

Identifizierung aktiver und enantioselektiver Hydrolasen für den industriellen Einsatz

Inauguraldissertation

zur
Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von

Markus Baumann

geboren am 6. April 1972
in Esslingen am Neckar

Greifswald

2002

Dekan: Prof. Dr. Klaus Fesser

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe T. Bornscheuer
Institut für Chemie & Biochemie
Abteilung für Technische Chemie & Biotechnologie
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

2. Gutachter: Prof. Dr. Rolf D. Schmid
Institut für Technische Biochemie
Universität Stuttgart

Tag des Promotionskolloquiums: 04. September 2002

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine andere als die darin angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Lichtenwald, den 26. September 2002

(Markus Baumann)

Danksagung

Prof. Uwe Bornscheuer danke ich für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas, das mir eine umfassende Einarbeitung in die aktuellen Fragestellungen der modernen Biotechnologie ermöglichte. Darüber hinaus danke ich ihm für die ausgezeichnete Betreuung, die schnellen 'e-mail-Korrekturen' sowie die stetige, motivierende Unterstützung.

Prof. Rolf Schmid danke ich für die freundliche Aufnahme und die hervorragenden Arbeitsbedingungen an seinem Institut. Außerdem danke ich ihm für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Den Projektpartnern BASF Ludwigshafen und dem Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst Baden-Württemberg für die Finanzierung. Insbesondere möchte ich Herrn Dr. Stürmer und PD Dr. Hauer (BASF AG) für ihre fachliche Diskussionsbereitschaft hervorheben.

Allen Mitgliedern des Instituts für Technische Biochemie (Stuttgart) und dem Institut für Technische Chemie und Biotechnologie (Greifswald), die durch ihre freundschaftliche Zusammenarbeit zum guten Arbeitsklima beigetragen haben. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. Erik Henke für die geduldige Vermittlung der Arbeitsmethoden und seine Bereitschaft für fachliche Diskussionen danken. Außerdem danke ich Frau Dr. Ulrike Schmid für die stets freundliche Unterstützung.

Hubert Zipper und Katrin Lämmle vom Fraunhofer Institut Stuttgart sowie Andreas Witt vom Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart möchte ich für die stets gute Zusammenarbeit und die wertvollen Hinweise danken.

Der Messabteilung des Instituts für Organische Chemie der Universität Stuttgart für die Aufnahme der NMR-Spektren sowie für die Elementaranalysen.

Meinen Eltern Anna Baumann und Helmut Baumann, die mich immer in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Abkürzungen

a	Jahr(e)	LB	Luria Bertani (Flüssigmedium)
AC	primary accession number der Swissprot Datenbank	log-Wert	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
APS	Ammoniumperoxodisulfat	m	Meter bzw. Multipllett-Aufspaltung bei NMR-Spektroskopie
ATP	Adenosintriphosphat	M	Molar
ATCC	American Type Culture Collection	mA	Milliampere
BAC	künstliches Bakterienchromosom	min	Minute(n)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	mm	Millimeter
BPB	Bromphenolblau	mM	Millimolar
bps	Basenpaare	mL	Milliliter
BSA	Rinderserumalbumin	MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
BSE	Esterase aus <i>Bacillus stearothermophilus</i>	% (M/V)	Massenprozent
c	Konzentration	NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidiert)
C	Celsius	NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
CAL B	Lipase B aus <i>Candida antarctica</i>	n.b.	nicht bestimmt
<i>cfu</i>	Kolonien bildende Einheit(en)	Ni-NTA	Nickel-Nitriltriacetat
CoA	Coenzym A	nm	Nanometer
c.-f.	immobilisiert (bei Enzympräparationen)	NMR	Kernspin-Resonanz
cm	Zentimeter	OD _x	optische Dichte bei x nm
δ	chemische Verschiebung in ppm (NMR-Spektroskopie)	<i>orf</i>	offenes Leseraster
Da	Dalton	<i>p</i>	para
DC	Dünnschichtchromatographie	<i>p.a.</i>	pro analysi
DEAE	Diethylaminoethyl	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
deriv.	derivatisiert	PCR	Polymerasenkettenreaktion
DMF	Dimethylformamid	pdb	Eintrag der 3D-Struktur in Protein-Daten-Bank
DMSO	Dimethylsulfoxid	pk _s -Wert	neg. dek. Logarithmus der Säurekonstante
DNA	Desoxyribonucleinsäure	pNPA	<i>p</i> -Nitrophenylacetat
dNTP	2'-Desoxynucleotid 5'-triphosphat	PEG	Polyethylenglycol
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonucleinsäure	PFE	Esterase I aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	PFE II	Esterase II aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>
DTT	1,4-Dithio DL-threitol (Cleland Reagenz)	ppm	parts per million
<i>E_{app}</i>	scheinbare Enantioselektivität	psi	pound force/square inch (1 psi = 6,895 kPa)
<i>E_{true}</i>	wahre Enantioselektivität	Ramp	Temperaturerhöhung pro Minute bei GC
EC	Enzyme Commission	RNA	Ribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	rRNA	Ribosomale RNA
% <i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss in Prozent	RT	Raumtemperatur
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	s	Sekunde(n) bzw. Singulett bei NMR-Spektroskopie
<i>ep</i> PCR	<i>error-prone</i> PCR (fehlerhafte PCR)	SDS	Natriumlaurylsulfat
FID	Flammen-Ionisations-Detektor	ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonucleinsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	t	Tonne(n)
g	Gramm	T	Temperatur
<i>g</i>	Erdbeschleunigung	TBME	<i>tert.</i> -Butylmethylether
GC	Gaschromatographie	TBDMS	<i>tert.</i> -Butyldimethylsilyl
h	Stunde(n)	TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
HTS	Hochdurchsatz-Screening	U	Unit(s)
IEF	Isoelektrische Fokussierung	Upm	Umdrehungen pro min
IMAC	Metallaffinitäts Chromatographie	UV	Ultraviolett
IR	Infrarot	V	Volt
Iso	Isothermzeit bei der GC-Analyse	VIS	sichtbarer Bereich des Lichts
kB	1000 Basenpaare	V/V	Volumenverhältnis
kDa	1000 Dalton	% (V/V)	Volumenprozent
kPa	1000 Pascal	Å	Ångström
L	Liter	µg	Mikrogramm
		µL	Mikroliter

Gliederung

1	ALLGEMEINER TEIL	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Industrielle Biotransformationen	3
1.3	Hydrolasen in der organischen Synthese	6
1.4	Übersicht über die Enzymklasse der Hydrolasen	8
1.4.1	Struktur und Mechanismus	9
1.4.2	Lipasen (Triacylglycerol-Acylhydrolasen)	12
1.4.3	Esterasen (Carboxylester-Hydrolasen)	12
1.4.3.1	Mikrobielle Esterasen	13
1.4.3.1.1	Esterase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	13
1.4.3.1.2	Weitere mikrobielle Esterasen	15
1.4.4	Proteasen mit Esterase-Aktivität	16
1.5	Enzymkinetik	16
1.5.1	<i>Steady-state</i> -Kinetik	16
1.5.2	Enantioselektivität	17
1.5.2.1	Grundlagen der Stereoselektivität	17
1.5.2.2	Berechnung der Enantioselektivität	18
1.5.2.2.1	Irreversible Reaktionen	19
1.5.2.2.2	Reversible Reaktionen	20
1.5.2.2.3	Bedeutung der Enantioselektivität für praktische Anwendungen	21
1.5.2.3	Vorhersage und Abschätzung der Enantioselektivität	22
1.5.2.3.1	Kazlauskas-Regel	22
1.5.2.3.2	Schätzwert für die Enantioselektivität (<i>Quick E</i>)	23
1.6	Metallaffinitäts-Chromatographie	24
1.7	Entwicklung eines biokatalytischen Prozesses	26
1.7.1	Auswahl des Biokatalysators	28
1.7.1.1	Traditionelle Enzyme	28
1.7.1.2	Identifizierung neuer Enzyme	29
1.7.1.3	Biotechnologische Bedeutung extremophiler Mikroorganismen	32
1.7.2	Optimierung einer biokatalytischen Reaktion	33
1.7.2.1	Substrat-Engineering	34
1.7.2.2	Medien-Engineering	35
1.7.2.3	Modifikation des Biokatalysators	37
1.7.3	Molekularbiologische Methoden zur Verbesserung des Enzyms	39
1.7.3.1	Rationales Proteindesign	39
1.7.3.2	Gerichtete Evolution	41
1.7.3.3	Rationaler Ansatz vs. Kombinatorik	43
1.8	Hochdurchsatz-Testsysteme zur Identifizierung geeigneter Enzyme	45
1.8.1	Selektion	46
1.8.2	Screening	47
2	ZIELSETZUNG	51

3	ERGEBNISSE	57
3.1	Chemische Synthesen und Herstellung der rekombinanten Esterasen.....	57
3.1.1	Chemische Synthesen.....	57
3.1.1.1	Synthese von (<i>R,S</i>)-3-Acetoxy-tetrahydrofuran (3b), (<i>R,S</i>)-Pantolacton-acetat (4b) und (<i>R,S</i>)-3-Butyroxy-but-3-in (1c)	57
3.1.1.2	Synthese der enantiomerenreinen Esterverbindungen.....	57
3.1.2	Herstellung der rekombinanten Esterasen	58
3.2	Testsystem zur Identifizierung aktiver und enantioselektiver Hydrolasen	61
3.2.1	Aufbau des Testsystems	61
3.2.2	1. Stufe: pH-Assay.....	62
3.2.2.1	Prinzip.....	62
3.2.2.2	Durchführung	63
3.2.2.3	Ergebnis.....	65
3.2.3	2. Stufe: Screening.....	66
3.2.3.1	Durchführung	66
3.2.3.2	Ergebnis.....	68
3.3	Optimierung der biokatalytischen Reaktionen	71
3.3.1	Hydrolysen in wässriger Lösung.....	71
3.3.1.1	'Trennung' der Racemate in größerem Maßstab (<i>up-scaling</i>)	71
3.3.1.2	Einfluss des Acylrests bei der 'Trennung' von 2-Hydroxy-but-3-in (1a)	73
3.3.2	Biotransformationen in organischen Lösungsmitteln.....	74
3.3.2.1	Acylierung der Modellverbindungen 1a – 4a	75
3.3.2.2	Einsatz der Esterase I aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> zur Reaktionskatalyse in organischen Lösungsmitteln.....	77
3.3.2.2.1	Einfluss des Reaktionsmediums auf die Enantioselektivität der Esterase I aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	78
3.3.2.2.2	Immobilisierung der Esterase I aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	81
3.4	Entwicklung eines stereoselektiven Hochdurchsatz-Testsystems.....	84
3.4.1	Prinzip.....	84
3.4.2	Evaluierung des Testformats	85
3.4.2.1	Eignung des Testkits zur Bestimmung der Hydrolyseaktivität.....	85
3.4.2.2	Übertragung des Acetat-Assays auf das Mikrotiterplattenformat.....	86
3.4.2.2.1	Testprotokoll zur Bestimmung der Hydrolase-Aktivität.....	86
3.4.2.2.2	Empfindlichkeit und Linearität.....	87
3.4.2.2.3	Übertragbarkeit des Testformats	89
3.4.2.2.4	Bestimmung der scheinbaren Enantioselektivität (E_{app})	90
3.4.2.2.5	Einsatz von Zelllysaten.....	92
3.4.3	Gerichtete Evolution der Esterase I aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	95
3.4.3.1	Erzeugung einer Mutantenbibliothek	95
3.4.3.2	Durchmusterung der Mutantenbibliothek.....	98
4	ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION	100
4.1	Testsystem zur Identifizierung aktiver und enantioselektiver Hydrolasen	100
4.2	Optimierung der biokatalytischen Reaktionen	103
4.3	Entwicklung eines stereoselektiven Hochdurchsatz-Testsystems.....	104

4.4	Zusammenfassung	107
5	MATERIAL UND METHODEN	108
5.1	Geräte und Verbrauchsmittel	108
5.1.1	Biotransformationen und chemische Synthesen	108
5.1.2	Mikrobiologie und Molekulargenetik	109
5.2	Chemikalien und Enzyme	110
5.2.1	Substrate	110
5.2.2	Hydrolasen	111
5.2.2.1	Kommerzielle Hydrolasen	111
5.2.2.2	Rekombinante Esterasen	113
5.2.2.3	Hydrolasen aus thermophilen Mikroorganismen	113
5.2.3	Chemikalien und Enzyme	114
5.3	Lösungen, Medien und Puffer	115
5.3.1	Mikrobiologie und Molekulargenetik	115
5.3.1.1	Medien für <i>E. coli</i>	115
5.3.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA	116
5.3.1.3	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	117
5.3.1.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	117
5.3.1.5	Puffer und Lösungen für weitere Anwendungen	118
5.3.2	Biotransformationen und chemische Synthesen	119
5.3.3	Acetat-Assay	119
5.4	Gaschromatographie	120
5.5	Mikrobiologische und molekulargenetische Techniken und Methoden	121
5.5.1	Stammhaltung, Bakterienanzucht und Expression	121
5.5.1.1	Stammhaltung	121
5.5.1.2	Bakterienanzucht	122
5.5.1.3	Expression der Esterase I aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	122
5.5.1.4	Optimierung des Zellaufschlusses	122
5.5.1.5	Stammhaltung, Bakterienanzucht und Expression in Mikrotiterplatten	123
5.5.2	Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA	123
5.5.2.1	Isolierung und Reinigung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	123
5.5.2.1.1	Schnellisolierung von Plasmid-DNA	123
5.5.2.1.2	Isolierung reiner Plasmid-DNA mit Ionenaustauschersäulen	124
5.5.2.2	Präzipitation von DNA mit Alkohol	125
5.5.2.3	Bestimmung der DNA-Konzentration	126
5.5.3	<i>error-prone</i> PCR	126
5.5.4	Charakterisierung von DNA-Molekülen	128
5.5.4.1	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	128
5.5.4.2	Restriktionsspaltung von DNA	130
5.5.4.3	Sequenzierung	130
5.5.5	Ligation und Transformation in <i>E. coli</i>	133
5.5.5.1	Ligation mit der T4 DNA-Ligase	133
5.5.5.2	Transformation in <i>E. coli</i>	134
5.5.5.2.1	Transformation nach der PEG/DMSO-Methode	134

5.5.5.2.2	Schnell-Transformation (Rubidiumchlorid-Methode)	134
5.5.6	Charakterisierung von Proteinen	135
5.5.6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	135
5.5.6.2	Bestimmung des Proteingehalts	137
5.5.6.3	Aktivitätsmessung von Hydrolasen.....	137
5.5.6.3.1	pNPA-Assay	137
5.5.6.3.2	pH-stat-Assay	138
5.6	Chemische Synthesen.....	139
5.6.1	Synthese von (<i>R,S</i>)-3-Acetoxy-tetrahydrofuran (3b)	139
5.6.2	Synthese von (<i>R,S</i>)-Pantolactonacetat (4b).....	140
5.6.3	Synthese von (<i>R,S</i>)-3-Butyroxyl-but-3-in (1c)	140
5.6.4	Synthese der enantiomerenreinen Acetate (1b – 4b) und des Butyrats (1c)	140
5.7	Testsysteme	141
5.7.1	pH-Assay	141
5.7.1.1	Selektion aktiver Hydrolasen	141
5.7.1.2	Testreaktionen im mg-Maßstab zur Bestimmung der Enantioselektivität	141
5.7.2	Acetat-Assay.....	142
5.7.2.1	Hydrolyse von 1-Phenylethylacetat (5b) im mL-Maßstab.....	142
5.7.2.2	Allg. Vorschrift zur Bestimmung von Essigsäure im Mikrotiterplattenformat....	142
5.7.2.3	Bestimmung der Aktivität von Hydrolase-haltigen Kulturüberständen.....	142
5.7.2.4	Aufreinigung der Esterase I aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> an einer Ni-NTA Matrix im Mikrotiterplattenformat	143
5.8	Biotransformationen	143
5.8.1	Allgemeines Verfahren für die enantioselektive Hydrolyse im g-Maßstab	143
5.8.2	Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeiten und Startaktivitäten bei der 'Trennung' von 1b – 1f	143
5.8.3	Allgemeines Verfahren für die Hydrolase-katalysierte Acylierung in einem organischen Lösungsmittel.....	144
5.9	Immobilisierung der Esterase I aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	145
6	ANHANG	146
6.1	Ergebnisse der Racematspaltungen im mg-Maßstab.....	146
6.2	Racematspaltungen für die Validierung des Acetat-Assay	151
6.3	DNA-Sequenz der Esterase I aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	152
7	LITERATURVERZEICHNIS	153
8	VERÖFFENTLICHUNGEN	166
9	LEBENS LAUF	168

1 Allgemeiner Teil

1.1 Einleitung

Biokatalytische Prozesse werden von Menschen seit alters her zur Produktion fermentierter Nahrungs- und Genussmittel angewendet. So beruht die Konservierung von Lebensmitteln oder die Weinherstellung auch heute noch auf den selben Prinzipien wie früher, obwohl sich die Verfahren im Lauf der Zeit durch neue Technologien, die einsetzende Kommerzialisierung und behördliche Reglementierung verändert haben und die Abläufe zum Teil auf molekularer Ebene bekannt sind [Neidleman, 2001]. Das Wissen über die Wirkungsweisen von Mikroorganismen und Enzymen wird u.a. dazu eingesetzt, die Haltbarkeit eines Lebensmittels zu verbessern (z.B. Pasteurisation; Sterilisation; Blanchieren) oder dessen Herstellungsprozess zu optimieren (z.B. Teigherstellung; Wurst- und Fleischtechnologie) [Belitz und Grosch, 1992; Ruttloff, 1994]. In jüngster Zeit kommen in der Lebensmittelindustrie neue Technologien zum Einsatz, die gezielt die primäre Molekularstruktur von Lebensmitteln modifizieren ('neuartige Lebensmittel'). Aber auch Zutaten (z.B. modifizierte Fette) und Zusatzstoffe (z.B. Emulgatoren) werden durch biotechnologische Verfahren erzeugt. Insbesondere sind die Fortschritte auf dem Gebiet der Lipid-Modifikation hervorzuheben [Bornscheuer, 1999, 2000a].

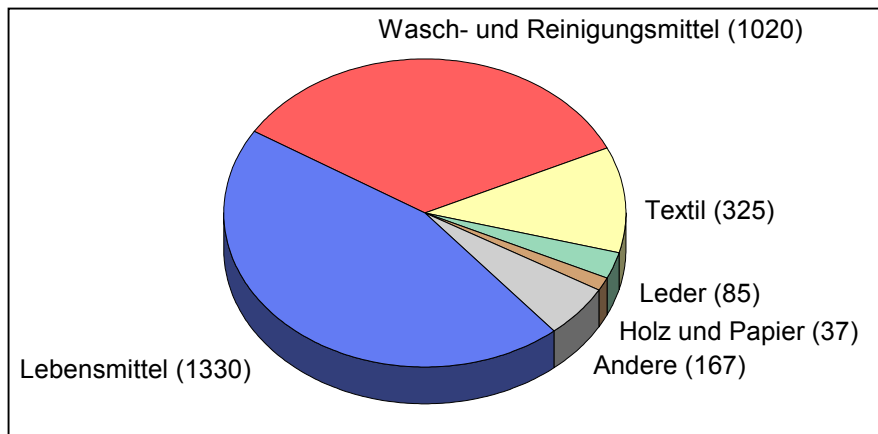


Abb. 1-1: Einsatz von Enzymen in der Industrie aufgeteilt nach Branchen. Der weltweite Umsatz mit industriellen Enzymen 1997 betrug ca. 3 Mrd. DM [Stroh, 1998]. Die Anteile in Mio. DM der einzelnen Industriebranchen sind in Klammern angegeben.

Ein weiteres klassisches Anwendungsgebiet biokatalytischer Prozesse liegt im Waschmittelsektor [Ruttloff, 1994]. Die Nutzung proteolytischer Enzyme für die Praxis wurde schon 1913 in einem Patent beschrieben. Das von *Röhm* entwickelte Einweich- und Waschmittel *Burnus* enthielt einen

proteasehaltigen Rohextrakt aus Pankreas. Ihm folgte in den 40er Jahren ein weiteres pankreatinhaltiges Produkt *Bio 38*. Seit Ende der 50er Jahre ermöglichen Mikroorganismen mit hoher Syntheseleistung eine ökonomisch tragbare Enzymgewinnung (Einführung submerser Verfahren), so dass die Entwicklung und Produktion enzymhaltiger Waschmittel weiter stimuliert wurde. Moderne Waschmittel enthalten heutzutage Amylasen, Proteasen und Lipasen, um eine effektive Entfernung von Polysaccharid-, Protein- und Fettverschmutzungen zu ermöglichen.

Biokatalytische Prozesse finden aber auch in zahlreichen weiteren Industriezweigen Anwendung (Abb. 1-1). Ihr Einsatz erstreckt sich über die Anwendung in der Textil- und Papierindustrie bis hin zur Verwendung in der Medizin- (z.B. Antibiotika) und Umweltanalytik [Schmid, 2002]. In den letzten Jahren erobern Mikroorganismen und Enzyme ein neues Anwendungsgebiet, welches bisher der synthetischen Chemie vorbehalten war: die Produktion von Feinchemikalien und Synthone (chirale Bausteine). Aufgrund der hohen Chemo-, Regio- und Stereoselektivität kann der Einsatz von Mikroorganismen und Enzymen der synthetischen Chemie überlegen sein. So ist es möglich, chemisch schwer zugängliche Verbindungen durch biotechnologische Verfahren herzustellen. Von besonderem praktischen Wert ist hierbei die Tatsache, dass viele Enzyme nicht nur die Reaktionen ihrer natürlichen Substrate mit hoher Stereoselektivität katalysieren, sondern dass mitunter eine bemerkenswerte Toleranz gegenüber der Struktur der umzusetzenden Substrate zu beobachten ist ('relative Spezifität'). Dies erlaubt die Umwandlung vieler nicht-natürlicher, synthetischer Verbindungen. Biotransformationen werden üblicherweise unter milden Reaktionsbedingungen (Temperatur; Druck) und in wässriger Lösung durchgeführt, so dass im Vergleich zu den konventionellen, chemischen Syntheseverfahren die Prozessführung weniger Energie verbraucht. Zusammen mit der Möglichkeit zur Vermeidung toxischer Nebenprodukte und Abfälle ergibt sich eine positive Auswirkung auf die Kosten- und Umweltbilanz.

Rapide Fortschritte auf den Gebieten der Mikrobiologie und Molekulargenetik, wie z.B. die rekombinante Produktion von Enzymen in mikrobiellen Expressionssystemen, die eine fortlaufende Gewinnung des Biokatalysators aus nachwachsenden Rohstoffen ermöglicht, forcieren eine Umkehr auf die zunehmend konkurrenzfähigen, biotechnologischen Verfahren. Heutzutage sind auch organische Lösungsmittel und mehrphasige Systeme als Reaktionsmedien möglich, so dass sowohl wasserlösliche als auch organische Verbindungen selektiv mit biokatalytisch aktiven Zellen und Enzymen modifiziert werden können.

1.2 Industrielle Biotransformationen

Die Umstellung auf biokatalytische Prozesse in der Industrie zur Synthese von chemischen Verbindungen ist derzeit im Begriff drastisch anzusteigen. Der zunehmende Einsatz von Mikroorganismen und Enzymen – speziell im Bereich der organischen Synthese – spiegelt sich in der steigenden Zahl der Patente und wissenschaftlicher Veröffentlichungen auf diesem Gebiet wider und ist in der Literatur ausführlich dokumentiert [Bornscheuer und Kazlauskas, 1999; Faber, 2000; Liese et al., 2000]. Der Trend zur Umstellung auf biokatalytische Prozesse [Rogers, 1999], lässt sich auch an den Bestrebungen erkennen, fehlendes Know-how im Biotechnologie-Bereich durch Kooperationen (*outsourcing*), eigene Entwicklung (*in-house expertise*) oder die Übernahme von Konkurrenzfirmen zu erwerben (Abb. 1-2). Nach Ansicht der Industrie ist derzeit bei Produkten, die einen Verkaufspreis größer als 20 - 30 US\$/kg auf dem Markt erzielen, eine Umstellung auf biotechnologische Verfahren rentabel. Liegt der Marktwert unter dieser Schwelle, so muss eine jährliche Produktion von über 1000 t/a angestrebt werden [Schmid et al., 2001].

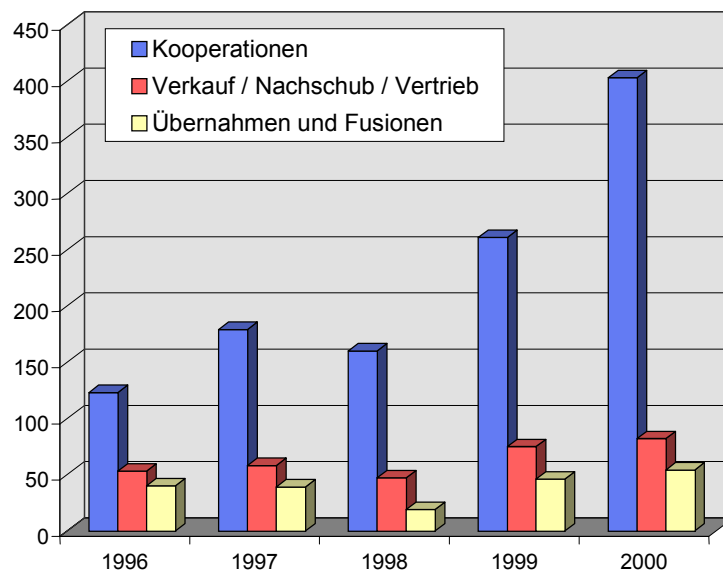


Abb. 1-2: Die zunehmende Bedeutung biotechnologischer Verfahren spiegelt sich in den Geschäftsaktivitäten der europäischen Biotech-Firmen seit 1996 wider¹. Insbesondere ist die Anzahl der jährlich neu geschlossenen Kooperationen deutlich angestiegen.

Während bis zu Beginn der 80iger Jahre hauptsächlich nur sehr komplexe Produkte (z.B. Antibiotika, Insulin) durch biotechnologische Verfahren hergestellt wurden, werden mittlerweile auch vergleichsweise einfache Verbindungen (Bulk- und Feinchemikalien) produziert. Als

¹ Ernst & Young's Eight Annual European Life Sciences Report 2001; Ernst & Young Int.; Cambridge; England

Beispiel ist hier die Produktion von Ethanol durch Fermentation von Cellulose oder Getreide (ca. 5,7 Mrd. L pro Jahr in USA [Thayer, 2001]) zu nennen. Setzte man traditionell auf typische Fermentationsprozesse unter Verwendung ganzer Zellen, so gewinnen isolierte Enzyme immer mehr an Bedeutung, da sich diese wie konventionelle, heterogene Katalysatoren behandeln lassen. Sie können aufgereinigt, immobilisiert und stabilisiert werden, um so auch in kontinuierlichen Prozessen höhere Leistungen zu erzielen. Beispiele für den Einsatz von Enzymen in industriellen Prozessen sind die Herstellung von Acrylamid ausgehend von Acetonitril (eingesetzter Stamm: *Rhodococcus rhodochrous* J1; Nitto Chemical, Yokohama, Japan; > 30000 t/a) [Bornscheuer und Kazlauskas, 1999], die Darstellung von L-Asparaginsäure durch die Addition von Ammoniak an Fumarsäure (DSM, Heerlen, Niederlande; > 1000 t/a) [Schmid et al., 2001] und die Produktion von Glucose-Fructose-Sirup (*high fructose syrup*; 6 Mio. t/a) aus Glucose [Schmid, 2002].

In den letzten Jahren gewann jedoch ein neuer Markt immer mehr an Bedeutung: die Synthese chiraler Bausteine (*single enantiomers*). Der weltweite Bedarf an enantiomerenreinen Verbindungen (Abb. 1-3), insbesondere in der Pharmaindustrie als pharmazeutisch wirksame Zutat oder als Zwischenstufe steigt stetig an. So erhöhten sich die weltweiten Umsätze für enantiomerenreine Medikamente von 86,8 Mrd. US\$ (1997) auf 132,5 Mrd. US\$ (2000), wobei ein weiterer Anstieg erwartet wird (Prognose für 2005: 171,9 Mrd. US\$) [Stinson, 1999, 2001a]. Allein für chirale Feinchemikalien, die isomerenrein im Handel sind, wird eine jährliche Zunahme der weltweiten Umsätze um 13 % von derzeit 6,63 Mrd. US\$ (2000) auf 16,0 Mrd. US\$ im Jahr 2007 prognostiziert [Stinson, 2001b].

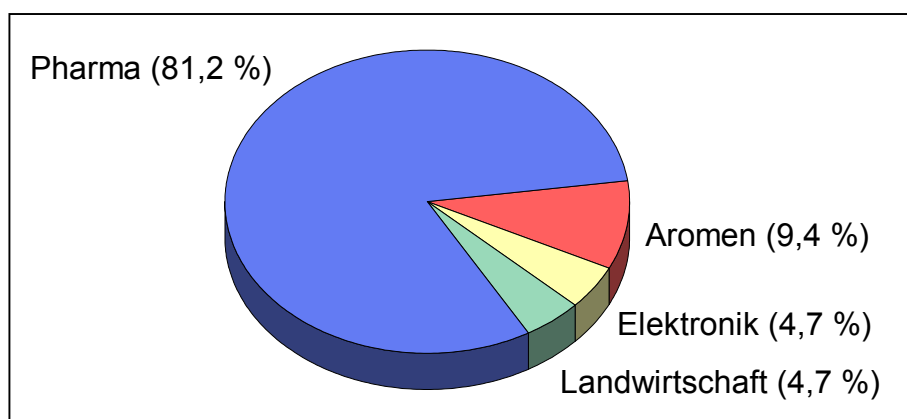


Abb. 1-3 Der Bedarf an enantiomerenreinen Feinchemikalien aufgliedert in die einzelnen Industriebranchen. Der weltweite Umsatz im Jahr 2000 betrug 6,63 Mrd. US\$ und steigt nach Prognosen jährlich um 13 % [Stinson, 2001b].

Der wachsende Wettbewerb sowohl in der pharmazeutischen Chemie als auch in der Agrochemie erfordert eine immer raschere Entwicklung neuer Wirkstoffe, Testverfahren und eine schnellere Markteinführung der Produkte, um letztendlich durch geringere Forschungs- und Entwicklungskosten dem Druck der Mitbewerber standhalten zu können. Um die Entwicklungskosten neuer oder verbesserter Medikamente zu senken, wird von der Pharmaindustrie der Markt für chirale Verbindungen weiter angetrieben. Durch Forschung im medizinischen Bereich werden zunehmend Enzyme, Hormone, Rezeptoren auf Zelloberflächen und andere Komponenten in menschlichen Zellen und Mikroorganismen als valide Targets für Arzneimittel identifiziert und all diese Ziele sind aus chiralen Aminosäuren, Kohlenhydraten und Fetten aufgebaut. Um die Erfolgsrate eines Medikaments, das auf diese chiralen Strukturen einwirken soll, zu erhöhen, muss es selbst in optischer Reinheit vorliegen. Hinzu kommt, dass die Behörden auf Präparate mit *single-enantiomer*-Substanzen drängen und die Entwicklung eines racemischen Wirkstoffes im Hinblick auf die Zulassung nahezu den Kosten von zwei optisch reinen Verbindungen entspricht [Stinson, 2001b]. Darüber hinaus ist zu bedenken, dass bei chiralen Substanzen eine stereoisomere Form keine oder nur eingeschränkte Wirkungen nach Applikation besitzt. Im Extremfall ist sogar eine Beeinträchtigung oder Schädigung der Gesundheit zu befürchten. Auch teratogene Eigenschaften einer enantiomeren Form, wie beim Wirkstoff Thalidomid (Schlafmittel Contergan), sind nicht auszuschließen. So wirkt das (*R*)-Enantiomer von Thalidomid als Sedativum, während das Stereoisomer Missbildungen bei Neugeborenen verursachte. Darüber hinaus wird zur Zeit über mutagene Eigenschaften von (*S*)-Thalidomid diskutiert. Dieses bekannte Beispiel aus den 50er Jahren führte 1961 zu einer drastischen Reform des Arzneimittelgesetzes² in Deutschland, um für Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit von Medikamenten für Mensch und Tier zu sorgen.

Zur Entwicklung neuer Testsubstanzen (Leitstrukturen) bedient sich die moderne Wirkstoffsuchforschung der Methoden der kombinatorischen Chemie. Hierbei ist die effiziente Synthese großer Substanzbibliotheken von Molekülen mit mehr oder weniger ähnlichen chemischen, physikalischen und strukturellen Eigenschaften durch unterschiedliche Verfahren möglich. Während in den Anfängen dieses relativ neuen Konzepts zur Generierung neuer Strukturen die Synthese an erster Stelle stand, tritt heutzutage das rasche parallele und empfindliche Testen der Substanzbibliotheken zur Identifizierung von Leitstrukturen mit den

² Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln vom 16. Mai 1961; Bundesgesetzblatt Teil I; Seite 533

gewünschten Eigenschaften (Hochdurchsatz-Screening; HTS) in den Vordergrund. Nach diesem Primär-Screening werden die gefundenen Verbindungen durch kontinuierliche Veränderungen z.B. der Struktur oder Konzentration weitgehend optimiert. Durch ein immer tiefer gehendes Verständnis von Struktur und Wirkung der einzelnen Substanzen, steigt die Anzahl identifizierter Leitstrukturen stetig an. Weltweit werden dennoch nur 35 Medikamente, die aus neuartigen Wirkstoffen bestehen, pro Jahr neu zugelassen. Aufgrund der strengen vorklinischen und klinischen Testverfahren scheiden viele Präparate bereits früh in der Entwicklungsphase aus [Stinson, 2001c]. In der Folge ist es unerlässlich, die Anzahl der Leitstrukturen weiter zu erhöhen und kostengünstige Verfahren für die Synthese von Varianten zu entwickeln. Aufgrund der hohen Chemo-, Regio- und Stereoselektivität von Enzymen stellt gerade hier der Einsatz biotechnologischer Verfahren die aussichtsreichste Perspektive dar. Die Herausforderung der Industrie besteht jetzt darin, geeignete Biokatalysatoren zu identifizieren, diese zu charakterisieren und an die Reaktionsbedingungen anzupassen.

1.3 Hydrolasen in der organischen Synthese

Von allen Arten Enzym-katalysierter Reaktionen bei der organisch-chemischen Synthese gestaltet sich der Einsatz von Hydrolasen (Kap. 1.4) am einfachsten. Sie benötigen keine Cofaktoren, deren Recycling die Prozessführung komplexieren und die Kosten erhöhen würde, und sind in lyophilisierter Form sehr stabil und damit in großer Vielzahl kommerziell erhältlich. Aus diesen Gründen, gekoppelt mit einem breiten Substratspektrum und der hohen Stabilität in organischen Lösungsmitteln, setzte die Synthesechemie in den letzten 10 Jahren bevorzugt auf diese Enzymklasse.

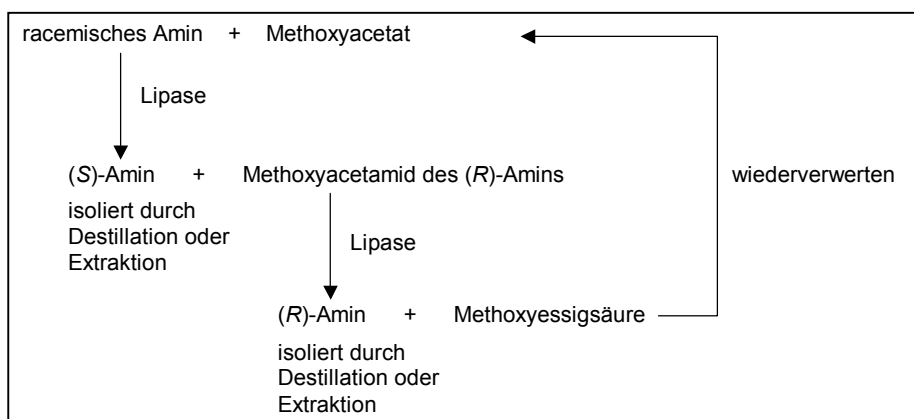
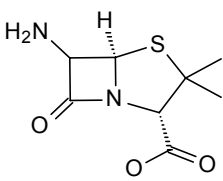
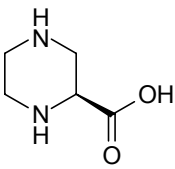
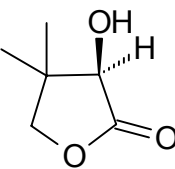
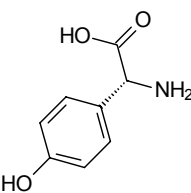
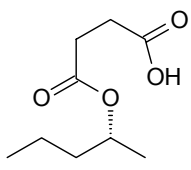
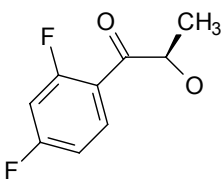


Abb. 1-4 Schematische Darstellung des Prozesses zur kinetischen Racematspaltung von Aminen durch die BASF AG, Ludwigshafen [Balkenhohl et al., 1997] (nach Carrea und Riva, 2000). Die Jahresproduktion an enantiomerenreinen Aminen beträgt mehrere tausend Tonnen.

Tab. 1-1 Ausgewählte Beispiele für Hydrolase-katalysierte Biotransformationen zur Darstellung optisch-reiner Zwischenstufen für bioaktive Verbindungen in der Industrie [Ogawa und Shimizu, 1999; Patel, 2001a, 2001b; Schmid et al., 2001; Schulze und Wubbolts, 1999; Shimizu, 2000; Zaks, 2001]

Produkt	Verwendung / Prozessführung	Hersteller
 6-Aminopenicillansäure	Produktion von halbsynthetischen Penicillinen (> 1000 t/a) Hydrolyse von Penicillin G/V mit Penicillin-Acylase	DSM (Heerlen, Niederlande) Smith Kline Beecham (Harlow, England) Pfizer (Groton, USA) Toyo (Tokio, Japan)
 (S)-Piperazin-2-carbonsäure	Zwischenstufe für bioaktive Verbindungen; z.B. HIV-Protease-Inhibitor 'Crixivan' (Merck, Darmstadt) Racematspaltung mit Amidase von: <i>Klebsiella terrigena</i> (DSM 9174; S-spez.) <i>Burkholderia sp.</i> (DSM 9925; R-spez.)	Lonza (Basel, Schweiz)
 D-Pantolacton	Synthese von (R)-Pantothensäure (bzw. D-Pantothensäure; > 1000 t/a) Racematspaltung mit einer Lactonase aus <i>Fusarium oxysporum</i>	Daiichi Fine Chemicals (Toyama, Japan)
 D-p-Hydroxyphenylglycin	Synthese von Antibiotika (> 1000 t/a): Cephalosporine halbsynthetische Penicilline dynamische, kinetische Racematspaltung: Hydantoinasen und Carbamoylasen aus <i>Agrobacterium radiobacter</i> und <i>Pseudomonas putida</i>	Ajinomoto (Tokio, Japan) Bayer (Leverkusen) DSM (Heerlen, Niederlande)
 (R)-2-Pentylhemisuccinat	Zwischenstufe für die Herstellung von Medikamenten zur Behandlung der Alzheimer Krankheit Racematspaltung mit Lipase B von <i>Candida antarctica</i>	Bristol-Myers Squibb (New Jersey; USA)
 (Zwischenstufe für die Herstellung eines Mittels gegen Pilze)	Zwischenstufe für die Herstellung eines Mittels gegen Pilze (multi-kg Maßstab) Racematspaltung mit Lipase B aus <i>Candida antarctica</i>	Hoffmann-La Roche (Basel; Schweiz)

Gegenwärtig produzieren mehrere Firmen chirale Zwischenstufen mit Hilfe Hydrolase-katalysierter Reaktionen. Sie halten ihre Prozesse jedoch weitgehend geheim, so dass es schwierig ist, über diese oder auch nur die verwendeten Substrate und Enzyme etwas zu erfahren. Dennoch sind anhand von wissenschaftlichen Veröffentlichungen und der Patentliteratur einige Beispiele bekannt. Bei dem derzeit größten, industriell durchgeführten Prozess (Abb. 1-4) dürfte es sich um die enzymatische Racematspaltung von Aminen handeln [Balkenhohl et al., 1997]. Die Jahresproduktion der BASF (Ludwigshafen) liegt bei mehreren tausend Tonnen pro Jahr und soll durch weitere Produktionsanlagen gesteigert werden [Schmid et al., 2001; Thayer, 2001]. Nach diesem Verfahren können verschiedene, sowohl aliphatische als auch aromatische, Amine als Zwischenstufen für die Synthese von Pharmazeutika und Pestizide enantiomerenrein hergestellt werden. Als Beispiel ist (*S*)-Methoxyisopropylamin (MOIPA) als chiraler Baustein für das Herbizid *Frontier x2* zu nennen [Schmid et al., 2001]. Weitere Beispiele für Hydrolase-katalysierte Biotransformationen zur Darstellung optisch-reiner Zwischenstufen als Synthesebausteine für bioaktive Verbindungen sind in Tab. 1-1 aufgezeigt.

1.4 Übersicht über die Enzymklasse der Hydrolasen (EC 3. ...)

Enzyme, die eine Substratspaltung unter Beteiligung von Wasser katalysieren, aber dabei auch reversibel wirken können, werden als Hydrolasen bezeichnet und stellen die 3. Hauptgruppe (EC 3) gemäß der *International Union of Biochemistry* dar. Zu dieser Gruppe gehören insbesondere die Lipasen (systematischer Name: Triacylglycerol-Acylhydrolasen, EC 3.1.1.3), die Esterasen (Carboxylester-Hydrolasen, EC 3.1.1.1) und die Proteasen (Peptid-Hydrolasen, EC 3.4...), welche nach ihrem katalytischen Mechanismus in vier Unterklassen aufgeteilt werden. So erfolgt eine Unterscheidung in Serin- (EC 3.4.21...), Cystein- (EC 3.4.22...), Aspartat- (EC 3.4.23...; saure Proteasen) und Metallo-Proteasen (EC 3.4.24...). Diese Enzyme kommen ubiquitär in der belebten Natur vor und sind insbesondere für katabole Stoffwechselprozesse bedeutsam. Lipasen und Esterasen akzeptieren darüber hinaus ein breites Spektrum an Verbindungen, so dass bei höheren Organismen, neben der Umsetzung der natürlichen Substrate, auch der Abbau von Xenobiotika in Betracht zu ziehen ist.

Die formale Einteilung der Hydrolasen erfolgt nach den natürlicherweise bevorzugten Substraten und spiegelt sich in der zweiten Ziffer des EC-Codes wider. So indiziert beispielsweise die Ziffer '1', dass ein Enzym natürlicherweise Esterbindungen spaltet. Neben dieser formalen Einteilung lassen sich die Enzyme der 3. Hauptgruppe aber auch nach strukturellen bzw. mechanistischen

Eigenschaften in Gruppen einteilen, wobei insbesondere die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren im aktiven Zentrum maßgeblich sind.

1.4.1 Struktur und Mechanismus

Die zahlenmäßig größte Gruppierung innerhalb der 3. Hauptgruppe stellen die Serin-Hydrolasen dar, die eine besondere strukturelle Gemeinsamkeit aufweisen. Bei den meisten der bislang aufgeklärten Strukturen zeigte sich eine sogenannte α/β -Hydrolasefaltung als gemeinsames Motiv [Ollis et al., 1992]. Diese besteht aus acht, meist parallelen β -Faltblättern (1-8), die auf beiden Seiten von α -Helices (A-F) umgeben sind (Abb. 1-5). Obwohl diese Anordnung eine gewisse Variabilität in der Anzahl der Protein-Sekundärstrukturen erlaubt (zusätzliche α -Helices und β -Faltblätter z.B. bei der Lipase aus *Geotrichum candidum*), bleibt die zentrale Topologie des aktiven Zentrums erhalten. Trotz einer mitunter geringen Sequenzhomologie besitzen die Serin-Hydrolasen vergleichbare 3D-Raumstrukturen und die Anordnung der Aminosäuren des katalytischen Zentrums ist identisch (divergente Evolution). Abgesehen von den Aminosäureresten (O-Nucleophil, Carboxylatgruppe, Histidinrest) und des damit verbundenen Katalysemechanismus weisen sie keine weiteren, strukturellen Ähnlichkeiten mit anderen Enzymen, die ebenfalls katalytische Triaden besitzen (Serin-Proteasen, Cystein-Proteasen), auf. Als typische Vertreter hierfür sind insbesondere die Subtilisine und Papain zu nennen. Die Koexistenz dieser unterschiedlichen Klassen ist ein Beispiel für eine konvergente Evolution [Ollis et al., 1992]. Die Konservierung der räumlichen Anordnung der katalytischen Triade deutet darauf hin, dass die stereochemischen Faktoren, die eine nucleophile Spaltung einer Esterbindung dirigieren, hinsichtlich der strukturellen und chemischen Vorgänge spezifisch und genau definiert sein müssen [Dodson und Wlodawer, 1998].

