de Wildeman, G.J. Poelarends, B.L. Feringa, B.W. Dijkstra, D.B. Janssen, Biochemical properties and crystal structure of a β -phenylalanine aminotransferase from *Variovorax paradoxus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (2013) 185–195. <https://doi.org/10.1128/AEM.02525-12>.
- [177] J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Žídek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S.A.A. Kohli, A.J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A.W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, D. Hassabis, Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*. 596 (2021) 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- [178] M. Mirdita, K. Schütze, Y. Moriwaki, L. Heo, S. Ovchinnikov, M. Steinegger, ColabFold - Making protein folding accessible to all, (2021) 2021.08.15.456425. <https://doi.org/10.1101/2021.08.15.456425>.
- [179] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The protein data bank, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- [180] T.D. Goddard, C.C. Huang, E.C. Meng, E.F. Pettersen, G.S. Couch, J.H. Morris, T.E. Ferrin, UCSF ChimeraX: meeting modern challenges in visualization and analysis, *Protein Sci.* 27 (2018) 14–25. <https://doi.org/10.1002/pro.3235>.
- [181] D. Sehnal, S. Bittrich, M. Deshpande, R. Svobodová, K. Berka, V. Bazgier, S. Velankar, S.K. Burley, J. Koča, A.S. Rose, Mol* Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures, *Nucleic Acids Res.* 49 (2021) W431–W437. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab314>.
- [182] J.-H. Seo, J.-Y. Hwang, S.-H. Seo, H. Kang, B.-Y. Hwang, B.-G. Kim, Computational selection, identification and structural analysis of ω -aminotransferases with various substrate specificities from the genome sequence of *Mesorhizobium loti* MAFF303099, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76 (2012) 1308–1314. <https://doi.org/10.1271/bbb.120062>.
- [183] Amine transaminases in chiral amines synthesis: recent advances and challenges | SpringerLink, (n.d.). <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-017-2395-2> (accessed June 14, 2022).
- [184] C.G. Crismaru, G.G. Wybenga, W. Szymanski, H.J. Wijma, B. Wu, S. Bartsch, S. de Wildeman, G.J. Poelarends, B.L. Feringa, B.W. Dijkstra, D.B. Janssen, Biochemical properties and crystal structure of a β -phenylalanine aminotransferase from *Variovorax paradoxus*, *Appl. Environ. Microbiol.* (2013). <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/AEM.02525-12> (accessed January 15, 2022).
- [185] S. Kwon, J.H. Lee, C.M. Kim, H.J. Ha, S.H. Lee, C.S. Lee, J.-H. Jeon, I. So, H.H. Park, Structural insights into the enzyme specificity of a novel ω -transaminase from the thermophilic bacterium *Sphaerobacter thermophilus*, *J. Struct. Biol.* 208 (2019) 107395. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.09.012>.
- [186] T. Jang, B. Kim, O.K. Park, J.Y. Bae, B.-G. Kim, H. Yun, H.H. Park, Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of omega-transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17, *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 66 (2010) 923–925. <https://doi.org/10.1107/S1744309110021573>.

- [187] ω -amino acid:pyruvate transaminase from *Alcaligenes denitrificans* Y2k-2: a new catalyst for kinetic resolution of β -amino acids and amines, (n.d.).
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2529-2534.2004>.
- [188] C. Sayer, M.N. Isupov, A. Westlake, J.A. Littlechild, Structural studies of *Pseudomonas* and *Chromobacterium* ω -aminotransferases provide insights into their differing substrate specificity, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 69 (2013) 564–576.
<https://doi.org/10.1107/S0907444912051670>.
- [189] J. Kim, D. Kyung, H. Yun, B.-K. Cho, J.-H. Seo, M. Cha, B.-G. Kim, Cloning and characterization of a novel β -transaminase from *Mesorhizobium* sp. Strain LUK: a new biocatalyst for the synthesis of enantiomerically pure β -amino acids, *Appl. Environ. Microbiol.* (2007). <https://doi.org/10.1128/AEM.02119-06>.
- [190] Structural dynamics of the transaminase active site revealed by the crystal structure of a co-factor free omega-transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17 | *Scientific Reports*, (n.d.). <https://www.nature.com/articles/s41598-018-29846-0> (accessed May 4, 2022).
- [191] Crystal structure of an (R)-selective ω -transaminase from *Aspergillus terreus* | *PLOS ONE*, (n.d.).
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0087350> (accessed June 12, 2022).
- [192] T. Linder, Phenotypical characterisation of a putative ω -amino acid transaminase in the yeast *Scheffersomyces stipitis*, *Arch. Microbiol.* 201 (2019) 185–192.
<https://doi.org/10.1007/s00203-018-1608-x>.
- [193] G. Andersen, B. Andersen, D. Dobritzsch, K.D. Schnackerz, J. Piškur, A gene duplication led to specialized γ -aminobutyrate and β -alanine aminotransferase in yeast, *FEBS J.* 274 (2007) 1804–1817. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05729.x>.
- [194] ShowDocument-File.pdf, (n.d.).
https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-DE-Site/de_DE/-/EUR/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA_CHEM-100765&DocumentId=100765_SDS_DE_DE.PDF&DocumentType=MSD&Language=DE&Country=DE (accessed July 23, 2022).
- [195] T. Tatusova, M. DiCuccio, A. Badretdin, V. Chetvernin, E.P. Nawrocki, L. Zaslavsky, A. Lomsadze, K.D. Pruitt, M. Borodovsky, J. Ostell, NCBI prokaryotic genome annotation pipeline, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) 6614–6624.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>.
- [196] D.H. Haft, M. DiCuccio, A. Badretdin, V. Brover, V. Chetvernin, K. O’Neill, W. Li, F. Chitsaz, M.K. Derbyshire, N.R. Gonzales, M. Gwadz, F. Lu, G.H. Marchler, J.S. Song, N. Thanki, R.A. Yamashita, C. Zheng, F. Thibaud-Nissen, L.Y. Geer, A. Marchler-Bauer, K.D. Pruitt, RefSeq: an update on prokaryotic genome annotation and curation, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) D851–D860. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1068>.
- [197] U. Kaulmann, K. Smithies, M.E.B. Smith, H.C. Hailles, J.M. Ward, Substrate spectrum of ω -transaminase from *Chromobacterium violaceum* DSM30191 and its potential for biocatalysis, *Enzyme Microb. Technol.* 41 (2007) 628–637.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.05.011>.
- [198] F. Steffen-Munsberg, C. Vickers, A. Thontowi, S. Schätzle, T. Meinhardt, M. Svedendahl Humble, H. Land, P. Berglund, U.T. Bornscheuer, M. Höhne, Revealing the structural basis of promiscuous amine transaminase activity, *ChemCatChem.* 5 (2013) 154–157.
<https://doi.org/10.1002/cctc.201200545>.

Literatur

- [199] S. Ōmura, A. Nakagawa, K. Shibata, H. Sano, The structure of hitachimycin, a novel macrocyclic lactam involving β -phenylalanine, *Tetrahedron Lett.* 23 (1982) 4713–4716. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)85694-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)85694-4).
- [200] D.J. Korz, U. Rinas, K. Hellmuth, E.A. Sanders, W.-D. Deckwer, Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.* 39 (1995) 59–65. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(94\)00143-Z](https://doi.org/10.1016/0168-1656(94)00143-Z).
- [201] T. Matsui, H. Yokota, S. Sato, S. Mukataka, J. Takahashi, Pressurized culture of *Escherichia coli* for a high concentration, *Agric. Biol. Chem.* 53 (1989) 2115–2120. <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869644>.
- [202] H. Märkl, C. Zenneck, A.Ch. Dubach, J.C. Ogbonna, Cultivation of *Escherichia coli* to high cell densities in a dialysis reactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39 (1993) 48–52. <https://doi.org/10.1007/BF00166847>.
- [203] Full article: Identification of β -phenylalanine as a non-protein amino acid in cultivated rice, *Oryza sativa*, (n.d.). <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19420889.2015.1086045> (accessed July 13, 2022).