Bei den Enzymen mit α/β -Hydrolasefaltung existiert eine vergleichsweise hohe Variabilität bei der Zusammensetzung der katalytischen Triade. So ist lediglich Histidin bei allen Enzymen dieser Klasse konserviert. Sowohl für den Acylrest (Asparaginsäure oder Glutaminsäure) als auch für das Nucleophil (Serin, Cystein oder Asparaginsäure) besteht dagegen ein gewisser Spielraum. Bei Serin-Hydrolasen ist darüber hinaus das Pentapeptid Gly-x-Ser-x-Gly (x steht willkürlich für eine Aminosäure; Ser ist das aktive Serin) als gemeinsames Motiv konserviert. Die räumliche Anordnung der drei katalytischen Aminosäuren ist jedoch in allen Strukturen identisch, d.h. sie sind immer auf bestimmten Verbindungen (*loops*) zwischen den strukturgebenden β -Faltblättern und α -Helices lokalisiert (Abb. 1-5). Da die Enzyme mit α/β -Hydrolasefaltung ein breites Spektrum an Substraten umsetzen, bildet diese zentrale Topologie offensichtlich ein geeignetes

Grundgerüst zur Anordnung der unterschiedlichen Triaden, ohne dass die Effizienz des katalytischen Systems beeinträchtigt wird. Dies bestätigt auch eine umfassende Studie, bei der 53 Lipasen, Esterasen und Phospholipasen aufgrund ihrer Aminosäure-Sequenz und biologischen Eigenschaften in acht Familien eingeteilt wurden [Arpigny und Jaeger, 1999]. Die Mehrzahl der hierbei untersuchten Enzyme zeigt die kanonische α/β -Hydrolasefaltung, wobei aber Abweichungen vom konservierten Gly-x-Ser-x-Gly-Motiv auftreten (z.B. Ala-x-Ser-x-Gly). Die Hydrolasen der Familie II besitzen sogar ein Tetrapeptid (Gly-Asp-Ser-Leu) als gemeinsames Merkmal. Bei der Esterase von *Streptomyces scabies* (Enzym aus der Familie II) ist darüber hinaus lediglich eine katalytische Dyade (Ser, His) vorhanden und sie weist eine sogenannte α/β -Tertiärfaltung als Protein-Sekundärstruktur auf [Wei et al., 1995].

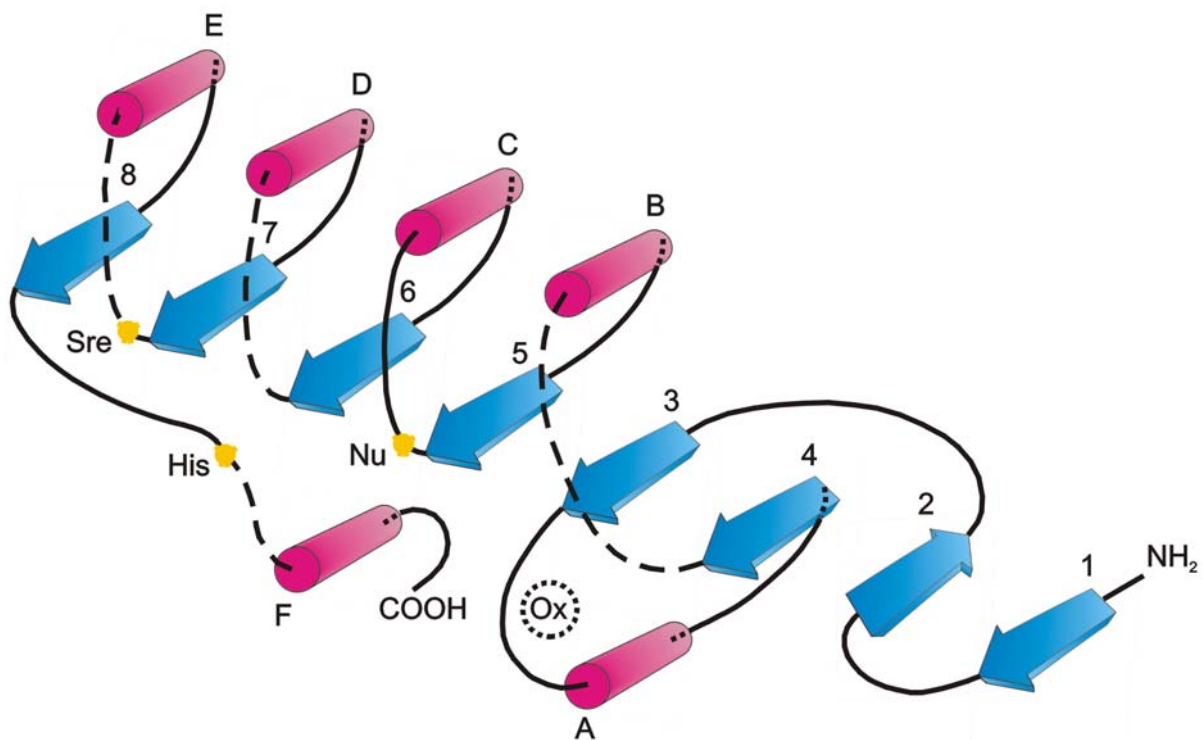


Abb. 1-5: Schematische Darstellung der α/β -Hydrolasefaltung von Lipasen (modifiziert nach Ollis et al., 1992). Die β -Faltblätter (1-8) sind als Pfeile (blau), die α -Helices (A-F) als Zylinder (rot) dargestellt. Ebenfalls sind die Bereiche der Bindungsstellen für den Acylrest (Sre), das Nucleophil (Nu) und das Histidin (His) der katalytischen Triade sowie die Oxyaniontasche (Ox) eingezeichnet. Trotz Variabilität in bestimmten Bereichen (gestrichelte Linien) bleibt die zentrale Topologie erhalten.

Serin-Hydrolasen sind typische *induced-fit* Enzyme, d.h. die Konformation und damit auch die Geometrie der Bindungstasche passt sich dem jeweiligen Substrat an, so dass die katalytischen Aminosäuren in eine geeignete Anordnung für die Reaktion gebracht werden [Koshland, 1994].

Bei der anschließenden Lipase-katalysierten Reaktion erfolgt zunächst ein nucleophiler Angriff des Serins auf den Carbonylkohlenstoff der Esterverbindung unter Ausbildung eines tetrahedralen Intermediats (T_{d1} ; Abb. 1-6). Unter Abspaltung eines Alkohols (R_AOH) entsteht im zweiten Schritt ein planarer Acyl-Enzym-Komplex. Die Entstehung dieses Komplexes wird vor allem durch den Imidazolrest des Histidins, welcher das freiwerdende Proton des Serinrests übernimmt, und durch das Carboxylatanion des Acylrestes (in Abb. 1-6 Glutaminsäure) unterstützt. Die Aminosäuren der sogenannten Oxyaniontasche stabilisieren hierbei das negativ geladene Intermediat (T_{d1}). Der Acyl-Enzym-Komplex wird durch den Angriff eines Nucleophils (z.B. Wasser; Abb. 1-6) in ein zweites tetrahedrales Intermediat (T_{d2}) überführt. Dieses zerfällt im letzten Schritt des katalytischen Prozesses in das freie Enzym (Regeneration des Katalysators) und das Produkt (Säure). Handelt es sich bei dem angreifenden Nucleophil um einen Alkohol so entsteht erneut eine Esterverbindung (Umesterung). Die Freisetzung des Produkts limitiert die Geschwindigkeit des Reaktionsmechanismus (geschwindigkeitsbestimmender Schritt).

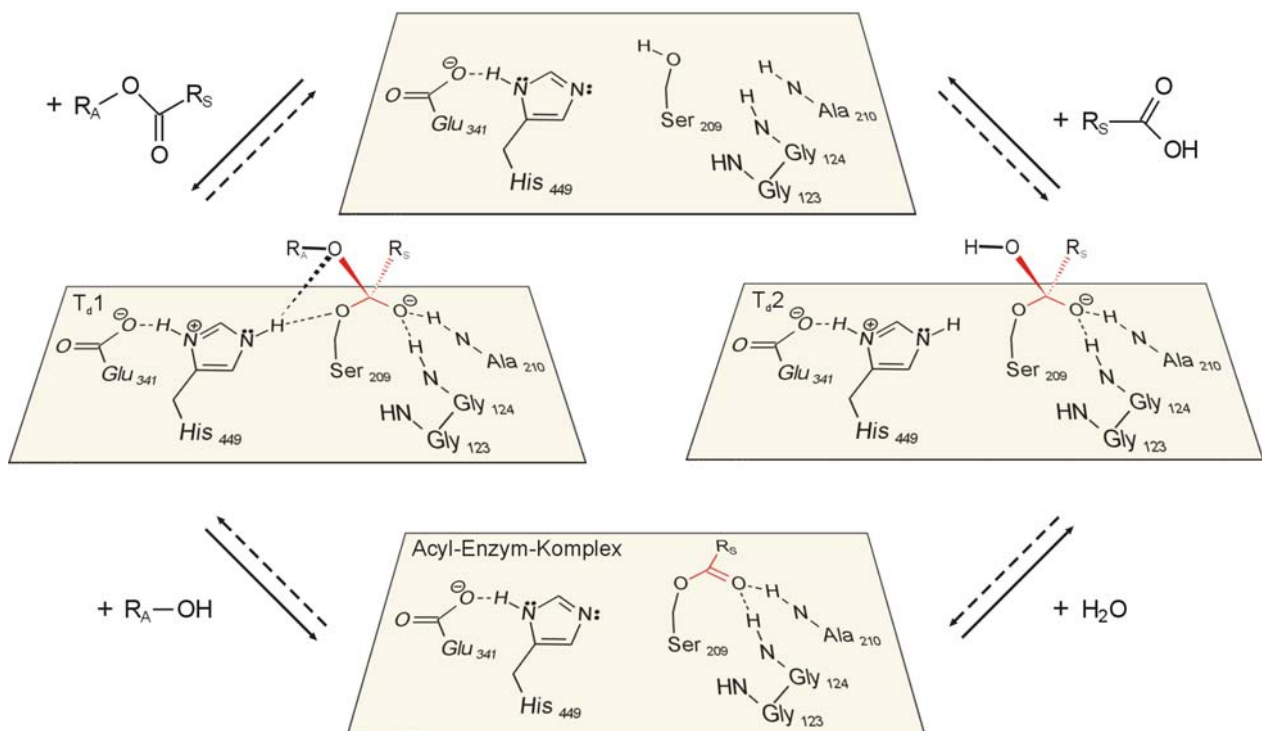


Abb. 1-6 Reaktionsmechanismus von Lipasen bei der Hydrolyse von Esterverbindungen. Die Aminosäure-Numerierung entspricht dem aktiven Zentrum der Lipase aus *Candida rugosa* (modifiziert nach Bornscheuer und Kazlauskas, 1999). Die Abkürzungen T_{d1} und T_{d2} bezeichnen die beiden tetrahedralen Intermediate. Als Nucleophile können auch Amine (Amidbildung) oder Thiole (Thioester) eingesetzt werden.

1.4.2 Lipasen (Triacylglycerol-Acylhydrolasen, EC 3.1.1.3)

Aus der Gruppe der Serin-Hydrolasen stellen die Lipasen die wichtigsten Enzyme für den Einsatz in der Synthesechemie dar und sind in der Literatur am besten charakterisiert [Bornscheuer und Kazlauskas, 1999; Faber, 2000; Pandey et al., 1999; Schmid und Verger, 1998]. Als natürliche Substrate bevorzugen sie wasserunlösliche Substrate, sind aber durchaus in der Lage, u.a. Triglyceride aus kurzkettigen Fettsäuren umzusetzen. Die Hydrolyse der Esterbindungen erfolgt an der Öl-Wasser-Grenzfläche. Neben dem aktiven Kontakt zwischen Enzym und Substrat, führt dies zu einem drastischen Anstieg der katalytischen Aktivität durch das Phänomen der Grenzflächenaktivierung (*interfacial activation*). Durch Untersuchung der Lipaseaktivität bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen kann dieser Effekt beobachtet werden. So lässt sich erst im Bereich der Substratsättigung ein deutlicher Umsatz beobachten. Ursache für dieses Phänomen ist, dass der Zugang zum aktiven Zentrum bei den meisten Lipasen durch eine bewegliche Oligopeptideinheit (*lid*) blockiert ist. Erst bei Bindung an eine hydrophobe Grenzfläche öffnet sich dieses *lid* und die Reaktionsrate steigt an [Jaeger und Wohlfarth, 1993]. Eine Ausnahme hiervon stellt z.B. die häufig eingesetzte Lipase B von *Candida antarctica* (CAL B) dar, da hier lediglich ein kleiner hydrophober Bereich den Zugang zum aktiven Zentrum blockiert und somit keine Grenzflächenaktivierung zu beobachten ist. CAL B kann als eine evolutionäre Zwischenstufe einer Lipase und einer Esterase eingestuft werden [Anderson et al., 1998].

1.4.3 Esterasen (Carboxylester-Hydrolasen, EC 3.1.1.1)

Esterasen werden aus den gleichen Quellen wie Lipasen isoliert und sind in ihren biochemischen Eigenschaften und strukturellen Merkmalen diesen sehr ähnlich. Die verwandtschaftliche Nähe zu den Lipasen ließ sich durch Strukturaufklärung einer Carboxylesterase aus *Pseudomonas fluorescens* bestätigen [Kim et al., 1993, 1997]. Folglich weisen Esterasen nicht nur eine der Serin-Hydrolasen vergleichbare α/β -Hydrolasefaltung auf, sondern sie besitzen auch die gleiche katalytische Triade. Im Gegensatz zu den Lipasen besitzen Esterasen kein *lid*, das den Zugang zum aktiven Zentrum verschließt, und bevorzugen kurzkettige und hydrophile Substrate. Aus diesem Grund erfolgt die Katalyse natürlicherweise in wässriger Lösung und eine Grenzflächenaktivierung wird nicht beobachtet. Die Kinetiken von Esterase-katalysierten Reaktionen (Kap. 1.5.1) erfolgen somit streng nach Michaelis-Menten [Michaelis und Menten, 1913], d.h. bei zunehmender Substratkonzentration steigt die Aktivität des Enzyms an [Bornscheuer, 2002]. Zur weiteren Unterscheidung dient die Faustregel, dass Verbindungen, die

aus einem großen Säure- und einem kleinen Alkohol-Rest (z.B. Methanol) aufgebaut sind, bevorzugt von Esterasen umgesetzt werden. Lipasen dagegen besitzen eine hohe Affinität zu Substraten, die einen komplexen Alkohol- und einen kleinen Säurerest aufweisen [Phythian, 2000].

Für den Einsatz bei Biotransformationen besitzen Esterasen nur eine untergeordnete Bedeutung im Vergleich zu den Lipasen. Obwohl in der Literatur einige Beispiele für den Einsatz von Esterasen beschrieben sind, ist für die organische Synthese nur die Schweineleber-Esterase von Interesse, denn sie zeigt eine hohe Stereoselektivität bei der Umsetzung einer Vielzahl von Verbindungen. Die Verwendung der aus Schweineleber isolierten Präparationen ist aber mit einer Reihe von Nachteilen verbunden. So variiert der Esteraseanteil in jeder Charge und es sind weitere Hydrolasen, die als problematisch bezüglich der Selektivität anzusehen sind, enthalten. Darüber hinaus liegt Schweineleber-Esterase in Form mehrerer Isoenzyme vor, die sich teilweise erheblich in ihrer Substratspezifität unterscheiden. Lange et al. [Lange et al., 2001] gelang es kürzlich, die sogenannte γ -Untereinheit (ein Isoenzym) zu klonieren und in *Pichia pastoris* erstmals aktiv zu exprimieren. Durch Überexpression in einem geeigneten Mikroorganismus ist die Gewinnung der Esterase einfacher und eine Veränderung von Enzymeigenschaften durch genetische Methoden wird ermöglicht [Musidlowska et al., 2001]. In Verbindung mit neuen Techniken, die die Stabilität beim Einsatz von Schweineleber-Esterase in organischen Lösungsmitteln verbessern, wird deren Bedeutung in der organischen Synthese in Zukunft weiter steigen [Gais et al., 2001].

1.4.3.1 Mikrobielle Esterasen

1.4.3.1.1 Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE)

Im Jahr 1990 beschrieben Choi et al. die Klonierung und Expression einer Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE) mit einem 708 bps *orf*, kodierend für ein Protein mit 236 Aminosäuren und damit einer theoretischen Molekülmasse von 26936 Da [Choi et al., 1990]. Neueren Erkenntnissen zur Folge wurde die Sequenz 1995 auf einen *orf* von 816 bps berichtigt (siehe Anhang) [Pelletier und Altenbuchner, 1995]. Das Gen besitzt einen für *Pseudomonas* typischen GC-Gehalt von 62 % und kodiert für 272 Aminosäuren. Nach Umklonierung in den Rhamnose-induzierbaren Expressionsvektor pJOE2702 [Stumpp et al., 2000] konnte die Esterase in *Escherichia coli* überexprimiert und vollständig charakterisiert werden [Krebsfänger et al., 1998a, 1998b; Liu et al., 2001; Zocher et al., 1998]. Die Konstruktion des Plasmids pJOE2792

erfolgte über die Insertion des Esterase-Gens über die beiden Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Nde*I. Zuvor wurden in den Vektor pJOE2702 zusätzliche sechs Histidin-Codons eingeführt, so dass die reife PFE am C-terminalen Ende mit einem sogenannten *his-tag* [Schmitt et al., 1993] fusioniert ist und durch Metallaffinitäts-Chromatographie (Kap. 1.6) aufgereinigt werden kann.



Abb. 1-7 Homologiemodell³ der Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* auf Basis der Strukturen der verwandten Haloperoxidasen CPOF, CPOL und BPO-A1. Die acht parallelen β -Faltblatt-Strukturen (blau) und die α -Helices (rot) weisen die für Serin-Hydrolasen typische α/β -Hydrolasefaltung [Ollis et al., 1992] auf. Die katalytische Triade ist aus den Aminosäuren Serin (grün), Asparaginsäure (orange) und Histidin (gelb) zusammengesetzt. Der für Esterasen charakteristische freie Zugang zum aktiven Zentrum ist gut zu erkennen.

Die PFE zeigt neben den typischen Esterase-Eigenschaften auch Bromierungs-Aktivität und weist darüber hinaus auch eine hohe Homologie zu den häm-freien bakteriellen Haloperoxidasen auf, wodurch die evolutive Verwandtschaft mit diesen Enzymen indiziert wird [Pelletier und Altenbuchner, 1995]. Insbesondere mit der Chlorperoxidase F aus *Pseudomonas fluorescens* (CPOF; AC O31158; 55 %), der Chlorperoxidase L aus *Streptomyces lividans* (CPOL; AC P49323; 49 %) und der Bromperoxidase aus *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762 (BPO-A1; AC P33912; 45 %) ist eine hohe Übereinstimmung⁴ der Aminosäure-Sequenz zu beobachten. Ausgehend von den bekannten Strukturen dieser Haloperoxidasen (Einträge in der

³ Homologie-Modell nach Swiss-Model (www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html)

⁴ Identität der Aminosäure-Sequenzen nach BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)

Protein-Daten-Bank: CPOF pdb 1A8S_; CPOL pdb 1A88A-C; BPO-A1 pdb 1A8Q_) [Hofmann et al., 1998] kann ein Homologiemodell der PFE erstellt werden (Abb. 1-7).

Die Charakterisierung der PFE ergab, dass sie in einem weiten pH-Bereich von 5-10 (Maximum zwischen pH 7,5 und 8) und bis zu einer Temperatur von 70°C aktiv ist, wobei die Stabilität über 50°C stark nachlässt. Eine Lagerung der Esterase bis zu einer Temperatur von 40°C ist ohne Aktivitätseinbußen möglich. Von den eingesetzten Substraten wurden Essigsäureethylester, Buttersäureethylester und -propylester bevorzugt umgesetzt. Bei den Untersuchungen zur Darstellung optisch reiner Verbindungen zeigte die PFE lediglich in der Racematspaltung von 1-Phenylethanol bzw. 1-Phenylethylacetat eine hohe Stereoselektivität.

Weitere Arbeiten umfassten neben der näheren Charakterisierung auch die Erweiterung des Substratspektrums der PFE durch evolutive Methoden (Kap. 1.7.3.2). Hierbei gelang es, eine Esterase-Mutante zu erzeugen, die in der Lage ist einen sterisch-gehinderten 3-Hydroxyester, der als Baustein bei der Synthese von Epothilon A dient und vom Wildtyp-Enzym nicht als Substrat akzeptiert wird, mit moderater Stereoselektivität umzusetzen [Bornscheuer et al., 1998, 1999]. Epothilone stellen eine neue Klasse von Makroliden dar, die eine Taxol-ähnliche Antitumorwirkung aufweisen. Neben der Erweiterung des Substratspektrums wurde auch gezielt versucht, die Stereoselektivität der PFE zu steigern. So ließ sich die Enantioselektivität (Kap. 1.5.2) bei der Hydrolyse von 3-Phenylbuttersäure-Resorufinester von $E = 3,5$ (Wildtyp) nahezu auf das Doppelte steigern ($E = 6,6$; Einfach-Mutante bzw. $E = 12$ nach Sättigungsmutagenese) [Bornscheuer, 2002; Henke und Bornscheuer, 1999].

1.4.3.1.2 Weitere mikrobielle Esterasen

Mit Ausnahme der Carboxylesterase NP, die ursprünglich aus *Bacillus subtilis* isoliert wurde und Bedeutung bei der Herstellung von (*R*)-Naproxen (nicht-steroidaler Entzündungshemmer) erlangte, der Esterase von *Arthrobacter globiformis* (synthetische Pyrethroide) [Bornscheuer, 2002] und der Lactonase von *Fusarium oxysporum* (Tab. 1-1), sind die verfügbaren, mikrobiellen Esterasen zur Zeit lediglich von akademischem Interesse. Die Veröffentlichungen beziehen sich zumeist auf die Klonierung und Expression des Enzyms, so dass nur einzelne, besonders ausgewählte Verbindungen als Substrate getestet wurden [Bornscheuer und Kazlauskas, 1999]. Nichtsdestotrotz besitzen einige dieser mikrobiellen Esterasen, insbesondere bei der Racematspaltung von sekundären Alkoholen, beachtliche Selektivitäten [Phythian, 2000].

1.4.4 Proteasen mit Esterase-Aktivität

Subtilisine, Serin- und Cystein-Proteasen (Papain) weisen analog den Enzymen mit α/β -Hydrolasefaltung eine katalytische Triade auf, die aus einem Nucleophil, Acylrest und Histidin gebildet wird (Kap. 1.4.1), und besitzen somit auch den gleichen Katalysemechanismus [Ollis et al., 1992]. Proteasen und Amidasen setzen im Gegensatz zu den Lipasen nur gelöste Substrate um, wobei sie insbesondere gegenüber sekundären Alkoholen eine hohe Selektivität zeigen [Bornscheuer und Kazlauskas, 1999]. Auffällig ist hierbei, dass bei Serin-Proteasen im Vergleich zu den anderen Enzymen mit α/β -Hydrolasefaltung, eine invertierte Anordnung der katalytischen Aminosäuren im aktiven Zentrum zu beobachten ist, und sie somit eine entgegengesetzte Stereopräferenz besitzen [Dodson und Wlodawer, 1998; Ollis et al., 1992].

1.5 Enzymkinetik

1.5.1 *Steady-state-Kinetik* [Briggs und Haldane, 1925; Michaelis und Menten, 1913]

Der einfachste Fall einer enzymatischen Katalyse ist eine Reaktion, bei der ein Substrat irreversibel umgesetzt wird. Damit ist es gleichgültig, ob ein einziges Produkt entsteht oder mehrere Spaltprodukte freigesetzt werden [Bisswanger, 2000]. Ein Beispiel hierfür stellt die Hydrolase-katalysierte Spaltung von Esterverbindungen in wässriger Lösung dar.



Abb. 1-8: Der einfachste Fall einer Enzym-katalysierten Reaktion ist die irreversible Umsetzung eines Substrats (*Sub*) in das Produkt (*Prod*). k_1 ist die Geschwindigkeitskonstante für die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes (*EnzSub*), während k_{-1} und k_2 den Zerfall in das freie Enzym und das Substrat bzw. Produkt beschreiben.

In Abb. 1-8 ist der einfachste Fall einer Enzym-katalysierten Reaktion dargestellt. Zunächst bildet sich aus dem Substrat (*Sub*) und dem freien Enzym (*Enz*) reversibel der Enzym-Substrat-Komplex (*EnzSub*), der anschließend unter Bildung des Produkts (*Prod*) irreversibel zerfällt. k_1 , k_{-1} und k_2 stehen hierbei für die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Reaktionsschritte und Produktinhibierung sei ausgeschlossen. Als Umsatzgeschwindigkeit v wird die Produktzunahme definiert, die der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes direkt proportional ist:

$$v = \frac{d[Prod]}{dt} = k_2 \cdot [EnzSub] \quad [Gl. 1]$$

Im Verlauf der Reaktion stellt sich für die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes ein Fließgleichgewicht (*steady-state*) ein, d.h. die Bildung ($d[EnzSub]/dt$) und der Zerfall ($-d[EnzSub]/dt$) laufen mit derselben Geschwindigkeit ab. Nach dem Prinzip der Massenerhaltung entspricht die zur Reaktion eingesetzte Menge an Enzym (E_0) der Summe aus freiem Enzym (Enz) und dem Enzym-Substrat-Komplex ($EnzSub$). Hiernach ergibt sich mit $d[EnzSub]/dt = k_1 \cdot [Enz] \cdot [Sub]$ und $-d[EnzSub]/dt = k_{-1} \cdot [EnzSub] + k_2 \cdot [EnzSub]$:

$$[EnzSub] = \frac{[E_0] \cdot [Sub]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [Sub]} = \frac{[E_0] \cdot [Sub]}{K_M + [Sub]} \quad [Gl. 2]$$

Die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) steht hierbei als zusammengefasste, scheinbare Dissoziationskonstante für alle Enzym-gebundenen Spezies, die an der Reaktion beteiligt sind [Fersht, 1999]. Durch Einsetzen in [Gl. 1] ergibt sich die Umsatzgeschwindigkeit v :

$$v = \frac{k_2 \cdot [E_0] \cdot [Sub]}{K_M + [Sub]} \quad [Gl. 3]$$

Mit $v_{max} = k_2 \cdot [E_0]$ und bei infinitesimal kleiner Konzentration des Substrats im Vergleich zur Michaelis-Konstante ($[Sub] \ll K_M$) vereinfacht sich [Gl. 3]:

$$v = \frac{v_{max}}{K_M} \cdot [Sub] \quad [Gl. 4]$$

Die Umsatzgeschwindigkeit v ist also direkt proportional zur Substratkonzentration (Reaktion 1. Ordnung).

1.5.2 Enantioselektivität

1.5.2.1 Grundlagen der Stereoselektivität

Der Hauptvorteil bei der Verwendung von Biokatalysatoren liegt neben der Regio- und Chemoselektivität in der häufig beobachteten Stereospezifität. Enzyme sind aus Aminosäuren aufgebaut, die mit Ausnahme von Glycin, das kein Stereozentrum enthält, alle dieselbe absolute Konfiguration (L- bzw. S-Form) aufweisen. Aufgrund dieser Besonderheit besitzen sie bei der

Reaktionskatalyse im Vergleich zur absoluten asymmetrischen Synthese, bei der enantiomerenangereicherte Produkte aus achiralen Vorstufen ohne Einwirkung bereits vorhandener optisch aktiver Elemente gebildet werden [Feringa und van Delden, 1999], die Fähigkeit zur chiralen Diskriminierung. So können Biokatalysatoren neben Racematspaltungen auch Meso-Verbindungen stereoselektiv umsetzen bzw. pro- und achirale Substrate spezifisch in optische aktive Produkte überführen.

Bei der Anlagerung eines Substrats an ein Enzym (Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes) im Verlauf der Reaktionskatalyse treten Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureresten im aktiven Zentrum und der umzusetzenden Verbindung auf. Im Verlauf der Komplexierung werden einige der bestehenden Wasserstoffbrücken geöffnet, so dass die dafür notwendige Energie die freie Energie der Komplexbildung (ΔG) verändert [Chen und Sih, 1989]. Durch den einheitlichen Aufbau von Enzymen aus L-Aminosäuren befindet sich das gebundene Substrat in einer homochiralen Umgebung. Die freie Energie der Komplexbildung ist somit auch abhängig von der absoluten Konfiguration des Substrats, d.h. ΔG ist für die beiden optischen Antipoden einer asymmetrischen Verbindung unterschiedlich hoch. Diese Energiedifferenz ($\Delta\Delta G$) ist entscheidend dafür, welche enantiomere Form bevorzugt umgesetzt bzw. ausgehend von Meso-Verbindungen sowie pro- und achiralen Substraten gebildet wird, d.h. $\Delta\Delta G$ bestimmt die Stereoselektivität eines Enzyms.

1.5.2.2 Berechnung der Enantioselektivität

Unter physiologischen Bedingungen katalysieren Enzyme die Umsetzung ihrer natürlichen Substrate meist mit 100 %iger Stereoselektivität. Ohne diese Einheitlichkeit der enzymatischen Reaktionen in den Organismen z.B. bei der Synthese chiraler Verbindungen, die an Erkennungs- und Informationsprozessen beteiligt sind, könnten Lebensformen, wie wir sie kennen, nicht existieren. In nicht-natürlichen Systemen werden bei biokatalytischen Umsetzungen jedoch verschiedene Stufen der Stereoselektivität beobachtet. Die Ausprägung der Stereopräferenz kann über die optische Reinheit der an der Reaktion beteiligten Verbindungen charakterisiert werden. Die Angabe erfolgt hierbei üblicherweise in Prozent Enantiomerenüberschuss (%*ee*). Dieser kann aus dem Molenbruch der beiden Enantiomere (x_A und x_B) gemäß [Gl. 5] berechnet werden:

$$\%ee = \frac{x_A - x_B}{x_A + x_B} \cdot 100 \quad [\text{Gl. 5}]$$

In der Praxis werden Enantiomerenüberschüsse meist aus den Peakflächen der beiden Enantiomere aus der GC- bzw. HPLC-Analyse unter Verwendung chiraler Trennsäulen bestimmt. Diese Berechnung ist möglich, da optische Antipoden die gleichen Response-Faktoren bei der Detektion (z.B. Flammen-Ionisations-Detektor) besitzen.

Bei einer kinetischen Racematspaltung verändern sich jedoch die Enantiomerenüberschüsse in Abhängigkeit vom Umsatz. Untersuchungen bezüglich der Ausprägung der Stereoselektivität bei zwei kinetischen Racematspaltungen sind folglich nur bei vergleichbaren Umsätzen sinnvoll. Aus diesem Grund wurden Berechnungsmodelle entwickelt, die eine quantitative Beschreibung der Stereoselektivität erlauben [Chen et al., 1982, 1987; Chen und Sih, 1989]. Als Kenngröße dient hierbei die sogenannte Enantioselektivität bzw. das Enantiomerenverhältnis E . Dieser E -Wert stellt ein Maß für die Unterscheidung eines Katalysators zwischen zwei Enantiomeren dar.

1.5.2.2.1 Irreversible Reaktionen [Chen et al., 1982]

Bei der Hydrolase-katalysierten Spaltung des Acetats eines sekundären, chiralen Alkohols in Puffer-Lösung (Abb. 1-9) kann aufgrund der hohen Konzentration des Wassers (55,5 mol/L) von einer irreversiblen Reaktion ausgegangen werden. Die beiden enantiomeren Formen A und B der optisch aktiven Verbindung treten dabei in Konkurrenz um den Biokatalysator, wobei A bevorzugt umgesetzt wird.

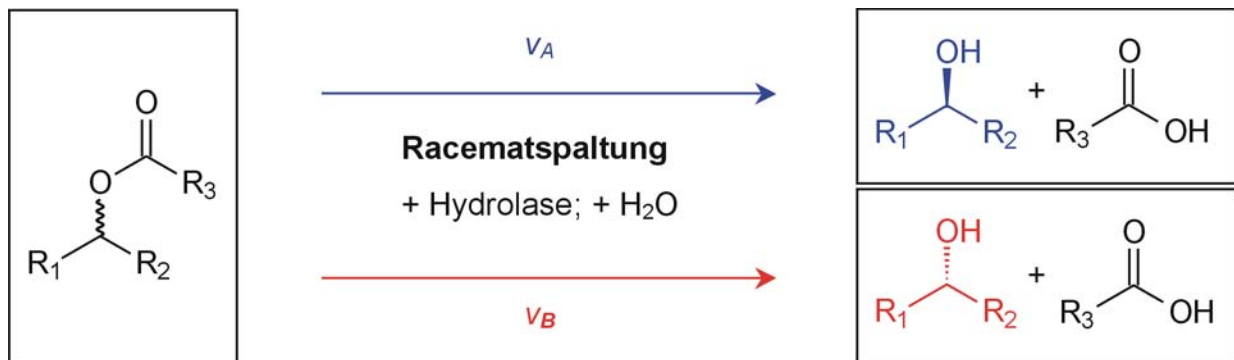


Abb. 1-9 Irreversible Hydrolyse eines Esters eines sekundären, chiralen Alkohols in wässriger Puffer-Lösung (Racematspaltung). Die beiden enantiomeren Formen A und B treten dabei in Konkurrenz um den Biokatalysator. v_A und v_B geben die Umsatzgeschwindigkeiten der beiden kompetitiven Enantiomere an.

Unter weiterer Annahme, dass keine Produktinhibierung auftritt gilt nach [Gl. 4] für das Verhältnis der Umsatzgeschwindigkeiten (v_A und v_B) bei abnehmenden Konzentrationen von A ($d[A]$) und B ($d[B]$):

$$\frac{v_A}{v_B} = \frac{\left(\frac{v_{\max}}{K_M}\right)_A}{\left(\frac{v_{\max}}{K_M}\right)_B} \cdot \frac{d[A]}{d[B]} \quad [\text{Gl. 6}]$$

Integration der Differentialgleichung von der Anfangskonzentration $[A_0]$ bzw. $[B_0]$ bis zur aktuell vorliegenden Konzentration $[A]$ bzw. $[B]$ ergibt:

$$\frac{\ln \frac{[A]}{[A_0]}}{\ln \frac{[B]}{[B_0]}} = \frac{\left(\frac{v_{\max}}{K_M}\right)_A}{\left(\frac{v_{\max}}{K_M}\right)_B} = E \quad [\text{Gl. 7}]$$

Die Enantioselektivität E gibt die chirale Diskriminierung des Enzyms gegenüber den beiden um das Enzym konkurrierenden Enantiomere wieder. E ist hierbei durch die Michaelis-Konstanten und die Maximalgeschwindigkeiten bei der Umsetzung von A und B determiniert und stellt somit eine kinetische Größe dar. Da die Bestimmung dieser Konstanten in einer Reaktion, bei der die beiden optischen Antipoden A und B kompetitiv vorliegen, nicht möglich ist, wurden eine Reihe von Näherungsformeln entwickelt. So lassen sich E -Werte bei Kenntnis des Umsatzes (U) und des Enantiomerenüberschusses von Substrat und Produkt ($\%ee_S$ bzw. $\%ee_P$) nach:

$$E = \frac{\ln[(1-U) \cdot (1-ee_S)]}{\ln[(1-U) \cdot (1+ee_S)]} = \frac{\ln[1-U \cdot (1+ee_P)]}{\ln[1-U \cdot (1-ee_P)]} \quad [\text{Gl. 8}]$$

berechnen (Endpunkt-Methode), wobei U neben einer experimentellen Bestimmung, wie z.B. durch den pH-stat-Assay (Kap. 5.5.6.3.2), auch über $\%ee_S$ und $\%ee_P$ zugänglich ist:

$$U = \frac{ee_S}{ee_S + ee_P} \quad [\text{Gl. 9}]$$

1.5.2.2.2 Reversible Reaktionen [Chen et al., 1987]

Steht bei einer Hydrolase-katalysierten Reaktion das Nucleophil, das den Acyl-Enzym-Komplex angreift (Kap. 1.4.1), nur in begrenztem Umfang zur Verfügung, so ist die enzymatische

Umsetzung prinzipiell als reversibel anzusehen [Faber, 2000]. Als Beispiel kann eine Um- oder Veresterung in organischen Lösungsmitteln oder 2-Phasen-Systemen dienen. Bei der Berechnung der Enantioselektivität ist im Gegensatz zur Hydrolyse von Esterverbindungen in wässriger Lösung die Lage des Gleichgewichtes der Reaktion zu berücksichtigen. Der *E*-Wert ist somit von der Gleichgewichtskonstanten *K* (thermodynamische Größe) abhängig.

In achiraler Umgebung bleiben die Gleichgewichtskonstanten der an der Reaktion beteiligten Enantiomerenpaare (*R*-Edukt und *R*-Produkt bzw. *S*-Edukt und *S*-Produkt) unverändert, so dass sowohl bei der Hin- als auch bei der Rückreaktion die gleiche Stereopräferenz auftritt. Das heißt, wenn eine enantiomere Form des Substrats schneller reagiert, so wird bei der Rückreaktion das Produkt mit derselben absoluten Konfiguration, wie dieses Edukt, bevorzugt umgesetzt. Die Umkehrreaktion besitzt also eine Stereopräferenz, die die optische Reinheit des zurückbleibenden Substrats verringert. Um dennoch hohe Enantiomerenüberschüsse für das Edukt und Produkt zu erhalten, müssen die Bedingungen so gewählt werden, dass sich das Gleichgewicht verschiebt und eine annähernd irreversible Reaktion (Kap. 1.5.2.2.1) resultiert. Bei dieser Vorgehensweise wird neben der Erhöhung der Enantioselektivität auch die Umsatzrate des Substrats gesteigert. Aus diesem Grund erfolgt z.B. die Acylierung eines Alkohols in einem organischen Lösungsmittel üblicherweise durch Umesterung mit dem korrespondierenden Acyl-Vinyl-Ester als Kosubstrat. Der hierbei freigesetzte Acetaldehyd (Vinylalkohol) entweicht aus dem Gleichgewicht und verschiebt die Reaktion auf die Seite der gewünschten Esterverbindung (Kap. 3.3.2.1). Eine andere Möglichkeit das Gleichgewicht einer stereoselektiven Reaktion zu verlagern besteht darin, ein Enantiomer aus dem Ansatz zu isolieren. Kürzlich wurde quantitativ nachgewiesen, dass sich durch nicht-stereospezifische Entfernung chiraler Produkte, wie z.B. bei einer enantioselektiven Enzym-katalysierten Hydrolyse in einem organischen Lösungsmittel, sowohl der Umsatz als auch die optische Reinheit des Substrats und des Produkts steigern lässt [Cheng und Tsai, 2000].

1.5.2.2.3 Bedeutung der Enantioselektivität für praktische Anwendungen

Bei der Auswahl eines Enzyms als Biokatalysator für eine stereospezifische Reaktion kommt der Enantioselektivität die entscheidende Bedeutung zu. Als Faustregel gilt, dass *E*-Werte kleiner 15 für präparative Zwecke nicht geeignet sind. Bei einem ausreichend hohen Umsatz kann aber dennoch zumindest das Substrat in kleinem Umfang optisch rein isoliert werden. Dagegen ist ein Enzym im Bereich von $E = 15 - 30$ als gut und bei Werten darüber als exzellent anzusehen. Hierbei ist aber zu berücksichtigen, dass hohe *E*-Werte ($E > 100$) stark fehlerbehaftet sein

können. In diesem Bereich haben selbst minimale Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse einen signifikanten Einfluss auf die hieraus berechnete Enantioselektivität [Faber, 2000]. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll, *E*-Werte > 100 nicht mehr explizit anzugeben.

1.5.2.3 Vorhersage und Abschätzung der Enantioselektivität

Die Enantioselektivität eines Enzyms beschreibt immer ein Gesamtsystem, d.h. jede Änderung eines Reaktionsparameters kann sich darauf auswirken. Ein Wechsel der Reaktionsbedingungen (Temperatur; Druck), der Substratstruktur (Edukt; Kosubstrat) oder des Reaktionsmediums (wässrige Lösung vs. organisches Lösungsmittel; 2-Phasen-Systeme; Wasseraktivität; Polarität) sowie eine Modifikation des Biokatalysators (Mutation; Immobilisierung; *imprinting*-Technologie) kann einen drastischen Einfluss auf die Stereospezifität haben. So führt z.B. die Erniedrigung der Reaktionstemperatur üblicherweise zur Erhöhung der Enantioselektivität, wobei aber auch gegenteilige Beispiele existieren [Bornscheuer und Kazlauskas, 1999]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei der Racematspaltung von arylaliphatischen Carbonsäure-Vinylestern eine erhöhte Stereospezifität im Vergleich zu den Ethylester-Analoga zu beobachten ist. Neben der positiven Beeinflussung des Gleichgewichts (Kap. 1.5.2.2.2), dürfte dieser Effekt auf elektronische Wechselwirkungen der Doppelbindung mit den Aminosäureresten des Enzyms zurückzuführen sein, da die beiden Alkoholreste (Vinyl- bzw. Ethyl-) eine vergleichbare Größe besitzen [Henke et al., 2000; Yang et al., 1999]. Schließlich sind bei der Modifikation eines Enzyms durch die Methoden der gerichteten Evolution (Kap. 1.7.3.2) oder bei einem Wechsel des Reaktionsmediums (Kap. 1.7.2.2), eventuell verbunden mit einer Immobilisierung des Biokatalysators, drastische Änderungen der Enantioselektivität zu beobachten. Trotz einer Vielzahl an Untersuchungen auf diesem Gebiet und neuer Ansätze in der Bioinformatik (*in silico assays*; z.B. Pleiss et al., 2000; Scheib, 1999) ist zur Zeit eine Angabe von Enantioselektivitäten bei enzymatischen Reaktion *a priori* nicht möglich.

1.5.2.3.1 Kazlauskas-Regel

Neben der bereits im Jahre 1964 aufgestellten 'Prelog-Regel', die eine Vorhersage des stereochemischen Verlaufs bei der asymmetrischen Reduktion von Ketonen aufgrund der Größe bzw. Hydrophobizität der Substituenten an der Keto-Funktion erlaubt [Prelog, 1964], wurden auch für die Lipase-katalysierte Umsetzung von primären bzw. sekundären Alkoholen Regeln

entwickelt, die eine Prognose der Stereopräferenz ermöglichen [Kazlauskas et al., 1991; Weissfloch und Kazlauskas, 1995].

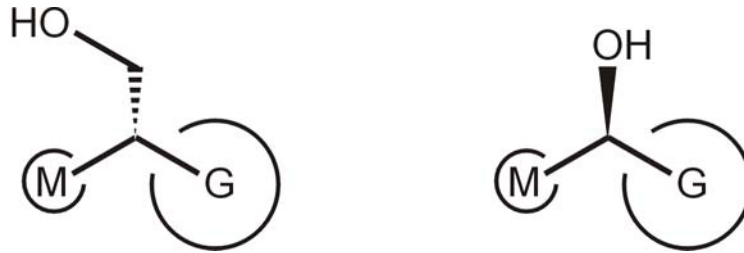


Abb. 1-10 Empirische Regel (Kazlauskas-Regel) zur Vorhersage, welches Enantiomer eines primären bzw. sekundären Alkohols bei einer Lipase-katalysierten Reaktionen bevorzugt reagiert. Das abgebildete Enantiomer mit den Substituenten G (großer Rest) und M (mittelgroßer Rest) am chiralen Zentrum wird in Ver- bzw. Umesterungen schneller umgesetzt [Kazlauskas et al., 1991; Weissfloch und Kazlauskas, 1995].

Die empirischen Regeln zur Vorhersage der Enantiopräferenz bei Lipase-katalysierten Reaktionen basieren auf dem Größenverhältnis der Substituenten am chiralen Zentrum. Bei den Untersuchungen zur Umsetzung von mehr als 130 sekundären Alkoholen [Kazlauskas et al., 1991] erzielte die Prognose mit über 93 % eine höhere Trefferquote als bei den primären Alkoholen (89 %; 61 Verbindungen) [Weissfloch und Kazlauskas, 1995]. Neben der höheren Zuverlässigkeit im ersten Fall ist zudem die Stereopräferenz im Vergleich zu den primären Alkoholen umgekehrt (Abb. 1-10). Bei einem deutlichen Größenunterschied der beiden Substituenten (G: groß; M: mittelgroß) am chiralen Zentrum ist eine erhöhte Enantioselektivität bei der Umsetzung zu beobachten. Sind sie dagegen klein bzw. von vergleichbarer Größe, so resultiert eine annähernd symmetrische Molekülstruktur. In diesen Fällen ist lediglich eine geringe chirale Diskriminierung im Verlauf der Reaktion zu erwarten, d.h. diese Verbindungen sind bei Ver- und Umesterungen als 'schwer-trennbar' einzustufen.

1.5.2.3.2 Schätzwert für die Enantioselektivität (*Quick E*)

Die Bestimmung der Enantioselektivität bei irreversiblen, Hydrolase-katalysierten Reaktionen gemäß der Endpunkt-Methode (Kap. 1.5.2.2.1) [Chen et al., 1982] gestaltet sich in der Praxis sehr aufwendig. Nach Durchführung einer Testreaktion unter kompetitiven Bedingungen (Racematspaltung) müssen zur Berechnung des *E*-Werts die Enantiomerenüberschüsse des Edukts und Produkts sowie der Umsatz ermittelt werden. Die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes (Aliquot) und die Bestimmung der erforderlichen Parameter ist äußerst zeitintensiv. Aus diesem Grund wurde ein Konzept (*Quick E*) entwickelt, nach dessen Messprinzip die Enantioselektivität

bei einer Hydrolase-katalysierten Reaktion abgeschätzt werden kann (scheinbare Enantioselektivität E_{app}) [Janes und Kazlauskas, 1997]. Im Gegensatz zur Endpunkt-Methode für die Bestimmung der wahren Enantioselektivität E_{true} erfolgt keine Testreaktion unter kompetitiven Bedingungen, sondern jedes Enantiomer wird separat umgesetzt (Abb. 1-11).