Anhang

Gensequenz von VboTA

CAT**ATG**ACCACTGCGATTGACCAGGCACTGGCACAAGCGCATCAGCGCTTCACGGATGGCAACCCGG
AATCGCTGCGTCGCTTCGAAGCGCAAACCCGTTATATGCCGGGTGCGAACAGTCGCTCGGTTCTGTT
CTATGCCCCATTTCCGTTGACCATCGCGAAAGGTGAAGGCGCATCACTGTGGGACGCAGATGGCCAT
CGCTACACGGACTTTATCGCGGAGTATACGGCTGGCGTGTATGGTCACTCTGCCCCAGAAATCCGGG
AAGCGGTCATTGAGGCGATGCAGGGTGGTATCAATCTCACTGGCCACAACCTGCTGGAAGGCCGTCT
GGCTCAGACCATCTGCGAACGCTTTCCTCAGGTGCGAGCAGCTCCGTTTCACCAATAGCGGCACGGAA
GCGAATCTTATGGCTCTGACAGCTGCGTTGCGTTTTACCGGTCGTCGCAAGATTGTGGTGTCTTCTGG
CGGGTATCATGGTGGGGTACTGGGATTTGGGGACCAACCCTCTCCGACCACAGTGCCGTTTGACTTT
CTGGTCTCCCGTACAACGACGCCGATACTGCACGCGCCAAATCGACGAACATGGTGC GGATATTG
CAGCGATCCTGGTGGAAACCGATGCAAGGCGCCAGCGGGTGTATTCCGGGTGGCCGTGAGTTCCTGC
AGACCCTGCGTGGTGGGGCAACACGCGTTGGAGCATTACTCGTGTTCGATGAGGTAATGACGTCGC
GGTAGGTCCCCATGGCTTAGCGAATGGACTGGGCATTCTGTCGGATCTGACTACCCTTGGCAAATA
CATTGGTGGCGGAATGTCCTTTGGAGCCTTTGGTGGTCGCGCGGATGTGATGGCGCAGTTCGATCCG
CGTACCGGTGCCCTTGCCATAGTGGCACGTTCAACAACAATGTCATGACCATGGCAGCGGGCTACG
CTGGCCTGACACAGCTGTTTACGCCTGAAGCCGCCGCTGCCTTGGCCGAACGTGGCGAGGCGATGC
GTTCCCGCTTAAACGCTCTTTGCGAACGCGAAGGCGTTGCCATGCAATTTACCGGCGTTGGCAGCCT
GATGAATGCCCACTTCTGCGCGGTGAAGTACGCCGTGTTGCGGATCTGGCGGCTGTAGATGGTCG
GTTACGCCAGTTGCTGTTCTTTACCTTCTGAAAGAGGGGATTTACACTAGCCCACGCGGGTTTGTG
TTCTGAGTCTGCCTCTCAGCGCTCAGGATATTGATCGCTATGTCGCAGCAGTCGGATCCTTCATTGAA
GCGTGTGCGCCGTTATTGCTGTCAGCAGGGCTCGAG

Gensequenz von StoTA

ATGAGCAGCGGCAGCCGACGAGGTGGGAACGTTTACCGGGAGCCGGGGTTCGGCCGCGGCGGACCT
GTTTCGAGCGAGCACGCCGGGTGCTCCCTGGAGGCAACACCCGCACAACCGTCTACAGCGCGCCCTA
CCCGCCCTACGCGGCCCGGGGCCGTGGCGCGGTTATCGTCGATGCCGACGGGGAGGAACGGCTCG
ACTTCGTCATAACTACACCGCGCTCATCCACGGCCACGCCGACCCGGACATCAACGAGGCGGTCAT
CCGCCAGCTCGCGGACGGCGTGGCCTTCGCGATGCCGACCGAACACGAGATCGCCCTCGCGGAGCT
GCTCACGGAGCGCGTGCCGTCGCTGCAGCAGGTGCGCTTACCAACTCTGGTACCGAGGCGGTGAT
GATGGCGATCAAGGCGGCGCGCCTTACACGGGTGCGCCGCGGATCGCGAAGTTCGACGGCTGCTA
CCACGGTTCCTACGACTTCGAGAGGTGAGCACGCAGTCCAGTGGGAAACCCGGGGAAAGACGGGTT
CCCTGTGGCGACGCCGTACACCGGCGGCACACCTCAGGCAGTGTGGACTCGGTGGTGGTCTCCCC
TTCAACGACATCGACGGGACCGAGCGGCTGATCGAGCAGCACCGGGACGAGCTGGCGGCGGTGCT
GATCGACCCGAACCCGCGCAGCCTCGGGCTGTACCCGGCCGAACCGGCATTCTCCAGCGGCTGCG
AGAGATCACTCGTGCCTACGGCATCGTGTGATCTTCGACGAGGTCATCTCGCTCCGCTCGGACTAC
GGCGGGATGCAGTCGGTGTCTCGGGGTGACTCCGGACCTGACGGCGATGGGGAAAGATCATCGGCGG
TGCTTCCCGGTTGGGGCAGTAGGAGGCTCGGCCGAGGTGATGTCGGTCTTCGACCCAACCGGCGG
ACCGCCGCGGGCGCCGCACGGGGGACGTTCAATGCCAACCTGTGACGATGGTCGCCGGGTTGAC
GGCGATGCGCAAGCTGACACCTGCCGAGTTCGACCGGCTCGCTACCCTGGGGCAACAGTTACGGGC
GGGCGTCGAGGAGGTGCTGCGCGAGGCTGGCGTGCCGGGACAGGTGACGGGATACGGCTCGCTCT
TCCACATCCACCTGCACCAGCGACCGCTCGCGGATTACCGCAACAGCGTCCTCTCGGCACAGGAGCG

Anhang

CGCTTTCGTCGGGCGCGTCCACGAGGCGCTGATGGGACGCGGCATCTTCATCACCCCGGCGCTGTTC
GGTTGCCTCTCGACGCCGATGGGCGTGCCGGAGGTGGAGGCGTTCGTGGACGCCTTCGCCGCCGCA
CTCCAGGACGCGCGGGG

Gensequenz von LsoTA

CATATGGAGAAACGCTACGAAAACAGCAAACCTGGCCTTCGAGAAAGCAGTAGATCTGATGCCCGGT
GGGGTAAATAGCCCAGTGCGTGCGTTTAAAAGCGTCAACATGGATCCGATCTTCATGGAATCCGGTA
AAGGTGCGATGATCAAAGACATCGATGGCAACGAATACATTGACTACGTGCTTTCATGGGGCCCGCT
CATCTTGGGCCATGCAGATGAGGATGTAGTTGAGGGTATCCAGCGTGTTGCCGCCACCGGTAGTTCC
TTTGGCGCGCCTACCTTAGCCGAGAACGAATTGGCAGAGCTGGTCATCGATCGCGTACCCTCGATCG
AGATGATTGCGATGTTTTCTCAGGGACCGAAGCGACTATGTCTGCCCTGCGTCTTGCTCGTGGCTAT
ACAGGCCGCAACATTATTATGAAATTTGAAGGCTGCTATCACGGTCATGGCGATTCCCTCCTGATCAA
AGCTGGCAGTGGCGTGGCCACCTTAGGGTTGCCGATTCTCCGGGTGTTCCGGAAAGCATTGCGCGC
AATACCATTACTGTGCCGTATAACGACCTGGAATCGGTCAAGCTGGCCATGAACGAATACGGCGATG
ATATTGCGGCACTGATCGTAGAACCGGTTGCCGGCAATATGGGTGTGGTTCCGCCGGAACCGGGTTT
CCTGGAAGGACTGCGGGAACCTGACGACCGAAAATGGCTCATTACTGATCTTTGACGAAGTTATGACC
GGTTTTCGCGTGGGGTATGAATGCGCACAAGGCTATTATGACGTGACTCCGGACATTACGTGTCTGG
GAAAAGTGATTGGTGGAGGGCTGCCAGTCGGAGCTTATGGCGGTAGCAAGGAAATCATGAGCCAG
ATTGCGCCTAGTGGCACGGTCTATCAAGCGGGTACTTTATCGGGTAATCCGCTGGCCATGACCGCCG
GAATTGAAACGCTCAAGAACTTACACCGGCAAGTTACGAATACTTTAACAACTCGGTGACCAGTT
GGAAGCAGGCTTTCGTGAGGCAGCTGAAAAGTACAATATTCCTCATAACCGTCAATCGCGCTGGTTCT
ATGATTGGCTTCTTCTTACGAATGAGAAAGTGGTGAACCTATGATAAGGCTAAAACCTCCGATCTGG
AACTGTTTTCGGAGTACTATCGCCTGATGGCGGAAGAGGGCATTTCCTGCCACCAAGCCAGTTTGA
AGGGATGTTTCTTCTGACGCGCATACGGAAGAGCACATTGCCAAAACAGTTGAAGCGTTTCACAAA
GTGTTTCGCGAAATTAGCGCGGCTCGAG