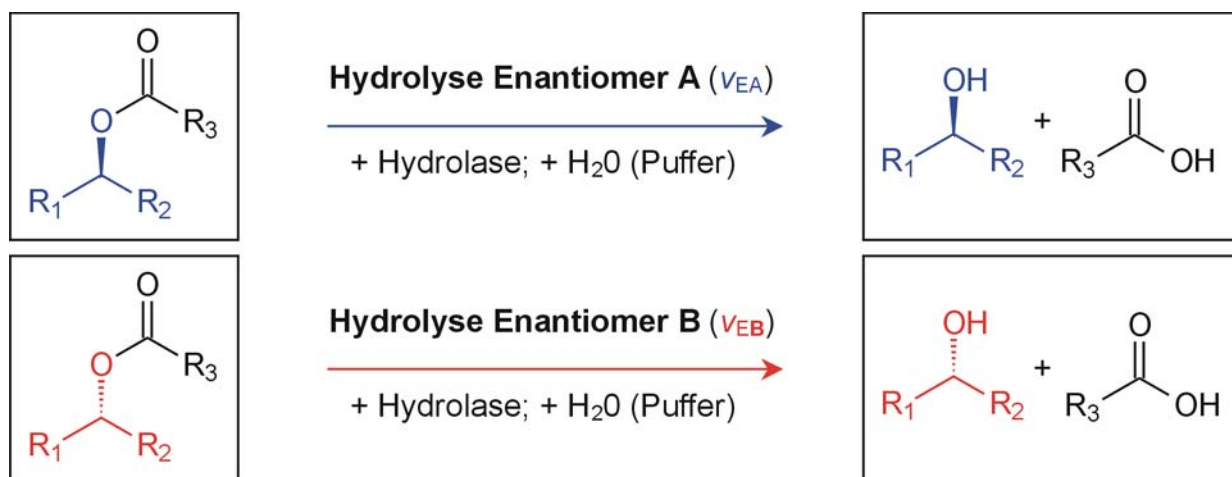


Abb. 1-11 Bei Durchführung einer Hydrolase-katalysierten Reaktion unter nicht-kompetitiven Bedingungen wird für jedes der beiden Enantiomere A und B eine separate Testreaktion durchgeführt. Aus dem Verhältnis der beiden Start-Reaktionsgeschwindigkeiten v_{EA} und v_{EB} ergibt sich ein Schätzwert für die Enantioselektivität (scheinbare Enantioselektivität E_{app}).

Aus dem Verhältnis der beiden Start-Reaktionsgeschwindigkeiten v_{EA} und v_{EB} , berechnet sich die scheinbare Enantioselektivität E_{app} :

$$E_{app} = \frac{v_{EA}}{v_{EB}} \quad [\text{Gl. 10}]$$

Durch Auswahl eines geeigneten Assay-Systems (Kap. 1.8), das die rasche Bestimmung einer der Reaktionsgeschwindigkeit proportionalen Messgröße (z.B. Absorptionsmessung) erlaubt, sind die Startaktivitäten leicht zugänglich. Bei Wiedereinführung einer Konkurrenzsituation durch Zugabe einer zweiten, racemischen Verbindung in beide Ansätze lässt sich die Zuverlässigkeit des Schätzwerts E_{app} erhöhen [Janes und Kazlauskas, 1997].

1.6 Metallaffinitäts-Chromatographie

Das Prinzip der Affinitäts-Chromatographie beruht darauf, dass ein spezifischer Ligand des Proteins über einen Abstandshalter (*spacer*) an eine Matrix (z.B. Agarose oder Acrylamid)

gekoppelt wird (Abb. 1-12). Anschließend lässt sich dann ein Protein nach ausgiebigem Waschen mit dem gleichen oder einem anderen Liganden von der Matrix spezifisch ablösen.

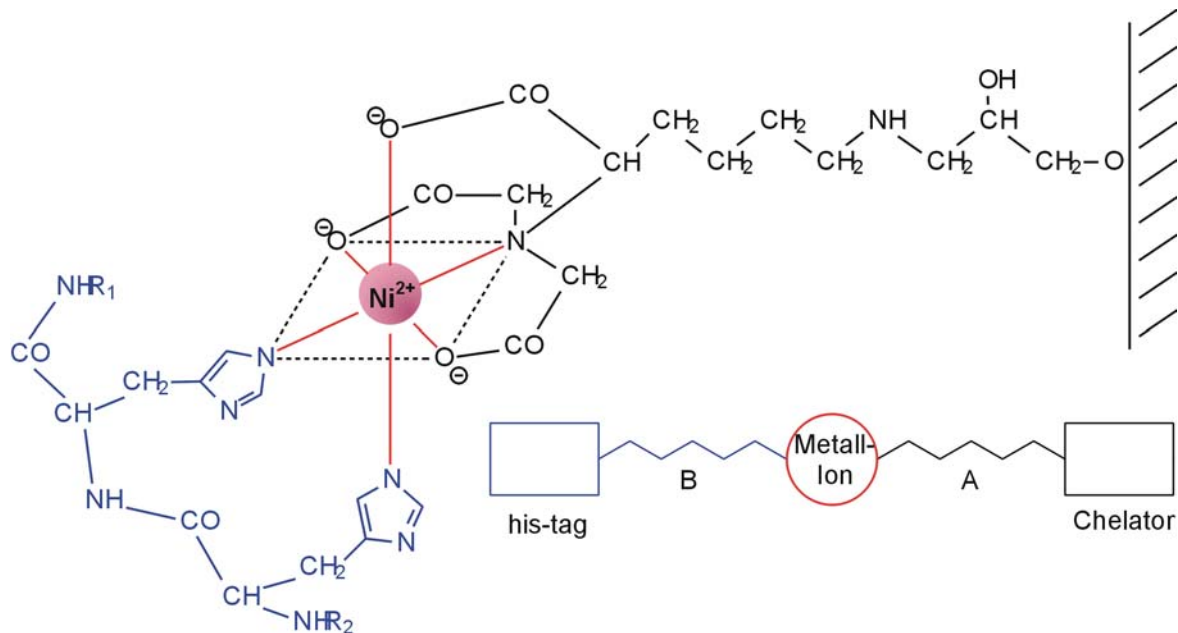


Abb. 1-12 Wechselwirkungen (rot) zwischen den benachbarten Histidinresten eines Proteins (blau) und der Nickel-Nitrilotriessigsäure-Matrix (schwarz). Die funktionelle Nitrilotriessigsäure-Gruppe ist im aufgezeigten Beispiel an Sepharose CL-6B gebunden. In der schematischen Darstellung sind die entscheidenden Wechselwirkungen hervorgehoben. Ist die Komplexbindung B zu schwach, dann ist eine Bindung des *his-tag*-Proteins nicht möglich. Dagegen treten bei einer zu starken Wechselwirkung B Verluste durch die Ablösung von Protein-Metall-Komplexen beim Waschen der Matrix auf. Bei der Verwendung von Nitrilotriessigsäure und Nickel sind beide Bindungen (A + B) stärker, so dass eine erfolgreiche Aufreinigung von *his-tag*-Proteinen ermöglicht wird.

Bei der Metallaffinitäts-Chromatographie (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*; IMAC) basiert die reversible Bindung auf Metallionen (meist Ni^{2+} , Cu^{2+} oder Zn^{2+}), die über einen Chelat-Komplex an der Matrix fixiert sind [Porath et al., 1975]. Hierbei bleiben jedoch einige Koordinationsstellen des Metalls frei. An diesen unbesetzten Stellen können Histidin-, Tryptophan- oder Cystein-Gruppen des aufzureinigenden Proteins gebunden werden. Neben dieser unspezifischen Koordination frei zugänglicher Aminosäuren weist eine Reihe natürlich vorkommender Eiweißstrukturen zusätzlich definierte Metallbindungsstellen auf. Diese Proteine binden im Normalfall stärker an die immobilisierten Metallionen, so dass sie erst bei hoher Liganden-Konzentration (z.B. Imidazol) im Eluenten aus der Koordinationsbindung gelöst werden. Fusioniert man eine derartige Metallbindungsstelle z.B. an ein Enzym, so lässt sich der Biokatalysator unter Ausnutzung des beschriebenen Prinzips aufreinigen.

In den letzten Jahren wurden mehrere Peptidsequenzen, die in der Lage sind spezifische Wechselwirkungen mit immobilisierten Metallionen einzugehen, identifiziert. Bei dem am häufigsten verwendeten *tag* handelt es sich um sechs aufeinanderfolgende Histidine (*his-tag*) [Schmitt et al., 1993], die auf molekulargenetischem Wege angefügt werden. Zur Fusion der Proteine mit dem *his-tag* steht eine Reihe kommerziell erhältlicher Expressionsvektoren zur Verfügung. Zur Aufreinigung wurde zunächst Cu^{2+} , das vier Koordinationsstellen für die Fixierung der *his-tag* Strukturen besitzt, eingesetzt. Die Bindung der *his-tag*-Proteine erwies sich jedoch zu schwach, so dass man auf Ni^{2+} , das sechs Komplexbindungsstellen aufweist, überging. Die Ni^{2+} -Ionen werden dabei mit einem speziell entwickelten, vierzähligen Chelatbildner (Nitrilotriessigsäure; NTA) fest an der Matrix gehalten, so dass zwei Positionen zur Bindung des Proteins zur Verfügung stehen [Hochuli et al., 1987]. Die Effizienz der Anlagerung eines Poly-Histidin-Peptids ist aber auch von dem zur Chromatographie eingesetztem Eluenten abhängig. Proteine mit einem *tag* aus zwei Histidinen binden aus diesem Grund nur bei niedrigen Ionenstärken (z.B. 0,05 mol/L Phosphat-Puffer) an die Matrix. Bei höher konzentrierten Eluenten oder unter denaturierenden Bedingungen (z.B. 6 mol/L Guanidin) sind für eine erfolgreiche Aufreinigung *tags*, die aus mehr als zwei Histidinen bestehen, erforderlich. Für die gängigen Verwendungszwecke erwiesen sich sechs Histidine (*his-tag*) als am besten geeignet [Hochuli et al., 1988].

Nitrilotriessigsäure-Matrices zur Aufreinigung von *his-tag* Proteinen sind heutzutage in unterschiedlichster Form kommerziell erhältlich. So existieren neben einfachen Trenngelen und vorgefertigten Festphasen-Extraktionssäulen bereits auch Protokolle für den Einsatz in Hochdurchsatz-Testsystemen. Durch Fixierung der NTA-Matrix auf kleinen (ca. 50 μm Durchmesser), magnetischen Kügelchen (Ni-NTA *magnetic agarose beads*) lässt sich z.B. eine Proteinaufreinigung bzw. -isolierung im Mikrotiterplattenformat durchführen.

1.7 Entwicklung eines biokatalytischen Prozesses

Im Vergleich zu konventionellen, chemischen Syntheseverfahren müssen bei der Entwicklung eines biokatalytischen Prozesses, aufgrund der eingesetzten Mikroorganismen und Enzymen, besondere Aspekte berücksichtigt werden. Hierbei handelt es sich vor allem um die spezifische Enzymkinetik, die Proteinstabilität unter technischen Bedingungen und die Besonderheiten, die sich aus den ursprünglichen physiologischen Aufgaben in der lebenden Zelle ableiten, wie z.B. Wachstum, Induktion der Enzymexpression oder die Verwendung von Stoffwechselwegen für

mehrstufige Reaktionen [Schmid et al., 2001]. In Abb. 1-13 ist die Vorgehensweise bei der Etablierung eines biokatalytischen Verfahrens schematisch dargestellt.

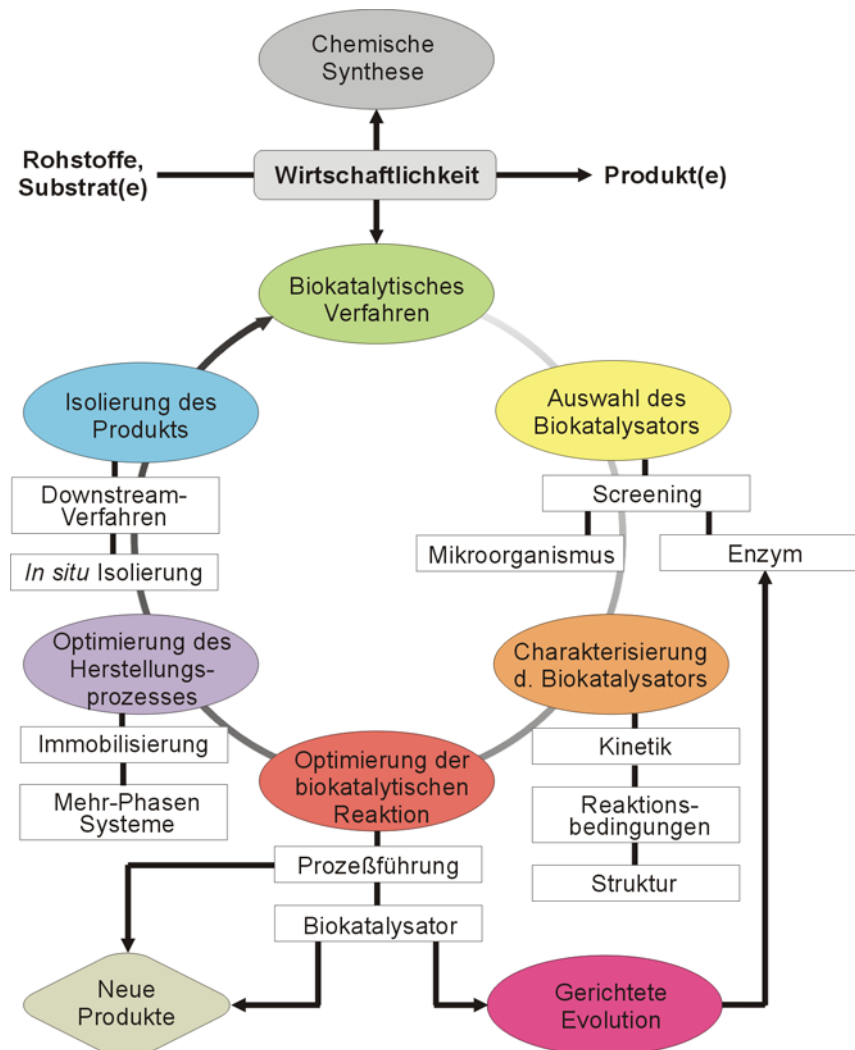


Abb. 1-13 Schematische Darstellung der einzelnen Aspekte, die bei der Entwicklung eines biokatalytischen Verfahrens berücksichtigt werden müssen (modifiziert nach Koeller und Wong, 2001; Schmid et al., 2001).

Bei der Planung eines biokatalytischen Verfahrens steht an erster Stelle die Auswahl eines möglichen Synthesewegs und der (kostengünstigen) Substrate. Im zweiten und gleichzeitig wichtigsten Schritt ist es anschließend erforderlich, einen Biokatalysator zu finden, der in der Lage ist, die Ausgangsverbindung in das gewünschte Produkt zu überführen. Die Bedeutung dieses Punkts lässt sich daran ermessen, dass die Entdeckung eines geeigneten Biokatalysators oder eines neuen Reaktionsweges der Anlass für die Umstellung eines Verfahrens bzw. einzelner Syntheseschritte innerhalb eines konventionellen Herstellungsprozesses sein können [Shimizu et al., 1997]. Findet sich bei einem Screening-Verfahren, bei dem die zur Verfügung stehenden

Mikroorganismen und Enzyme getestet werden, ein geeigneter Biokatalysator, so sind bei der weiteren Entwicklung einige wichtige Punkte zu berücksichtigen.

Bei den meisten industriell interessanten Verbindungen handelt es sich nicht um die natürlichen Substrate der Mikroorganismen bzw. Enzyme, d.h. die Umsetzung erfolgt möglicherweise nicht mit der gewünschten Regio- und Stereoselektivität. Ferner ist zu beachten, dass der identifizierte Biokatalysator im Hinblick auf die Temperatur- und Lösungsmittelstabilität unter den erforderlichen Reaktionsbedingungen nicht eingesetzt werden kann. Schließlich ist aus Gründen der wirtschaftlichen Rentabilität eine hohe Standzeit unter den Produktionsbedingungen anzustreben. Deshalb erfolgt in Analogie zu konventionellen chemischen Prozessen der Einsatz meist in immobilisierter Form (heterogene Katalysatoren). Hierdurch erhöht sich die Stabilität der Biokatalysatoren und sie können relativ einfach isoliert und wiederverwendet werden. Mittlerweile existieren jedoch Verfahren, die aufgrund der eingesetzten Biokatalysatoren so kostengünstig sind, dass Mikroorganismen oder Enzyme auch als homogene Katalysatoren ohne nachfolgende Isolierung oder Wiederverwertung Verwendung finden (z.B. Coenzym-abhängige Redoxreaktionen) [Schmid et al., 2001].

1.7.1 Auswahl des Biokatalysators

Bei der Auswahl des Biokatalysators stellt sich prinzipiell die Frage, ob für das Produktionsverfahren ein Mikroorganismus oder ein isoliertes Enzym geeignet ist. Für Umsetzungen bei denen keine Cofaktor-Regenerierung erforderlich ist, wie z.B. bei Hydrolysen oder Isomerisierungen, können sowohl lebende Zellen als auch isolierte Enzyme eingesetzt werden. Allerdings ist die Isolierung des Produkts bei der Verwendung ganzer Zellen oftmals umständlich. Im Gegensatz dazu lassen sich isolierte Enzyme mehr wie konventionelle, heterogene Katalysatoren behandeln. Neben einer einfachen Aufreinigung können sie leicht immobilisiert (Kap. 1.7.2.3) und für den Einsatz in organischen Lösungsmitteln stabilisiert werden [Thayer, 2001]. Aus diesen Gründen wird im Folgenden verstärkt auf die Verwendung isolierter Enzyme (insbesondere Hydrolasen) eingegangen.

1.7.1.1 Traditionelle Enzyme

Die schnellste und einfachste Methode einen geeigneten Biokatalysator zu finden ist es, die kommerziell erhältlichen Enzyme zu testen. Das Assay-System ist hierbei so gestaltet, dass auf Rahmenbedingungen zurückgegriffen wird, die für alle zu prüfende Enzyme verträglich sind (z.B. wässrige Lösung; Test von Modellsubstraten). Findet man hierbei eine Präparation mit den

gewünschten Eigenschaften, so dürfte auch die Verfügbarkeit in größerem Maßstab, wie sie für den technischen Einsatz erforderlich ist, gesichert sein. Dieser Punkt gehört neben der Stabilität und der erzielbaren Raum-Zeit-Ausbeuten zu den drei entscheidenden Kriterien für einen rentablen Herstellungsprozess [Marrs et al., 1999]. Ein weiterer Vorteil dieser kommerziellen Enzyme liegt darin, dass sie schon seit Jahren traditionell bei Biotransformationen eingesetzt werden und so die spezifischen Eigenschaften und Arbeitsmethoden, die sich für die Entwicklung eines technischen Prozesses als sehr hilfreich erweisen dürften, umfangreich in der Literatur dokumentiert sind. Das Angebot an diesen herkömmlichen Biokatalysatoren ist jedoch gering. Bei den Lipasen z.B. sind derzeit etwa 70 Präparationen auf dem Markt, wobei die tatsächliche Anzahl an unterschiedlichen Spezies (20) weit darunter liegt [Kazlauskas und Bornscheuer, 2000].

1.7.1.2 Identifizierung neuer Enzyme

Im Lauf der historischen Entwicklung wurden industrielle Enzyme aus reichlich vorkommenden, natürlichen Abfallprodukten isoliert (Taubendung für die Ledergerbung; Kälbermagen bei der Käseherstellung). Über die Jahre wurden die Präparationen ausgehend von der einfachen Aufreinigung bis hin zur heutigen, kostengünstigen Produktion in rekombinanter Form stets verfeinert (z.B. Schweineleber-Esterase [Lange et al., 2001; Musidlowska et al., 2001]). Obwohl die Möglichkeiten noch nicht ausgeschöpft sind, industriell nützliche Enzyme in noch ungenutzten natürlichen Quellen (z.B. Abfälle in der Fischindustrie) zu finden, konzentriert sich die Suche mittlerweile nahezu ausschließlich auf die Identifizierung bislang unbekannter Mikroorganismen [Marrs et al., 1999]. Bei der Annahme, dass alle mikrobiellen Spezies in ihrer Gesamtheit biochemisch omnipotent sind [Schlegel, 1992], wird eine Fülle noch unbekannter Enzyme vermutet, die mit ihren neuen, einzigartigen Eigenschaften im Vergleich zu den derzeit kommerziell angebotenen Biokatalysatoren (Kap. 1.7.1.1) ein riesiges Potential für industrielle Anwendungen in sich bergen.

Seit Anfang der 90er Jahre wird die biologische Artenvielfalt (insbesondere der Mikroorganismen) gezielt als Quelle für neue Innovationen in der Biotechnologie angesehen. Aufgrund von morphologisch-physiologischen Untersuchungen nahm man an, dass von den Bakterien maximal 12 % (4760 Spezies von geschätzten 40000 Spezies) und von den Pilzen sogar nur maximal 5 % (69000 von 1,5 Mio.) aller Spezies bekannt waren [Bull et al., 1992]. Diese Vermutung kann sehr einfach z.B. durch Mikroskopie einer Bodenprobe bestätigt werden, denn hierbei lassen sich 10 bis 100 mal mehr mikrobielle Spezies beobachten als durch gängige

Verfahren isolierbar (kultivierbar) sind [Rondon et al., 1999]. Die weitergehende Analyse zeigt, dass in anderen Lebensräumen die Anzahl an nicht-kultivierbaren Mikroorganismen noch höher liegen dürfte (Tab. 1-2) [Amann et al., 1995; Whitman et al., 1998]. Gestützt werden diese Untersuchungen durch neue Ansätze, die mikrobielle Vielfalt mit molekularbiologisch-chemotaxonomischen Methoden (16S-rRNA-Vergleich; DNA-Hybridisierung) [Amann et al., 1995; Rondon et al., 1999] und statistischen Betrachtungen [Hughes et al., 2001], die für höhere Organismen entwickelt wurden, zu erfassen. Demnach wird heutzutage davon ausgegangen, dass der Anteil an bekannten, kultivierbaren Mikroorganismen mit 1 bis 0,1 % deutlich kleiner ist als frühere Schätzungen vermuten ließen [Hough und Danson, 1999; Rondon et al., 1999; Rouhi, 1999], d.h. die Biotechnologie der letzten Jahre hat sich bislang nur mit den 'mikrobiellen Unkräutern' befasst [Short, 1997]. Die Gesamtzahl aller tierischen, pflanzlichen und mikrobiellen Spezies liegt somit bei ca. $10^7 - 10^8$, wobei bei einem durchschnittlichen Gehalt von $10^4 - 10^5$ *open reading frames* die natürlich vorhandene, genetische Diversifität bei ca. 10^{13} definierten, funktionalen Sequenzen liegen dürfte [Burton et al., 2002].

Tab. 1-2 Prozentualer Anteil der kultivierbaren Mikroorganismen eines bestimmten Lebensraums im Vergleich zu der darin enthaltenen Gesamtzahl an Zellen [Amann et al., 1995]. Die kultivierbaren mikrobiellen Spezies wurden hierbei als *cfu* (*colony forming units*) gemessen.

Lebensraum	Anzahl der kultivierbaren Mikroorganismen [%]
Meer- bzw. Seewasser	0,001 – 0,1
Süßwasser	0,25
Seewasser (mesophil)	0,1 - 1
unbelastetes Mündungswasser	0,1 – 3
Belebtschlamm	1 – 15
Sediment	0,25
Boden	0,3

Zur Identifizierung neuer Enzyme haben sich in den letzten Jahren zwei prinzipiell unterschiedliche Methoden etabliert. Einerseits wird versucht durch umfangreiche Testserien unter Anwendung spezieller Protokolle für die Isolierung bzw. Anreicherung so wie der Auswahl von Proben aus besonderen Habitaten (substratspezifisch; extreme Lebensräume, Kap. 1.7.1.3) bislang unbekannte Mikroorganismen isolieren und charakterisieren zu können [Clausen, 1997]. In das Testsystem ist oft die gewünschte Reaktion implementiert, um so die Mikroorganismen zu

selektieren, die durch Metabolisierung des Substrats z.B. eine Stickstoff- oder Kohlenstoffquelle erschließen können [Hauer et al., 1999]. Erst kürzlich gelang es mit dieser Vorgehensweise 25 neue Lipasen zu gewinnen [Cardenas et al., 2001a., 2001b]. Unter Berücksichtigung der taxonomischen Zugehörigkeit neuidentifizierter Spezies zu einer bekannten Familie, die bereits als Quelle für einen Biokatalysator oder Naturstoff genutzt wird, lässt sich die Wahrscheinlichkeit erhöhen, ein verwandtes Enzym oder eine neue Verbindung mit besonderen Eigenschaften zu finden [Bull et al., 1992; Clausen, 1997].

Andererseits ist in den letzten Jahren auf der Suche nach neuen Enzymen durch moderne Ansätze in der Biotechnologie und den Möglichkeiten der Bioinformatik ein Paradigmen-Wechsel eingetreten [Bull et al., 2000]. Gemäß der traditionellen Vorgehensweise in der Mikrobiologie wurde bislang versucht, umfangreiche Stammsammlungen anzulegen und die einzelnen Spezies näher zu charakterisieren. Neuerdings ist man dazu übergegangen, die in einer Probe enthaltene DNA nach Lyse der vorhandenen Mikroorganismen ohne jegliche Anreicherung zu extrahieren und diese anschließend nach neuen Enzymen zu untersuchen. Hierdurch wird erreicht, dass die ursprüngliche biologische Vielfalt auf DNA-Ebene erhalten bleibt, da keine Diskriminierung bzw. kein Verlust an genetischer Information wie bei einer Kultivierung auftritt [Rondon et al., 1999; Short, 1997]. Durch Normalisierung wird hierbei versucht, unter-repräsentierte DNA-Fragmente anzureichern, und somit bei der weitergehenden Analyse auch *least-abundant* genetische Informationen zu erfassen. Hierbei nutzt man aus, dass sich die beiden passenden Einzelstränge einer häufig vorhandenen DNA in dem Gemisch von Molekülen (Boden-DNA-Extrakt) mit viel höherer Wahrscheinlichkeit treffen und schneller als die selten vorhandenen DNA-Fragmente reassoziieren. Durch anschließende Selektion auf die verbliebenen Einzelstränge (ssDNA) können diese angereichert werden [Ko, 1990].

Zur weitergehenden Analyse der extrahierten DNA sind mehrere Strategien gebräuchlich [Antranikian, 2001; Dalboge und Lange, 1998; Marrs et al., 1999; Miller, 2000; Rondon et al., 1999; Rouhi, 1999; Short, 1997]. Auf der einen Seite wird versucht, die DNA partiell zu verdauen und in ein geeignetes Expressionssystem (*gene-sized fragments*; *shotgun*-Methode) zu klonieren. Bei Durchmusterung der Klon-Bank (Bibliothek) mittels eines geeigneten Testsystems (Kap. 1.8) bzw. durch Sequenzierung und anschließender Datenbank-Recherche (*gene-mining*) lassen sich neue Enzyme identifizieren. Bei einer Variante dieses Verfahrens werden größere, sehr reine DNA-Fragmente (*operon-sized fragments*; bis zu 300000 bps) isoliert und aufgereinigt. Nach Integration in BAC-Vektoren (*bacterial artificial chromosome*) lassen sich unter Ausnutzung der natürlichen Promotoren ganze Stoffwechselwege exprimieren (*low-level*

expression). Schließlich besteht die Möglichkeit mittels PCR unter Verwendung degenerierter Primer phylogenetisch eng-verbundene DNA-Sequenzen aus der Probe zu amplifizieren. Auf diese Weise können Enzyme identifiziert werden, die verwandten Organismen anderer Habitats entstammen. Zwar weisen diese vergleichbare funktionelle Eigenschaften auf, doch unterscheiden sie sich meist in den optimalen Katalysebedingungen [Demirjian et al., 1999].

1.7.1.3 Biotechnologische Bedeutung extremophiler Mikroorganismen

Im Verlauf der Evolution haben sich Mikroorganismen entwickelt, die auch in den unwirtlichsten Milieus der Erde (Temperatur; Druck; hoher Salzgehalt; usw.) existieren können. Die Anpassungen an solch extreme Umgebungsbedingungen schufen einen Zellaufbau und einen Stoffwechsel, die sich stark von den bislang untersuchten 'mesophilen' Lebensformen unterscheiden. Diese Mikroorganismen und ihre Enzyme weisen Eigenschaften auf, die für die industrielle Anwendung neue, vielversprechende Potentiale aufzeigen (Tab. 1-3).

Tab. 1-3 Industrielle Anwendungen von extremophilen Mikroorganismen und ihren Enzymen (nach Antranikian und Grote, 1997; Demirjian et al., 2001; Hough und Danson, 1999; Schumacher et al., 2001)

Phänotyp	Lebensraum	Enzym(e)	Anwendungen in Diskussion
Thermophil	50 – 80°C	Xylanasen	Papierindustrie
		DNA-Polymerasen	bereits kommerzialisiert (PCR)
		Proteasen	Waschmittel; Brauerei; Wolle
Hyperthermophil	85 – 113°C	Amylase; Pullulanase	Glucose / Fructose als Süßstoffe
Psychrophil	-2 – 20°C	Proteasen	Molkereiprodukte; Käsureifung
		Dehydrogenasen	Biosensoren
Acidophil	pH < 4	Schwefeloxidation	Kohle-Entschwefelung
Alkalophil	pH > 9	Cellulasen	Reinigungsmittel
Halophil	3 – 20 % Salz		Ionentauscher Regenerierung
Piezophil	hohe Drücke	ganze Zellen	Stärkegranulat
Metallophil	hoher Metallgehalt	ganze Zellen	Biominalisation; Erz-Laugung
Radiophil	hohe Strahlendosis	ganze Zellen	biologische Sanierung
Microaerophil	< 21 % O ₂		

Die Suche nach neuen Biokatalysatoren konzentriert sich insbesondere auf Enzyme aus thermophilen Mikroorganismen [Adams und Kelly, 1998; Kelly und Brown, 1993; Niehaus et al., 1999; Sellek und Chaudhuri, 1999]. Diese besitzen nicht nur eine bemerkenswerte

Temperaturstabilität (im Extremfall bis 130°C), sondern sind auch äußerst resistent gegenüber Proteasen, Detergenzien und chaotropen Agenzien. Die Durchführung biotechnologischer Prozesse bei höheren Temperaturen ist mit vielen Vorteilen verbunden. So steigt die Löslichkeit und Diffusion der beteiligten Verbindungen an, wogegen die Viskosität der Reaktionslösung abnimmt. Als Folge hiervon sind höhere Umsatzraten zu erwarten und die Gefahr einer mikrobiellen Kontamination ist bei diesen Temperaturen (> 60°C) deutlich reduziert. Die meisten dieser Enzyme lassen sich in einfacher Weise (Aufreinigung durch Hitzebehandlung) rekombinant in mesophilen Mikroorganismen produzieren, wodurch die Anzahl der kommerziell erhältlichen Biokatalysatoren in jüngster Zeit drastisch angestiegen ist. Einige Hersteller (Kap. 5.2.2.3) sind mittlerweile in der Lage, auf Anfrage zum Teil mehrere hundert Enzyme einer gewünschten Aktivitätsgruppe zu liefern [Demirjian et al., 1999; Miller, 2000].

Durch Aufklärung der Strukturen von Enzymen extremophiler Mikroorganismen wird versucht, die Ursachen für die Stabilität, Flexibilität und Aktivität unter drastischen Bedingungen zu eruieren. Diese Erkenntnisse stellen Ansatzpunkte für das rationale Proteindesign (*molecular modeling*; Kap. 1.7.3.1) verbesserter Biokatalysatoren dar. So konnten über den Vergleich von Enzymen aus thermophilen (Stabilisierung der α -Helices; erniedrigte Entropie des aufgefalteten Enzyms; weniger ungeladene, polare Aminosäurereste; erhöhte Anzahl elektrostatischer Wechselwirkungen) [Sternier und Liebl, 2001] bzw. psychrophilen (weniger Wechselwirkungen zwischen Strukturdomänen; optimierte Elektrostatik im Bereich des aktiven Zentrums) [Smals et al., 2000] Mikroorganismen mit Biokatalysatoren aus mesophilen Spezies einige Besonderheiten identifiziert werden. Eine allgemeine Regel für eine erhöhte bzw. erniedrigte Temperaturstabilität konnte aber bislang noch nicht aufgestellt werden, da bis heute nur wenige Strukturen bekannt sind und sich in den analysierten Enzymen unterschiedliche 'Strategien' offenbaren.

1.7.2 Optimierung einer biokatalytischen Reaktion

Die Charakterisierung eines geeigneten Enzyms, das im Rahmen des Testverfahrens identifiziert wurde, führt meist zur Erkenntnis, dass die Eigenschaften im Hinblick auf die Entwicklung eines rentablen Herstellungsprozesses nur unzureichend sind. Häufig besitzt das Enzym eine zu niedrige Enantioselektivität bei der angestrebten Reaktion, weist unter den erforderlichen Rahmenbedingungen (organisches Lösungsmittel; Temperatur) eine zu geringe Stabilität auf bzw. zeigt eine zu kleine Umsatzrate. Um diese Nachteile zu umgehen und ein effektives biokatalytisches Verfahren (idealer Prozess) [Burton et al., 2002] etablieren zu können, stehen verschiedene Techniken zur Verfügung (Abb. 1-14). Neben den klassischen Ansätzen zur

Variation des Substrats (Substrat-Engineering) oder der Reaktionsbedingungen (Medien-Engineering) sowie der Modifikation des Biokatalysators (Immobilisation; chemische Derivatisierung) kommen hierbei die modernen Methoden der gerichteten Evolution und des rationalen Proteindesigns zum Einsatz.

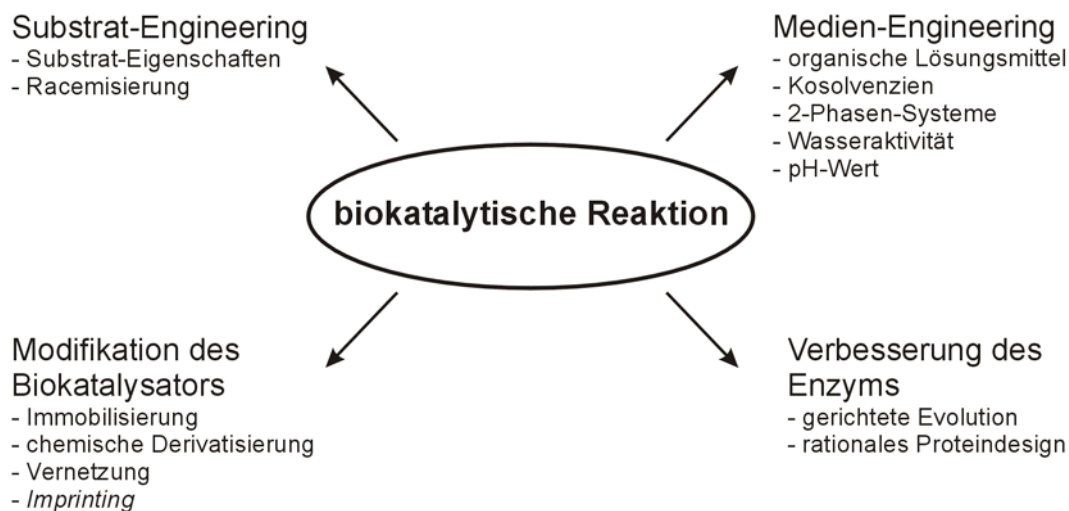


Abb. 1-14 Möglichkeiten zur Verbesserung der biokatalytischen Reaktion bei der Entwicklung eines Herstellungsprozesses. Neben den klassischen Ansätzen zur Variation der Reaktionsbedingungen (Substrat- und Medien-Engineering) und der Modifikation des Biokatalysators stehen die modernen Techniken der gerichteten Evolution und des rationalen Proteindesigns für die Verbesserung eines Enzyms zur Verfügung.

1.7.2.1 Substrat-Engineering

Die Veränderung der Substrateigenschaften ist ein vielversprechender Ansatz zur Optimierung einer Enzym-katalysierten Reaktion. Diese Technik ist allgemein für alle Arten biokatalytischer Umsetzungen anwendbar und wirkt sich insbesondere auf die Stereoselektivität aus. Die Fähigkeit eines Enzyms zur chiralen Diskriminierung eines gegebenen Substrats beruht stark auf dessen Sterik (Kap. 1.5.2.3). Aus diesem Grund lässt sich durch Variation der Substratstruktur, die am einfachsten durch Addition oder Entfernung einer veränderten Schutzgruppe zu bewerkstelligen ist, eine andere Passung im aktiven Zentrum des Enzyms erreichen, die zu einer verbesserten Selektivität führen kann [Faber, 2000]. Als Beispiel hierfür dient die Darstellung eines chiralen Alkohols durch Hydrolase-katalysierte Racematspaltung des korrespondierenden Esters. Da hierbei lediglich der Alkohol in enantiomerenreiner Form gewünscht ist, lässt sich die Säuregruppe frei wählen. Im umgekehrten Fall ist bei der Trennung einer chiralen Carbonsäure der Alkoholrest variabel (z.B. Vinyl- an Stelle von Ethyl-; Kap. 1.5.2.3). Ein zusätzliches Stereozentrum im frei-wählbaren Rest (diastereomerer Ester) kann sich ebenfalls positiv auf die

Selektivität auswirken. So wurde z.B. (*R*)-2-Phenylpropionsäure-(*R*)-1-phenylethanol-ester bzw. das Buttersäure-Analogon durch doppelte Racematspaltung jeweils in hoher Diastereomeren-Reinheit hergestellt [Yang et al., 1999].

Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung einer stereoselektiven Reaktion besteht darin, dass gezielt ein prochirales oder meso-Substrat ('meso-Trick') eingesetzt wird. Bei dieser Vorgehensweise erhöht sich die theoretisch erzielbare Ausbeute von 50 auf 100 % [Faber, 2000], wobei aber auch die Stereoselektivität des Gesamtprozesses beeinflusst wird. Bei der klassischen Racematspaltung zur Herstellung einer optisch aktiven Verbindung in enantiomerenreiner Form beträgt der maximal erreichbare Umsatz dagegen 50 %. Eine Steigerung der Ausbeute ist aber durch Racemisierung (labiles Substrat oder chemische Racemisierung) möglich. Bei der dynamischen kinetischen Racematspaltung z.B. von sekundären Alkoholen konnten nach dieser Methode Umsätze zwischen 91 und 97 % bei hoher Enantiomerenreinheit (95 – 99 %*ee*) erzielt werden. Die Katalyse der *in situ*-Racemisierung erfolgte hierbei durch eine Ruthenium-Verbindung [Kim et al., 2001].

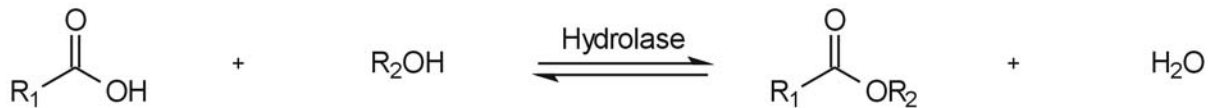
1.7.2.2 Medien-Engineering

Die Enzymaktivität und -selektivität werden stark durch Faktoren beeinflusst, die an das Reaktionsmedium gekoppelt sind. Zahlreiche Veröffentlichungen über biokatalytische Reaktionen in unterschiedlichen Lösungsmitteln, bei verschiedenen Substratkonzentrationen und Wassergehalten belegen dies. Insbesondere bei Lipasen existieren viele Untersuchungen, die eine Abhängigkeit der Selektivität vom pH-Wert, der Zugabe von Additiven (chiral oder achiral; Amine; Kronenether) und des Salzgehalts aufzeigen [Berglund, 2001].

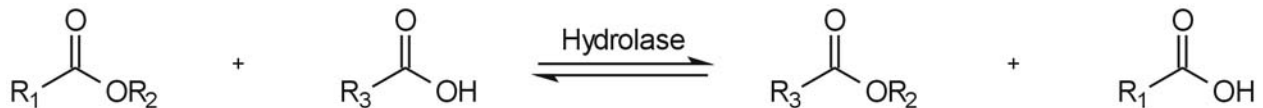
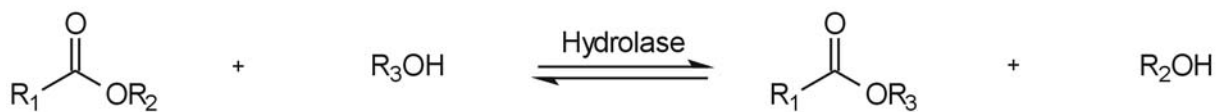
Die technologische Nützlichkeit von Enzymen erhöht sich wesentlich, wenn die biokatalytische Umsetzung nicht in natürlicher, wässriger Lösung, sondern in einem organischen Solvens durchgeführt wird [Klibanov, 2001]. Der Übergang auf ein organisches Lösungsmittel ermöglicht Reaktionen, die in Wasser zurückgedrängt würden (Abb. 1-15), und verhindert unerwünschte Nebenreaktionen (z.B. Hydrolyse von Anhydriden). Zudem ist hierbei die Thermostabilität des Biokatalysators erhöht, da bei niedrigen Wassergehalten Konformationsänderungen des Enzyms und Abbaureaktionen der Proteinstruktur (Deaminierung von Asparagin und Glutamin; Hydrolyse der Peptidbindungen) erschwert sind. Zudem ergeben sich noch weitere wichtige Vorteile für die Prozessführung. Neben der verbesserten Solubilisierung von hydrophoben Substraten und der Verringerung der Gefahr einer mikrobiellen Kontamination, können die Reaktionsprodukte leichter isoliert und das unlösliche Enzym aus dem Reaktionsansatz zurückgewonnen werden

[Carrea und Riva, 2000]. Hierbei ist es möglich, die Aktivität der biokatalytischen Reaktion in Abhängigkeit vom Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P$ -Wert) [Leo et al., 1971] des verwendeten Lösungsmittels vorherzusagen [Laane et al., 1987]. Danach ist sie in polaren Solvenzien ($\log P < 2$) gering, bei $\log P$ zwischen 2 und 4 mäßig bzw. unterschiedlich ausgeprägt (Entscheidung im Einzelfall) und üblicherweise hoch in apolaren Lösungsmitteln ($\log P > 4$).

Veresterung:



Umesterung (Alkoholyse; Acidolyse):



Interesterifikation:

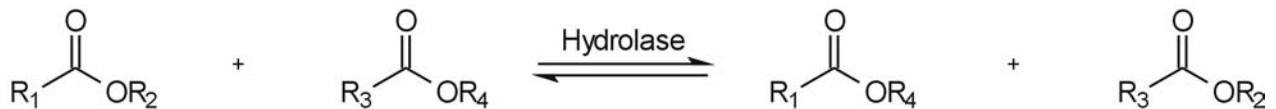


Abb. 1-15 Übersicht über Hydrolase-katalysierte Reaktionen, die nur in nicht-wässrigen Lösungsmitteln durchgeführt werden können (modifiziert nach Villeneuve et al., 2000). Bei Anwesenheit von Wasser ist dagegen die Hydrolyse begünstigt.

Für die Anwendbarkeit eines biokatalytischen Verfahrens bei der chemischen Synthese ist die Stereospezifität von entscheidender Bedeutung. Die Enantioselektivität eines Enzyms in organischen Lösungsmitteln kann sich von der in Wasser unterscheiden, d.h. sie ändert [Berglund, 2001; Carrea und Riva, 2000; Secundo et al., 1992; Wescott und Klibanov, 1994] oder kehrt sich sogar um [Tawaki und Klibanov, 1992]. Durch gezielte Auswahl des Lösungsmittels ist es daher möglich, die stereospezifische Präferenz zu beeinflussen. Als mögliche Ursachen für diesen Effekt werden insbesondere die Änderungen der Enzymkonfiguration, die Energetik der Substrat-Solvatisierung und die im aktiven Zentrum gebundenen Lösungsmittel-Moleküle, die bei der Umwandlung der einzelnen Enantiomere unterschiedlich ausgeprägte Interferenzen verursachen, diskutiert [Overbeeke et al., 2000]. Zudem wird der Einfluss von Diffusionsprozessen (*mass transport limitations*) auf die Stereoselektivität diskutiert [Rotticci et al., 2000]. Gegenwärtig scheint keine Gemeinsamkeit zwischen den verschiedenen Hypothesen zu

existieren, obgleich es wahrscheinlich ist, dass das Solvens die enzymatische Selektivität über mehr als einen Mechanismus beeinflusst. Aus diesem Grund existiert bislang keine Regel, die eine Vorhersage der Änderung der Enantioselektivität beim Wechsel des Lösungsmittel erlaubt [Wolff et al., 1997].

1.7.2.3 Modifikation des Biokatalysators

Biokatalysatoren sind in organischen Solvenzien unlöslich und können am Ende der Reaktion leicht abgetrennt werden. Aber selbst nach Optimierung des Mediums ist die Reaktionsgeschwindigkeit oftmals wesentlich geringer als in wässriger Lösung bzw. in Mischung von Wasser mit einem Kosolvens. Die Ursachen hierfür sind in der eingeschränkten Diffusion (*mass transfer effects*) und den Aktivitätsverlusten bei der Herstellung der Enzympräparationen (Lyophilisierung) zu suchen [Bornscheuer und Kazlauskas, 1999]. Eine einfache Lösung diese Probleme zu beheben, besteht darin, das Enzym zu immobilisieren. Neben einer gesteigerten Raum-Zeit-Ausbeute vereinfacht sich der Umgang mit dem Biokatalysator und die Isolierung aus dem Reaktionsansatz wird erleichtert. Die Möglichkeit der Wiederverwertung sowie die erhöhte Langzeit- und Lagerstabilität, die auf der Fixierung der Proteinstruktur beruhen, gleichen bei einem biokatalytischen Verfahren den finanziellen Mehraufwand für die Immobilisierung nicht nur aus, sondern ermöglichen sogar zum Teil Einsparungen an Prozesskosten bis zu 40 % [Vorlop und Jekel, 1997].