Gensequenz von PmoTA

CATATGAAAATGCAGGAGGAAATCCTGTTGAGCGAGAAAACCAAGAAATCTGCGTCGCTCTTCAACA
AAGCCTGTGAAGTTATTCTGGCGGTGTTACCGCCAATATCAAATACTTTGATCCGCACCCATTGATG
ATGGAAAAGGGCAAAGGATCCAACTGTTTGATGTAGATGGCAATGAGTACATTGACTATCTGCTGT
GCTACGGCGCACTGATACTGGGTCATGGCCATCCACAGGTCTTTGAGGCAGTGACGAAACAGATGA
TGGAGTCAGGGACCACGATTTTCGGTACACCTCACAAAATGGAAACGACCATGGCGGAGAAACTGG
TCGAACTGTATCCCGCATTGAAATGGTGCCTATAACCAATAGTGGACTGGAAGCGACCTTATTGGC
GATTCGTACAGCCGTGGCATAACGGGCAAGGAGAAAATCGCGAAATTTGAAGGCCACTATCATGG
CGGGTATGACCAGGTGCTGGTAAGCGTGAACCCTGACATTGATAAAGCGGGTGAAGCCACTATTCC
GAAAGCAGTTGGTGAAGCCGTGGCTTACCGAACTACTATCTCGACAATACCGTCACTTCTCCCGTTTA
ACGACTTAGAAGCGACGGAGAAAATACTGAAAGCCCATGCCACGAACTGGCAGGTGTCATTCTGG

AACCGATCCAAGGCGGGTTTATTCCGGCGGATCAAGATTTTCATGACAGGTCTACGCAAATTACTGA
AGAGCTGGACATTGTATTAATCTTCGACGAAGTGAAAACCGGCTTTCGTATCAGTTTGGGAGGGGCT
CAGAAAACGTATGGGATTAACCGGATATCACCGCCCTTGGTAAAGTCCTGGGCGGTGGTTTCCCAG
TAGGCGCGATTGGCGGCAAGAAGGACATTATGATGATTTCAAGCGCTAGAGGAGGCCGCGATATCC
TCACAGCTGGTGCTGAAAACAAGAACAACAGGATCCCCTGTATCACTCGGGCACTTACAATGGGCA
TCCGACCATTCTTGCCGCGGGGCTTGCTACCATCAATGTTTTGGAACAGAAAGGAACGATGGATCAG
CTGTTTGCGAATACCCAACCTGTTACGTGATCAACTTGAAGAAGTGATAAAAGCCACGGTCTGACTAT
GCAGACGGTTGGTATGGGTAGTATCTTCAACATTATCCTAGGTGAAGGTAACATCAAGAACTATCGC
GATATGTCGAAAGCGGATACTAACTGCGCGAAAAGATCGATTACGAACTGCTGAAATTAGGCGTG
TACACCAAACCGTTGAATCGCTATTCCATGTCTGTGGTGCATACCAAAGAGGACATACGACGTACGG
TTGCAGCACATGATGAAGCCATCCAACGGGTTATCAACAAGCTCGAG