Für die Immobilisierung von Enzymen aber auch Mikroorganismen existieren mittlerweile verschiedene Techniken (Abb. 1-16). Die Spannweite reicht von der einfachen Adsorption auf einem inerten Träger bis hin zur Mikroverkapselung. Zusätzlich besteht die Möglichkeit die Biokatalysatoren mit sich selbst (z.B. *cross-linked enzyme crystals*; *CLEC's*) [Govardhan und Margolin, 1995] oder einem Träger kovalent (z.B. Eupergit C) [Katchalski-Katzir und Kraemer, 2000] zu vernetzen. Es existiert jedoch keine Regel zur Vorhersage der Aktivität und Stabilität eines Biokatalysators nach der Immobilisierung. Diese können sowohl erhöht als auch erniedrigt werden, wobei aber meist eine gesteigerte Thermostabilität (*man-made extremozymes*) [Govardhan und Margolin, 1995] resultiert [Villeneuve et al., 2000]. Bei Lipasen wurde darüber hinaus festgestellt, dass sich durch die unterschiedlichen Immobilisierungs-Techniken neben der Aktivität und Stabilität auch die Stereospezifität ändert. So konnte die Enantioselektivität der *Pseudomonas fluorescens* Lipase bei der Hydrolyse von (*R,S*)-2-Hydroxy-4-phenylbuttersäureethylester durch Adsorption auf unterschiedlichen Matrices, deren Oberflächen gezielt

hinsichtlich der Hydrophobizität modifiziert wurden, von sieben auf 80 verbessert werden [Fernández-Lorente et al., 2001].

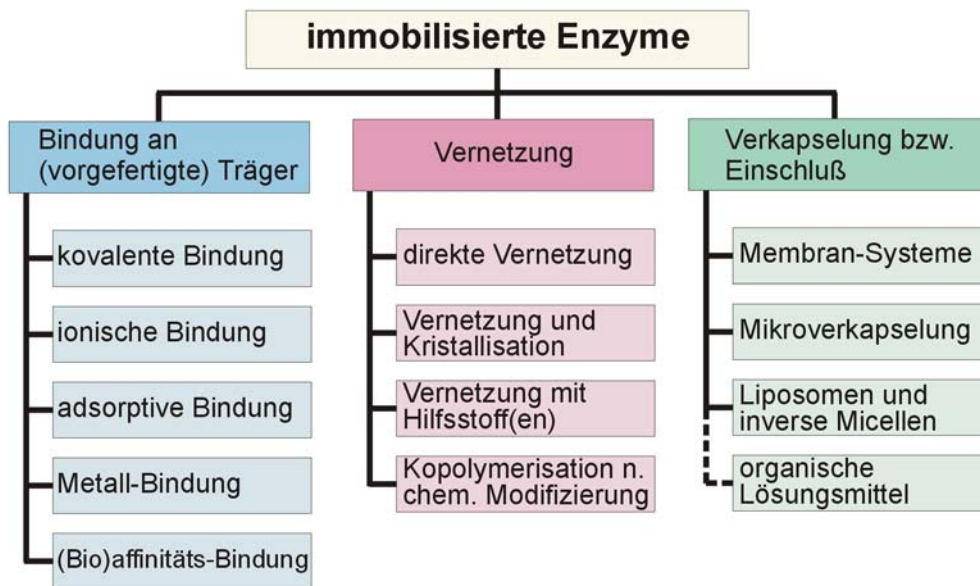


Abb. 1-16 Einteilung der unterschiedlichen Methoden für die Immobilisierung von Enzymen [Tischer und Wedekind, 1999]

Neben der Immobilisierung stehen weitere Möglichkeiten für die Modifikation von Biokatalysatoren zur Verfügung. Bei der sogenannten *imprinting*-Technik, bei der ein Enzym in Gegenwart eines Liganden lyophilisiert wird, ändert sich die Anordnung der Proteinstruktur. Der Konformations-Wechsel des aktiven Zentrums bleibt auch beim Einsatz in wasserfreien Lösungsmitteln erhalten (*memory effect*) und kann u.a. zu einer veränderten Stereospezifität führen [Klibanov, 2001]. Dauerhaftere Änderungen der Enzymeigenschaften ergeben sich dagegen beim gezieltem Austausch einzelner Aminosäureresten. Substitution des aktiven Serins von Subtilisin in Cystein auf chemischem Wege (Benzylsulfonylfluorid / Kaliumthioacetat) resultiert z.B. in einem sogenannten Thiolsubtilisin, das keine hydrolytische Aktivität mehr gegenüber Amidien zeigt und daher zur Peptid-Synthese geeignet ist. Des weiteren kann das Proteingerüst mit funktionellen Gruppen gekoppelt werden, die dem Biokatalysator weitergehende funktionelle Eigenschaften verleihen. Die Derivatisierung eines Enzyms mit einem Cofaktor stellt auch eine Möglichkeit dar, sogenannte Fusionsproteine zu synthetisieren [Tann et al., 2001].

1.7.3 Molekularbiologische Methoden zur Verbesserung des Enzyms

Beschränkte man sich bislang darauf, Enzyme durch chemisch-physikalische Methoden zu optimieren und der Möglichkeit, Mikroorganismen für ihren technischen Einsatz durch Züchtung zu verbessern, werden Proteine heutzutage auf molekular-genetischem Wege modifiziert, um so maßgeschneiderte Biokatalysatoren zu erhalten [Olsen et al., 2000]. Zur Erreichung dieses Ziels haben sich zwei diametrale Techniken etabliert: rationales Proteindesign und gerichtete Evolution [Arnold, 2001; Bornscheuer, 1998; Bornscheuer und Pohl, 2001]. In Abb. 1-17 sind die beiden unterschiedlichen Vorgehensweisen schematisch dargestellt.

1.7.3.1 Rationales Proteindesign

Beim rationalen Design wird mittels bioinformatischer Methoden (*molecular modeling*) versucht, Vorhersagen darüber zu machen, wie eine Proteinstruktur geändert werden muss, damit sich die Eigenschaften des Biokatalysators in die gewünschte Richtung lenken lassen. Hierzu sind neben der Kenntnis der Aminosäure-Sequenz und der damit verbundenen Proteinstruktur genaue Informationen über mechanistische und dynamische Vorgänge bei der Katalysereaktion erforderlich. Die Komplexität dieser Beziehung lässt sich daran ermessen, dass Proteine meist am Rand zur Instabilität stehen, d.h. der räumliche Aufbau des aktiven Enzyms ist das Ergebnis aller intramolekularen Wechselwirkungen, wobei z.B. schon die Änderung einzelner Wasserstoffbrücken zum Konformations-Wechsel und damit zum Aktivitätsverlust führen kann. Ein gezielter Austausch von Aminosäuren, der das Zusammenspiel der Kräfte nicht aus dem Gleichgewicht bringt und zusätzlich zu verbesserten oder sogar neuen Eigenschaften des Enzyms führt, erfordert eine solche Fülle an Informationen, die nur für sehr wenige Proteine zur Verfügung steht. Zudem ist es nach Änderung eines Merkmals (z.B. erhöhte Stabilität) nahezu unmöglich, die Auswirkungen auf andere Eigenschaften (z.B. Aktivität) vorherzusagen. Trotz des hohen Zeitaufwands und der relativ wenigen Beispiele für die Verbesserung eines Enzyms (vor allem zur Thermostabilität) durch rationales Proteindesign, stellt dieser Ansatz, insbesondere im Zusammenspiel mit evolutiven Methoden, eine aussichtsreiche Perspektive für die Zukunft dar [Bornscheuer und Pohl, 2001]. Unterstützt wird dieser Anspruch durch neueste Erkenntnisse, dass die derzeit bekannten Enzyme nur aus wenigen gemeinsamen Vorläufern abstammen und somit die unterschiedlichen Aktivitäten auf geringen Modifikationen in den Strukturen der aktiven Zentren beruhen [Arnold, 2001]. Zusätzlich ist bei einigen Biokatalysatoren, vergleichbar zu anderen makromolekularen Systemen in der Biologie (z.B. bei der ribosomalen Proteinbiosynthese), von einem modularen Aufbau auszugehen, so dass durch rationales Proteindesign schnell geeignete Enzyme zugänglich sein sollten [Khosla und Harbury, 2001].

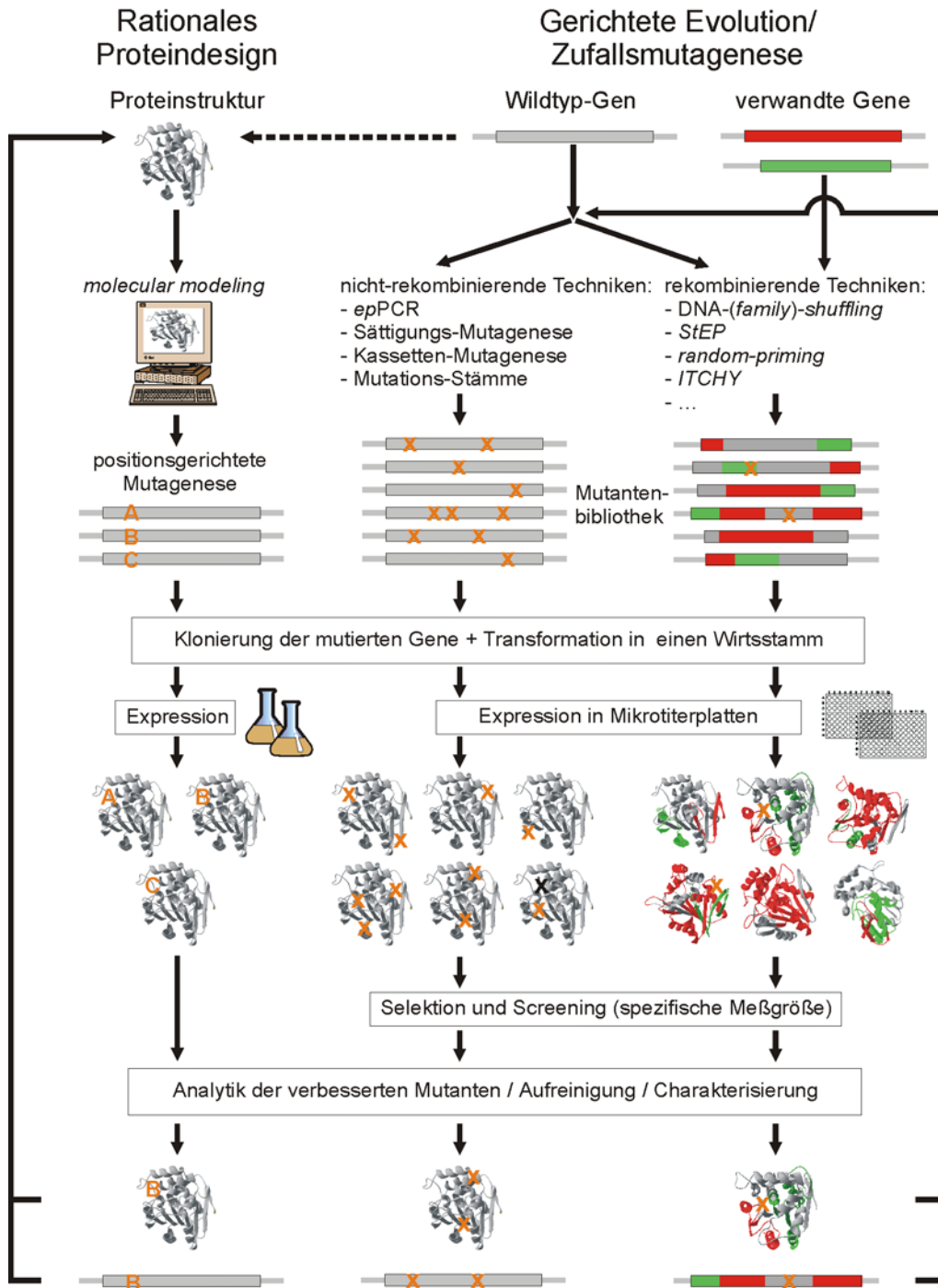


Abb. 1-17 Schematische Darstellung der prinzipiellen Vorgehensweisen beim rationalen Proteindesign (A,B,C: gezielt ausgetauschte Aminosäure) und der gerichteten Evolution (X: Punktmutation durch Zufallsmutagenese). Die schrittweise Verbesserung des Enzyms kann iterativ erfolgen, wobei im Idealfall beide Methoden zum Einsatz kommen sollten. Die rekombinierenden Techniken ermöglichen es, Chimären aus mehreren parental Genen (verwandte DNA-Sequenzen aus unterschiedlichen Organismen; verbesserte Mutanten) zu erzeugen.

1.7.3.2 *Gerichtete Evolution*

Die natürlich vorkommenden komplexen Strukturen und Sequenzen entwickelten sich nach einem einzigen Mechanismus, der natürlichen Evolution. Diese führt weder in eine definierte Richtung noch wird ein bestimmtes Ziel angestrebt ('der ungerichtete Charakter der Mutation') [Schlegel, 1992], sondern dient allein der Adaption an veränderte Lebensbedingungen. Die zugrunde liegenden Prozesse (Rekombination; Mutation) treten spontan ein, d.h. ohne auf eine Sequenz oder Strukturinformation der zugrunde liegenden Gene zurückzugreifen, wobei nur positive Veränderungen ein Überleben der natürlichen Selektion ermöglichen [Arnold, 1998]. Insbesondere bei Mikroorganismen spielt dieser Vorgang aufgrund der kurzen Generationszeit eine entscheidende Rolle. So mutiert z.B. in einer einzelnen *Escherichia coli*-Kultur, selbst bei Abwesenheit eines äußeren Selektionsdrucks, innerhalb von 24 Stunden 0,1 % des gesamten Erbguts. Im Verlauf des schnellen Wachstums können sich durch divergente bzw. konvergente Evolution, kombiniert mit dem lateralen Austausch genetischer Merkmale, neuartige Eigenschaften der Organismen ergeben [Short, 1997].

Nach dem Prinzip der Zufallsmutagenese wird seit langer Zeit versucht, Mikroorganismen zu erzeugen, die beim Einsatz in fermentativen Prozessen bessere Ausbeuten an den gewünschten Metaboliten ergeben. Die evolutiven Vorgänge zur Veränderung ganzer Stoffwechselwege beschleunigt man dabei durch mutagene Bedingungen (chemische Agenzien; UV-Licht; Transposone) [Schlegel, 1992]. Inzwischen hat sich, bedingt durch die Entdeckung der Polymerasen-Kettenreaktion [Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988, 1985], eine andere Vorgehensweise entwickelt. Seit Mitte der 90er Jahre wird mittels PCR-Techniken versucht, durch Zufallsmutagenese Enzyme mit neuen oder verbesserten Eigenschaften zu generieren (*error-prone* PCR). Im Gegensatz zur natürlichen Adaption an veränderte Umwelteinflüsse besitzt diese gerichtete Evolution also ein definiertes Ziel, wobei die zugrunde liegende Mutagenese sorgfältig überwacht wird und die Auswahl der verbesserten Enzymvarianten nach der Expression durch ein geeignetes Testsystem erfolgt (Kap. 1.8) [Arnold, 1998]. Außer dem Gen, dass sich in einem geeigneten Wirtsorganismus exprimieren lässt, sind anders als beim rationalen Design keine Kenntnisse über die Proteinstruktur und die Zusammenhänge zwischen der Aminosäuresequenz und des räumlichen Aufbaus bzw. des Katalysemechanismus erforderlich. Damit die gerichtete Evolution zum Erfolg führen kann, muss die gewünschte Eigenschaft des (neuen) Biokatalysators aber prinzipiell möglich und durch Zufallsmutagenese zugänglich sein. In der Praxis bedeutet dies, dass ein evolutiver Weg vom Wildtyp-Enzym über verbesserte Varianten bis hin zur gewünschten Eigenschaft existieren muss. Zudem sollte es möglich sein, eine ausreichend große

Anzahl an Varianten (Bibliothek mit $10^3 - 10^6$ Mutanten) zu erzeugen, da günstige Mutationen nur selten auftreten. Schließlich muss ein geeignetes Testsystem (Kap. 1.8) entwickelt werden, um die Bibliothek durch Selektion oder über eine spezifische Messgröße (Screening) auf Enzyme mit neuen oder verbesserten Eigenschaften untersuchen zu können. Wie bei der klassischen Züchtung lässt sich im Anschluss die DNA-Sequenz der besten Variante als Ausgangsmaterial für die nächste Runde einsetzen (rekursives Verfahren), um additive und synergistische Effekte der einzelnen Mutationen zur Generierung des idealen Enzyms zu nutzen. Die prinzipielle Vorgehensweise bei der gerichteten Evolution ist in Abb. 1-17 dargestellt und in der Literatur umfassend erörtert [Arnold, 1998; Arnold und Moore, 1997; Arnold und Volkov, 1999; Bornscheuer, 1998, 2000b, 2001; Bornscheuer und Pohl, 2001; Burton et al., 2002; Farinas et al., 2001; Jaeger et al., 2001; Powell et al., 2001; Reetz, 2000; Reetz und Jaeger, 1999, 2000; Schmidt-Dannert, 2001; Smith, 1994; Zhao et al., 2002; Zocher et al., 2001].

Neben der gezielten Einführung von Punktmutationen (positionsgerichtete Mutagenese; Kap. 1.7.3.1) in eine DNA-Sequenz handelt es sich bei der klassischen Methode der gerichteten Evolution um die sogenannte *error-prone* PCR (*epPCR*), d.h. durch (empirische) Variation der Bedingungen (Nucleotid-Verhältnis; Mg^{2+} -Konzentration; Mn^{2+} -Zusatz; Basenanaloga) wird die Fehlerrate der Polymerase um das Tausendfache (1 % anstatt 0,001 %) erhöht [Cadwell und Joyce, 1992; Leung et al., 1989; Spee et al., 1993; Vartanian et al., 1996]. Bei der Vervielfältigung des Gens treten hauptsächlich Mutationen einzelner Nucleotide auf. Aufgrund des ungerichteten Charakters und des degenerierten genetischen Codes sind durch den Austausch einer einzigen Base (eines Codons) statistisch nur 5,7 der 20 Aminosäuren für die Substitution in Betracht zu ziehen [Bornscheuer, 2001]. Ein hinsichtlich der Fehlerrate vergleichbares Verfahren beruht auf der Verwendung von Wirtsstämmen (z.B. *Epicurian coli* XL1-Red; Stratagene; La Jolla; USA), die Defekte in ihrem DNA-Reparaturmechanismus aufweisen (Mutationsstämme) [Bornscheuer et al., 1998; Henke und Bornscheuer, 1999; Selifonova et al., 2001]. Zusätzlich zum Austausch von Basen werden hierbei vermehrt Insertionen, Deletionen und *frame-shifts* beobachtet.

Im Gegensatz zur *epPCR* lassen sich durch das sogenannte *DNA-shuffling* die natürlichen Vorgänge der Evolution besser im Labormaßstab simulieren. Es besteht hierbei die Möglichkeit, ein parentales Gen zu mutieren oder auch DNA-Sequenzen aus verwandten Organismen (*family shuffling*) [Crameri et al., 1998] durch wiederholte Zyklen der Punktmutagenese, Rekombination und Selektion miteinander zu vermischen (sexuelle Evolution). Nach zufälliger Fragmentierung eines Pools homologer DNA-Sequenzen mit einer unspezifischen Endonuclease (DNAse I)

werden die einzelnen Bruchstücke im Rahmen einer PCR-Reaktion, bei der die Spaltprodukte selbst als Transkriptionsprimer dienen, wieder zu vollständigen (chimären) Genen zusammengefügt (*molecular breeding*) [Arnold, 2001; Giver und Arnold, 1998; Powell et al., 2001; Sutherland, 2000]. Diese Technik ermöglicht es auf einfache Weise selbst in kleinen Bibliotheken eine hohe Diversität zu erzeugen [Stemmer, 1995] und sogar die Möglichkeit ganze Stoffwechselwege (*molecular breeding of pathways*) [Schmidt-Dannert, 2001; Schmidt-Dannert et al., 2000] zu züchten.

Die Entwicklung des DNA-*shufflings* im Jahre 1994 [Stemmer, 1994a, 1994b] hatte einen großen Einfluss auf das Gebiet der gerichteten Evolution, so dass sich in der Folge weitere Techniken etabliert haben, die auf dem Prinzip der Rekombination basieren. Als Beispiele hierfür sind insbesondere der *staggered extension process (StEP)* [Giver und Arnold, 1998; Zhao et al., 1998], die *random-priming*-Methode [Shao et al., 1998] und das *RACHITT*-Verfahren (*random chimeragenesis on transient templates*) [Coco et al., 2001] zu nennen. In jüngster Zeit entwickelten sich bedingt durch die Fortschritte auf dem Gebiet der Laborautomation und neuer Hochdurchsatz-Testsysteme (Kap. 1.8) weitere Techniken, die auch eine Vermischung nicht-homologer DNA-Sequenzen (z.B. 50 % bei *incremental truncation for the creation of hybrid enzymes – ITCHY*) [Ostermeier et al., 1999] durch rekursive genetische Rekombination ermöglichen [Kurtzman et al., 2001].

1.7.3.3 Rationaler Ansatz vs. Kombinatorik

In der Literatur sind mittlerweile viele Beispiele für den erfolgreichen Einsatz von rationalem Proteindesign bzw. gerichteter Evolution bei der Verbesserungen von Enzymen beschrieben (Tab. 1-4). Auffällig ist hierbei, dass die relative Lage der eingeführten Mutationen in den Proteinen mit der angewendeten Methode korreliert. Beim rationalen Proteindesign werden gezielt Aminosäuren ausgetauscht, die nach Auswertung der Daten der Computer-Simulationen 'logisch' erscheinen. Diese befinden sich üblicherweise direkt im aktiven Zentrum bzw. der Bindungstasche des Enzyms, wobei ihr Einfluss auf die Struktur des Enzyms, die Substratbindung und den Katalysemechanismus relativ gut vorhersehbar sind. Bei den kombinatorischen Methoden werden, wie es dem Wesen eines evolutiven Prozesses entspricht, die Mutationen zufällig über die gesamte Proteinstruktur verteilt und liegen somit oft räumlich weit entfernt vom aktiven Zentrum. Die Lage dieser *hot spots* sind durch rationale Überlegungen nicht zugänglich, so dass der allgemein anwendbaren gerichteten Evolution ein größeres Potential bei der Erzeugung verbesserter Enzyme zukommt [Tobin et al., 2000]. Vor allem bei der

Modifikation von Eigenschaften, deren strukturelle Basis derzeit noch nicht aufgeklärt ist (z.B. Stereoselektivität), führen evolutive Methoden eher zum Erfolg [Bornscheuer und Pohl, 2001].

Tab. 1-4 Ausgewählte Beispiele für die Verbesserung von Enzymen durch gerichtete Evolution (MS: Mutationsstamm; SM: Sättigungs-Mutagenese; SH: DNA-*shuffling*; KM: Kassetten-Mutagenese) [Bornscheuer, 2001, 2002; Kauffmann und Schmidt-Dannert, 2001; Reetz et al., 2001a]

Enzym	Ziel	Methode	Ergebnis
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Esterase	Veränderung der Substratspezifität	MS	Zweifachmutante mit geringer Enantioselektivität
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Esterase	Erhöhung der Enantioselektivität	MS/ <i>ep</i> PCR/SM	<i>E</i> -Wert Steigerung von 3,5 auf 12
<i>Bac.thermocatenulatus</i> Lipase	Veränderung der Substratspezifität	<i>ep</i> PCR	Übergang von einer Lipase zu einer effektiven Phospholipase
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Esterase	Erhöhung der Enantioselektivität	<i>ep</i> PCR/SM/SH/KM	<i>E</i> -Wert Steigerung von 1,1 auf > 51 (umfangreiche Untersuchung)
<i>Bacillus subtilis</i> Esterase	höhere Aktivität in DMF gegenüber Loracarbef-pNB-Ester	<i>ep</i> PCR/SM/SH	150 fache Erhöhung der Aktivität
<i>Arthrobacter</i> sp. Hydantoinase	Umkehrung der Enantioselektivität	<i>ep</i> PCR/SM/SH	Wechsel der Stereospezifität von D (40 % <i>ee</i>) auf L (20 % <i>ee</i> ; Umsatz 30 %)
Subtilisin S41	erhöhte Thermostabilität	<i>ep</i> PCR/SM/SH	Aktivität im Temperaturbereich von 10 – 60°C
<i>Bacillus subtilis</i> Esterase	erhöhte Thermostabilität	<i>ep</i> PCR/SM/SH	Temperaturstabilität hat sich um ca. 14°C erhöht
<i>Pseudomonas</i> SY77 Glutaryl Acylase	Erhöhung der Adipyl-Acylase Aktivität	<i>ep</i> PCR/SM/KM	Erhöhung von v_{max} / K_M bei der Umsetzung von Adipyl-7-ADCA
Phytoen-Desaturase / Lycopon Zyklase	Erzeugung neuartiger Carotinoide	<i>ep</i> PCR/SM/SH	neuartige Carotinoide (z.B. Torulen); Generierung neuer Stoffwechselwege
verschiedene Subtilisine	allgemeine Verbesserung der Stabilität	DNA-family <i>shuffling</i>	hoch-aktive Chimären durch Nachahmung des natürlichen Evolutionsprozesses

Bei Identifizierung eines *hot spots* oder einer Region, die wichtig für die Verbesserung der gewünschten Eigenschaften ist, sollten im Idealfall beide Methoden zur weiteren Verbesserung des Enzyms kombiniert werden, wobei insbesondere die Sättigungs-Mutagenese (z.B. durch *one-step overlap extension process*) [Jaeger et al., 2001; Kammann et al., 1989] und eine gezielte Mutation des entscheidenden Sequenzbereichs (Kassetten-Mutagenese) [Cramer und Stemmer, 1995; Reetz et al., 2001a] heranzuziehen sind. Ein überzeugendes Beispiel hierfür ist die

Erhöhung der Stabilität der Pilz-Peroxidase aus *Coprinus cinereus* für den Einsatz als Verfärbungs-Inhibitor in Waschmitteln [Cherry et al., 1999]. Bei gezielter Vereinigung der Mutationen aus den unterschiedlichen Methoden (rationales Proteindesign und *epPCR*) konnte eine Enzymvariante erzeugt werden, die 110 fach stabiler gegen thermische Inaktivierung ist und eine um 2,8 fach erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Abbau als der Wildtyp zeigt. Durch anschließendes *DNA-shuffling* ließen sich diese Werte noch deutlich verbessern (174 fach / 100 fach) werden.

1.8 Hochdurchsatz-Testsysteme zur Identifizierung geeigneter Enzyme

Die Suche nach einem geeigneten Mikroorganismus oder einem Enzym hängt entscheidend vom eingesetzten Testsystem ab. Konnte man früher die (kommerziell) erhältlichen Biokatalysatoren noch einzeln auf ihre Eignung im angestrebten Prozess untersuchen, so ist heutzutage eine andere Vorgehensweise erforderlich. Zur Durchmusterung einer Klon-Bank (Kap. 1.7.1.2) bzw. einer Mutantenbibliothek (Kap. 1.7.3.2) mit $10^4 - 10^7$ Individuen werden Verfahren benötigt, die einen wesentlich höheren Durchsatz ermöglichen (Hochdurchsatz-Testsysteme; HTS-Systeme). Klassische Methoden zur Analyse von Enzym-katalysierten Umsetzungen, wie z.B. der pH-stat-Versuch oder der flüssig- bzw. gaschromatographische Nachweis der Edukte und Produkte bei einer Testreaktion, sind in diesen Dimensionen nicht mehr durchführbar [Moris-Varas et al., 2001; Reetz, 2001]. Zudem wurde schon früh erkannt, dass Standard-Testsysteme nicht immer das wahre Potential eines Biokatalysators aufzeigen und so die Auswahlverfahren stets an das aktuelle Problem angepasst werden müssen [Vorderwülbecke et al., 1992]. Die Entwicklung neuer HTS-Systeme ist hierbei eng an die Fortschritte auf dem Gebiet der Laborautomation gekoppelt. Die Durchführung Roboter-gesteuerter Analysen erhöht die Reproduzierbarkeit und vereinfacht die Auswertung der Messdaten. Ein wichtiger Punkt ist in diesem Zusammenhang auch die zunehmende Miniaturisierung, wodurch einerseits die benötigten Mengen der einzelnen Testkomponenten (Biokatalysator; Substrat; Lösungen) drastisch reduziert werden und andererseits die Durchführung einer größeren Anzahl an Reaktionen unter identischen Bedingungen gewährleistet ist [Battersby und Trau, 2002; Wahler und Reymond, 2001].

An erster Stelle eines modernen HTS-Systems steht die physikalische Trennung bzw. Aufsplitterung der Zellen, um die Untersuchung der einzelnen Klone bzw. der hiervon abgeleiteten Kolonien zu ermöglichen [Cohen et al., 2001]. Diese Separation erfolgt üblicherweise durch Ausplattieren auf einem Festmedium (Petri-Schalen), woran sich in Abhängigkeit vom Testsystems eine Vereinzelung der Kolonien in Mikrotiterplatten anschließen

kann. Hiernach ist es möglich, die Untersuchungen zur Identifizierung eines neuen oder verbesserten Biokatalysators mit lebenden, ganzen Zellen auszuführen bzw. die nach einem Aufschluss freigesetzten Enzyme über eine spezifische Messgröße zu charakterisieren und zu vergleichen. Bei einer hierarchischen Vorgehensweise wird im qualitativen, ersten Schritt (Selektion) die Anzahl der zu testenden Individuen schnell und einfach reduziert. So lassen sich z.B. diejenigen Klone eliminieren, die keine oder nur eine geringe Aktivität hinsichtlich der gewünschten Eigenschaften zeigen. In die zeitaufwendigen, quantitativen Untersuchungen (spezifische Messgröße; Screening) werden anschließend lediglich die selektierten Varianten einbezogen [Demirjian et al., 1999; Saha und Demirjian, 2001; Sutherland, 2000].

Ein Screening- oder Selektionsverfahren zur Identifizierung eines neuen oder insbesondere eines verbesserten Biokatalysators sollte im Idealfall auf dem aktuellen Substrat basieren, wobei dies oft nicht möglich ist. In diesen Fällen muss eine Modellverbindung (z.B. ein chromophorer Alkohol an Stelle eines Methoxy- oder Ethoxy-Rests) herangezogen werden, die der eigentlichen Ziel-Substanz ('wahres' Substrat) vergleichbar ist. Nur bei sorgfältiger Auswahl dieser Modellverbindung ist ein erfolgreiches Testsystem gewährleistet ('*you get what you screen for*') [You und Arnold, 1994]. Ein Verfahren mit abgewandelten, aber dafür wesentlich leichter detektierbaren Substanzen führt dagegen häufig in eine 'falsche' Richtung [Demirjian et al., 1999; Saha und Demirjian, 2001].

1.8.1 Selektion

Selektive Testsysteme sind auf dem Gebiet der Molekularbiologie weit verbreitet. Sie dienen z.B. zur schnellen Kontrolle von Klonierungsexperimenten (Blau-weiß-Selektion) oder der Isolation bzw. Anreicherung von Mikroorganismen, die eine bestimmte Resistenz aufweisen [Mühlhardt, 2000]. Auch für die gezielte Suche nach neuen oder verbesserten Biokatalysatoren werden selektive Testsysteme eingesetzt, wobei die qualitative Unterscheidung der einzelnen Individuen einer Bibliothek z.B. auf Hofbildung (Tributyryn-Agar) basiert bzw. über eine Indikatorreaktion (pH-Indikatoren; Farbreaktionen) [Demirjian et al., 1999; Moris-Varas et al., 2001, 1999] erfolgt. Weiterhin führt die Kopplung der gewünschten Enzymaktivität an eine zusätzliche Nahrungsquelle bei Verwendung von Minimalmedien zu einem verstärkten Wachstum der positiven Klone (größere Kolonien) [Bornscheuer et al., 1998, 1999]. Diese Arten von phänotypischer Selektion sind aber auf die Identifizierung von Biokatalysatoren beschränkt, die eine direkte biologische Relevanz besitzen (z.B. Überleben eines Klons) oder indirekt an eine Indikatorreaktion gekoppelt werden können. Eine zusätzliche Einschränkung besteht darin, dass

es Mikroorganismen im Laufe der Evolution gelernt haben, sich schnell an drastische Änderungen des Umgebungsmilieus anzupassen (Kap. 1.7.3.2). Aus diesem Grund führt ein angelegter Selektionsdruck oft zu weiteren Mutationen, die nicht mit der gewünschten enzymatischen Aktivität korrelieren. So kann z.B. die Erhöhung der Expressionsrate eines eigentlich ungeeigneten Enzyms einen verbesserten Biokatalysator vortäuschen [Olsen et al., 2000].

Im Gegensatz zu den Testsystemen, bei denen die Identifizierung von neuen oder verbesserten Biokatalysatoren über den Substratverbrauch oder die Produktzunahme erfolgt, haben sich in den letzten Jahren neue Selektionsverfahren entwickelt, die einen höheren Durchsatz erlauben. Als Beispiele hierfür sind das *phage display*, die *FACS*-Analyse (*fluorescence-activated cell sorting*; bis zu 10^9 Tests pro Stunde) und ausgeklügelte, molekularbiologisch-molekulargenetische Verfahren (genetische Marker-Proteine, wie z.B. *green fluorescent* Protein oder β -Galactosidase; *querying for enzymes using the three-hybrid system - QUEST*; usw.), die für spezielle Enzyme entwickelt wurden, zu nennen [Firestine et al., 2000; Olsen et al., 2000; Waldo et al., 1999; Wigley et al., 2001].

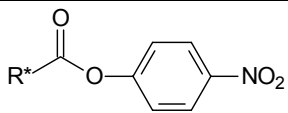
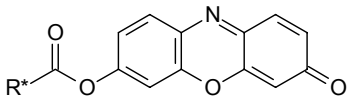
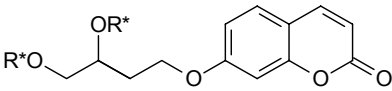
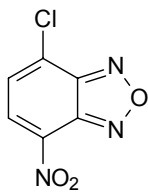
Zusammenfassend ist festzustellen, dass selektive Testsysteme zwar einerseits einen äußerst hohen Durchsatz erlauben, jedoch auf der anderen Seite nur qualitative bzw. unter Berücksichtigung des Ausmaßes oder der Geschwindigkeit der Indikatorreaktion auch halbquantitative Aussagen ermöglichen. Fortschritte auf dem Gebiet der digitalen Bilderfassung (*digital imaging*) unterstützen hierbei den Übergang zu einer mehr quantitativen Auswertung [Olsen et al., 2000].

1.8.2 Screening

Screening-Verfahren basieren auf der (halb-)quantitativen Bestimmung einer spezifischen Messgröße, wobei die Individuen ohne Selektionsdruck einzeln analysiert werden und die Identifizierung der verbesserten Enzymvarianten über den direkten Vergleich der Messwerte erfolgt [Demirjian et al., 1999; Olsen et al., 2000]. Im Vergleich zu selektiven Testsystemen sind sie einfacher zu entwickeln und insbesondere zur Durchmusterung von Mutantenbibliotheken geeignet, die durch gerichtete Evolution (Kap. 1.7.3.2) erzeugt wurden, denn hierbei weisen üblicherweise alle Varianten die gleichen Fähigkeiten auf, so dass eine Differenzierung nur über die unterschiedliche Ausprägung dieser Eigenschaften möglich ist. Auch bei der Suche nach neuen Biokatalysatoren (Kap. 1.7.1.2) kann die Anzahl der im ersten Schritt selektierten Enzyme durch Bestimmung einer spezifischen Messgröße weiter reduziert werden (hierarchische

Vorgehensweise). Hierbei ist zu beachten, dass die gewählten Testbedingungen (Substrat; pH-Wert; Temperatur; Lösungsmittel; usw.) die Anforderungen des angestrebten biokatalytischen Prozesses so gut wie möglich imitieren. Kürzlich wurde hierzu ein Testsystem beschrieben, das auf Basis einer parallelen Kapillarelektrophorese die gleichzeitige Bestimmung der Umsatzrate bei 96 Testreaktionen ermöglicht [Ma et al., 2000].

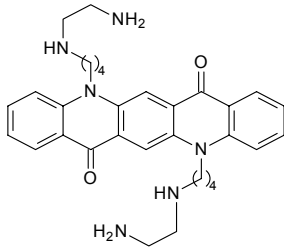
Tab. 1-5 Übersicht über Hochdurchsatz-Testsysteme zur Identifizierung von enantioselektiven Hydrolasen. Den aufgezeigten Screening-Verfahren liegt die Bestimmung der scheinbaren Enantioselektivität E_{app} [Janes und Kazlauskas, 1997] zugrunde. (R^* = chiraler Rest)

Messprinzip	Besonderheiten / Quelle(n)
 <p>p-Nitrophenol-Ester einer chiralen Säure als Modellsubstrat: Hydrolyse des Esters setzt p-Nitrophenol frei</p>	<p>Zusatz von Resorufin-Estern einer anderen, achiralen Säure bedingt Wiedereinführung einer Konkurrenzsituation und führt damit zu E_{app}-Werten, die die wahre Enantioselektivität besser widerspiegeln.</p> <p>[Janes und Kazlauskas, 1997; Liu et al., 2001; Retz et al., 1997]</p>
 <p>Resorufin-Ester einer chiralen Säure als Modellsubstrat: Hydrolyse des Esters setzt Resorufin frei</p>	<p>Die Untersuchung der Fluoreszenz ist auch bei nicht aufgereinigten Zellextrakten möglich und vereinfacht damit das Testsystem.</p> <p>[Henke und Bornscheuer, 1999; Janes und Kazlauskas, 1997]</p>
 <p>Aus Modellsubstraten wird nach Hydrolyse durch Oxidation (NaIO_4) und β-Eliminierung (BSA) Umbelliferon freigesetzt.</p>	<p>[Badalassi et al., 2000; Wahler et al., 2001]</p>
<p>Chirale Phenolphthalein-Derivate, die Kronenether-Strukturen als Seitengruppen tragen, bilden mit freigesetzten Aminderivaten unterschiedlich gefärbte Komplexe aus.</p>	<p>Beschränkung auf Hydrolase-katalysierte Reaktionen, bei denen definierte, längerkettige Amine freigesetzt werden.</p> <p>[Tsubaki et al., 2001]</p>
 <p>7-Chlor-4-nitrobenzofurazan bildet mit freigesetzten Aminen intensiv grünbraun gefärbtes Addukt (7-Amino-4-nitro-benzofurazan), das in organischer Lösung stark fluoresziert.</p>	<p>Sowohl Absorptions- (bei 478 nm) als auch Fluoreszenzmessung (Anregung 485 nm / Emission 538 nm) sind möglich, wobei jeweils eine hohe Intensität zu beobachten ist. Beschränkung auf Hydrolase-katalysierte Amidspaltung.</p> <p>[Henke, 2001]</p>

Fortsetzung Tab. 1-5

Messprinzip

Besonderheiten / Quelle(n)



Fluoreszenz (Emission 558 nm) des Acridin-Derivats wird bei Anwesenheit von 2-wertigen Metallkationen gequencht. Durch Hydrolyse freigesetzte Liganden stören diese Komplexbildung.

Beschränkung des Testsystems auf Hydrolase-katalysierte Reaktionen, bei denen aus einem nicht-komplexierenden Substrat (z.B. L-Leucinamid oder *N*-Acetyl-L-methionin) ein mind. 2-zähniger Ligand (L-Leucin oder L-Methionin) freigesetzt wird.

Abhängigkeit der Intensität I von pM (negativer dekadischer Logarithmus der Metallionen-Konzentration) nach Verdrängung aus dem Chelat-Komplex

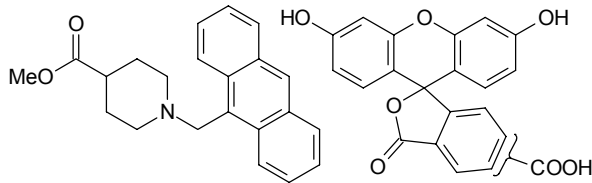
[Klein und Reymond, 2001]

Quantitative Bestimmung der pH-Wert-Änderungen im Verlauf einer Hydrolase-katalysierten Reaktion (z.B. Esterspaltung; Amidspaltung), bei der eine Säure als Produkt entsteht. Die Detektion erfolgt durch Absorptionsmessung (Farbänderung eines pH-Indikators, wie z.B. *p*-Nitrophenol).

'Wahre' Substrate können zum Test eingesetzt werden.

Aufwendige Kalibrierung und der pH-Wert ändert sich im Verlauf der Reaktion (Einfluss auf Enzymeigenschaften).

[Janes et al., 1998; John und Heinze, 2001; Weiß et al., 2001; Whittaker et al., 1994]



Quantitative Bestimmung der pH-Wert-Änderungen: Detektion mittels pH-Fluoreszenz-Indikatoren Aminomethyl-Anthracen-Derivat bzw. 5(6)-Carboxyfluorescein

'Wahre' Substrate können zum Test eingesetzt, wobei sich durch Fluoreszenzmessung eine hohe Empfindlichkeit ergibt.

[Copeland und Miller, 1999; Henke, 2001]

Neben der Suche nach aktiven Biokatalysatoren werden Hochdurchsatz-Testsysteme insbesondere zur Identifizierung von stereoselektiven (enantioselektiven) Enzymen eingesetzt. Für die rasche Bestimmung der Stereospezifität bei Hydrolase-katalysierten Reaktionen wurden bereits viele Testsysteme entwickelt (Tab. 1-5). Zur Erzielung eines hohen Durchsatzes liegt diesen Screening-Verfahren die Ermittlung der scheinbaren Enantioselektivität E_{app} (Kap. 1.5.2.3.2) [Janes und Kazlauskas, 1997] zugrunde, wobei sichergestellt sein muss, dass die E_{app} -Werte die wahren E -Werte widerspiegeln. Nachteilig ist dabei, dass die meisten dieser Testsysteme Modellverbindungen mit sperrigen chromophoren Gruppen (Nitrophenol; Resorufin; Umbelliferon) benötigen, welche sich gewöhnlich beträchtlich vom 'wahren' Substrat unterscheiden. Durch Entwicklung von Screening-Verfahren, die direkt auf dem 'wahren' Substrat

oder Modellverbindungen ohne Chromophore (z.B. nur Acetat-Rest) basieren, lässt sich dieses Problem umgehen. Ein Beispiel hierfür ist die Hydrolyse sowohl der Acetate von chiralen Alkoholen als auch der Ester von optisch aktiven Carbonsäuren in Gegenwart von *p*-Nitrophenol als pH-Indikator [Janes et al., 1998]. Auch die Anwendung physikalischer Messverfahren, wie z.B. die zeitaufgelöste IR-thermographische Detektion der Reaktionswärme [Reetz et al., 1998, 2001b], welche nicht an eine spezifische Nachweisreaktion gekoppelt ist, ermöglicht den Einsatz des 'wahren' Substrats, wobei keine Beschränkung auf eine bestimmte Stoffgruppe besteht.

Im Gegensatz zu den Screening-Verfahren, denen die Bestimmung der E_{app} -Werte zugrunde liegt, sind beim Einsatz von 'Pseudo'-Enantiomeren, wobei eine Form der optischen Antipoden isotopenmarkiert wird und die Analyse der Screening-Reaktionen massenspektroskopisch erfolgt, direkt die Enantiomerenüberschüsse (%*ee*) und somit auch die wahre Enantioselektivität E der Enzymvarianten zugänglich [Guo et al., 1999; Reetz et al., 1999]. Besondere Nachteile dieses Verfahrens sind aber in der Verwendung reiner deuterierter Enantiomere und den hohen Ausstattungskosten zu sehen. Vergleichbares gilt für den Einsatz von Screening-Verfahren, die auf radioaktiv markierten Verbindungen (^{14}C und ^3H) beruhen [Reetz, 2001]. Kürzlich wurde ein 'Super-HTS' (7000 *ee*-Werte pro Tag) zur direkten Bestimmung der Enantioselektivität beschrieben, bei dem unter Verwendung einer parallelen Kapillarelektrophorese und Cyclodextrinen, die als chirale Selektoren (pseudostationäre Phasen) dem Elektrolyten zugesetzt sind, die Messung der optischen Reinheit von FITC-markierten Aminen erfolgt [Reetz et al., 2000]. Dieses System ist jedoch auf Amine beschränkt erfordert ebenfalls eine teure Ausstattung. Zur direkten Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse wurde außerdem ein Verfahren entwickelt, das auf einem kompetitiven ELISA-Test unter Verwendung von substratspezifischen Antikörpern (*anti-racemate* und *enantiospecific*) beruht [Taran et al., 2002]. Diese Methode wurde aber bislang nur für chemische Reduktionen unter Einsatz heterogener Katalysatoren (Amin-Derivate) validiert. Schließlich können E -Werte im Rahmen eines Screening-Verfahrens auch durch eine optimierte GC- (chirale Trennsäule) oder HPLC-Analyse (achirale Trennsäule und Detektion über Zirkulardichroismus-Spektroskopie) ermittelt werden, wobei durch Parallelschaltung, Automatisierung und kurze Trennsäulen bis zu 900 genaue *ee*-Bestimmungen pro Tag möglich sind [Reetz, 2001].