Genesequenz von BroTA1

ATGGCAGGTGCAGCTTTATGGAGACAGTTGAAAGCCTATCAAGTGTGGAGCCAACACAGATGTTG
GAAAAACGATCATTTTCATCAGCGCTTTCGCAAGTACCTTGCCGAGCACCAGTCTGACCCTGTTTGGTAT
TTGAAGCCAATTCAAACGGGAGATATTTATGATACCAGTCACGTAAAAAATTTACGTCTTCTGGTAC
CCTTTCGACGCAGCACCTAGTTCATTACCCTCGCCCTGTTCTCCTCATGTCTCTGCACGAATGCCGGG
CTGTAAGCCAGTTTCAGACGAAAAAGTTGCTAGCTTGACCTTGAAGCTCTACAATCCTACGCCGACC
ACGGCCCAGGCTGGGCAATTGTAGAACTGCTGGTGGAGTGTTGTCACCAGGCCCTTCAAATCTCT
TCAAGCGGACATCTATCGACCGCTTCGGCTCCCCAGTCTACTCATTGCAGATCCCAAGTTAGGAGGTA
TTTCTTCCACAATCTCTGCGTTCGAGTCTCTTAAGTTGAGAGGCTATGATGTTGCATCGATTATTACCT
TTCTCAACAGTGACACTGAGAATCATTCTACTTCAAGGAGTACTTTGATAATGCGGTAGTTTTACCTC
CTCCCCGCCTTTTTCTAACAATGACACTGCCTCTATGCAGGCTTATTATAGCGATCTAGTCAAATGC
CGGAATTCTCATCATTGGTGCGCCTACTGGATCAAATTCACAAAGATAGGCTCTCCGAACTCGATAAC
ATGAGCACTGACGCAGAAAAACAATTTGGTACCCATTTTCACAGCACAAAGAGATAAATAGGGACA
CAATTGTAACGGTTGATTCTGCATATAAAGACTCCTTTCAAACGTTGAGAAAGGGCTCTACTGAACCT
AGCGAGAATGCGCTGGCCTCTTCTTCGATGGATCAGCAAGCTGGTGGACACAAGGCTTGGGACAT
GGGAATCCTAAGCTTGCCTTAACTGCTGCACATGCCGCTGGAAGATACGGACACATGATTTTGGCAA
ACACAATTCATGAGCCGGCTCTGAACTAGCTAAGAAAATACTCGAAGTTGTCAATAATGAAAAGTT
ACGAAGAGTTTTCTACTCTGACAATGGCAGCACTGGTATTGAGGTTGCGGTTAAAATGGCTATGAAA
GCAACTTGCGAAAAATATGGCTGGGACGTATCTGATGGATCAATTGGTATTCTTGGGCTCAAAGAA
GTTACCATGGGGATACCATCGGATCGATGGATTGCTCTGAACCATCTGTTTACAGTAAAAAGGTCAC
CTGGTATTCTGGGAGGGGTGCTTGGCTTGAGTATCCACAGTGTTGCTAAAAACGGAAAGTGGGT
CGTCGAATCTCCTGAGCCACTGAACGAAGAGCTTGACTCCAAGGTATTCTCGACGATTGATGAAGTC
TATGACCTTTCAAACCGAGATCCTGGTCCCTATAAGGAATATATCAGGAAAGAACTGCAAAAACCTATT
GGATAAAGGGTTGAAATTTGGTGCTTCTGCTTGAGCCAGCATTGCTAGGGGCAGGAGGTATGGT
AGCGGTAGATCCGCTGTTCCAGAAAGCACTAGTTGACGTTGTACGGGAAACAGAGTTTGGCAAAG
CATCTCCGATGGGTCTTCATGGTCAGGATTGCCTGTGATCTGTGACGAGGTTTTTAGTGGCCTTTATC
GCTTAGGTAGGGCAAGCGCTTCTCCCTTGTGGAATTGATCCTGAAATTTCCGTTTCATGCTAAGCTT
CTCACTGGAGGTCTTCTCCCTTGAGTGTACATTAGCGTCCGAGGACATTTTTTCAGACCTTCATCAGT
TCGGACAAAGCCGATGCTTTACTTCATGGACACTCATACTGCACACCCAGTAGGATGCTCAGTTGC
ACTTGAATCACTAGAGCAGTTACAGTCATTAGCCAGTTCGTGGGGTCCAGAAAACCTATCGTGTCTT
TTGGTCTGAGGAGTCTTGACTAGGGTGTCCAATTATTCAAATGTAGAGGGGCGCTTTTGAATGGG