2 Zielsetzung

Im allgemeinen Teil wurde bereits darauf hingewiesen, dass das Angebot kommerziell erhältlicher Enzyme in den letzten Jahren stetig zugenommen hat (Kap. 1.7.1.2). Es existieren mittlerweile einige Firmen, die sich auf die Suche nach neuen, bislang unbekanntem Biokatalysatoren spezialisiert haben und umfangreiche Screening-Programme unterhalten. Die Anzahl der verfügbaren Enzyme wird aus diesem Grund in Zukunft noch weiter ansteigen. Konnte man früher die wenigen (kommerziellen) Biokatalysatoren noch einzeln auf ihre Einsatzmöglichkeit im angestrebten Verfahren untersuchen, so ist heutzutage eine andere Vorgehensweise erforderlich. Durch Testsysteme, die einen hohen Durchsatz erlauben und die Bedingungen des angestrebten Herstellungsprozesses so gut wie möglich imitieren, sollen schnell und zuverlässig potentielle Enzyme identifiziert werden (Kap. 1.7.1). Von speziellem Interesse sind hierbei die Biokatalysatoren aus extremophilen Mikroorganismen, die mit ihren einzigartigen Eigenschaften, der Anlass für die Umstellung eines Verfahrens bzw. einzelner Syntheseschritte innerhalb eines Herstellungsprozesses sein können (Kap. 1.7.1.3). Um deren Potential vollständig zu erfassen, müssen die Reaktionsbedingungen des Testsystems an die jeweiligen Besonderheiten dieser Biokatalysatoren adaptiert werden. Als Beispiel kann die Untersuchung von Enzymen aus thermophilen Mikroorganismen dienen, die zum Teil ein Temperaturoptimum von über 80°C besitzen. Eine Durchmusterung der einzelnen Präparationen unter Standardbedingungen (z.B. 37°C) ist hierfür nicht sinnvoll. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand daher in der Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung von aktiven und enantioselektiven Hydrolasen, das zusätzlich zur Untersuchung von Enzymen aus mesophilen Organismen auch bei höheren Temperaturen (> 40°C) zuverlässig einsetzbar ist und darüber hinaus direkt auf den 'wahren' Substraten basiert. Zur Erzielung eines hohen Durchsatzes ist dabei ein Messverfahren im Mikrotiterplattenformat anzustreben. Das Testsystem soll anhand von Modellverbindungen (Abb. 2-1) und 116 verschiedenen Hydrolase-Präparationen (Tab. 2-1; Kap. 5.2.2), darunter auch 70 Enzyme aus unbekanntem, thermophilen Mikroorganismen, entwickelt werden.

Tab. 2-1 Übersicht über die eingesetzten Hydrolasen.

Amano Pharmaceutical		Roche Molecular Biochemicals		Diversa Corporation		ThermoGen		Novo Nordisk		
Acid Esterase	Quelle nicht bekannt	Chirazyme L-1	<i>Pseud. cepacia</i>	BD019	BD120	BD277	E001	E011	SP 382	<i>C. antarct. (AB)</i>
Acylase ACS	Quelle nicht bekannt	Chirazyme L-2	<i>Cand. antarctica (B)</i>	BD021	BD133	BD400	E002	E012	SP 523	<i>Mucor miehei</i>
Amano S	<i>Seaprose</i>	Chirazyme L-5	<i>Cand. antarctica (A)</i>	BD022	BD135	BD402	E003	E013	SP 525	<i>C. antarctica (B)</i>
Lipase A	<i>Aspergillus niger</i>	Chirazyme L-6	<i>Pseud. sp.</i>	BD027	BD137	BD405	E004	E014	Fluka Chemie	
Lipase AH	<i>Pseud. cepacia</i>	Chirazyme L-7	porcine pancreas	BD036	BD138	BD421	E005	E015	Esterase hog liver	
Lipase AK	<i>Pseud. fluorescens</i>	Chirazyme L-8	<i>Humicola sp.</i>	BD045	BD151	BD423	E006	E016	Lipase	<i>Cand. lipolytica</i>
Lipase AY	<i>Cand. rugosa</i>	Chirazyme L-9	<i>Rhizomucor miehei</i>	BD048	BD196	BD429	E007	E017b	Lipase	<i>Rhiz. arrhizus</i>
Lipase D	<i>Rhizopus javanicus</i>	Chirazyme L-10	<i>Alcaligenes sp.</i>	BD051	BD197	BD433	E008	E018b	Lipase	<i>Rhiz. niveus</i>
Lipase F	<i>Rhizopus javanicus</i>	Chirazyme L-12	thermoph. Mikroorg.	BD064	BD202	BD434	E009	E019	Protease	<i>Asp. oryzae (2A)</i>
Lipase G	<i>Penicillium cycloptium</i>	Chirazyme E-1	pig liver	BD073	BD213	BD468	E010	E020	Protease	<i>Asp. niger (6)</i>
Lipase M	<i>Rhizomucor javanicus</i>	Chirazyme E-2	hog liver	BD078	BD214	BD473	Protease			<i>Bac. subtilis</i>
Lipase PS	<i>Pseud. cepacia</i>	Chirazyme E-3	thermoph. Mikroorg.	BD094	BD236	BD519	Protease			<i>B. subt.(var. A)</i>
Lipase R	<i>Penicillium roqueforti</i>	Chirazyme E-4	thermoph. Mikroorg.	BD099	BD240	BD544	Protease			<i>Bac. subtilis (N)</i>
Papain W	<i>Carica papaya L.</i>	Lipase	<i>Rhizopus arrhizus</i>	BD100	BD245	BD551	Asahi Kasei			
Selbst-hergestellte Esterasen		Lipase	pig pancreas	BD102	BD265	BD553	Lipase			<i>Chromobact. vis.</i>
<i>Pseud. fluorescens (PFE und PFE II)</i>		Gist-brocades		BD104	BD266	BD556				
<i>Bacillus stearothermophilus</i>		lipase puur	<i>Pseud. alcaligenes</i>	BD105	BD273					

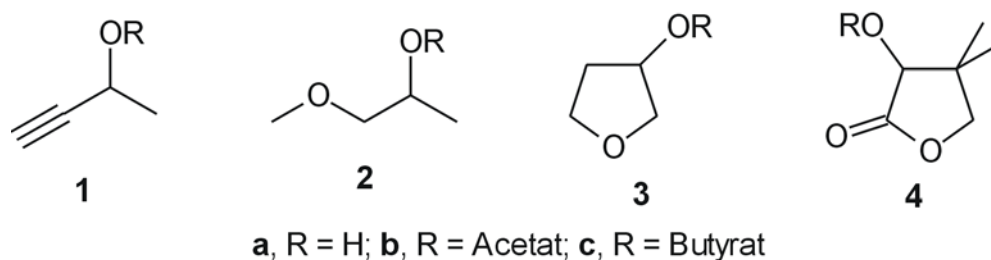


Abb. 2-1 Modellverbindungen für die Entwicklung des Testsystems.

Bei den ausgewählten Substraten handelt es sich um die sekundären Alkohole 2-Hydroxybut-3-in (**1a**), 1-Methoxy-2-propanol (**2a**), 3-Hydroxy-tetrahydrofuran (**3a**) und Pantolacton (**4a**) bzw. deren korrespondierende Ester (Acetate; Butyrate). Diese Verbindungen tragen jeweils nur sehr kleine Reste am stereogenen Zentrum bzw. sie sind nahezu symmetrisch aufgebaut. Nach der empirischen Kazlauskas-Regel (Kap. 1.5.2.3.1) lassen sich somit nur geringe Enantioselektivitäten bei einer biokatalytischen Veresterung bzw. Esterspaltung erwarten. Aus diesem Grund konnten bislang noch keine Hydrolasen identifiziert werden, die eine effiziente 'Trennung' dieser Substrate ermöglichen, so dass sowohl die Edukte als auch die Produkte in hoher optischer Reinheit erhältlich sind. Die sekundären Alkohole **1a** – **3a** und das Lacton **4a** stellen wichtige chirale Bausteine für die organische Synthesechemie dar. So dient z.B. **1a** insbesondere zur Synthese eines Sex-Pheromons des männlichen Bergkiefer-Käfers (*Dendroctonus brevicomis*) [Nakamura et al., 1998] bzw. von (*S*)-Austrocorticin, das als Haupt-Pigment in den orangenen Fruchtkörpern eines australischen Pilzes (*Dermocybe*) natürlicherweise vorkommt [Cotteril und Gill, 1993; Cotteril et al., 1994]. Das weitere Synthesepotential von optisch aktiven 1-Alkin-3-ol-Verbindungen ist in Abb. 2-2 dargestellt, wobei darüber hinaus zu berücksichtigen ist, dass einfache Acetylen-Verbindungen eine mikrobiologische Wirksamkeit besitzen [Reisch et al., 1967]. **2a** wird zur Synthese von chiralen Grignard-Liganden [Terfort und Brunner, 1996] und zur Derivatisierung bioaktiver Verbindungen genutzt [Bal-Tembe et al., 1997; Marrel et al., 1985; Sami et al., 1989]. Neben der Verwendung in anästhetischen Mitteln [Talipov et al., 1993] stellen **3a** und die davon abgeleiteten Verbindungen wichtige Bestandteile in neuen Wirkstoffen gegen AIDS (HIV Protease-Inhibitoren) dar [Beaulieu et al., 2000; Etmayer et al., 1996; Ghosh et al., 1996; Medou et al., 1999; Takashiro et al., 1998].

D-Pantolacton bzw. (*R*)-**4a** ist eine Vorstufe in der chemischen Synthese bzw. Biosynthese von Pantothenensäure, Panthenol und deren Derivate. Diese werden als Vitaminzusätze in der menschlichen Ernährung, im Tierfutter, in der Medizin (z.B. Wundheilung) und in der Kosmetik

(z.B. Haarkosmetik) eingesetzt. Für die Darstellung von D-Pantolacton wurden bereits mehrere Synthesestrategien verfolgt. Neben den chemischen Verfahren zur Herstellung von D-Pantolacton (z.B. enantioselektive Hydrierung von Ketopantolacton) [Brunner und Tracht, 1998; Schürch et al., 1998] oder der fraktionierten Kristallisation diastereomerer Salze von Pantothen säure mit homochiralen Aminen [Gamalevich und Serebryakov, 1997] wurden auch verschiedene biotechnologische Prozesse entwickelt. An erster Stelle steht hierbei die Racematspaltung von Pantolacton mittels der Lactonase aus *Fusarium oxysporum* (Kap. 1.3) [Shimizu und Kataoka, 1996a, 1996b; Shimizu et al., 1992]. Weitere Ansätze basieren z.B. auf der 'Trennung' von Pantolactonestern [Bevinakatti et al., 1989; Gamalevich und Serebryakov, 1997; Glänzer et al., 1988; Haughton et al., 2000] oder der enzymatischen Addition von Blausäure an Pivaldehyd-Derivate und anschließender Hydrolyse des Cyanhydrins [Effenberger et al., 1995]. Zudem wurde erst kürzlich eine neue L-Pantolacton-Hydrolase identifiziert [Kessler et al., 1999], die für zukünftige Anwendungen ein großes wirtschaftliches Potential in sich bergen dürfte. Diese Prozesse führen jedoch häufig nur zu Produkten mit geringer optischer Reinheit bzw. sie laufen nur mit einer geringen Raum-Zeit-Ausbeute ab. Aufgrund des beträchtlichen Marktvolumens (> 7000 t/a) [Shimizu, 2000] von D-Pantolacton und der davon abgeleiteten Derivate besteht ein großes Interesse daran, neue biotechnologische Herstellungsverfahren zu entwickeln.

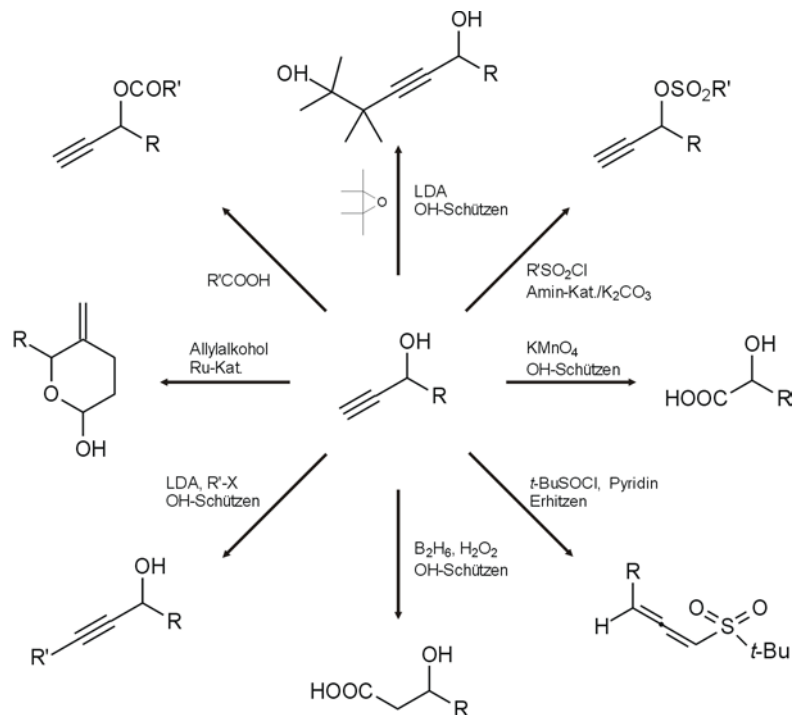


Abb. 2-2 Schematische Darstellung des Synthesepotentials von 1-Alkin-3-ol-Verbindungen ohne Berücksichtigung der Stereoselektivität der einzelnen Reaktionswege (modifiziert nach Faber, 2000 und Nakamura et al., 1998).

Bei Identifizierung geeigneter Enzyme, die eine hohe Stereoselektivität bei der 'Trennung' (Veresterung bzw. Esterhydrolyse zur Spaltung der Racemate) der ausgewählten Substrate aufweisen, soll eine nähere Charakterisierung der jeweiligen Hydrolasen erfolgen. Hiermit eng verbunden ist die Etablierung einer effizienten Analytik (GC-Analyse) zum Nachweis der enantiomerenreinen Modellverbindungen und die Auswahl der Reaktionsmedien, wobei ein Übergang auf organische Lösungsmittel anzustreben ist. In diesem Zusammenhang muss berücksichtigt werden, ob sich durch eine Immobilisierung der Biokatalysatoren die Stabilität unter den angestrebten Prozessbedingungen steigern lässt. Des Weiteren soll anhand von Testresolutions im Labor-Maßstab (g-Bereich) geprüft werden, ob eine Eignung der identifizierten Hydrolasen für den Einsatz in einem technischen Prozess gegeben ist.

Für die weitere Entwicklung der biokatalytischen Herstellungsverfahren sollen neben dem Substrat- (Kap. 1.7.2.1) bzw. Medien-Engineering (Kap. 1.7.2.2) und der Optimierung der Biokatalysatoren (Kap. 1.7.2.3) auch molekularbiologische Methoden zur Verbesserung der Enzyme (Kap. 1.7.3) zum Einsatz kommen. Die stetige Entwicklung neuer Methoden zur evolutiven Veränderung von Proteinen erfordern leistungsstarke Testsysteme zur Identifizierung der besten Varianten. Zwar wird schon seit Mitte der 90er Jahre mittels PCR-Techniken versucht, durch Zufallsmutagenese neue oder verbesserte Eigenschaften zu generieren, doch existieren HTS-Systeme (Kap. 1.8) zur Identifizierung enantioselektiver Enzyme erst seit 1997. Dies bedeutet, dass die Methoden der gerichteten Evolution mittlerweile etabliert sind, aber andererseits ein großer Bedarf an geeigneten HTS-Systemen besteht [Reetz, 2001, 2002; Sutherland, 2000]. Insbesondere Testverfahren, die auf dem Einsatz der 'wahren' Substrate beruhen (Kap. 1.8.2), erfordern extrem hohe Ausstattungskosten (z.B. NMR- oder Massenspektrometer sowie Isotopen-markierte Verbindungen) oder eine äußerst aufwendige Kalibrierung (z.B. pH-Wert Messung). Ein weitere Aufgabe bestand daher in der Entwicklung eines neuen, stereoselektiven HTS-Systems, das eine zuverlässige und schnelle Durchmusterung von Esterasevarianten einer Bibliothek, die durch Zufallsmutagenese erzeugt wurde, erlaubt. Das Testverfahren soll dabei auf dem Einsatz des 'wahren' Substrats beruhen und keine spezielle Ausstattung erfordern.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lässt sich folgendermaßen zusammenfassen. An erster Stelle steht die Entwicklung eines Testsystems, das eine schnelle Untersuchung der kommerziell erhältlichen Hydrolasen auf geeignete Biokatalysatoren ermöglicht. Hierbei sollen Enzyme identifiziert werden, die bei der Umsetzung der industriell bedeutsamen Substrate eine hohe Stereoselektivität zeigen. Für die weitere Entwicklung der biotechnologischen Prozesse zur

Herstellung der enantiomerenreinen Modellverbindungen ist es anschließend erforderlich, die ausgewählten Hydrolasen näher zu charakterisieren und die biokatalytischen Umsetzungen zu optimieren. Insbesondere der Übergang auf nicht-wässrige Medien, die Vergrößerung der Reaktionsansätze auf den g-Maßstab sowie die Immobilisierung der Enzyme ist zu untersuchen. Zur Verbesserung der Enzyme auf molekularbiologischer Ebene sollen auch die Methoden der gerichteten Evolution zum Einsatz kommen, wobei vorrangig die Entwicklung eines neuen, stereoselektiven HTS-Systems zur Durchmusterung einer Bibliothek von Esterasevarianten anzustreben ist.

3 Ergebnisse

3.1 Chemische Synthesen und Herstellung der rekombinanten Esterasen

3.1.1 Chemische Synthesen

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Modellverbindungen sind nicht alle kommerziell erhältlich. Aus diesem Grund war es erforderlich, die fehlenden Substrate (Acetate; Butyrate) selbst herzustellen. Darüber hinaus mussten für die Etablierung einer effizienten Enantiomerenanalytik auch die optisch reinen Ester synthetisiert werden.

3.1.1.1 Synthese von (*R,S*)-3-Acetoxy-tetrahydrofuran (**3b**), (*R,S*)-Pantolactonacetat (**4b**) und (*R,S*)-3-Butyroxyl-but-3-in (**1c**)

Die Darstellung von (*R,S*)-3-Acetoxy-tetrahydrofuran (**3b**), (*R,S*)-Pantolactonacetat (**4b**) und (*R,S*)-3-Butyroxyl-but-3-in (**1c**) erfolgte nach dem in Abb. 3-1 aufgezeigten, allgemein bekannten Reaktionsschema. Zur Synthese der Ester werden die korrespondierenden sekundären Alkohole in einem organischen Lösungsmittel vorgelegt und durch Zugabe von Acetyl- bzw. Butyrylchlorid sowie Pyridin als Katalysator verestert (Kap. 5.6). Die Aufreinigung der aus der Reaktionslösung extrahierten Acetate erfolgte anschließend durch Säulenchromatographie an Kieselgel bzw. bei (*R,S*)-**1c** durch Destillation. Die bei diesen Synthesen erzielten Ausbeuten sind in Tab. 3-1 aufgeführt.

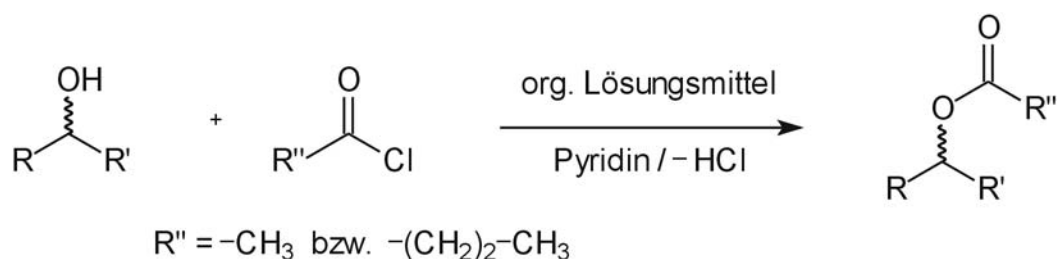


Abb. 3-1 Reaktionsschema für die Veresterung der sekundären Alkohole.

3.1.1.2 Synthese der enantiomerenreinen Esterverbindungen

Die Synthese der enantiomerenreinen Esterverbindungen erfolgte ebenfalls nach dem in Abb. 3-1 aufgezeigten Reaktionsschema, wobei die Synthesen nur im Mikromaßstab (Ansatzgrößen < 100 mg) durchgeführt wurden (Kap. 5.6.4).

Tab. 3-1 Übersicht über die Ausbeuten bei den chemischen Synthesen.

Verbindung	organisches Lösungsmittel	Reaktionsbedingungen	Alkohol [g / mmol]	Ester [g / mmol]	Ausbeute [%]
(<i>R,S</i>)- 1c	Pyridin	RT / 20 h	10,5 / 150	12,3 / 88	59
(<i>R,S</i>)- 3b	Dichlormethan	RT / 22 h	4,0 / 45	2,7 / 21	46
(<i>R,S</i>)- 4b	Pyridin	RT / 19 h	9,8 / 75	6,4 / 37	50

3.1.2 Herstellung der rekombinanten Esterasen

Die Herstellung der Esterase I aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE) erfolgte durch Überexpression in *E. coli* DH5 α (Kap. 1.4.3.1.1) [Krebsfänger et al., 1998a, 1998b; Zocher et al., 1998]. Beim Plasmid pJOE2792 (Abb. 3-2) handelt es sich um einen Expressionsvektor, bei dem die Genexpression der Kontrolle eines starken Rhamnose-induzierbaren Promotors (*rhaP*) unterliegt, der aus den für den Abbau von L-Rhamnose verantwortlichen Genen, die in den meisten *E. coli*-Stämmen vorhanden sind, stammt [Stumpp et al., 2000]. Hierdurch lassen sich diese Vektoren in all diesen Stämmen ohne Veränderungen verwenden.

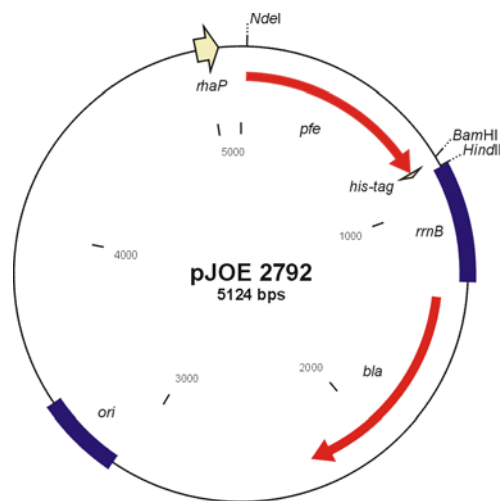


Abb. 3-2 Plasmidkarte des Expressionsvektors pJOE2792, der das für die *Pseudomonas fluorescens* Esterase I codierende Gen (*pfe*) trägt. Neben dem β -Lactamase-Gen (*bla*; Ampicillinresistenz) und dem Rhamnose-induzierbaren Promotor (*rhaP*) sind noch der an die Esterase fusionierte *his-tag* sowie die Bereiche der ribosomalen Bindungsstelle (*rrnB*) und des Replikationsstartpunkts (*ori*) eingezeichnet. Von den vorhandenen Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind nur *NdeI*, *BamHI* und *HindIII* explizit markiert.

Vor der Expression der PFE nach einem Standardprotokoll (Kap. 5.5.1.3) wurden zunächst die Bedingungen für den Aufschluss der *E. coli*-Zellen optimiert. Die Kombination aus einem

Gefrier-Auftau-Zyklus und einer anschließenden Ultraschall-Behandlung von 2× 1 min erbrachte hierbei die höchste Aktivität (30 U/mg gegenüber pNPA) bei den durchgeführten Expressionsansätzen (Tab. 3-2).

Tab. 3-2 Ansätze zur Optimierung der Aufschlussbedingungen bei der Herstellung der Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* (Kap. 5.5.1.4).

Ansatz	Vorbehandlung der Zellen durch Gefrier-Auftau-Zyklen v. Ultraschall-Aufschluss	Ultraschall-Aufschluss	Aktivität [U/mg] (Kap. 5.5.6.3.1)
A	keine Vorbehandlung	2× 1 min	5
B	keine Vorbehandlung	2× 2 min	9
C	1× Einfrieren bei –80°C	2× 1 min	30
D	1× Einfrieren bei –80°C	kein Ultraschall	3
E	2× Einfrieren bei –80°C	kein Ultraschall	9

Nach Optimierung der Aufschlussbedingungen wurden auch die Esterase II aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE II) und die Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* (BSE) gemäß des Standardprotokolls hergestellt. Um hierfür ein einheitliches Expressionssystem für die Esterasen zu nutzen, klonierte man die für die PFE II und BSE codierenden Gene in das Plasmid pJOE2792 um. Das Gen für die PFE II stand hierzu im Vektor pFIS32 zur Verfügung [Khalameyzer et al., 1999], der sich wie das Expressionssystem pJOE2792 vom Plasmid pJOE2775 ableitet [Stumpp et al., 2000]. Eine Umklonierung konnte somit einfach unter Ausnutzung der Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* erfolgen. Dagegen wurde das für die BSE codierende Gen ausgehend vom Vektor pMK2 [Amaki et al., 1994, 1992; Kugimiya et al., 1992; Tulin et al., 1993] zunächst in das high-copy-Plasmid pG-BsteE.WT [Henke, 2001] integriert. Anschließend ließ sich die BSE ebenfalls über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* in pJOE2792 umklonieren.

Die rekombinanten Esterasen wurden in 500 mL Kulturen hergestellt, wobei die Identifizierung der exprimierten Enzyme durch SDS-PAGE (Kap. 5.5.6.1) erfolgte (Abb. 3-3). Beim Einsatz geringer Mengen an Lyophilisat (ca. 20 µg Protein) lassen sich im SDS-Gel gezielt nur die deutlich überexprimierten Proteinfractionen nachweisen. Im Zymogramm konnten so die PFE (theoretische Masse mit *his-tag* 31,0 kDa) und die BSE (29,2 kDa) zweifelsfrei identifiziert werden. Trotz der Verwendung vergleichbarer Mengen an lyophilisiertem Rohextrakt war ohne Induktion und bei der PFE II (35,9 kDa) keine Bande zu erkennen, d.h. bei den Ansätzen zur Herstellung der rekombinanten Esterasen erfolgt ohne L-Rhamnose keine Expression (Nachweis

für pJOE2792 mit PFE-Gen) bzw. im Fall der Esterase II aus *Pseudomonas fluorescens* wurde nur eine geringe Menge des rekombinanten Proteins gebildet.

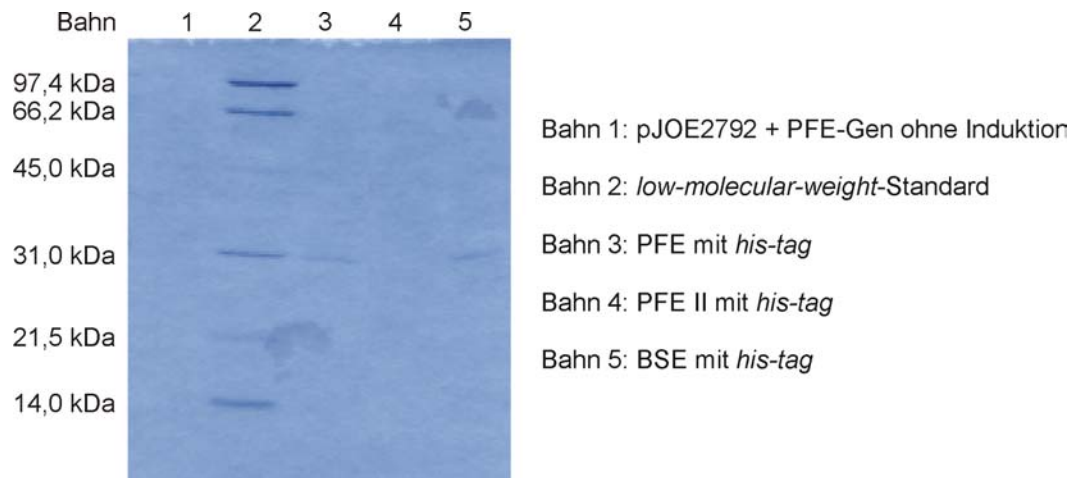


Abb. 3-3 SDS-PAGE Zymogramm der Expression der rekombinanten Esterasen in *E. coli* DH5 α . Die eingesetzten Mengen an Protein (20 μ g) wurden so gewählt, dass bei den einzelnen Ansätzen jeweils nur die Bande des überexprimierten Enzyms zu erkennen ist.

Zur weiteren Charakterisierung der Esterasen wurde ihre Aktivität gegenüber pNPA (Kap. 5.5.6.3.1) bestimmt sowie der Proteingehalt (Kap. 5.5.6.2) ermittelt (Tab. 3-3). Die PFE zeigt hierbei die höchste spezifische Aktivität und besitzt darüber hinaus die größte Expressionsrate (ca. 500 mg Rohesterase / 500 mL Kultur). Wie zu erwarten, stellte sich ohne Induktion ein deutlich erniedrigter Proteingehalt (24 %) ein und es war keine Aktivität gegenüber pNPA zu beobachten. Weiterhin besitzt die PFE II Präparation trotz eines hohen Proteingehalts (42 %) nur eine geringe Aktivität gegenüber pNPA. In Verbindung mit der SDS-PAGE-Analyse steht dies im Einklang mit früheren Erkenntnissen, wonach es sich bei der PFE II um ein membranfixiertes Protein handeln könnte [Khalameyzer et al., 1999] bzw. im Verlauf der Expression Einschlusskörper (*inclusion bodies*) gebildet werden [Henke, 2001].

Tab. 3-3 Übersicht über die Aktivitäten gegenüber pNPA und der Proteingehalte der hergestellten Zellrohextrakte (Enzympräparationen). Die Expression der rekombinanten Esterasen erfolgte jeweils im 500 mL Maßstab in *E. coli* DH5 α .

	ohne Induktion	PFE	PFE II	BSE
pNPA-Aktivität [U/mg Lyophilisat]	---	30	0,2	3
Proteingehalt [%] bezogen auf BSA	24	42	42	36
spezifische Aktivität [U/mg Protein]	---	71	0,5	8

3.2 Testsystem zur Identifizierung aktiver und enantioselektiver Hydrolasen

In den letzten Jahren hat sich das Angebot an kommerziell erhältlichen Enzymen drastisch erhöht (Kap. 1.7.1.2), wodurch sich eine neue Herausforderung bei der Etablierung von innovativen, biokatalytischen Herstellungsverfahren ergibt. Konnten früher noch die verfügbaren Enzyme einzeln auf ihre Verwendbarkeit im angestrebten Prozess getestet werden, muss heute eine schnelle Vorauswahl geeigneter Biokatalysatoren erfolgen. Derzeit existieren hierfür noch keine etablierten Testsysteme, die eine schnelle und einfache Durchmusterung der kommerziell erhältlichen Enzympräparationen erlauben. Konventionelle Methoden zum Nachweis von Hydrolase-produzierenden Mikroorganismen, die auf einer Hofbildung (z.B. Tributyrin-Agarplatten) oder der Farbänderung eines pH-Indikators auf einem Festmedium [Bornscheuer et al., 1998, 1999] beruhen, sind in diesem Fall nicht anwendbar. Selbst Screening-Verfahren, wie sie z.B. im Rahmen der gerichteten Evolution zum Einsatz kommen (Kap. 1.8.2), erweisen sich für diesen Zweck als ungeeignet. Nur wenige dieser HTS-Systeme beruhen auf den 'wahren' Substraten und die Verfahren sind zumeist sehr aufwendig. Aus den vorgenannten Gründen ist es unerlässlich, ein neues Testsystem zu entwickeln, welches die rasche Identifizierung von enantioselektiven Hydrolasen erlaubt.

3.2.1 Aufbau des Testsystems

Das entwickelte Testsystem zur Identifizierung von aktiven und enantioselektiven Hydrolasen basiert auf einer hierarchischen Vorgehensweise (Abb. 3-4). Im ersten Schritt (Selektion) werden mittels eines sogenannten pH-Assays (Kap. 3.2.2) die Hydrolasen selektiert, die gegenüber den Modellverbindungen (Abb. 2-1) Aktivität zeigen. Durch geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen (Hydrolysen in wässrig, gepufferter Lösung) ist dabei sichergestellt, dass die zu testenden Enzyme unter optimalen Konditionen direkt bei der Umsetzung der 'wahren' Substrate untersucht werden. Zudem ermöglicht die Ausführung des pH-Assays im Mikrotiterplattenformat einen hohen Durchsatz. In den nachfolgenden zweiten Schritt des Testsystems (Screening) werden nur die vorausgewählten Hydrolasen einbezogen. Die aufwendigeren Untersuchungen zur Bestimmung der Enantioselektivität (spezifische Messgröße) beschränken sich somit auf einen Bruchteil der ursprünglich zur Verfügung stehenden Enzympräparationen. Die im Verlauf des Screenings erforderlichen Testreaktionen (Racematspaltungen) können dabei direkt unter den Bedingungen des angestrebten biokatalytischen Herstellungsverfahrens durchgeführt werden, wobei die Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse durch GC-Analyse unter Verwendung chiraler Trennsäulen erfolgt.

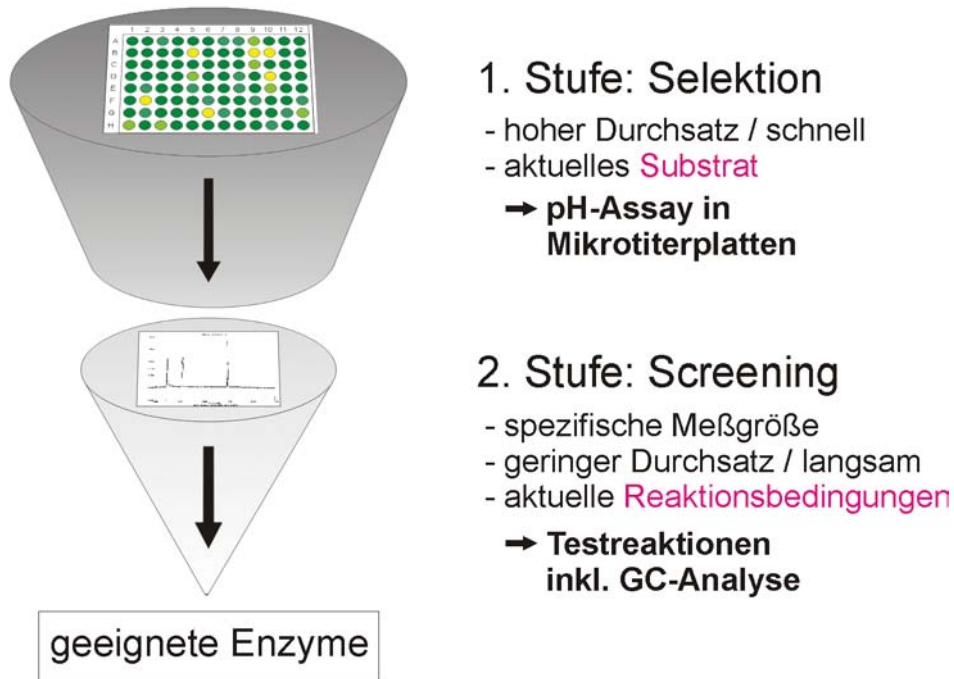


Abb. 3-4 Schematische Darstellung der hierarchischen Vorgehensweise zur Identifizierung aktiver und enantioselektiver Hydrolasen.

3.2.2 1. Stufe: pH-Assay

3.2.2.1 Prinzip

Der im Rahmen des entwickelten Testsystems etablierte pH-Assay lehnt sich an die konventionellen Methoden zum Nachweis von Hydrolase-produzierenden Mikroorganismen auf Festmedien (Agarplatten) [Bornscheuer et al., 1998, 1999] an und überträgt dieses Schema auf das Mikrotiterplattenformat. Im Gegensatz zur Untersuchung von lebenden Zellen können so Lösungen der zur Verfügung stehenden Enzympräparationen eingesetzt werden. Dem pH-Assay liegt dabei das in Abb. 3-5 dargestellte Reaktionsprinzip zugrunde.

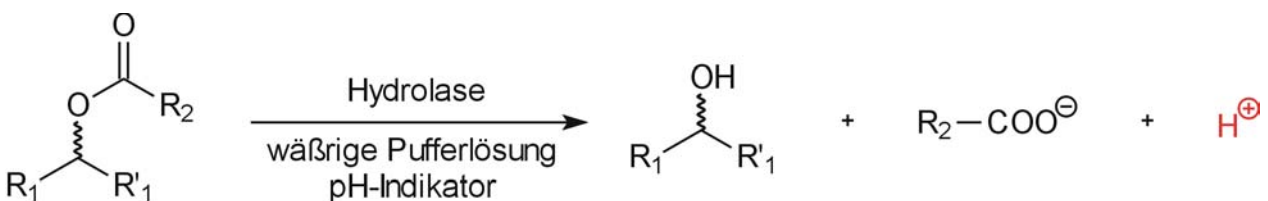


Abb. 3-5 Grundreaktion des pH-Assays: die Hydrolase-katalysierte Spaltung einer Esterverbindung führt zur Freisetzung der Säure, wodurch sich der pH-Wert der Reaktionslösung erniedrigt. Die Detektion der pH-Wertänderung erfolgt mittels eines pH-sensitiven Farbindikators.

Die Hydrolase-katalysierte Spaltung einer Esterverbindung führt zur Freisetzung der Säure, wodurch sich der pH-Wert der Lösung erniedrigt. Diese Änderung kann mittels eines pH-sensitiven Farbindikators verfolgt werden. Die Verwendung von Bromthymolblau (pK_s 7,3) [Lide, 1998] in wässrig, gepufferter Lösung (Phosphat-Puffer; pH 7,3; 10 mM) ergibt dabei eine Farbänderung von grün nach gelb. Durch Auswahl eines Puffersystems, dessen pH-Wert der Säurestärke des eingesetzten Indikators entspricht, ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Wasserstoffionen-Konzentration und der Umsatzrate, d.h. die Kinetik der Esterhydrolyse kann direkt über die Farbänderung verfolgt werden [Janes et al., 1998]. Hierbei ist zu beachten, dass ein Absinken des pH-Werts im Verlauf der Reaktion die Eigenschaften der untersuchten Enzyme beeinflussen kann, d.h. bei exakten kinetischen Messungen darf sich der pH-Wert nur infinitesimal ändern. Bei der Verwendung enantiomerenreiner Substrate und einer (halb-)quantitativen Auswertung der Farbänderungen können neben der Aktivitätsbestimmung zusätzlich auch die Schätzwerte für die Enantioselektivität (Kap. 1.5.2.3.2) ermittelt werden [Demirjian et al., 1999; Janes et al., 1998; Moris-Varas et al., 2001, 1999]. Die Ausführung des pH-Assays in diesem quantitativen Modus ist jedoch sehr aufwendig (Kalibrierung, enantiomerenreine Substrate) und die erhaltenen Schätzwerte für die Enantioselektivität können weit vom wahren *E*-Wert abweichen [Reetz, 2001]. Eine Ursache hierfür dürfte in der Inhomogenität der Hydrolase-Präparationen (Lyophilisation bei unterschiedlichen pH-Werten) liegen, wodurch Störungen bei der quantitativen Auswertung unvermeidlich sind. Aus diesen Gründen wurde lediglich ein qualitativer pH-Assay etabliert, der auf einfache Weise die rasche Identifizierung aktiver Hydrolasen erlaubt. Durch die schnell ablaufende Indikatorreaktion (visuelle Farbänderung) und die geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen (Kosolvens; irreversible Hydrolyse) wird auch die Verwendung stark flüchtiger Esterverbindungen (z.B. **1b**) ermöglicht. Darüber hinaus kann die Assay-Temperatur an das Optimum der zu untersuchenden Hydrolasen (insbesondere aus extremophilen Mikroorganismen) angepasst werden.

3.2.2.2 Durchführung

Die Durchführung des pH-Assays zur Selektion von aktiven Hydrolasen gestaltet sich sehr einfach (Kap. 5.7.1.1), da für jede Testreaktion im Prinzip nur ein Pipettierschritt erforderlich ist. In den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte werden die wässrig, gepufferten Enzymlösungen vorgelegt, die Reaktionen durch Zugabe von Bromthymolblau sowie des Substrats (< 0,01 mg pro Testreaktion) gestartet und anschließend eventuell auftretende Farbänderungen beobachtet. Als Lösungsvermittler (Kosolvens) dient hierbei DMSO, das unter dem gegebenen Konzentrationsverhältnis die enzymatischen Umsetzungen nicht stört. Als Faustregel ist

allgemein bekannt, dass wasserlösliche Solvenzien bis zu einem Gehalt von 10 % keinen nachteiligen Einfluss auf biokatalytische Reaktionen besitzen [Faber, 2000]. Aufgrund des einfachen Testprotokolls kann der pH-Assay zur Erzielung eines hohen Durchsatzes sehr leicht automatisiert (Pipettier-Roboter) werden.

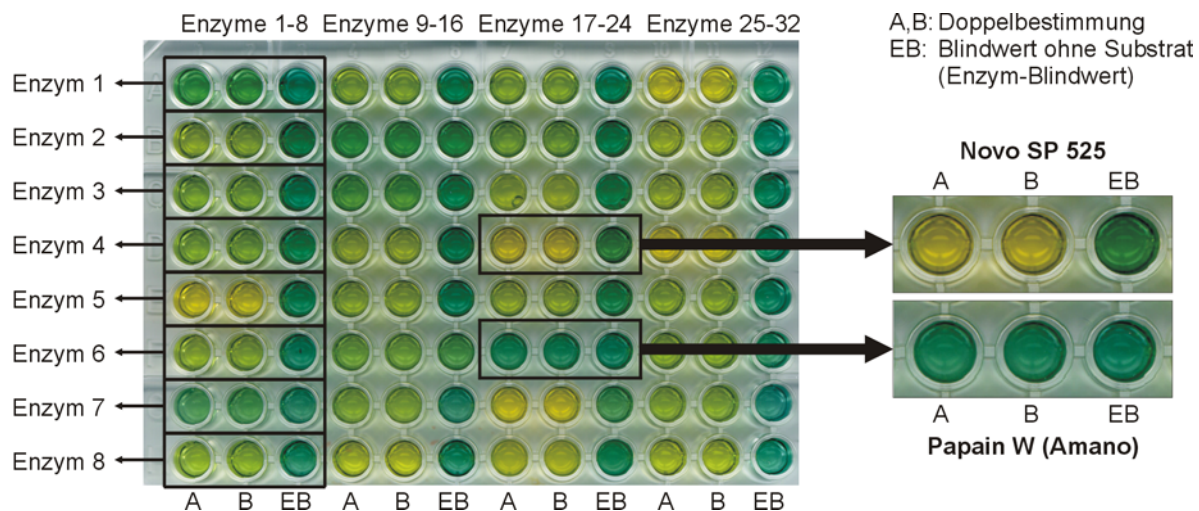


Abb. 3-6 Beispiel für die Aktivitätsprüfung der Hydrolasen, die vor und nach jeder Messserie mit Tributyrin als Substrat durchgeführt wurde. Sichtbare Farbunterschiede zwischen den Reaktionsansätzen (Doppelbestimmung für jedes Enzym) und den korrespondierenden Blindwerten (EB) zeigen aktive Hydrolasen an. Exemplarisch sind die Testreaktionen für Novo SP 525 (hohe Aktivität) und Papain W (keine Aktivität unter den Testbedingungen) vergrößert dargestellt.

Im Verlauf des pH-Assays wurde die Aktivität jeder Hydrolase (insgesamt 116 unterschiedliche Präparationen) vor und nach Beendigung einer Messserie gegenüber Tributyrin als Substrat getestet, wodurch sich die Stabilität der in Puffer gelösten Enzyme überprüfen ließ (Abb. 3-6). Mit Ausnahme von Papain sowie Diversa BD051, BD094 und BD151 waren unter den gegebenen Reaktionsbedingungen alle Biokatalysatoren in der Lage, das eingesetzte Triglycerid zu spalten. Obwohl die Hydrolasen vor ihrer Verwendung zum Teil bis zu sechs Stunden in Lösung gelagert wurden, konnten darüber hinaus keine signifikanten Aktivitätsverluste beobachtet werden. Neben den eigentlichen Testreaktionen (Doppelbestimmung) wurde für jedes Enzym zusätzlich ein Blindwert ohne Substrat (Enzym-Blindwert) mitgeführt und der Farbunterschied zwischen den korrespondierenden Ansätzen bewertet (Abb. 3-7).

Bei der Selektion von Hydrolasen, die in der Lage sind die Modellverbindungen umzusetzen, müssen neben den Enzym-Blindwerten zusätzlich die Stabilitäten der Substrate unter den Assay-Bedingungen (Substrat-Blindwerte) berücksichtigt werden. In Analogie zu Tributyrin erwiesen sich hierbei die Acetate **1b**–**3b** sowie das Butyrat **1c** als stabil. Selbst nach 24 stündiger

Inkubation bei 80°C war bei diesen Verbindungen keine Zersetzung zu beobachten, wogegen **4b** schon bei Temperaturen > 37°C merklich hydrolysierte. Durch Kombination der Substrat-Blindwerte mit der parallel durchgeführten Aktivitätsmessung gegenüber Tributyrin lassen sich fehlerhafte Bewertungen (falsch positiv bzw. falsch negativ) der Testreaktionen vermeiden.