Anhang

ATCTGTTCTAGCCATACACATGAAGGATACTTCTCCTGGATATACTTCGACAGTGGCTTCAAGAATTC
ACAATCACTTGCGCACAATTCAGGACGGGGAAAATATTCATACGAGACCTCTAGGAAGCGTACTCTA
TCTCATGTGTGGTCAAACGACGATCCCAGGAGAAGTACGTAAATTAGAGAAGAAGATAGAAGAGGC
ATTCTCT

Gensequenz von BroTA2

ATGAGCACAATCACATCTGCACAGGCTATTGAGTTGGAGGAGAAGCACTCTGCTCACAACCTACCACC
CCATTCCAGTGGTGTTCGCCAAGGGAAAGGGTGTCTCACGTTTGGGATCCTGAGGGAAAGCAGTATC
TGGACTTTCTGTCTGCTTACTCTGCCGTCAACCAGGGACACTGCCACCCCAAGATCATCCAGGCCCTC
ACTGAGCAGGCCAGAAAGCTCACTCTGAGCTCGCGAGCATTCCACAACGATGTTTTTGGCCAGTTTG
CCAAGTACGTGACCGAGTACTTTGGTTACGACATGGTGCTGCCCATGAACACTGGAGCTGAGGCCGT
CGAGACTGCCATCAAGCTTGCCCGAAAGTGGGGATACATGAAGAAGGGCATTCCCGTTGACCAGGC
CCTTGTTCTGAGCGCAACTGAGAACTTCCACGGACGAACTCTGGCCGTGGTTTCCATGTCCACCGATC
CTGAGGCCAAGGAGTACTATGGACCCTACCTGCAGAATGTAGGACCTACTATCCCTGGAAGCAACAA
GCCCCTTCGATACAACAACATTGGTGATTTGGAGGAGGCCTTTGCCGCTGCCGGAGACAAGATTGCC
GCCTTTTTGGTCGAGCCCATCCAGGGAGAGGCCGGAATTGTGGTGCCCGACGATGCCTACCTGCAAA
AGGTTGCTGAGCTGTGCAAGAAGCACAATGTGCTGTTTATTGCTGACGAGATTCAGACTGGAATTGC
CCGAACTGGAAAGATGCTCGCAGTAGACCACGTCGGAGTGCCTGATGCTGTTCTGCTCGGAAA
GGCCATCTCTGGAGGAGTGACCCAGTATCTGCCGTACTTGCAGACCGTGATGTGATGCTGTGCATC
CAGCCAGGAACGCACGGATCTACATACGGAGGAAACCCTTTTCGTGCGCCGTGGCCATTGCTGCCT
TGGAGGTTGTTAAGGAGGAGAAGTTGGCCGACCGTGCTGCTAAGCTCGGAGAGCGAATGCGCGAG
GGACTCAAGCCTCTGTTGGAGACTGGAATTGTCACTGAGGTCCGAGGCCGAGGTCTGCTTAATGCCA
TTGTCATTGACTCTTCCAAGGCCAATGGACGCTCTGCTTGGGACCTGTGCATGCTCATGAAGGACCA
GGGAGTGTGGCCAAGCCACTCACGAGAACATTATTCGATTGGCTCCTCCTTTGGTCATTTCTGAGG
AGGACGTTGACAAGGGACTTGAGGTCATCAAGGACTGTGTTAGCAAGCTTCCCAATGCCCTCACGC
CCAGCAC