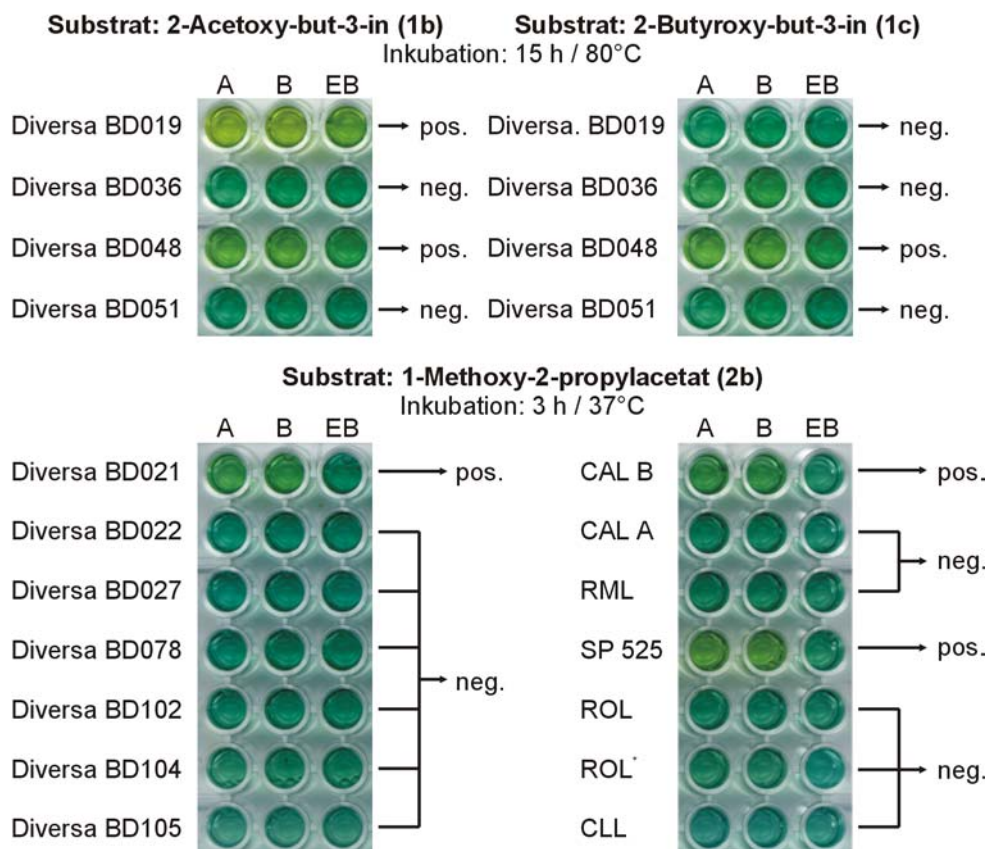


Abb. 3-7 Beispiele für den pH-Assay zur Selektion von aktiven Hydrolasen. Farbänderungen der Testreaktionen A und B (Doppelbestimmung) im Vergleich zu den korrespondierenden Enzym-Blindwerten EB (Ansätze ohne Substrat) indizieren Biokatalysatoren, die in der Lage sind die Modellverbindungen zu hydrolysieren (pos.). Können die Substrate von den eingesetzten Hydrolasen nicht gespalten werden (neg.), bleibt die Farbe der entsprechenden Testreaktionen unverändert. (RML: Lipase aus *Rhizomucor miehei*; ROL: Lipase aus *Rhizopus arrhizus*; ROL*: Lipase aus *Rhizopus niveus*; CLL: Lipase aus *Candida lipolytica*)

3.2.2.3 Ergebnis

Bei den durchgeführten Testreaktionen konnten für jedes der untersuchten Substrate **1b - 4b / 1c** aktive Hydrolasen identifiziert werden (Tab. 3-4). Die große Anzahl selektierter Enzyme (von 36 / **3b** bis 68 / **1c**), die in der Lage sind die Modellverbindungen zu spalten, dürfte dabei auf die geringen sterischen Anforderungen der Acetate bzw. des Butyrat der niedermolekularen Alkohole **1a - 4a** zurückzuführen sein. In diesem Zusammenhang zeigt sich auch, dass die Ester der

zyklischen, räumlich anspruchsvolleren Alkohole **3a** und **4a** von einer signifikant kleineren Anzahl an Hydrolasen als die übrigen Substrate gespalten werden. Dagegen scheint die Zunahme der Größe des Säurerests (Butyrat an Stelle von Acetat) keine negativen Einflüsse auf die enzymatischen Reaktionen zu verursachen. Es ist sogar ein Anstieg der Anzahl aktiver Enzyme beim Übergang von **1b** (51) nach **1c** (68) zu beobachten. Hierbei ist aber zu berücksichtigen, dass die im Rahmen des pH-Assays getesteten Lipasen erst bei länger-kettigen Substraten Aktivität zeigen.

Tab. 3-4 Zusammenstellung der Ergebnisse des pH-Assays zur Identifizierung von aktiven Hydrolasen. Die Gesamtzahl (Summe) der selektierten Biokatalysatoren ist jeweils nach der Herkunft der Enzyme aufgeschlüsselt. Insgesamt wurden 116 verschiedene Hydrolase-Präparationen in die Untersuchungen einbezogen.

Substrat	kommerzielle Hydrolasen (43)	rekombinante Esterasen (3)	Diversa- Enzyme (50)	ThermoGen- Enzyme (20)	Summe (116)
1b	13	2	22	14	51
1c	21	3	24	20	68
2b	11	1	15	20	47
3b	12	2	10	12	36
4b	12	2	13	11	38

Nach Abschluss der 1. Stufe des Testsystems (Selektion), wurden aus der ursprünglich zur Verfügung stehenden Menge an Enzymen effektiv diejenigen Biokatalysatoren selektiert, die prinzipiell in der Lage sind, die Modellverbindungen umzusetzen. Durch Anwendung des entwickelten pH-Assays konnte hierbei die Anzahl der Hydrolasen in Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat schnell und einfach reduziert (bei **3b** auf weniger als ein Drittel) werden.

3.2.3 2. Stufe: Screening

3.2.3.1 Durchführung

Zur Bestimmung der Stereospezifität wurde für jede aktive Hydrolase eine Racematspaltung im mg-Maßstab durchgeführt und nach unterschiedlichen Zeitabständen die erzielten Enantiomerenüberschüsse untersucht (Kap. 5.7.1.2). Hierzu war es erforderlich, eine schnelle und zuverlässige Methode (Gaschromatographie) zur Analyse der Proben zu etablieren. Es zeigte sich, dass bei Verwendung von stationären Phasen auf Cyclodextrinbasis für die eingesetzten

Alkohole und Ester eine Grundlinientrennung (Abb. 3-8) bei der gaschromatographischen Untersuchung möglich ist (Kap. 5.4). Die Retentionszeiten liegen dabei unter 25 min, so dass eine wichtige Voraussetzung für einen hohen Durchsatz gegeben ist. Zusätzlich zur Enantiomerenanalytik mussten geeignete Methoden für die Extraktion der Modellverbindungen aus der wässrigen Reaktionslösung entwickelt werden. Insbesondere die Alkohole (**1a** – **4a**) lassen sich nur bei Verwendung stark polarer Lösungsmittel wie Ethylacetat bzw. Dichlormethan in ausreichendem Maße isolieren. Die Verwendung dieser hydrophilen Solvenzien hat darüber hinaus den Vorteil, dass unmittelbar nach Zugabe des Extraktionsmittels die Proteinstruktur der Biokatalysatoren denaturiert und so die enzymatischen Umsetzungen gezielt nach definierten Zeitintervallen (Reaktionszeiten) gestoppt werden können.

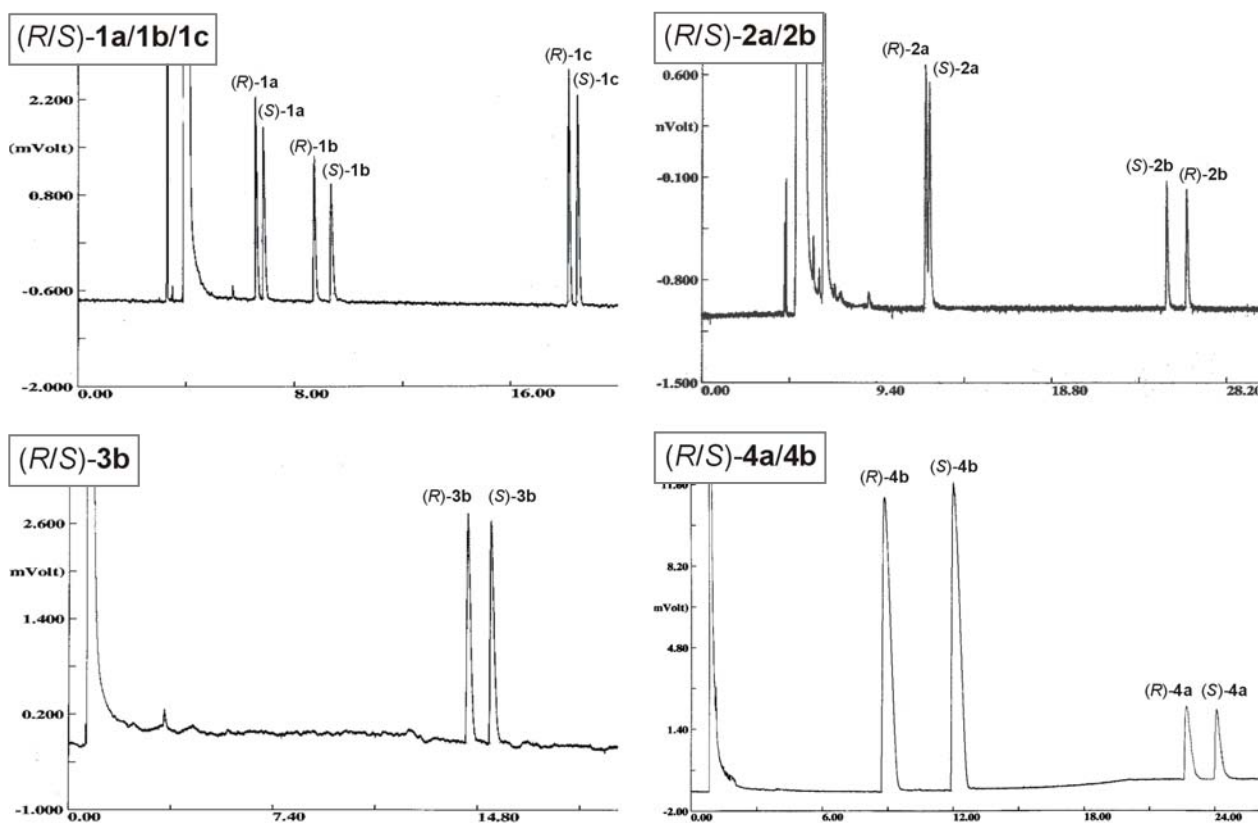


Abb. 3-8 Übersicht über die entwickelte GC-Analytik zur Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse. Für jede der Modellverbindungen ist exemplarisch ein Chromatogramm mit der Trennung des Acetats (bzw. Butyrats) und des korrespondierenden Alkohols abgebildet. Im Fall von (*R,S*)-**2a** lässt sich bei Verwendung einer anderen stationären Phase (hier nicht dargestellt) eine wesentlich höhere Auflösung erreichen. Bei (*R,S*)-**3b** ist lediglich die Untersuchung des Esters aufgezeigt, da die Analyse von (*R,S*)-**3a** separat (andere Trennsäule) erfolgte.

3.2.3.2 Ergebnis

Bei Durchführung der Racematspaltungen im mg-Maßstab konnten einige zum Teil hochenantioselektive Hydrolasen identifiziert werden. Für die unterschiedlichen Substrate sind repräsentative Beispiele in Abb. 3-9 aufgezeigt. Anhand der abgebildeten GC-Chromatogramme, welche die erzielten Enantiomerenüberschüsse unter den angegebenen Reaktionsbedingungen widerspiegeln, lässt sich das Potential dieser Biokatalysatoren bei der 'Trennung' der Modellverbindungen ermessen. Eine Übersicht der weiteren Enzyme, die ebenfalls eine hohe Aktivität und Stereospezifität gegenüber den eingesetzten Substraten zeigen oder eine umgekehrte (inverse) Enantioselektivität aufweisen, wird in Tab. 3-5 gegeben. Eine vollständige Auflistung aller im Rahmen der 2. Stufe des Testsystems (Screening) untersuchten Biokatalysatoren ist im Anhang aufgeführt (Kap. 6.1).

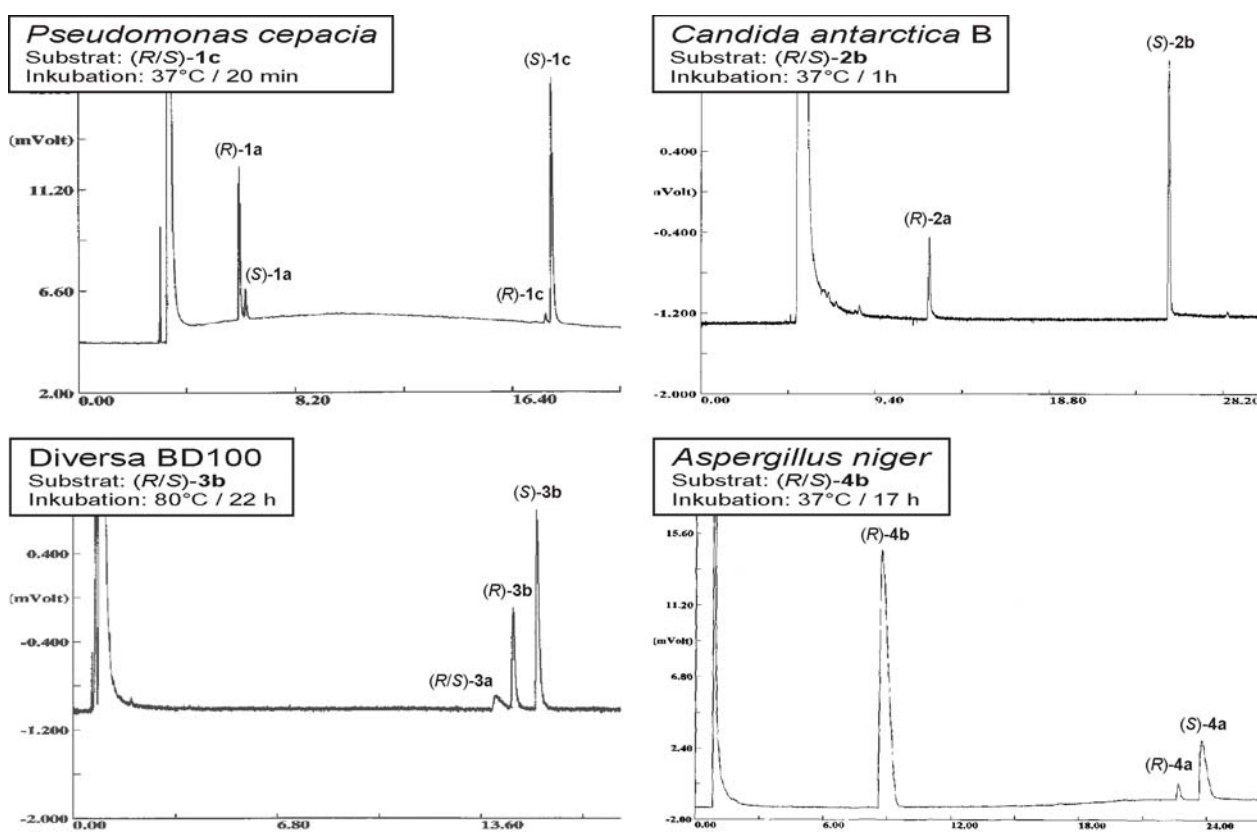


Abb. 3-9 Repräsentative Beispiele für die gaschromatographische Analyse der Enantiomerenüberschüsse bei den Racematspaltungen (Screening) im mg-Maßstab. Neben dem Ursprung bzw. Namen der Hydrolase und des Substrats sind zusätzlich die jeweiligen Reaktionsbedingungen angegeben. Im Fall von *Diversa BD100* ist nur die Trennung des Acetats (**3b**) aufgezeigt.

Tab. 3-5 Auszug der Ergebnisse der Racematspaltungen im mg-Maßstab. In der Tabelle sind nur die Enzyme mit den höchsten Enantioselektivitäten bzw. einer umgekehrten (inversen) Stereopräferenz aufgeführt.

Sub.	Name der Hydrolase bzw. Ursprung	Bedingungen [°C / h]	Ester [%ee]	Alkohol [%ee]	Umsatz ⁵ [%]	E-Wert ⁵
1b	<i>Alcaligenes sp.</i>	37 / 26	> 99 (S)	33 (R)	75	20
	<i>Aspergillus niger</i>	37 / 26	98 (R)	44 (S)	69	11
	<i>Bacillus stearoth.</i> (BSE)	37 / 1	45 (R)	84 (S)	35	18
	<i>Pseud. fluorescens</i> (PFE)	37 / 2 min	> 99 (R)	69 (S)	59	75
	BD021	37 / 26	99 (R)	58 (S)	63	19
	BD133	37 / 26	28 (R)	92 (S)	24	30
	BD213	37 / 26	80 (R)	85 (S)	48	30
	BD240	50 / 1	58 (R)	88 (S)	40	29
1c	<i>Candida antarctica</i> A	37 / 2 min	> 99 (R)	50 (S)	67	29
	<i>Pseud. cepacia</i> (Amano)	37 / 20 min	> 99 (S)	67 (R)	60	68
	<i>Pseud. cepacia</i> (Roche)	37 / 20 min	> 99 (S)	24 (R)	80	15
	<i>Pseud. fluorescens</i> (PFE)	37 / 10 min	75 (R)	87 (S)	46	33
2b	<i>Candida antarctica</i> B	37 / 1	> 99 (S)	> 99 (R)	50	> 100
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	37 / 23	62 (S)	62 (R)	50	8
	BD021	37 / 1	27 (R)	79 (S)	26	11
3b	<i>Candida antarctica</i> B	37 / 30 min	90 (R)	37 (S)	69	6
	<i>Pseud. fluorescens</i> (PFE)	37 / 22	31 (R)	40 (S)	43	3
	BD100	80 / 22	34 (S)	33 (R)	51	3
4b	<i>Aspergillus niger</i>	37 / 17	> 99 (R)	78 (S)	56	> 100
	<i>Bacillus stearoth.</i> (BSE)	40 / 24	84 (R)	82 (S)	51	26
	<i>Asp. oryzae</i> (Protease)	37 / 39	83 (R)	95 (S)	47	> 100
	BD073	80 / 6	68 (R)	94 (S)	42	66
	BD094	RT / 39	49 (R)	> 99 (S)	33	> 100
	BD405	37 / 17	25 (R)	> 99 (S)	20	> 100
	BD423	RT / 17	25 (S)	59 (R)	30	5
	E018b	40 / 24	86 (R)	82 (S)	51	29

Bei der Suche nach geeigneten Enzymen, die eine effektive biokatalytische Herstellung der 'schwer-trennbaren' Modellverbindungen erlauben, wurde im Fall von **1a** sowohl das Acetat (**1b**) als auch das Butyrat (**1c**) im Rahmen des Testsystems eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass eine große Anzahl der zur Verfügung stehenden Hydrolasen in der Lage ist, die Ester stereoselektiv zu hydrolysieren. Insbesondere sind die kurzen Reaktionszeiten bei der Esterase I aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE) und der Lipase A aus *Candida antarctica* auffällig. Schon nach zwei Minuten ist jeweils ein Umsatz größer als 50 % erreicht, wobei die zugehörigen Enantioselektivitäten 75 bzw. 29 betragen. Weiterhin sind die beobachteten Aktivitäten bei der Hydrolyse von **1c** alle kleiner als beim korrespondierenden Acetat. Ausgenommen hiervon ist die PFE, die als typischer Vertreter der Enzymklasse der Esterasen sowohl zum Butyrat als auch zum Acetat eine hohe

⁵ berechnet nach Chen et al., 1982

Affinität zeigt. Zudem ist auffällig, dass neun Hydrolasen bevorzugt das (*S*)-Enantiomer der Substrate **1b/1c** mit hoher Selektivität umsetzen und dagegen nur drei Enzyme entgegengesetzte Stereopräferenz aufweisen. Bei Verwendung der PFE (*E*-Wert = 75) und der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (*E*-Wert = 68) können somit beide enantiomere Formen des Alkohols **1a** in hoher optischer Reinheit hergestellt werden.

Bei der 'Trennung' von **2b** bzw. **4b** ergeben sich bei fünf Enzymen hervorragende Werte für die Enantioselektivität (*E* > 100). Insbesondere ist die Hydrolyse von **2b** mit der Lipase B aus *Candida antarctica* (CAL B) hervorzuheben, da bei einem Umsatz von 50 % sowohl der Ester als auch der Alkohol in enantiomerenreiner Form (> 99 %*ee*) zugänglich sind. Neben diesem Enzym weist auch die Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (*E* = 8) eine moderate (*R*)-Selektivität auf. Diversa BD021 zeigt im Gegensatz dazu eine umgekehrte Stereopräferenz (*E* = 11) bei der 'Trennung' von **2b**. Ein analoges Resultat ergibt sich bei **4b**, da sieben Hydrolasen die (*S*)-Form des Acetats bevorzugt spalten und erneut ein Diversa-Enzym (Diversa BD423) eine höhere Affinität zum entgegengesetzten Enantiomer besitzt.

Bei der enzymatischen Hydrolyse von **3b** tritt ebenfalls die im vorigen Abschnitt beschriebene Besonderheit auf. Während die CAL B und die PFE bei der Reaktion höhere Enantiomerenüberschüsse zugunsten von (*S*)-**3a** ergeben, setzt Diversa BD100 die stereoisomere Form des Esters bevorzugt um. Obwohl insgesamt mehr als 100 verschiedene Enzyme in das Testsystem einbezogen wurden, sind die gefundenen Enantioselektivitäten gegenüber **3b** als gering einzustufen. Außerdem ergeben sich trotz der langen Reaktionszeiten (bis 23 h) zumeist nur sehr kleine Umsätze, so dass die Enantiomerenüberschüsse des Produkts nicht zugänglich sind. Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen des pH-Assays (Kap. 3.2.2) für **3b**, da mit Ausnahme von sieben Hydrolasen (Kap. 6.1) bei den durchgeführten Testreaktionen nur minimale Farbänderungen zu beobachten waren. Dieser Zusammenhang spiegelt sich auch bei den anderen Modellverbindungen wider, d.h. je größer die Abnahme des pH-Werts ist, umso höher liegt die Reaktionsgeschwindigkeit bzw. Umsatzrate bei der nachfolgend durchgeführten Racematspaltung im mg-Maßstab. Umgekehrt ließ sich anhand mehrerer Stichproben belegen, dass Enzyme, die bei beim pH-Assay als 'negativ' bewertet wurden, auch im Rahmen der zweiten Stufe des Testsystems keine Aktivität zeigen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass für alle Modellverbindungen mit Ausnahme von **3a/b** geeignete Enzyme identifiziert wurden, die eine effektive, biokatalytische 'Trennung' ermöglichen. Zusätzlich existiert für jedes Substrat mindestens eine Hydrolase, die eine

entgegengesetzte Stereopräferenz aufweist, so dass immer beide enantiomeren Formen des Alkohols bzw. des Esters zugänglich sind. Insbesondere die Diversa-Enzyme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Stereospezifität von den anderen, 'traditionellen' Biokatalysatoren, wobei die beobachteten Enantioselektivitäten zum Teil sehr beachtlich ($E > 100$) ausfallen. Dagegen zeigen die ThermoGen-Hydrolasen auf der einen Seite zwar hohe Aktivitäten gegenüber den untersuchten Substraten, doch erweisen sie sich andererseits als unselektiv. Einzige Ausnahme hiervon ist das Enzym ThermoGen E018b, das bei der 'Trennung' von **4b** einen E -Wert von 29 zeigt.

3.3 Optimierung der biokatalytischen Reaktionen

Nach Auswahl geeigneter Biokatalysatoren ist es bei der Etablierung eines biokatalytischen Herstellungsverfahrens erforderlich, eine Charakterisierung der identifizierten Enzyme unter den Prozessbedingungen durchzuführen. In diesem Zusammenhang müssen die enzymatischen Umsetzungen auf einen größeren Maßstab (*upscaling*) übertragen werden und der Einsatz organischer Lösungsmittel als Reaktionsmedien ist zu prüfen. Andere Faktoren, wie z.B. das Substrat-Engineering oder die Verwendung der Biokatalysatoren in immobilisierter Form, stellen weitere Ansatzpunkte dar, um die Effizienz der Biotransformationen zu erhöhen.

3.3.1 Hydrolysen in wässriger Lösung

3.3.1.1 'Trennung' der Racemate in größerem Maßstab (*up-scaling*)

Für zehn Enzyme, die in der 2. Stufe des Testsystems (Racematspaltungen im mg-Maßstab; Kap 3.2.3) eine hohe bzw. im Vergleich zu den anderen Biokatalysatoren umgekehrte Stereopräferenz zeigten, wurden die entsprechenden Hydrolysereaktionen in größerem Maßstab wiederholt. Die hierzu durchgeführten Biotransformationen erfolgten unter standardisierten Bedingungen (Reaktionsmedium; konstanter pH-Wert) in einer pH-stat-Apparatur (Kap. 5.8.1). Bei Erreichung des gewünschten Umsatzes wurden die Ansätze zur Absicherung der analytischen Daten präparativ aufgearbeitet. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 3-6 zusammengefasst.

Tab. 3-6 Ergebnisse der enantioselektiven Hydrolysen (präparative Ansätze) der Modellverbindungen **1c** / **2b** – **4b** im g-Maßstab.

Substrat/ [mmol]	Name d. Hydrolase bzw. Ursprung	Enzym [mg]	Bedingungen [°C / min]	Umsatz [%]	Ester		Alkohol		<i>E</i> -Wert
					Ausb. ⁶ [%]	[% <i>ee</i>]	Ausb. [%]	[% <i>ee</i>]	
1b / 1,5	PFE	10	37 / 3,5	53	n.b.	> 99 (<i>R</i>)	n.b.	80 (<i>S</i>)	53
1c / 20	PFE	50	37 / 150	46	27	73 (<i>R</i>)	n.b.	85 (<i>S</i>)	26
1c / 20	<i>P. cepacia</i> (Amano)	100	37 / 170	60	n.b.	93 (<i>S</i>)	n.b.	63 (<i>R</i>)	15
1c / 1	<i>P. cepacia</i> (Roche)	10	37 / 70	69	4	79 (<i>S</i>)	n.b.	35 (<i>R</i>)	5
2b / 1	CAL B	10	37 / 205	50	23	> 99 (<i>S</i>)	n.b.	> 99 (<i>R</i>)	> 100
2b / 20	CAL B	50	37 / 210	50	55	> 99 (<i>S</i>)	n.b.	> 99 (<i>R</i>)	> 100
2b / 20	BD021	20	37 / 383	7	n.b.	3 (<i>R</i>)	n.b.	28 (<i>S</i>)	2
3b / 2	CAL B	20	37 / 63	75	8	83 (<i>R</i>)	n.b.	28 (<i>S</i>)	4
3b / 2	BD100	15	80 / 123	70	4	49 (<i>S</i>)	n.b.	24 (<i>R</i>)	3
4b / 2	<i>Aspergillus niger</i>	20	37 / 382	32	47	45 (<i>R</i>)	13	94 (<i>S</i>)	78
4b / 2	BSE	20	37 / 214	53	30	97 (<i>R</i>)	21	87 (<i>S</i>)	60
4b / 2	BD423	15	RT / 9	75	21	> 99 (<i>S</i>)	27	28 (<i>R</i>)	5
4b / 2	E018b	20	40 / 13	79	15	92 (<i>R</i>)	23	25 (<i>S</i>)	5

Beim Übergang vom mg-Maßstab in den Bereich von 1 – 20 mmol (g-Maßstab) lassen sich verschiedene Effekte beobachten, die für die einzelnen Substrate und Enzyme mehr oder weniger stark ausgeprägt sind: die *E*-Werte ändern sich zum Teil beträchtlich. Insbesondere bei der Hydrolyse von **1c** und **4b** treten starke Unterschiede im Vergleich zu den Ergebnissen der Screening-Reaktionen auf. Bei der 'Trennung' von **1c** sinkt die Enantioselektivität der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (Amano) von 68 auf 15, wobei der *E*-Wert bei einer anderen Präparation (Roche) noch etwas kleiner (von 15 auf 5) ausfällt. Ähnlich starke Abnahmen stellen sich bei BD021 bzw. E018b ein. Beträgt der *E*-Wert bei der Racematspaltung von **2b** bzw. **4b** im mg-Maßstab noch 11 bzw. 29, so laufen bei erhöhter Ansatzgröße weitgehend unselektive Reaktionen (*E* = 2 bzw. 5) ab. Im Gegensatz zu diesen Effekten nimmt die Enantioselektivität der BSE (Hydrolyse von **4b**) von 26 auf 60 signifikant zu, während bei der PFE (Hydrolyse von **1b/c**), der CAL B (Hydrolyse von **2b**) und bei der Lipase aus *Aspergillus niger* (Hydrolyse von **4c**) die beobachteten Stereospezifitäten nahezu unverändert hoch bleiben. Auch bei Durchführung der Racematspaltungen im größeren Maßstab sind die erzielten *E*-Werte bei der 'Trennung' von **3b** mit der CAL B bzw. BD100 nach wie vor sehr klein (*E* = 3 bzw. 4). Im Vergleich zu einer früheren Arbeit auf diesem Gebiet (Lipase aus *Pseudomonas cepacia*; *E* = 1,3)

⁶ Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich immer auf die maximal erzielbaren 50 %, die bei einer Racematspaltung erzielt werden können.

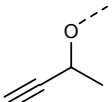

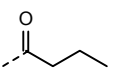
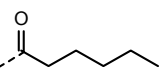
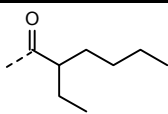
[Hönig et al., 1994] konnten damit aber leicht enantioselektivere Enzyme für die biokatalytische Herstellung von **3a** durch Racematspaltung identifiziert werden.

Weiterhin ist auffällig, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten trotz der erheblich gesteigerten Substratkonzentrationen mit den Ergebnissen der Screening-Reaktionen konform gehen. Bemerkenswert ist insbesondere die hohe Umsatzrate bei der PFE-katalysierten Hydrolyse von **1b**. Schon nach 3,5 min sind über 50 % des eingesetzten Esters mit hoher Stereospezifität ($E = 53$) gespalten. Aufgrund der hohen Volatilität sowohl des Alkohols **1a** als auch des Acetats **1b** wurde bei diesem Ansatz auf die präparative Aufarbeitung verzichtet. Die geringen Ausbeuten (4 bis maximal 55 %) bei den anderen Biotransformationen sind ebenfalls auf eine Besonderheit der untersuchten Modellverbindungen zurückzuführen. Aufgrund der Hydrophilie der an den Umsetzungen beteiligten Spezies (insbesondere der Alkohole) können diese trotz des Einsatzes stark polarer Solvenzien nur in geringem Umfang aus der wässrigen Reaktionslösung isoliert werden.

3.3.1.2 Einfluss des Acylrests bei der 'Trennung' von 2-Hydroxy-but-3-in (**1a**)

Bei der Darstellung von **1a** durch Racematspaltung einer korrespondierenden Esterverbindung lässt sich, da nur der Alkohol in enantiomerenreiner Form gewünscht ist, der Acylrest frei wählen (Kap. 1.7.2.1). Dies spielt z.B. bei der Integration des Hydrolase-katalysierten Schritts in einen biotechnologischen Gesamtprozess, bei dem andere Verbindungen als **1b** oder **1c** als Intermediate auftreten, eine wichtige Rolle. Der Einfluss auf die Effizienz (Kinetik) der enzymatischen Reaktion kann durch Untersuchung von Ester-Derivaten des Alkohols **1a**, die unterschiedliche Acylreste tragen, bestimmt werden (Kap. 5.8.2).

Tab. 3-7 Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit und der Startaktivität der PFE bei der 'Trennung' von Ester-Derivaten des Alkohols **1a**, die unterschiedliche Acylreste tragen.

					
	1b	1c	1d	1e	1f
Substrat [mmol]	1,5	1,0	0,5	0,5	0,5
Hydrolase [mg]	10	10	20	20	20
Zeit _{20% Umsatz} [min]	1	2	10	90	keine Reaktion
Startaktivität [U/mg]	42	18	0,3	n.b.	-----

In Tab. 3-7 sind die Hydrolysegeschwindigkeiten und die Startaktivitäten bei der 'Trennung' der Verbindungen **1b** – **1f** aufgezeigt. Als Biokatalysator diente die PFE, welche in den Voruntersuchungen (Kap. 3.2.3) mit die höchsten Umsatzraten und Enantioselektivitäten gegenüber **1b** bzw. **1c** zeigte. Obwohl die Reaktionszeiten bis zur Erreichung eines Umsatzes von 20 % und die Startaktivitäten aufgrund des Einsatzes unterschiedlich großer Mengen an Substrat und Enzym nicht direkt miteinander vergleichbar sind, ist auffällig, dass **1b** und **1c** wesentlich schneller als **1d** und **1e** hydrolysiert werden. Bei zunehmender Kettenlänge des Acylrests nimmt neben der Aktivität auch die Enantioselektivität stark ab. Außerdem zeigt die PFE im Vergleich zum Acetat bzw. Butyrat bei der Racematspaltung von **1d** und **1e** in beiden Fällen nur einen *E*-Wert von 1,7. Bei Einführung eines weiteren Chiralitätszentrums in die Substratstruktur (**1f**) durch einen verzweigten Säurerest, ist keine Reaktion mehr zu beobachten. Die bei den Untersuchungen zum Einfluss des Acylrests erhaltenen Resultate spiegeln den typischen Esterase-Charakter der PFE (Kap. 1.4.3.1.1) wider. Aus diesem Grund wurde die Kinetik der Hydrolyse von **1b** näher untersucht (Abb. 3-10). Die Effizienz dieser Biotransformation zeigt sich daran, dass schon nach einer Reaktionszeit von vier Minuten und einem Umsatz von ca. 50 % das Acetat in enantiomerenreiner Form zugänglich ist.

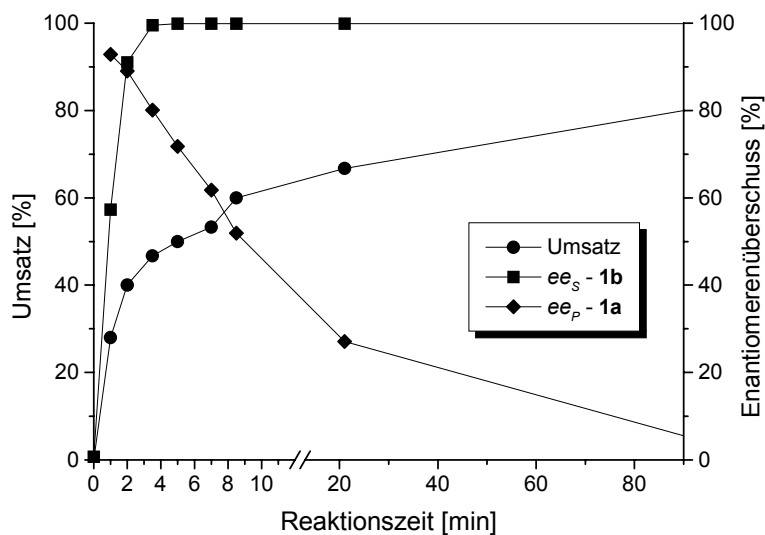


Abb. 3-10 Darstellung des zeitlichen Verlaufs des Umsatzes und der Enantiomerenüberschüsse des Substrats (%*ee_s*) bzw. des Produkts (%*ee_p*) bei der PFE-katalysierten Hydrolyse von **1b** in wässriger Lösung.

3.3.2 Biotransformationen in organischen Lösungsmitteln

Zur Steigerung der Effizienz einer biokatalytischen Reaktion ist der Einsatz organischer Lösungsmittel als Reaktionsmedien anzustreben (Kap.1.7.2.2). Die im Rahmen des Testsystems

zur Identifizierung aktiver und enantioselektiver Hydrolasen (Kap. 3.2) erforderlichen Testreaktionen wurden aber alle in wässrigem Milieu durchgeführt. Da bislang noch keine Regel existiert, die insbesondere eine Vorhersage der Änderung der Stereospezifität beim Wechsel des Lösungsmittels erlaubt, ist es somit nicht vorhersehbar, ob die identifizierten Biokatalysatoren auch für den Einsatz in nicht-wässrigen Reaktionsmedien geeignet sind. Aus diesem Grund wurde für die enantioselektivsten Hydrolasen der Einfluss organischer Solvenzien auf die Racematspaltung der Modellverbindungen untersucht.

3.3.2.1 Acylierung der Modellverbindungen 1a – 4a

Die Acylierung der Modellverbindungen **1a** – **4a** erfolgte nach dem in Abb. 3-11 dargestellten Reaktionsschema durch Umesterung der Alkohole mit Vinylacetat. Durch die Wahl dieses Synthesewegs ergeben sich zwei entscheidende Vorteile. Einerseits entweicht der freigesetzte Acetaldehyd und verschiebt somit das Gleichgewicht auf die Seite der gewünschten Esterverbindungen. Auf der anderen Seite wurden bei der Verwendung von Vinylacetat, aufgrund von Wechselwirkungen der Doppelbindung mit den Aminosäureresten im aktiven Zentrum des Enzyms, bereits positive Effekte auf die Stereoselektivität von Hydrolase-katalysierten Acetylierungs-Reaktionen beobachtet (Kap. 1.7.2.1).

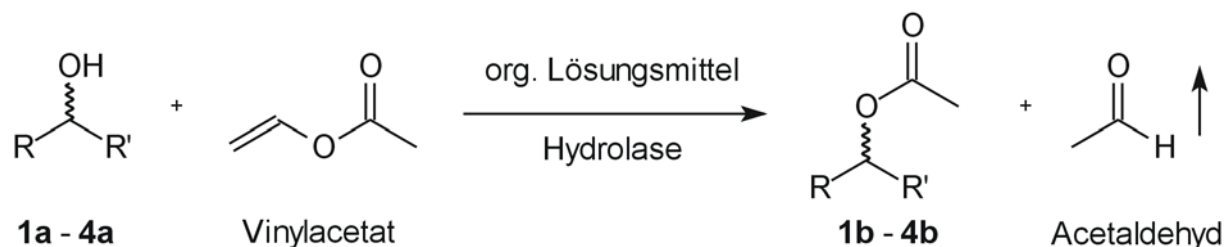


Abb. 3-11 Reaktionsschema für die Acetylierung der Modellverbindungen **1a** – **4a** durch Umesterung mit Vinylacetat.

Beim Übergang von den Hydrolysen in wässrigem Milieu auf die Veresterung der Modellverbindungen **1a** – **4a** in einem organischen Lösungsmittel sind verschiedene Tendenzen zu beobachten (Tab. 3-8). Im Vergleich zu den hohen *E*-Werten bei der PFE-katalysierten Spaltung von **1b** bzw. **1c**, führt der Wechsel des Reaktionsmediums zu einer drastischen Verkleinerung der Enantioselektivität (*E* = 1 bzw. 2; Kap. 3.3.2.2.1). Im Gegensatz dazu bleibt die Stereospezifität der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (Roche) bei der Umsetzung mit Vinylbutyrat nahezu unverändert (*E* = 4). Annähernd dieselbe Stereoselektivität (*E* = 3) zeigt sich auch bei der Acetylierung von **1a**. Der Einsatz der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* in immobilisierter Form (c.-f.) ergibt dabei hinsichtlich der Enantioselektivität keinen Vorteil.

Tab. 3-8 Ergebnisse der Racematspaltungen zur Trennung der Modellverbindungen **1a** – **4a** durch Acylierung mit Vinylacetat/Vinylbutyrat. Die Angaben c.-f. (*carrier-fixed*) und PS-C/D kennzeichnen immobilisierte Enzympräparationen.

Substrat/ [mmol]	Name d. Hydrolase bzw. Ursprung	Enzym [mg]	Reaktions- zeit [min]	Umsatz [%]	Ester		Alkohol		<i>E</i> -Wert
					Ausb. [%]	[% <i>ee</i>]	Ausb. [%]	[% <i>ee</i>]	
1a /0,75	PFE	50	180	39	1b	n.b. 14 (<i>R</i>)	n.b. 9 (<i>S</i>)	1	
1a /1,5	<i>P. cepacia</i> (Roche)	25	15	64	1b	n.b. 26 (<i>R</i>)	n.b. 47 (<i>S</i>)	3	
1a /1,5	<i>P. cepacia</i> (c.-f.)	30	60	36	1b	n.b. 43 (<i>R</i>)	n.b. 24 (<i>S</i>)	3	
1a /0,75	PFE	20	22 h	32	1c	n.b. 18 (<i>R</i>)	n.b. 8 (<i>S</i>)	2	
1a /1,5	<i>P. cepacia</i> (Roche)	25	180	44	1c	n.b. 49 (<i>R</i>)	n.b. 38 (<i>S</i>)	4	
2a /1,5	CAL B (c.-f.)	25	60	46	2b	n.b. > 99 (<i>R</i>)	n.b. 86 (<i>S</i>)	> 100	
2a /1,5	CAL B (c.-f.; C2)	25	30	45	2b	n.b. > 99 (<i>R</i>)	n.b. 83 (<i>S</i>)	> 100	
2a /1,5	CAL B (c.-f.; C3)	25	20	47	2b	20 98 (<i>R</i>)	n.b. 86 (<i>S</i>)	> 100	
2a /30	CAL B (c.-f.; C2)	500	22	46	2b	79 95 (<i>R</i>)	n.b. 80 (<i>S</i>)	100	
2a /1,5	<i>P. cepacia</i> (PS-C)	25	30	37	2b	n.b. 68 (<i>R</i>)	n.b. 40 (<i>S</i>)	8	
2a /1,5	<i>P. cepacia</i> (PS-D)	25	30	43	2b	n.b. 75 (<i>R</i>)	n.b. 57 (<i>S</i>)	12	
3a /1,5	CAL B (c.-f.; C3)	25	5	83	3b	31 15 (<i>S</i>)	7 71 (<i>R</i>)	3	
4a /1,5	<i>Aspergillus niger</i>	25	19 h	---	4b	-----	-----	-----	

Bei der CAL B-katalysierten Reaktion von **2a** mit Vinylbutyrat lassen sich wie bei der Hydrolyse von **2b** in wässriger Lösung hohe Enantiomerenüberschüsse erzielen. Bei den Umsetzungen in Hexan wurden verschiedene, kommerziell erhältliche Immobilisate der CAL B (c.-f.; c.-f. C2; c.-f. C3) getestet, wobei in allen Fällen ein *E*-Wert größer 100 resultiert. Hierzu ist in Abb. 3-12 exemplarisch der zeitliche Verlauf des Umsatzes sowie die erzielte optische Reinheit des Substrats (%*ees*) bzw. des Produkts (%*ee_p*) bei der Acetylierung von **2a** dargestellt. Wie gut zu erkennen ist, verringert sich bei Erreichung eines Umsatzes von 50 % die Reaktionsgeschwindigkeit drastisch und das entstandene Acetat sowie der noch nicht umgesetzte Alkohol können mit Enantiomerenüberschüssen von jeweils größer 99 %*ee* isoliert werden. Bei Erhöhung der Ansatzgröße auf 30 mmol **2a** (ca. 2,7 g) bleibt die hohe Stereoselektivität (*E* = 100) erhalten und die Ausbeute an (*R*)-**2a** (95 %*ee*) beträgt exzellente 79 %. Da die CAL B sowohl bei der Acetylierung in Hexan als auch bei der Hydrolyse des Acetats in wässriger Lösung (*R*)-spezifisch ist, sind beide enantiomeren Formen von **2b** in optisch reiner Form zugänglich. Eine wesentlich geringere Enantioselektivität ergibt sich dagegen bei Verwendung der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (Amano) in immobilisierter Form (PS-C bzw. PS-D). Die ermittelten *E*-Werte (*E* = 8 bzw. 12) stimmen aber mit dem Ergebnis der im Vorfeld durchgeführten Hydrolyse von **2b** überein (*E* = 8; Tab. 3-5), d.h. auch die Stereospezifität der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* bleibt beim Übergang in ein aprotisches Reaktionsmedium erhalten.

Bei der CAL B-katalysierten Acetylierung von **3a** (*E* = 3) lassen sich ebenfalls wie bei der Hydrolyse von **3b** im g-Maßstab nur geringe Enantiomerenüberschüsse erzielen. Das Medien-

Engineering zur Verbesserung der Stereoselektivität der CAL B erbrachte somit kein positives Resultat, d.h. eine effektive biokatalytische 'Trennung' der Modellverbindung **3a** durch eine Hydrolase-katalysierte Racematspaltung war im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen nicht möglich.

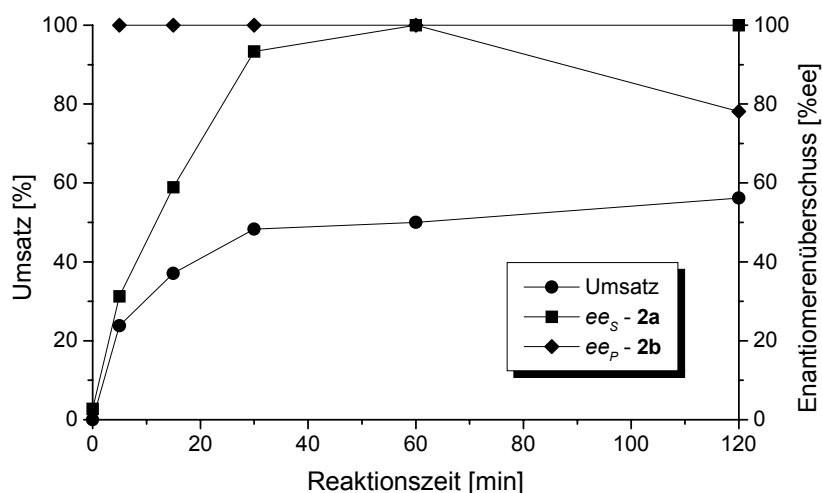


Abb. 3-12 Darstellung des zeitlichen Verlaufs des Umsatzes und der Enantiomerenüberschüsse des Substrats (ee_s) bzw. des Produkts (ee_p) bei der CAL B-katalysierten Umesterung von **2a** mit Vinylacetat in Hexan. Das Enzym wurde in immobilisierter Form (CAL B; c.-f.; C 3) eingesetzt.

Bei der Umesterung von **4a** mit Vinylacetat und der Lipase aus *Aspergillus niger* als Biokatalysator war selbst nach einer Reaktionszeit von 19 h kein Umsatz zu beobachten, d.h. das bei der Hydrolyse hoch-enantioselektive Enzym zeigt keine Aktivität. Aufgrund der geringen Löslichkeit des Lactons **4a** in Hexan musste bei dieser Reaktion ein anderes Medium (Toluol) verwendet werden.

3.3.2.2 Einsatz der Esterase I aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE) zur Reaktionskatalyse in organischen Lösungsmitteln

Bei der Suche nach geeigneten Biokatalysatoren, die in der Lage sind die Modellverbindungen **1** – **4** enantioselektiv umzusetzen, ist auffällig, dass die PFE zwar bei der Hydrolyse von **1b** bzw. **1c** in wässriger Lösung hohe E -Werte zeigt (Tab. 3-6), diese Selektivität aber beim Übergang auf ein aprotisches Medium (Hexan) verliert (Tab. 3-8). Um das Potential dieses Enzyms für Synthesereaktionen in organischen Solvenzien nutzen zu können, wurde der Lösungsmittel-einfluss bei der PFE-katalysierten Veresterung der sekundären Alkohole genauer untersucht. In

diesem Zusammenhang war außerdem zu prüfen, ob eine Immobilisierung der PFE möglich ist, d.h. der effektive Einsatz dieses Biokatalysators in aprotischen Medien sollte getestet werden.

3.3.2.2.1 Einfluss des Reaktionsmediums auf die Enantioselektivität der Esterase I aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE)

Für die Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses auf die Enantioselektivität der PFE wurde das Substratspektrum um einen weiteren sekundären Alkohol (1-Phenylethanol; **5a**) ergänzt. Früheren Ergebnissen zufolge wird 1-Phenylethylacetat (**5b**) mit guter Stereospezifität umgesetzt [Krebsfänger et al., 1998a, 1998b; Zocher et al., 1998]. Bei Durchführung einer Testreaktion (Reaktionsbedingungen 37°C / 1 h; Umsatz 18,4 %) im mg-Maßstab zur Bestimmung der Selektivität (Kap. 5.7.1.2) ergibt sich ein *E*-Wert von 34, wobei das (*R*)-Enantiomer von der PFE bevorzugt umgesetzt wird.

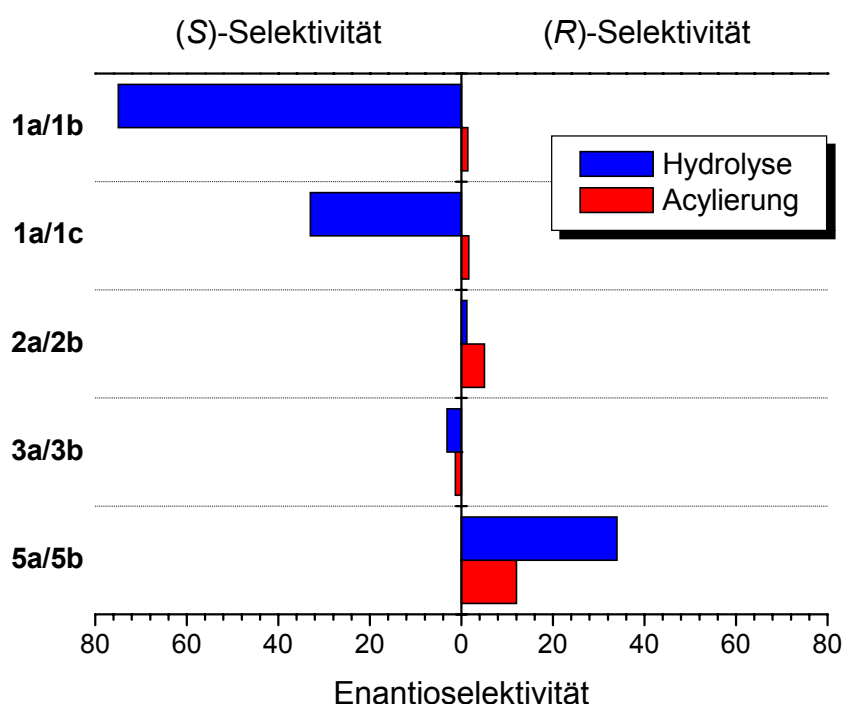


Abb. 3-13 Vergleich der Enantioselektivität der PFE beim Übergang von der Hydrolyse der Esterverbindungen **1b/1c - 3b** und **5b** in wässriger Lösung (Kap. 3.2.3.2) zur Acylierung von **1a - 3a** und **5a** in Hexan.

Beim Vergleich der Enantioselektivitäten der PFE bei der Hydrolyse der Esterverbindungen **1b/1c - 3b** und **5b** in wässriger Lösung (Kap. 3.2.3.2) zur Acylierung von **1a - 3a** und **5a** in Hexan (Tab. 5-4) sind zwei Effekte zu beobachten. An erster Stelle ist auffällig, dass die hohe

(*S*)-Spezifität bei der 'Trennung' von **1b** bzw. **1c** beim Übergang auf das aprotische Reaktionsmedium verloren geht. So werden bei der Umesterung von **1a** mit Vinylacetat bzw. Vinylbutyrat jeweils nur kleine Enantiomerenüberschüsse zugunsten von (*R*)-**1b** (14 %*ee*) bzw. (*R*)-**1c** (18 %*ee*) erzielt. Somit invertiert die Stereoselektivität der PFE beim Übergang von der wässrigen Reaktionslösung auf Hexan, wobei die Fähigkeit zur chiralen Diskriminierung im organischen Lösungsmittel nur sehr gering ausgeprägt ist ($E = 1,4$ bzw. 1,6). Ebenfalls kleine E -Werte werden bei der Acylierung von **2a** bzw. **3a** erzielt. In beiden Fällen bleibt aber die Stereopräferenz der PFE im Vergleich zur Hydrolyse in wässriger Lösung erhalten. Der zweite Effekt betrifft die Umsatzraten und ist insbesondere bei der Umesterung von **1a** mit Vinylacetat zu beobachten. Zur Demonstration der unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten soll die Hydrolyse von **1b** im g-Maßstab dienen. Bei Vorlage von 1,5 mmol des Acetats und dem Einsatz von 10 mg PFE wird bereits nach 3,5 min ein Umsatz von 53 % erreicht (Tab. 3-6). Dagegen liegt bei der Acetylierung (0,75 mmol **1a**; 50 mg PFE) selbst nach 3 h Reaktionszeit (Umsatz 39 %) noch über die Hälfte des Alkohols unverändert vor (Tab. 5-4). Als Ursachen hierfür dürften vor allem der geringe Dispersionsgrad des lyophilisierten Enzyms in Hexan sowie die schnellere Inaktivierung des Biokatalysators unter nicht-nativen Bedingungen (organisches Lösungsmittel) in Frage kommen. Bei der Acylierung der anderen Alkohole ist ebenfalls eine wesentlich geringere Reaktionsgeschwindigkeit als in wässriger Lösung zu beobachten. Die Modellverbindung **4a** wurde von den Untersuchungen bezüglich des Lösungsmiteleinflusses ausgeschlossen, da die PFE bei der Hydrolyse von **4b** in wässriger Lösung nur eine geringe Aktivität zeigt (Kap. 6.1).

Im Gegensatz zu den sekundären Alkoholen **1a** – **3a**, die jeweils nur sehr kleine Reste am chiralen Zentrum tragen, zeigt die PFE bei der Acetylierung von **5a** in Hexan eine moderate Selektivität ($E = 11,7$), die aber im Vergleich zur Hydrolyse von **5b** in wässriger Lösung auf ca. ein Drittel reduziert ist. In beiden Reaktionsmedium ist bei der 'Trennung' des Alkohols bzw. des Acetats eine Präferenz der PFE zugunsten des (*R*)-Stereoisomers zu beobachten, d.h. es tritt in diesem Fall keine Inversion ein. Da beim Wechsel des Reaktionsmediums eine Änderung der räumlichen Struktur der PFE nicht auszuschließen ist, scheint das Enzym, anders als bei Substraten mit kleinen Resten am Asymmetriezentrum (**1a** – **3a**), die Fähigkeit zur chiralen Diskriminierung bei sterisch anspruchsvolleren Verbindungen nicht vollständig zu verlieren.

Zur weiteren Evaluierung der PFE-Enantioselektivität wurde die Acetylierung von **5a** in verschiedenen organischen Lösungsmitteln untersucht. Da bislang keine Regel existiert, die eine Vorhersage der Änderung der Stereospezifität erlaubt (Kap. 1.7.2.2), wurden willkürlich sieben

weitere organische Solvenzien als Reaktionsmedien ausgewählt. Wie in Abb. 3-14 zu erkennen ist, zeigt die PFE E -Werte zwischen 10 und 25, wobei keine Korrelation z.B. zum Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P$ -Wert) des Lösungsmittels zu erkennen ist. In allen Fällen liegt die Enantioselektivität aber deutlich unter dem E -Wert ($E = 34$) der Hydrolyse von **5b** in Wasser, wobei sich die polaren Solvenzien Acetonitril ($\log P = -0,3$) und Diethylether ($\log P = 0,9$) diesem Ergebnis annähern. Weiterhin ist festzustellen, dass die PFE bei der Umsetzung von **5a** bzw. **5b** unabhängig von den eingesetzten Reaktionsmedien eine (R)-Spezifität aufweist. Aus diesem Grund sind frühere Ergebnisse [Krebsfänger et al., 1998a, 1998b; Zocher et al., 1998], bei denen ein Wechsel von der Hydrolyse von **5b** in einem 2-Phasensystem (Wasser / Toluol) zur Acetylierung von **5a** in Toluol ($\log P = 2,5$) zu einer deutlichen Umkehr der Enantioselektivität von $E = 58$ zugunsten der (S)-Form nach $E > 100$ und der Bevorzugung des (R)-Enantiomers führt, als äußerst unwahrscheinlich einzustufen.

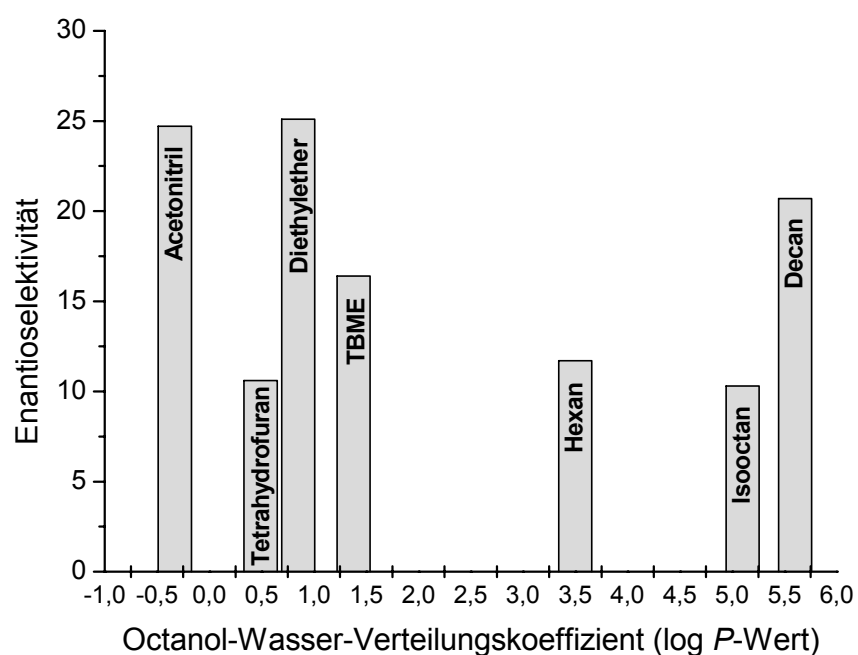


Abb. 3-14 Übersicht über die beobachteten Enantioselektivitäten bei der PFE-katalysierten Acetylierung von **5a** in verschiedenen organischen Lösungsmitteln. In allen Fällen zeigt das Enzym eine Stereopräferenz zugunsten von (R)-**5a**, wobei keine Korrelation z.B. zum Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten gegeben ist.

Anders als bei der Enantioselektivität ist bei den beobachteten Umsatzraten eine Korrelation zum verwendeten Lösungsmittel zu erkennen. Entsprechend der empirischen Regel zur Vorhersage der Aktivität in Abhängigkeit vom $\log P$ -Wert [Laane et al., 1987] erhält man bei Acetonitril ($\log P = -0,3$) und Diethylether ($\log P = 0,9$) die kleinsten Reaktionsgeschwindigkeiten

(Tab. 5-4), während die Umsatzraten in apolareren Lösungsmitteln höher liegen. Beim Einsatz von Dioxan ($\log P = -1,1$) ist selbst nach 41 h noch kein **5b** zu detektieren. Ein vergleichbares Bild ergibt sich bei der Acetylierung von **1a**, wobei hier entgegen der Vorhersage die Reaktionsgeschwindigkeit in TBME am kleinsten ist (Tab. 5-4).

3.3.2.2.2 Immobilisierung der Esterase I aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE)

Verbunden mit der Wahl eines geeigneten Reaktionsmediums stellt die Immobilisierung eine weitere Möglichkeit dar, die Effektivität eines Enzyms insbesondere in organischen Lösungsmitteln zu steigern. Bei dieser Technik wird durch Fixierung des Proteins an einem Träger die Struktur des Biokatalysators stabilisiert. In nicht-wässrigen Systemen ist dabei neben einer erleichterten Prozessführung (z.B. Abtrennung des Enzyms; Wiederverwertbarkeit) auch eine Steigerung der Enzymaktivität (u.a. durch einen höheren Dispersionsgrad) zu erwarten. Da die PFE beim Übergang in aprotische Reaktionsmedien sowohl ihre hohe Aktivität als auch Enantioselektivität bei der Umsetzung der Modellverbindungen verliert, wurde versucht, diese nachteiligen Effekte durch Immobilisierung (Kap. 5.9) zu umgehen.

Tab. 3-9 Übersicht über die durchgeführten Ansätze zur Immobilisierung der PFE. Die in der Tabelle angegebenen Aktivitäten beziehen sich auf die Umsetzung von Ethylacetat (Aktivität der PFE-Präparation gegen Ethylacetat: 16 U/mg Lyophilisat; Kap. 5.5.6.3.2).

	Celite 545	S-Sepharose	Eupergit C
Menge an Träger [g]	1,1	10	1,3
Menge an PFE-Rohextrakt [mg] bzw. - Menge an Protein [mg bezogen auf BSA]	230	870	200
- Aktivität [U]	97	365	84
Aktivität des Filtrats [U]	3700	14000	3200
maximal immobilisierte Aktivität [U]	2700	11400	400
maximale Immobilisierungsrate [%]	1000	2600	2800
Ausbeute an Immobilisat [g]	27	23	88
tatsächliche Aktivität [U/mg Immobilisat]	0,5	1,1	1,0
tatsächliche Immobilisierungsrate [%]	0,1	0,5	0,1
Proteingehalt (berechnet) [μ g Protein bezogen auf BSA/mg Immobilisat]	1,4	3,9	3,1
	3	13	3

Die Immobilisierung der PFE erfolgte nach zwei Strategien. Neben der Fixierung auf Celite 545 bzw. S-Sepharose (ein Kationentauscher) wurde versucht, dass Enzym kovalent an Eupergit C [Katchalski-Katzir und Kraemer, 2000] zu binden (Tab. 3-9). Weitere Versuche, die Esterase an unpolare Träger (z.B. Kunststoffe), Cellulose; Aluminiumoxid oder Aktivkohle zu fixieren, erwiesen sich als nicht erfolgreich (Daten hier nicht aufgezeigt). Zur Überprüfung der Effektivität der Immobilisierung (Immobilisierungsrate) diente die Aktivitätsmessung mit Ethylacetat (Kap. 5.5.6.3.2) als Testsubstrat. Ein Vergleich der eingesetzten Menge an PFE mit der beim Waschen des Immobilisates im Filtrat nachweisbaren Enzymaktivität ergibt die maximale Immobilisierungsrate (23 – 88 %). Diese liegt bei allen drei Ansätzen signifikant über der tatsächlichen Immobilisierungsrate (1,4 – 3,9 %), welche direkt über die Aktivitätsmessung des Immobilisats zugänglich ist. Als mögliche Ursachen für die großen Differenzen sind die Denaturierung der PFE im Verlauf des Immobilisierungsprozesses, der Aktivitätsverlust des fixierten Enzyms und die ungünstig gewählten Mengenverhältnisse zwischen Enzym und Träger in Betracht zu ziehen. Insbesondere beim Ansatz mit S-Sepharose erfolgte keine effiziente Bindung der PFE, denn ca. 80 % des eingesetzten Enzyms gingen beim Waschen des Immobilisats verloren. Verbunden mit dem höchsten Proteingehalt (13 µg Protein bezogen auf BSA/mg Immobilisat) wurde mit S-Sepharose dennoch das aktivste Immobilisat (0,5 U/mg Immobilisat) erzielt.

Zur Charakterisierung der Immobilisate wurde die Acetylierung von **1a** mit Vinylacetat in verschiedenen, organischen Lösungsmitteln untersucht. Vergleichbar der PFE-katalysierten Umesterung von **5a** (Kap. 3.3.2.2.1) wurden dabei die höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten in Isooctan erzielt. Wie in Abb. 3-15 zu erkennen ist, ergibt sich bei gleicher Ansatzgröße und der Verwendung von 350 U des PFE-Rohextrakts eine kleinere Umsatzrate als bei 50 U des S-Sepharose-Immobilisats. Selbst der Einsatz von nur 10 U der an Eupergit C-gebundenen Hydrolase bedingt eine schnelle Reaktion. Ein ähnliches Bild erhält man beim Wechsel des Solvens, wobei die Reaktionsgeschwindigkeiten in Diethylether und TBME deutlich absinken, so dass bei den Eupergit C-Ansätzen selbst nach fünf Tagen lediglich Spuren von **1b** nachweisbar sind. Das Celite-Immobilisat (jeweils 10 U) war in keinem der getesteten organischen Lösungsmittel aktiv, als Ursache ist der geringe Dispersionsgrad des polaren Silikats in einem nicht-wässrigen Reaktionsmediums in Betracht zu ziehen.

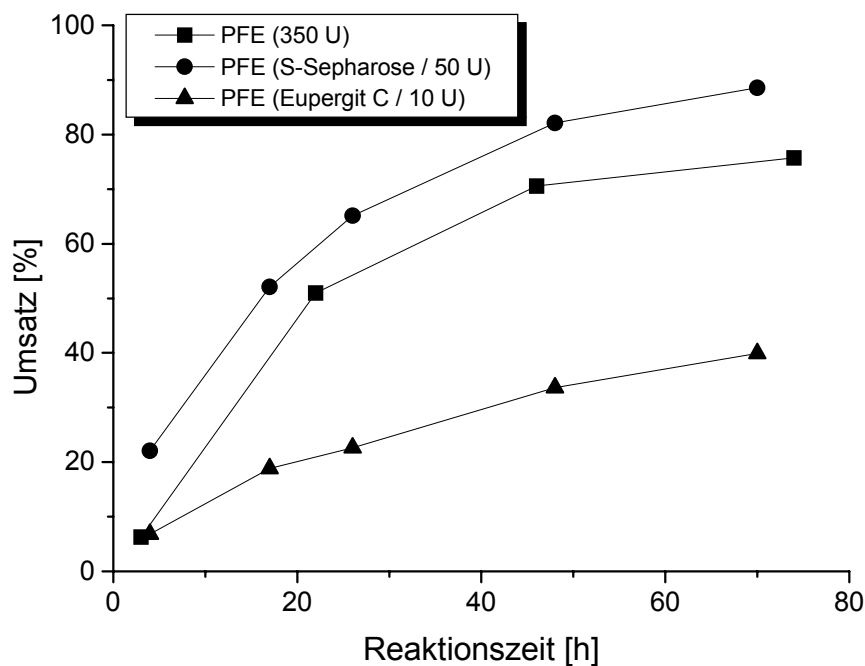


Abb. 3-15 Darstellung des zeitlichen Verlaufs des Umsatzes bei der Acetylierung von **1a** mit Vinylacetat in Isooctan. Neben dem PFE-Rohextrakt wurden auch die Immobilisate zur Reaktionskatalyse eingesetzt.

Im Gegensatz zur Aktivität ändert sich die Enantioselektivität der PFE bei der Immobilisierung erwartungsgemäß nicht. So weist die PFE bei der Acetylierung von **1a** in allen getesteten, organischen Lösungsmitteln sowohl in freier als auch in gebundener Form eine minimale Präferenz ($E < 2$) zugunsten des (*R*)-Enantiomers auf (Kap. 3.3.2.2.1). Umgekehrt dazu wird bei der Hydrolyse des Acetats in wässriger Lösung (*S*)-**1b** mit hoher Stereoselektivität gespalten. Die 'Trennung' von **1b** durch Racematspaltung im g-Maßstab ergibt dabei E -Werte von 39 (S-Sepharose), 41 (Eupergit C), 44 (Celite 545) und 53 (PFE-Rohextrakt; Tab. 3-6).

Die weitere Untersuchung der hergestellten Immobilisate konzentrierte sich auf die Charakterisierung der Bindung zwischen der PFE und S-Sepharose bzw. Eupergit C. Hierzu wurden jeweils 10 mg dieser Enzympräparationen (S-Sepharose: 5 U; Eupergit C: 1 U) so oft mit 2 mL Puffer gewaschen, bis im Überstand kein Protein mehr nachweisbar war. Anschließend erfolgte ein Aktivitätsvergleich der beiden vorbehandelten Immobilisate durch Racematspaltung (mg-Maßstab) von **1b** in wässriger Lösung (Kap. 5.7.1.2). Hierbei wurde bei der Eupergit C-Präparation nach 70 min einen Umsatz von 33 % (46 % ee_S ; 92 % ee_P ; $E = 37$) erreicht, wogegen das S-Sepharose-Immobilisat eine geringere Reaktionsgeschwindigkeit (20 % Umsatz; 23 % ee_S ; 95 % ee_P ; $E = 45$) zeigte. Die größere Restaktivität bei Eupergit C beweist, dass die PFE an diesen Träger stärker fixiert ist als im Vergleich zum Kationentauscher S-Sepharose. Eine

mögliche Erklärung für dieses Ergebnis kann in der Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen der PFE und Eupergit C zu suchen sein.

3.4 Entwicklung eines stereoselektiven Hochdurchsatz-Testsystems (Acetat-Assay)

Findet sich bei der Entwicklung eines Herstellungsverfahrens kein stereospezifisches Enzym (Kap. 3.2) oder kann die Effektivität eines biotechnologischen Prozesses durch Optimierung der Reaktionsbedingungen nicht gesteigert werden (Kap. 3.3), so besteht die Möglichkeit evolutive Methoden zur Generierung eines maßgeschneiderten Biokatalysators anzuwenden. Um hierbei erfolgreich zu sein, ist ein zuverlässiges Hochdurchsatz-Testsystem erforderlich. Die etablierten HTS-Verfahren (Kap. 1.8.2) sind aber für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten kleinen, 'schwer-trennbaren' Modellverbindungen ungeeignet. Die Nachteile bestehen einerseits in der Verwendung sperriger, chromophorer Gruppen, die sich beträchtlich von den hier untersuchten Substraten unterscheiden. Andererseits stellen die Methoden zumeist sehr hohe Anforderungen an die Ausstattung (z.B. NMR-Spektroskopie) oder bedürfen einer äußerst aufwendigen Kalibrierung (z.B. quantitative Bestimmung von pH-Wert-Änderungen). Aus diesen Gründen wurde versucht, ein einfaches und zuverlässiges Testformat zu entwickeln, das ein Hochdurchsatz-Screening auf Basis der Modellverbindungen ermöglicht.

3.4.1 Prinzip

Der Ausgangspunkt für die Entwicklung des Hochdurchsatz-Testsystems ist die Hydrolase-katalysierte Spaltung des Acetats eines chiralen Alkohols in wässrig-gepufferter Lösung. Basierend auf einem kommerziell verfügbaren und preiswerten Testkit [Beutler, 1984], der ursprünglich für die Lebensmittelanalytik entwickelt wurde, wird die freigesetzte Essigsäure anschließend in einer Kaskade von Enzymreaktionen bestimmt (Acetat-Assay; Abb. 3-16). Die stöchiometrische Umwandlung in einer gekoppelten enzymatischen Reaktionen bewirkt eine Veränderung in der Absorption bei 340 nm aufgrund der Reduktion von NAD^+ zu NADH. Diese Änderung lässt sich spektrophotometrisch messen und erlaubt die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit für die Bildung von NADH. Aufgrund des stöchiometrischen Zusammenhangs zwischen der Essigsäurefreisetzung und der NADH-Bildung kann somit die Hydrolyseaktivität bestimmt werden. Bei Verwendung optisch reiner (*R*)- und (*S*)-Acetate ist aus

dem Verhältnis der beiden Start-Reaktionsgeschwindigkeiten ein Schätzwert für die Enantioselektivität (scheinbare Enantioselektivität E_{app}) des getesteten Biokatalysators zugänglich.

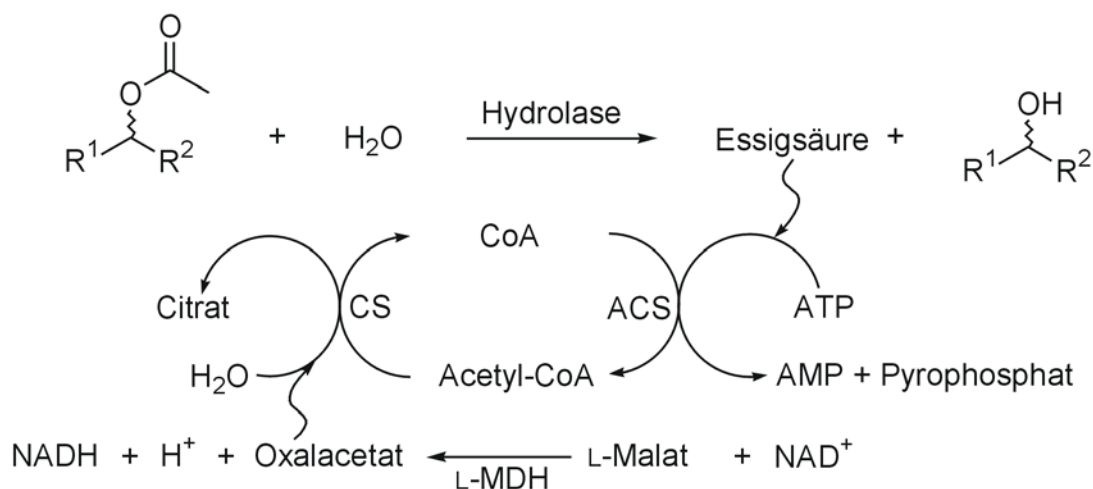


Abb. 3-16 Die Hydrolase-katalysierte Reaktion setzt Essigsäure frei, die in Gegenwart von ATP und Coenzym A (CoA) durch Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) zu Acetyl-CoA umgesetzt wird. Citratsynthase (CS) katalysiert die Reaktion zwischen Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Citrat. Das für diese Reaktion notwendige Oxalacetat wird aus L-Malat und NAD^+ durch L-Malat-Dehydrogenase (L-MDH) gebildet. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Essigsäurebildung kann folglich durch Messung der Zunahme der Absorption bei 340 nm durch den Anstieg der NADH-Konzentration bestimmt werden. Die Verwendung optisch reiner (*R*)- oder (*S*)-Acetate erlaubt die Bestimmung der scheinbaren Enantioselektivität E_{app} .

3.4.2 Evaluierung des Testformats

Für die Entwicklung des HTS-Verfahrens ist es erforderlich, das vorgeschlagene Testprinzip auf seine Eignung zur Identifizierung enantioselektiver Hydrolasen zu überprüfen. Hierbei ist insbesondere ein Übergang auf das Mikrotiterplattenformat anzustreben, um so einen hohen Durchsatz zu gewährleisten. Bei der Evaluierung des Acetat-Assay soll außerdem die einfache und zuverlässige Anwendbarkeit der Methode demonstriert werden. Schließlich ist in diesem Zusammenhang auch der Einsatz bei der Durchmusterung einer Bibliothek von Esterasevarianten und die Übertragbarkeit auf andere Hydrolasen bzw. Substrate zu berücksichtigen.

3.4.2.1 Eignung des Testkits zur Bestimmung der Hydrolyseaktivität

Zur Überprüfung der Eignung des Testkits zur Bestimmung der Hydrolyseaktivität wurde die Racematspaltung von **5b** durch die PFE als Modellreaktion ausgewählt, da dieses Substrat mit hoher Enantioselektivität von der Esterase umgesetzt wird. Wie in Kap. 3.3.2.2.1 ausgeführt,

ergibt sich bei der Racematspaltung von **5b** in wässrig-gepufferter Lösung ein *E*-Wert von 34, wobei das (*R*)-Enantiomer bevorzugt gespalten wird.

Erste Hydrolysen wurden im mL-Maßstab mit lyophilisierter PFE (1 mg/mL), 50 mM **5b** und dem Essigsäure-Testkit durchgeführt (Kap. 5.7.2.1). Unmittelbar nach Zugabe des Substrats ließ sich dabei eine Zunahme der Absorption bei 340 nm beobachten. Zusätzlich wurden Umsatz und Enantiomerenüberschüsse gaschromatographisch bestimmt, wobei der Wechsel des Reaktionsmediums (Mischung der Komponenten des Testkits anstelle des Phosphatpuffers) weder die Enantioselektivität noch die Aktivität der PFE ($E = 32$ bei 21 % Umsatz nach 1 h) beeinflusst. Bei Inkubation von **5b** bei pH 8,1 in Gegenwart der Testkit-Komponenten, aber ohne die PFE entsteht kein NADH, so dass unter den gegebenen Assay-Bedingungen eine Autohydrolyse des Substrats ausgeschlossen werden kann.

3.4.2.2 Übertragung des Acetat-Assays auf das Mikrotiterplattenformat

Beim Übergang auf das Mikrotiterplattenformat ist aufgrund der geringeren Volumina die kleinere Schichtdicke bei der spektrophotometrischen Absorptionsmessung zu berücksichtigen. Damit ist es erforderlich, die Empfindlichkeit, Linearität und Präzision des kommerziell erhältlichen Testkits in diesem Maßstab neu zu validieren. Im Gegensatz zur Endpunkt-Methode bei der Ermittlung des Acetat-Gehalts eines Lebensmittels, ist für die Bestimmung der Enzymaktivität einer vorgeschalteten Esterspaltung die Kinetik der NADH-Bildung entscheidend. Um zuverlässige Messwerte zu erhalten, müssen die Testparameter so gewählt werden, dass die Hydrolase-katalysierte Freisetzung der Essigsäure die Geschwindigkeit des Gesamtprozesses (NADH-Bildung) bestimmt.

3.4.2.2.1 Testprotokoll zur Bestimmung der Hydrolase-Aktivität

Für die Bestimmung des Acetat-Gehalts eines Lebensmittels werden entsprechend des Testkit-Protokolls Puffer- und Probelösung vorgelegt und die Nachweisreaktion anschließend durch Zugabe weiterer Reagenzien gestartet. Dagegen sollte bei der Aktivitätsmessung von Enzymen sofort nach Einsetzen der Esterhydrolyse die NADH-Bildung über die Absorptionzunahme bei 340 nm verfolgt werden. Im Hinblick auf die Entwicklung eines HTS-Verfahrens ist für den Acetat-Assay folglich ein anderes, kürzeres Pipettierschema notwendig (Kap. 5.7.2.2). Bei Vorlage einer Mischung aller Testkit-Komponenten und des Enzyms lässt sich eine wesentliche Vereinfachung erzielen. Zum Starten der eigentlichen Aktivitätsmessung ist dabei nur ein Pipettierschritt (Zugabe des Substrats) erforderlich und die Aufzeichnung der

Absorptionszunahme bei 340 nm kann unmittelbar nach Einsetzen der Hydrolysereaktion beginnen.

3.4.2.2.2 Empfindlichkeit und Linearität

Die Empfindlichkeit und Linearität der Essigsäurebestimmung im Mikrotiterplattenformat lässt sich anhand von Natriumacetat-Lösungen (Standardlösungen) mit verschiedenen Konzentrationen untersuchen. Im Gegensatz zur Aktivitätsbestimmung einer Hydrolase ist hierbei keine Esterspaltung vorgeschaltet, d.h. die vorgelegte Menge an Essigsäure kann unmittelbar abreagieren. Bei dieser Vorgehensweise wird die Geschwindigkeit der NADH-Bildung allein durch die Enzymkaskade limitiert, so dass die maximale Umsatzrate der gekoppelten enzymatischen Nachweisreaktion zugänglich ist (Abb. 3-17).

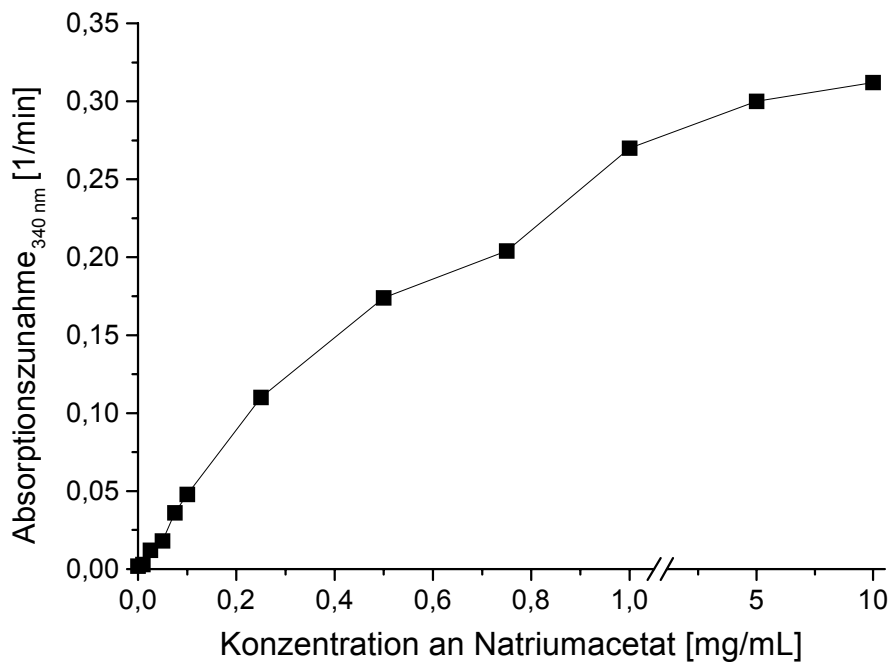


Abb. 3-17 Abhängigkeit der Absorptionszunahme pro Minute von der ansteigenden Konzentration an Natriumacetat. Für die Auswertung wurde jeweils die NADH-Bildung zu Beginn (vom Start bis 3 min) der einzelnen Nachweisreaktionen herangezogen.

Wie in Abb. 3-17 zu erkennen ist, nähert sich die Absorptionszunahme mit steigendem Natriumacetat-Gehalt asymptotisch einem Grenzwert (ca. 0,3 pro min) an. Dies entspricht der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit, die mit dem gekoppelten Esterase/Testkit-System bestimmt werden kann. Bei Verringerung der Essigsäurekonzentration stellt sich ein linearer Zusammenhang zur Absorptionszunahme bei 340 nm ein. Folglich müssen für eine hohe

Genauigkeit bei der Aktivitätsbestimmung einer vorgeschalteten Esterspaltung die Reaktionsparameter so gewählt werden, dass die Geschwindigkeit der NADH-Bildung innerhalb dieses linearen Bereichs (Absorptionszunahme kleiner als 0,3 pro min) liegt. Der Einsatz geringer Mengen an Substrat bzw. Hydrolase wird zudem durch die große Empfindlichkeit des Testsystems begünstigt, denn selbst bei einer Natriumacetat-Konzentration von 0,025 mg/mL in der Probelösung steigt die Absorption bei 340 nm noch signifikant (Zunahme 0,012 pro min) an.

Beim Übergang von den Natriumacetat-Standards auf den Einsatz von **5b** als Substrat für die vorgeschaltete, PFE-katalysierte Esterhydrolyse zeigt sich, dass die Linearität des Acetat-Assays nicht nur zu Beginn der Nachweisreaktionen (bis 3 min in Abb. 3-17) gegeben ist, sondern die NADH-Bildung bei geeigneter Wahl der Testparameter auch über einen längeren Zeitraum gleichförmig abläuft. Bei einer PFE-Konzentration von 2 mg/mL und unterschiedlichen Gehalten an **5b** (5 – 50 mg/mL) steigt die Absorption bei 340 nm jeweils über zehn Minuten nahezu linear an (Abb. 3-18). Diese Tatsache spielt für die Implementierung des Acetat-Assays in ein HTS-Verfahren im Mikrotiterplattenformat eine entscheidende Rolle, da aufgrund der erforderlichen Transferschritte eine zeitliche Verzögerung zwischen dem Start der Testreaktionen und der spektralphotometrischen Aufnahme der Absorptionswerte unvermeidlich ist.

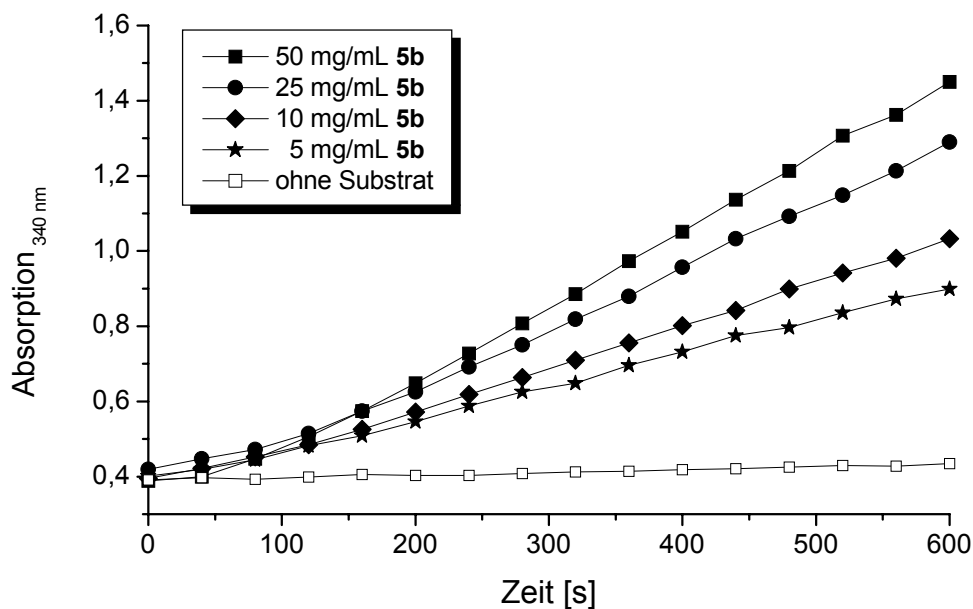


Abb. 3-18 Darstellung des nahezu linearen zeitlichen Anstiegs der NADH-Konzentration bei der Umsetzung von Essigsäure aus der PFE-katalysierten Hydrolyse von **5b**. Ohne die Esterase findet keine Hydrolyse statt, d.h. die Absorption bei 340 nm bleibt konstant.

3.4.2.2.3 Übertragbarkeit des Testformats

Neben der Bestimmung der PFE-Aktivität bei der Racematspaltung von **5b** ist das entwickelte Testformat auch für die Quantifizierung der Umsetzung weiterer, chiraler Ester sekundärer Alkohole geeignet. Als Beispiele dafür wurden die Modellverbindungen **1b** – **4b** ausgewählt und zur Reaktionskatalyse die sehr häufig eingesetzte CAL B [Anderson et al., 1998] verwendet. Die Hydrolyse der Acetate zeigt, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten in der Reihe **1b** > **2b** > **3b** > **4b** abnehmen. Dieser Befund stimmt mit den früheren Ergebnissen des pH-Assays (Kap. 3.2.3) überein und zeigt, dass das Testformat auch zur Identifizierung aktiver Hydrolasen geeignet ist.

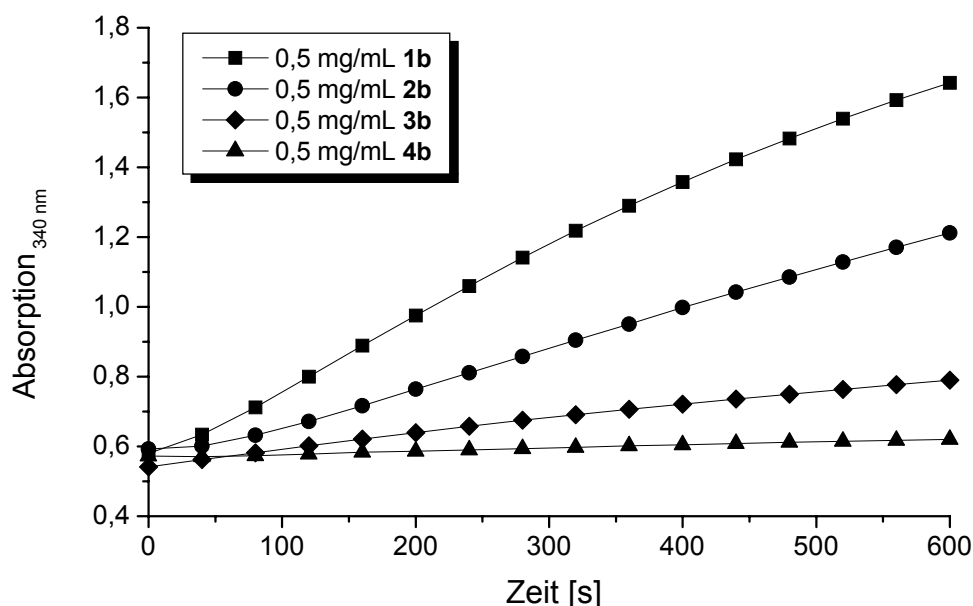


Abb. 3-19 Übertragung des Testformats auf die CAL B-katalysierte Hydrolyse der Acetate **1b** - **4b**. Die Reaktionsgeschwindigkeiten nehmen in der Reihe **1b** > **2b** > **3b** > **4b** ab und stimmen mit früheren Ergebnissen (Kap. 3.2.3) überein.

Bei der Durchführung des Acetat-Assays wurden bislang nur Substrate (**1b** – **5b**) eingesetzt, die in den gewählten Konzentrationsbereichen jeweils vollständig gelöst im wässrig-gepufferten Reaktionsmedium vorliegen. Daher besteht die Möglichkeit, das Substratspektrum des Testsystems durch Zusatz eines Lösungsvermittlers auch auf die Acetate stark apolarer Alkohole auszudehnen. Um den Einfluss eines Kosolvens auf die gekoppelte enzymatische Reaktion zum Nachweis der freigesetzten Essigsäure zu untersuchen, wurde beim Acetat-Assay eine DMSO-Lösung des stark hydrophoben Esters **5b** zur Bestimmung der Hydrolyseaktivität eingesetzt. In der Messlösung (Kap. 5.7.2.2) ergibt sich dadurch eine DMSO-Endkonzentration

von 10 % (V/V), die damit im üblichen Bereich (10 - 50 %, V/V) [Faber, 2000] für den Zusatz von Kosolventen bei biokatalytischen Reaktionen liegt. Wie Abb. 3-20 zeigt, beeinträchtigt der Lösungsmittelzusatz weder die PFE-katalysierte Hydrolyse von **5b** noch die Enzymkaskade zum Nachweis der freigesetzten Essigsäure, so dass die NADH-Bildung in beiden Ansätzen (ohne bzw. 10 % DMSO) nahezu identisch verläuft.

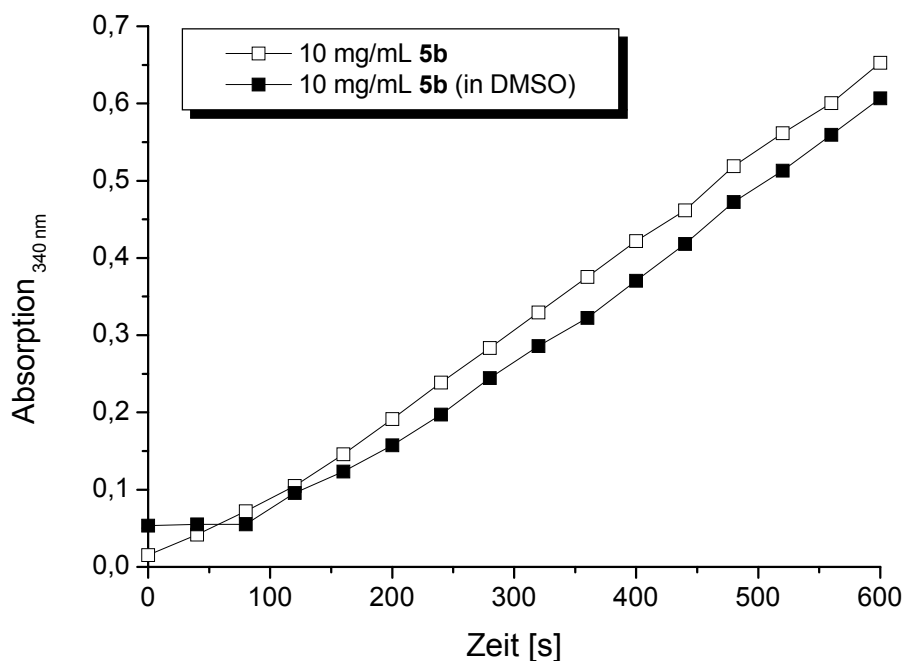


Abb. 3-20 Vergleich der PFE-katalysierten Hydrolyse von **5b** mit (10 % DMSO) und ohne Zusatz eine Kosolvens. Die NADH-Bildung verläuft in beiden Ansätzen nahezu identisch, d.h. der Acetat-Test wird durch den Zusatz des organischen Lösungsmittels nicht beeinträchtigt. Bei den Messungen ist jeweils der Blindwert (ohne Enzym) abgezogen.