Gensequenz von BroTA3

ATGCAGTCATTTACTCGAACTGTTGCTCGCTCAGCGAAGCGAGGGTACTCGACCAAATCATTTTTGGA
AACTCACAACCCATTCTCGGTCACTACTTACGCCGACCTGACATTGTGATTTCGACAGGGTCGAGGAT
CTCACTTGTGGGATACTGATGAAAGAAGTACATTGACTTTACTGCAGGAATTGCTGTTACTGGACT
GGGCCACTGTGATGACGAGGTGGCCGACATCATCCGACCAGTCAAAGACTTTGATCCATGCATCA
AACTTGTATTATAACGAATGGACTCCGCGACTACAAAAGGCAATTGTGGAACTACTTTAAATGCTG
GTGGAATGCATAATGCCTCCCGAGTGTTTTTGGCAAACCTCGGGTAGTGAAGCTAATGAGGCGGCTCT
GAAGTTTGCTCGTAAACACGGGAACAATATCAGTGGTGAAAAGACCGAAATCGTATCCTTCAATCGC
TCTTCCATGGACGAACTATGGGCGCCCTGACCGTGACCGCCAATCCAAAGTACACTGACCCCTTCCG
ACCTTTGATTCCAGGCGTCAAGCACGGTAACGTTAACGATATTGAGGCAATTGACTCGCTGGTCACT
GACAAGACTTGCGCCGTTATTGTGGAGCCTATTCAAGCCGAAGGAGGTATTTACGTGTGTGACGCCG
ACTTTTTGGTAGCATTGAAGAAGCGATGTTCTCAAGTGGGAGCTCTGCTTATTTACGATGAAATCCAG
TGTGGTCTGGGACGAACTGGAAAGCTGTGGGCTCATCAATGGCTGCCAAAGGAGGCACACCCTGAT
ATCCTTACCATGGCCAAGGCCCTTGGTAACGGGTACCCATTGGAGCCACTCTGGTTACTGAAGAAG
TCGAAAAGGCACTAAATGTCCGAGATCATGGTACAACCTTATGGAGGAAACCCTCTCGGATGCCGGG
TAGCCACCATGTGCTGTCCCGATTGGCATCTCCTGAGATCCAGCAAAATGTCAATACCGTATCACAG
TTGTTCCAAGAACGCCTTGAAGAAGCTACAGCAAAGTTCCCTGATACTATTACTGAAATTCGTGGAAA

Anhang

GGGTCTGCTGTTGGGCTTGCAACTCAGCAAGGACCCCGCTCCAATTCTTGCCAAAGCCCGAGAGGCT
GGCCTGCTTGCCATCACCTGTGGTGTAAACACCATTGTTTTGTGCCAGCCCTGAATATCCCTACTGA
AGTTGCCAAGGAGGGATTGGACATTCTTGAGTCAGTATTTGAG

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde. Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe.

Danksagung

Danksagung

Diese Arbeit wurde von Oktober 2018 bis Dezember 2021 in den Arbeitsgruppen Hefegenetik und molekulare Pflanzenernährung unter der fachlichen Leitung von Prof. Dr. Kunze angefertigt.

Ich möchte meinen Dank an alle aussprechen, die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren.

Zuerst möchte ich Prof. Kunze und Prof. von Wirén für die Möglichkeit, in ihren Arbeitsgruppen arbeiten zu können, und für ihre Unterstützung danken. In diesem Rahmen geht mein Dank auch an das Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben für die Bereitstellung hervorragender Infrastruktur für die Forschung, sowie an die AiF, die das Projekt unter der Fördernummer KS4061308AJ7 finanziert hat.

Vielen Dank auch an Martin Giersberg und Falko Matthes, die zwischenzeitlich die AG Hefegenetik geleitet haben und stets mit guten Ratschlägen zur Stelle waren.

Des Weiteren danke ich Prof. Schüller für seine Bereitschaft mein Betreuer an der Universität Greifswald zu sein.

Außerdem möchte ich Prof. Bode für das kritische Lesen meiner Manuskripte danken.

Mein Dank geht auch an die Kooperationspartner Dr. Rauter und Dr. Vorbrodt von Orgentis Chemicals für die enge und stets fruchtbare Zusammenarbeit in diesem Projekt.

Danksagung

Bei Dr. Hajirezaei und Nicole Schaefer bedanke ich mich für das Messen der Proben für die K_m Werte und Dr. D'Auria und Benjamin Chavez für die Hilfe bei der Messung an der Äkta.

Vielen Dank auch an Ina Lemke für die zahlreichen Klonierungen und Aktivitätstests, die sie durchgeführt hat.

André Volkov danke ich für die Korrektur der Rechtschreibung und der Kommasetzung.

Zum Schluss danke ich noch meinen Eltern, ohne deren Unterstützung mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.