3.4.2.2.4 Bestimmung der scheinbaren Enantioselektivität (E_{app})

Für die Entwicklung eines stereoselektiven HTS-Verfahrens ist es unerlässlich, dass das gewählte Testformat zur Bestimmung der scheinbaren Enantioselektivität (E_{app} ; Kap 1.5.2.3.2) geeignet ist. Um eine zuverlässige Identifizierung spezifischer Enzyme bzw. Enzymvarianten zu ermöglichen, müssen die E_{app} -Werte mit den wahren E -Werten (E_{true}), die sich aus Konkurrenzexperimenten ergeben, übereinstimmen. Aus diesem Grund erfolgte eine nähere Untersuchung der PFE-katalysierten Hydrolyse optisch reiner Acetate. Hierfür standen die Modellverbindungen **2b** und **5b** in enantiomerenreiner Form zur Verfügung, wobei (*R*)- bzw. (*S*)-**2b** ausgehend vom racemischen Alkohol (Acetylierung; Kap. 3.3.2.1) bzw. Ester (Hydrolyse; Kap. 3.3.1.1) selbst

hergestellt wurden. Da die PFE-katalysierte 'Trennung' von **2b** unspezifisch ($E = 1,2$ im mg- und g-Maßstab) verläuft, konzentrierten sich die Arbeiten zunächst auf die Hydrolyse von optisch reinem **5b**. So ergibt die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der Essigsäurefreisetzung aus den Enantiomeren (*R*)- und (*S*)-**5b** bei einer PFE-Konzentration von 1 mg/mL einen nahezu ausschließlichen Anstieg der Absorption für die (*R*)-Form, was die hohe Enantioselektivität der PFE widerspiegelt (Abb. 3-21). Aus dem Verhältnis der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten berechnet sich die scheinbare Enantioselektivität zu $E_{app} = 30$ und entspricht damit fast exakt dem wahren E -Wert ($E_{true} = 34$), der durch GC-Analyse bestimmt wurde (Kap. 3.3.2.2.1). Die PFE-katalysierte Hydrolyse von enantiomerenreinem (*R*)- und (*S*)-**2b** bestätigt diesen Befund, da hier die scheinbare Enantioselektivität ($E_{app} = 1,4$) ebenfalls mit dem wahren E -Wert ($E_{true} = 1,2$) übereinstimmt.

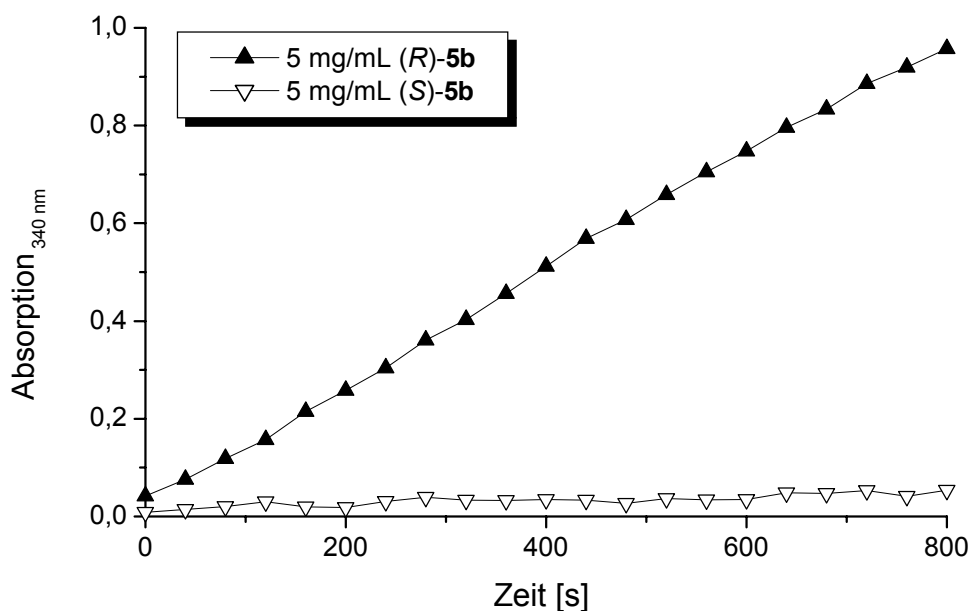


Abb. 3-21 Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten unter Verwendung von optisch reinem (*R*)- bzw. (*S*)-**5b** und 1 mg/mL PFE. Die scheinbare Enantioselektivität berechnet sich zu $E_{app} = 30$. Bei den Messungen ist jeweils der Blindwert (ohne Enzym) abgezogen.

Für die Validierung des Testformats wurden die E_{app} -Werte von 15 weiteren Esterasen und Lipasen bei der Umsetzung von **2b** ermittelt. Wie die Daten in Tab. 3-10 zeigen, stimmen die scheinbaren E -Werte E_{app} mit den wahren E -Werten, die sich aus der GC-Analyse (Kap. 6.2) ergeben, überein. So wird z.B. im Einklang mit den früheren Ergebnissen des pH-Assays (Kap. 3.2.3.2) die hohe Enantioselektivität der CAL B bei der 'Trennung' von **2b** bestätigt. Eine Abweichung von der gaschromatographischen Untersuchung gibt es dagegen bei Chirazyme E3,

denn gemäß des Acetat-Assays besitzt das Enzym eine entgegengesetzte Stereopräferenz im Vergleich zur GC-Analyse. Hierbei ist aber zu beachten, dass in beiden Fällen sowohl das Substrat als auch das Produkt in nahezu racemischer Form vorliegen. Darüber hinaus demonstriert die Bestimmung der E_{app} -Werte erneut, dass das Testformat sehr gut zur Identifizierung von aktiven Hydrolasen geeignet ist, denn eine NADH-Bildung lässt sich nur bei Enzymen beobachten, die auch bei der kinetischen Racematspaltung von **2b** Aktivität zeigen. Folglich sind in Tab. 3-10 von den 16 untersuchten Hydrolasen (Kap. 6.) nur die Esterasen und Lipasen aufgeführt, die in der Lage sind **2b** umzusetzen.

Tab. 3-10 Vergleich der Enantioselektivitäten, die über die Enzymkaskade (scheinbare Enantioselektivität E_{app}) und durch GC-Analyse (wahre Enantioselektivität E_{true}) in der kinetischen Racematspaltung von **2b** mit verschiedenen Esterasen und Lipasen bestimmt wurden.

Name der Hydrolase bzw. Ursprung	E_{app}	E_{true}	Stereopräferenz
CAL B	80	100	R
Chirazyme L6	13,7	12,1	R
Chirazyme L10	3,3	2,4	R
Chirazyme L12	4,0	5,1	R
Chirazyme E1	2,1	2,6	S
Chirazyme E2	2,2	1,9	S
Chirazyme E3	1,1	1,4	R / S
Chirazyme E4	2,0	2,3	R
<i>Chromobacterium viscosum</i>	7,5	4,9	R
PFE	1,4	1,2	R

3.4.2.2.5 Einsatz von Zelllysaten

Bei der Entwicklung eines HTS-Verfahrens ist zu berücksichtigen, dass die Durchmusterung einer Mutantenbibliothek aus einer gerichteten Evolution wesentlich vereinfacht wird, wenn sich direkt die Zelllysate zur Suche nach verbesserten Enzymvarianten einsetzen lassen. Um das Testformat auf diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden anstelle von lyophilisierten Esterase-Präparationen direkt PFE-enthaltende Kulturüberstände zur Hydrolyse von optisch reinem **5b** verwendet. Nach Anzucht einer Kultur von *E. coli* DH5 α , die das Plasmid pJOE2792 mit dem PFE-Gen trägt, und Expression der Esterase im Mikrotiterplattenformat, erfolgte hierzu ein

Zellaufschluss durch zwei Gefrier-Auftau-Zyklen. Um sicherzustellen, dass bei der Hydrolyse der Enantiomere die gleiche Enzymkonzentration vorlag, wurde anschließend der PFE-enthaltende Kulturüberstand aus einer Vertiefung geteilt und jeweils das gleiche Volumen (20 μL) zur Spaltung von (*R*)- bzw. (*S*)-**5b** eingesetzt (Kap. 5.7.2.3). Bei Verwendung des Kulturüberstands zeigt sich, dass die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten kleiner waren als bei Vorlage von 1 mg/mL PFE-Lyophilisat (Abb. 3-21), und die scheinbare Enantioselektivität $E_{app} = 21$ (Abb. 3-22) ist niedriger als der wahre E-Wert ($E_{true} = 34$). Dies kann durch Verunreinigungen aus der Kultivierung, z.B. Zelltrümmer oder Medienbestandteile, erklärt werden, die die Quantifizierung der Essigsäure beeinflussen. Entscheidend ist aber, dass das Testformat direkt zur Analyse von Zellrohextrakten geeignet ist und so der Acetat-Assay sehr einfach auf ein HTS-Verfahren übertragen werden kann.

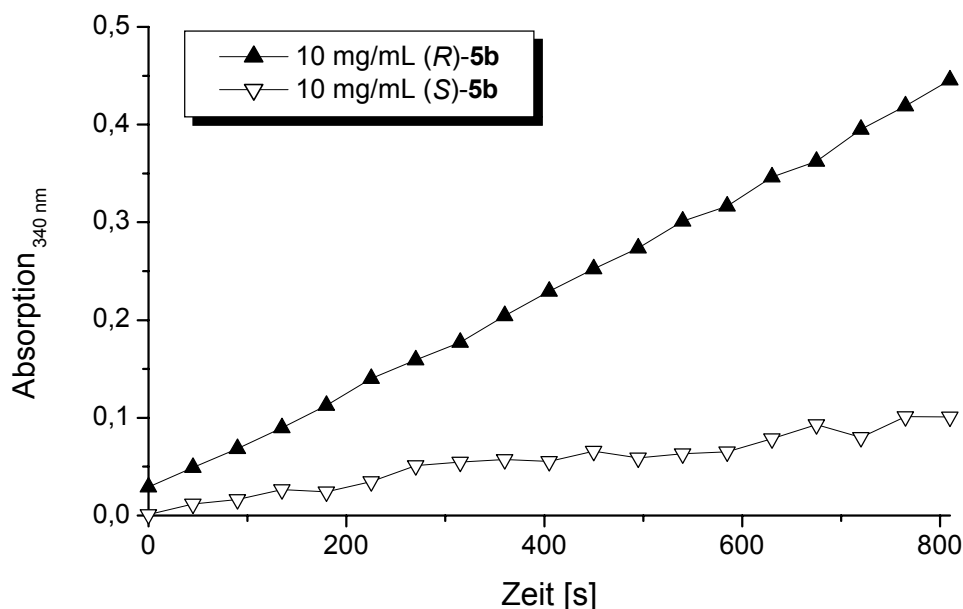


Abb. 3-22 Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten unter Verwendung von optisch reinem (*R*)- bzw. (*S*)-**5b** und jeweils 20 μL PFE-enthaltender Kulturüberstand aus einer Vertiefung der Mikrotiterplatte. Die scheinbare Enantioselektivität berechnet sich zu $E_{app} = 21$. Bei den Messungen ist jeweils der Blindwert (ohne Enzym) abgezogen.

Als weiteres Beispiel für den Einsatz von PFE-haltigen Kulturüberständen diene die Hydrolyse von optisch reinem (*R*)- bzw. (*S*)-**2b**. Um zu überprüfen, ob ein Reinigungsschritt im Mikrotiterplattenformat einen Einfluss auf die Bestimmung der scheinbaren Enantioselektivität E_{app} hat, wurden zwei unterschiedliche Vorgehensweisen gewählt. Bei ersten Ansatz erfolgte eine Aufreinigung der PFE unter Ausnutzung des fusionierten *his-tags*. Hierzu

wurde nach einem Lysozym-Aufschluss der *E. coli* DH5 α -Zellen die PFE in den einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatte an eine Nickel-Nitrilotriessigsäure-Matrix (Ni-NTA *magnetic agarose beads*) gebunden (Kap. 1.6). Durch wiederholte Waschschrte ließen sich die Verunreinigungen aus der Kultivierung entfernen, so dass nach Elution der PFE eine aufgereinigte Esterase-Lösung vorlag. Anschließend wurde zur Bestimmung (20 fach Bestimmung) der scheinbaren Enantioselektivität E_{app} das Eluat aus jeder Vertiefung geteilt und jeweils 20 μ L dieser Lösung zur Hydrolyse der beiden Enantiomere (*R*)- und (*S*)-**2b** eingesetzt. Beim zweiten Ansatz (5 fach-Bestimmung) erfolgte dagegen keine Aufreinigung des Enzyms, d.h. es wurde direkt der PFE-haltige Kulturüberstand nach Aufschluss der *E. coli* DH5 α -Zellen zur Reaktionskatalyse verwendet.

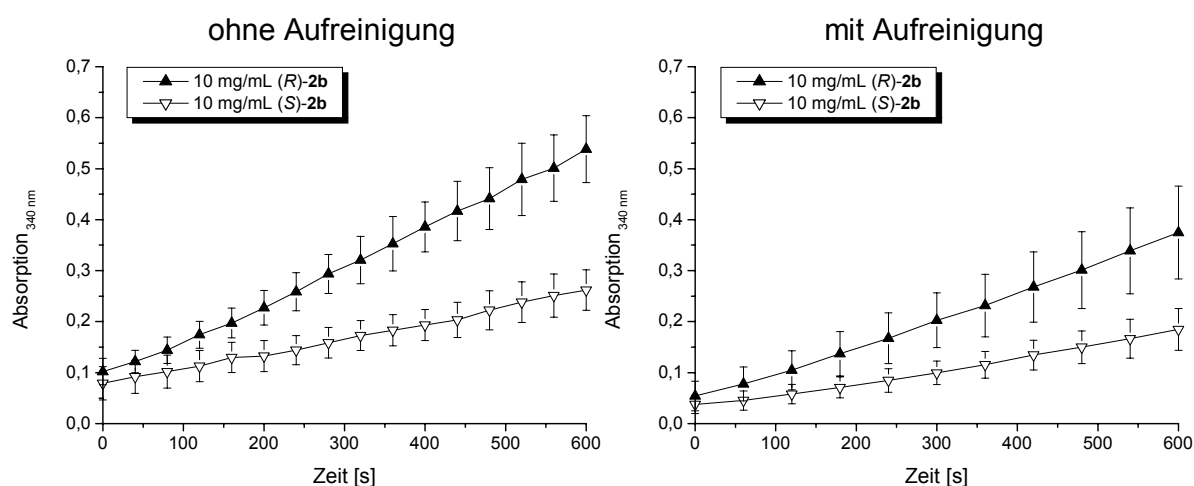


Abb. 3-23 Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten unter Verwendung von optisch reinem (*R*)- bzw. (*S*)-**2b** und 20 μ L einer PFE-enthaltenden Lösung. Beim direktem Einsatz des Kulturüberstands (5 fach Bestimmung) berechnet sich die scheinbare Enantioselektivität zu $E_{app} = 2,3$. Nach Aufreinigung des Zelllysats (20 fach Bestimmung) resultiert ein E_{app} -Wert von 1,7. Bei den Messungen sind jeweils die Blindwerte (ohne Enzym) abgezogen. In der Abbildung sind zusätzlich die Standarabweichungen eingezeichnet.

Wie in Abb. 3-23 zu erkennen ist, liefert die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten in beiden Fällen ein ähnliches Ergebnis. Dabei berechnet sich die scheinbare Enantioselektivität beim direkten Einsatz des PFE-haltigen Kulturüberstands zu $E_{app} = 2,3$ (Kap. 5.7.2.3; Lysozym-Aufschluss) und liegt damit leicht über der wahren Enantioselektivität ($E_{true} = 1,2$), die durch kinetische Racematspaltung von **2b** ermittelt wurde. Nach Entfernung der Verunreinigungen aus der Kultivierung (Kap. 5.7.2.4) liegt die scheinbare Enantioselektivität zwar tiefer ($E_{app} = 1,7$), aber die Präzision der einzelnen Messungen nimmt ab

(höhere Standardabweichung). Eine mögliche Ursache hierfür dürfte in Aktivitätsunterschieden der einzelnen PFE-Eluate zu suchen sein, da gemäß des Aufreinigungsprotokolls mehrere zusätzliche Pipettierschritte und Wartezeiten erforderlich sind. Da die Werte für die scheinbare Enantioselektivität in beiden Fällen nur unwesentlich voneinander abweichen und die Isolierung der PFE eine Mehrarbeit erforderlich macht, ist bei der Implementierung des Acetat-Assays in ein HTS-Verfahren in diesem Beispiel der direkten Verwendung von Zelllysaten Vorrang einzuräumen.

3.4.3 Gerichtete Evolution der Esterase I aus *Pseudomonas fluorescens*

Wie die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, kann die Aktivität der PFE bei der Umsetzung der Modellverbindungen **1** - **5** durch einen Wechsel des Reaktionsmediums oder durch Immobilisierung gezielt variiert werden. Dagegen führt der Übergang aus einem wässrigen System in ein aprotisches Reaktionsmedium zwar zu einer Änderung der Enantioselektivität, wobei sich dieser Effekt aber nicht steuern lässt. Hinzu kommt, dass die PFE nur bei der Hydrolyse von **1b** bzw. **1c** für präparative Zwecke (Faustregel E-Wert größer 15) geeignet ist. Aus diesem Grund wurde versucht, die Stereospezifität der PFE durch die Methoden der gerichteten Evolution zu verbessern. Als Ausgangspunkt hierfür diente PFE-katalysierte Spaltung von **2b**, die bei Verwendung des Wildtyp-Enzyms nahezu unselektiv verläuft (E = 1,2; Tab. 6-2)

3.4.3.1 Erzeugung einer Mutantenbibliothek

Für die Erzeugung einer Enzybibliothek wurde die klassische Methode der gerichteten Evolution durch *error-prone* PCR (*epPCR*) gewählt. Die Einführung von Mutationen erfolgt dabei durch Einstellung nicht-optimaler Reaktionsbedingungen im Verlauf der Amplifikation des Wildtyp- bzw. Parentalgens (Kap. 5.5.3). In Abb. 3-24 ist die gewählte Strategie für die *epPCR* aufgezeigt. Zur Vervielfältigung des *pfe*-Gens aus dem Plasmid pJOE2792 wurden jeweils vier parallele Ansätze (im 100 µL Maßstab) durchgeführt, bei denen jeweils ein Nucleotid deutlich im Unterschuss (fünffach kleinere Konzentration als die anderen Nucleotide) vorlag. Die Verwendung der Primer *epPFE1* und *epPFE2* (Kap. 6.3) führte dabei zur Amplifikation eines Genfragments von 1180 bps (Abb. 3-25). Es zeigt sich, dass das *epPCR*-Produkt nicht in allen Ansätzen in gleichem Umfang gebildet wurde. Ein Mangel an Purinbasen ergibt dabei eine kleinere Ausbeute, wogegen ein Unterschuss der Pyrimidinbasen zu größeren Banden bei der Agarose-Gelelektrophorese führt.

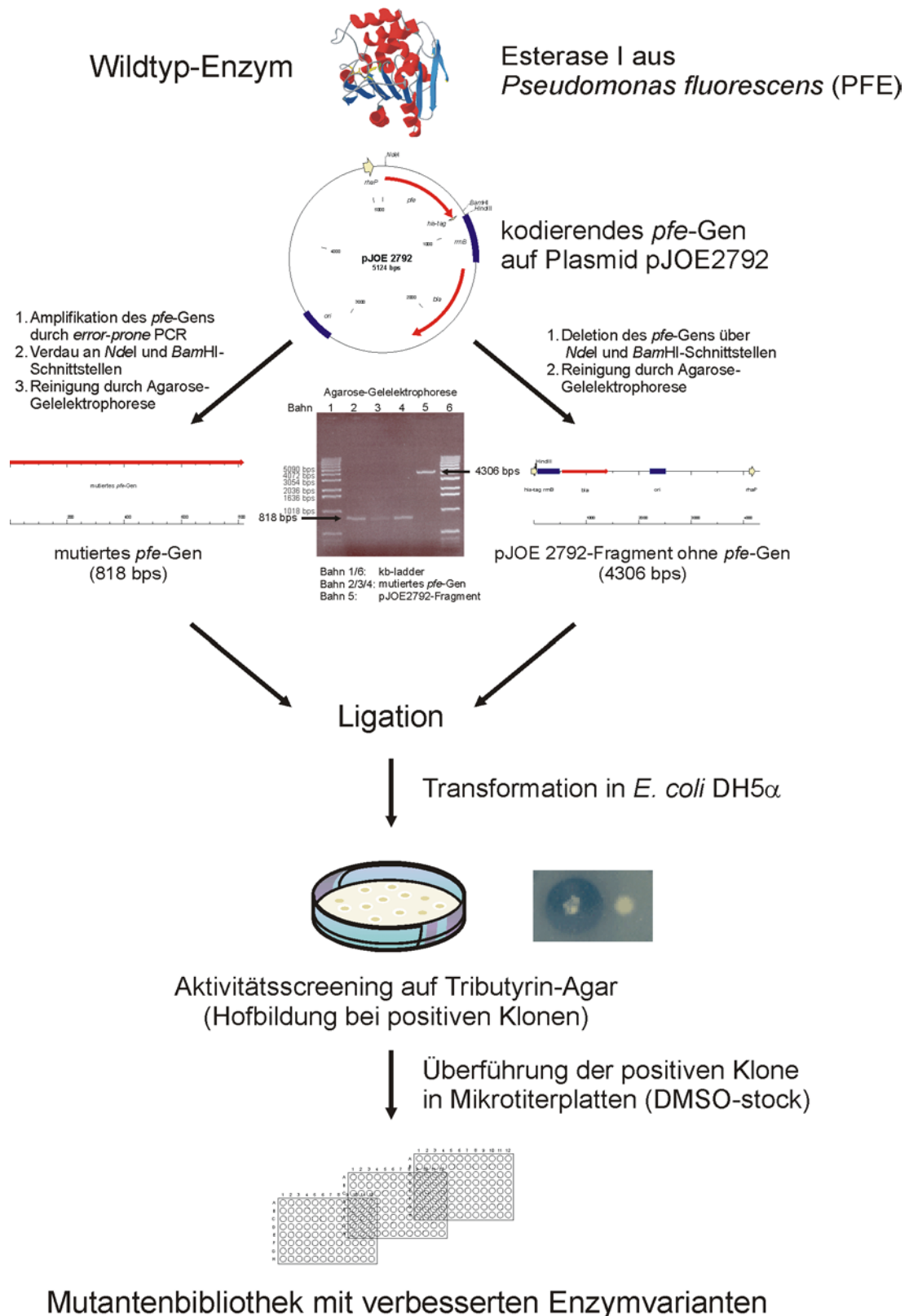


Abb. 3-24 Strategie für die Erstellung einer Mutantenbibliothek mit verbesserten Enzymvarianten der PFE. Nach Einführung der Mutationen durch *ep*PCR, Verdau an *NdeI* und *Bam*HI wird das *pfe*-Gen wieder in den Expressionsvektor pJOE2792 kloniert. Nach Ligation und Transformation in *E. coli* DH5α erfolgt ein Screening auf Hydrolyseaktivität. Anschließend wird ein DMSO-stock der hier aktiven Klone angelegt.

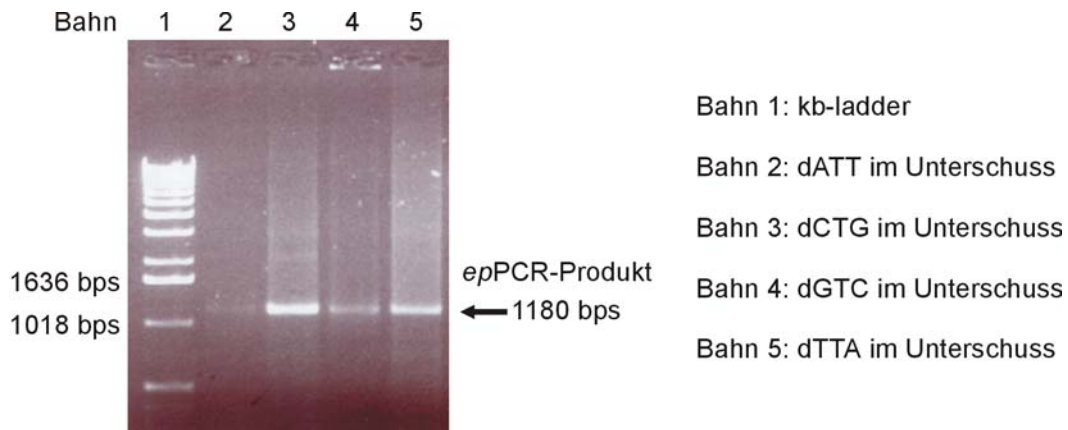


Abb. 3-25 DNA-Agarose-Gelelektrophorese der *ep*PCR-Produkte, die aus vier parallel durchgeführten Ansätzen (je ein anderes Nucleotid im Überschuss) stammen.

Nach Isolierung der *ep*PCR-Produkte aus dem Agarosegel (Abb. 3-25) und Restriktionsverdau an der *Nde*I- und *Bam*HI-Schnittstelle, wurden die Genfragmente (mutiertes *pfe*-Gen) wieder in das ursprüngliche Plasmid (pJOE2792) ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert (Kap. 5.5.5.2). Durch Ausplattierung auf Tributyrin-Rhamnose-Agar (TB/Rhamnose-Platten) ließ sich dabei die Hydrolase-Aktivität kontrollieren (Aktivitäts-Screening). Positive Klone, d.h. Kolonien bei denen eine Hofbildung zu erkennen war, wurden anschließend mit Hilfe eines Pick-Roboters in Mikrotiterplatten (384 Vertiefungen) abgelegt.

Die Stammhaltung der Klone erfolgte als DMSO-stock, d.h. nach Kultivierung in einem DMSO-haltigen Flüssigmedium (5 % DMSO; V/V) wurden die Mutanten bei -80°C eingefroren (Kap. 5.5.1.5), so dass eine Lagerung über einen längeren Zeitraum möglich war. Diese Methode bietet mehrere Vorteile gegenüber der Verwendung von Glycerin-Mischungen [Mühlhardt, 2000; Henke, 2001]. *E. coli* DH5 α ist in einem Flüssigmedium bis zu einer DMSO-Konzentration von 10 % (V/V; LB/DMSO/AMP-Medium) kultivierbar, wogegen ein Zusatz von Glycerin erst nach Anzucht der Zellen bis zu einer bestimmten optischen Dichte erfolgen kann [Sambrook et al., 1989], d.h. es ist ein zusätzlicher Pipettierschritt erforderlich. Bei der Arbeit mit Mikrokulturen ist dies aber im Hinblick auf die Gefahr von Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Die nachträgliche Zugabe einer Glycerin-Wasser-Lösung wird zudem durch die hohe Viskosität erschwert. Das DMSO-Flüssigmedium (5 % DMSO; V/V) lässt sich im Vergleich dazu sehr leicht pipettieren, so dass selbst kleinste Volumina (80 μL) problemlos in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte vorgelegt werden können.

3.4.3.2 Durchmusterung der Mutantenbibliothek

Für die Durchmusterung der Mutanten nach enantioselektiveren Enzymvarianten wurde zunächst der DMSO-stock auf Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen überimpft, so dass für die weiteren Untersuchungen eine Kopie der Bibliothek zur Verfügung stand (Abb. 3-26). Nach Anzucht der Klone (Kultivierung) im LB-Flüssigmedium (200 μ L je Vertiefung) und Expression der PFE wurden die *E. coli* DH5 α -Zellen abzentrifugiert und durch Zugabe einer Lysozym-Puffer-Lösung aufgeschlossen (Kap. 5.7.2.3). Im Vergleich zur Zellyse durch Gefrier-Auftau-Zyklen, bei denen ein Temperaturgradient zwischen den Vertiefungen am Rand und in der Mitte der Mikrotiterplatte zu beobachten war, besitzt diese Methode den Vorteil, dass alle 96 Kulturen unter identischen Bedingungen behandelt werden. Zudem konnte durch Kontrollexperimente gezeigt werden, dass die PFE-Aktivität durch den Einsatz von Lysozym nicht beeinträchtigt wurde. In Abweichung des Standard-Aufschlussprotokolls (Ni-NTA *magnetic agarose beads*-Testkit; QiaGen; Hilden) erfolgte die Lyse der Zellen nach Resuspension in einem Phosphat-Puffer (10 mM; pH 7,3) anstelle einer Imidazol-Lösung, wobei sich ebenfalls keine nachteiligen Effekte auf die PFE-Aktivität ergaben.

Für die Ermittlung der scheinbaren Enantioselektivität E_{app} der Enzymvarianten wurden in einer weiteren Mikrotiterplatte (Assayplatte) Mischungen der Testkit-Komponenten (150 μ L pro Vertiefung) vorgelegt und die PFE-enthaltenden Kulturüberstände aus jeder Vertiefung der Kultivierungsplatte auf zwei Vertiefungen der Assayplatte aufgeteilt (pro Reaktion 20 μ L; Abb. 3-26). Durch diese Vorgehensweise war sichergestellt, dass bei der Hydrolyse der beiden optisch reinen Formen des Acetats jeweils die gleiche Esterasekonzentration zum Einsatz kam. Der Start der Hydrolysereaktionen in den einzelnen Vertiefungen erfolgte durch Zugabe von 20 μ L einer Lösung des enantiomerenreinen Substrats (*R*)- bzw. (*S*)-**2b**. Die Geschwindigkeiten der einzelnen Umsetzungen korrelieren dabei mit der NADH-Bildung und können spektrophotometrisch miteinander verglichen werden. Über das Verhältnis der Absorptionzunahmen pro Minute des (*R*)- zum (*S*)-Enantiomer konnte anschließend für jede Enzymvariante die scheinbare Enantioselektivität E_{app} berechnet werden.

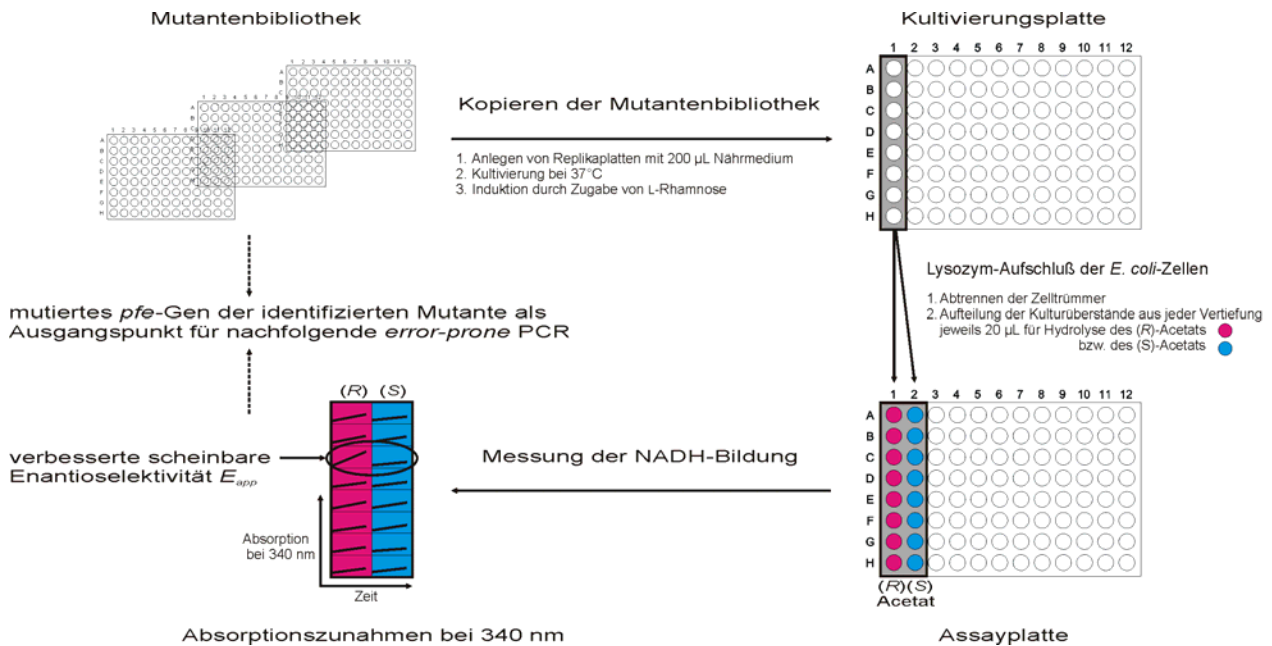


Abb. 3-26 Prinzipielle Vorgehensweise bei der Durchmusterung einer Mutantenbibliothek nach enantioselektiveren Enzymvarianten. Nach Überimpfen der Klone auf eine Kultivierungsplatte und Expression der PFE werden die Zellen aufgeschlüsselt. Die PFE-enthaltenden Kulturüberstände aus jeder Vertiefung werden für die Hydrolyse der beiden optisch reinen Formen des Acetats (R)- bzw. (S)-**2b** geteilt (jeweils 20 μL), so dass bei den parallel durchgeführten Reaktionsansätzen die gleiche Esterasekonzentration vorliegt. Durch vergleichende Messung der Absorptionszunahme bei 340 nm lassen sich schließlich Enzymvarianten identifizieren, die eine erhöhte scheinbare Enantioselektivität E_{app} zeigen.

Im Rahmen der Entwicklung des HTS-Testsystems und bei der Durchmusterung der Mutantenbibliothek wurden insgesamt ca. 1200 Enzymvarianten getestet. Die getesteten Hydrolasen wiesen dabei fast ausschließlich E_{app} -Werte von 1,4 bis 2,0 zugunsten von (R)-**2b** auf und lagen damit alle im Bereich der wahren Enantioselektivität ($E_{true} = 1,2$), die unter Konkurrenzbedingungen für die Wildtypform der PFE bestimmt wurde (Tab. 6-2). Bei Varianten, die eine scheinbare Enantioselektivität größer als 2,1 bzw. eine Stereopräferenz zugunsten des (S)-Enantiomers zeigten, erfolgte eine nähere Charakterisierung der zugehörigen Mutanten durch Sequenzierung des *pfe*-Gens. Hierbei wurden insgesamt 16 Klone sequenziert (Kap. 5.5.4.3), wobei aber keine Mutationen des Esterasegens gefunden wurden. Die Ursache für die erhöhten E_{app} -Werte bzw. die inverse Stereopräferenz dürfte auf unterschiedliche Konzentrationen der Esterase (Ungenauigkeiten beim Transfer der PFE-enthaltenden Kulturüberstände) in den parallel durchgeführten Reaktionsansätzen zur Bestimmung der scheinbaren Enantioselektivität zurückzuführen sein.

4 Zusammenfassung und Diskussion

4.1 Testsystem zur Identifizierung aktiver und enantioselektiver Hydrolasen

Ziel der Arbeit war es, Testsysteme für die Identifizierung von aktiven und enantioselektiven Hydrolasen zu entwickeln. Durch die allgemeinen Fortschritte im Bereich der Biotechnologie, hat sich in den letzten Jahren das Angebot kommerziell erhältlicher Enzyme stetig erweitert. Existierte früher nur ein begrenztes Spektrum an Esterasen, Lipasen und Proteasen, die alle einzeln auf ihre Eignung im gewünschten biokatalytischen Prozess getestet werden konnten, so ist heutzutage eine andere Vorgehensweise erforderlich. Einige Hersteller sind mittlerweile in der Lage, auf Anfrage zum Teil mehrere hundert Enzyme einer gewünschten Aktivitätsgruppe zu liefern [Demirjian et al., 1999; Miller, 2000], d.h. es werden neue, effektive Testverfahren benötigt, die einen hohen Durchsatz erlauben. Für diesen Zweck wurde ein leistungsfähiges System im Mikrotiterplattenformat entwickelt, das eine schnelle und zuverlässige Identifizierung aktiver und enantioselektiver Hydrolasen bei der Umsetzung ausgewählter Substrate erlaubt.

Als Ausgangspunkt dienten Modellverbindungen, für die bislang noch keine Biokatalysatoren existieren, die eine effiziente Racematspaltung ermöglichen, so dass sowohl die Edukte als auch die Produkte in hoher optischer Reinheit erhältlich sind. Hierbei handelt es sich um die sekundären Alkohole 2-Hydroxy-but-3-in (**1a**), 1-Methoxy-2-propanol (**2a**) und 3-Hydroxy-tetrahydrofuran (**3a**) sowie die korrespondierenden Acetate (**1b - 3b**) und 2-Butyroxyl-but-3-in (**1c**; Abb. 2-1). Eine Besonderheit dieser Substrate ist, dass die alle nur sehr kleine Reste am chiralen Kohlenstoffatom tragen und nahezu symmetrisch aufgebaut sind. Die Verbindungen stellen darüber hinaus wichtige chirale Bausteine für die organische Synthesechemie (Pharmaka; Pflanzenschutzmittel) dar. Zusätzlich wurde noch Pantolacton (**4a**), dessen D-Enantiomer eine Vorstufe für Pantothenensäure und Panthenol ist, und Pantolactonacetat (**4b**) in die Untersuchungen einbezogen. Zur Herstellung von D-Pantolacton existiert zwar schon seit mehreren Jahren ein großtechnisches Verfahren unter Verwendung der Lactonase aus *Fusarium oxysporum*, doch aufgrund des beträchtlichen Marktvolumens (> 7000 t/a) [Shimizu, 2000] besteht ein hohes Interesse von Seiten der Industrie neue biokatalytische Prozesse zu etablieren.

Neben den ausgewählten Modellverbindungen standen insgesamt 116 verschiedene Hydrolase-Präparationen (Esterasen, Lipasen und Proteasen) zur Verfügung. Darunter befanden sich auch 70 Enzyme aus unbekanntem, thermophilen Mikroorganismen, die zum Teil ein

Temperaturoptimum von 80°C besitzen und von den Firmen Diversa (San Diego; USA) und ThermoGen (Chicago; USA) vertrieben werden. Gerade diese Biokatalysatoren, die unter solch extremen Bedingungen einsatzfähig sind, bergen ein großes Potential für technische Anwendungen in sich [Antranikian und Grote, 1997; Sellek und Chaudhuri, 1999]. Die Einbeziehung von Hydrolasen mit diesen Eigenschaften erforderten ein Testsystem, das auch bei höheren Temperaturen zuverlässig angewendet werden kann.

Das entwickelte Testsystem basiert auf einer hierarchischen Vorgehensweise (Abb. 3-4). Im ersten Schritt (Selektion) werden mittels eines sogenannten pH-Assays die Hydrolasen ausgewählt, die gegenüber den Modellverbindungen (Abb. 2-1) Aktivität zeigen. Durch geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen (Hydrolysen in wässriger Lösung) ist dabei sichergestellt, dass die zu testenden Enzyme unter optimalen Konditionen direkt bei der Umsetzung der 'wahren' Substrate untersucht werden. Zudem ermöglicht die Ausführung des pH-Assays im Mikrotiterplattenformat einen hohen Durchsatz. Im nachfolgenden zweiten Schritt des Testsystems (Screening) werden anschließend nur die selektierten Hydrolasen einbezogen. Die aufwendigeren Untersuchungen zur Bestimmung der Enantioselektivität E als spezifische Messgröße beschränken sich somit auf einen Bruchteil der ursprünglich zur Verfügung stehenden Enzympräparationen, wobei die erforderlichen Testreaktionen (Racematspaltungen) direkt unter den Bedingungen des angestrebten biokatalytischen Herstellungsverfahrens durchgeführt werden können.

Das Grundprinzip des pH-Assays lehnt sich an die konventionellen Methoden zum Nachweis von Hydrolase-produzierenden Mikroorganismen auf Festmedien (Agarplatten) an und überträgt dieses Schema auf das Mikrotiterplattenformat. Ausgangspunkt hierfür ist die Hydrolase-katalysierte Spaltung einer Esterverbindung in deren Verlauf die freigesetzte Säure den pH-Wert der Reaktionslösung erniedrigt. Diese Änderung kann mittels eines pH-sensitiven Farbindikators verfolgt werden. Bei aktiven Hydrolasen stellt sich bei der Verwendung von Bromthymolblau eine Farbänderung von grün nach gelb ein, die sich visuell detektieren lässt. Die Ausführung des pH-Assays in einem quantitativen Modus [Janes et al., 1998], d.h. die direkte Untersuchung der Enzyme auf ihre Stereoselektivität durch Vergleich der Hydrolysegeschwindigkeiten bei der Umsetzung der beiden optisch reinen Formen eines Substrats (scheinbare Enantioselektivität E_{app}), erschien in diesem Zusammenhang nicht sinnvoll. Als Nachteile hierbei sind die aufwendige Kalibrierung, die für jede Modellverbindung neu erfolgen muss, und der große Bedarf an enantiomerenreinen Verbindungen zu werten. Zudem weichen die ermittelten E_{app} -Werte oftmals weit von der wahren Enantioselektivität ab [Reetz, 2001].

Für die Anwendung des pH-Assays zur Identifizierung aktiver Hydrolasen wurden zuerst die kommerziell nicht erhältlichen Modellverbindungen **1c** sowie die Acetate **3b** und **4b** ausgehend von den racemischen Alkoholen durch Veresterung mit Butyryl- bzw. Acetylchlorid synthetisiert. Neben den Substraten war es außerdem erforderlich, die Esterasen I und II aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE und PFE II) sowie die Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* (BSE), die alle in rekombinanter Form zur Verfügung standen, herzustellen. Vor der Expression der Enzyme in *E. coli* DH5 α nach einem Standardprotokoll [Krebsfänger et al., 1998] wurden zunächst die Bedingungen für den Zellaufschluss optimiert. Durch einmaliges Einfrieren mit anschließender Ultraschallbehandlung (2 \times 1 min) konnten dabei die höchsten Aktivitäten erzielt werden. So ergab z.B. die Expression der PFE im 500 mL-Maßstab eine Enzympräparation mit einer spezifischen Aktivität von 71 U/mg Protein (Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat). Die PFE II (0,5 U/mg Protein) und die BSE (8 U/mg Protein) erwiesen sich dagegen als weniger aktiv und bestätigten damit frühere Befunde [Henke, 2001].

Bei der Durchführung des pH-Assays konnten für jede der Modellverbindungen **1b - 4b / 1c** aktive Hydrolasen identifiziert werden. Die große Anzahl ausgewählter Enzyme (von 36 / **3b** bis 68 / **1c**), die in der Lage sind die Substrate zu spalten, dürfte dabei auf die geringen sterischen Anforderungen der Acetate bzw. des Butyrat der niedermolekularen Alkohole **1a - 4a** zurückzuführen sein. Darüber hinaus waren alle untersuchten Hydrolasen mit Ausnahme von Papain sowie drei Diversa-Enzymen aktiv gegenüber Tributyrin.

Vor der weiteren Untersuchung der ausgewählten Esterasen in der zweiten Stufe des Testsystems, musste zunächst für jede der Modellverbindungen eine geeignete Enantiomerenanalytik etabliert werden. Dabei zeigte sich, dass bei Verwendung von stationären Phasen auf Cyclodextrinbasis für die eingesetzten Alkohole und Ester eine Grundlinientrennung bei der GC-Analyse möglich ist. Die Retentionszeiten liegen dabei unter 25 min, so dass auch hier eine wichtige Voraussetzung für einen hohen Durchsatz gegeben ist.

In der zweiten Stufe des Testsystems konnten einige zum Teil hoch-enantioselektive Biokatalysatoren (E -Wert > 100) für die Umsetzung der Esterverbindungen identifiziert werden. Insbesondere ist die Hydrolyse von **2b** mit der Lipase B aus *Candida antarctica* (CAL B) hervorzuheben, da bei einem Umsatz von 50 % sowohl der Ester als auch der Alkohol in enantiomerenreiner Form (> 99 %*ee*) vorliegen. Als weitere Beispiele können die Umsetzung von **1b** und **1c** mit der PFE ($E = 75$ bzw. 33) und die Racematspaltung von **4b** (vier Enzyme mit Enantioselektivität größer 100) dienen. Zusätzlich existiert für jedes Substrat mindestens eine

Hydrolase, die eine entgegengesetzte Stereopräferenz aufweist, so dass immer beide enantiomere Formen des Alkohols bzw. des Esters zugänglich sind. Insbesondere die Diversa-Enzyme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Stereospezifität von den anderen, 'traditionellen' Biokatalysatoren, wobei die beobachteten Enantioselektivitäten zum Teil sehr beachtlich ($E > 100$) ausfallen. Schließlich ist anzumerken, dass unter den 116 getesteten Enzymen kein Biokatalysator gefunden wurde, der eine effektive Racematspaltung von **3b** ermöglicht. Die maximal erzielten E -Werte lagen lediglich bei $E = 6$ (CAL B) bzw. 3 (PFE I und Diversa BD100).

Nach den Ergebnissen des Testsystems ist festzustellen, dass die gewählte hierarchische Vorgehensweise geeignet ist, schnell und zuverlässig aktive und enantioselektive Hydrolasen zu identifizieren. Aufgrund der Auslegung des pH-Assays auf das Mikrotiterplattenformat sowie das einfache Testprotokoll kann der pH-Assay zur Erreichung eines hohen Durchsatzes außerdem sehr leicht automatisiert (Pipettier-Roboter) werden.

4.2 Optimierung der biokatalytischen Reaktionen

Nach Identifizierung geeigneter Hydrolasen ist es bei der Etablierung eines biokatalytischen Herstellungsverfahrens erforderlich, eine Charakterisierung der Biokatalysatoren unter den Prozessbedingungen durchzuführen. In diesem Zusammenhang müssen die enzymatischen Umsetzungen zunächst auf einen größeren Maßstab (*upscaling*) übertragen und präparativ aufgearbeitet werden. Da sich die technologische Nützlichkeit von Biokatalysatoren beim Einsatz in organischen Lösungsmitteln wesentlich erhöht (vereinfachte Prozessführung) [Klibanov, 2001], wurde versucht die ausgewählten Modellverbindungen auch in aprotischen Reaktionsmedien umzusetzen. Hiermit verbunden war die Auswahl geeigneter Solvenzien und der Einsatz der Hydrolasen in immobilisierter Form. Die Untersuchungen konzentrierten sich dabei auf die selbst-hergestellte PFE sowie die CAL B.

Bei Durchführung von Hydrolysen im g-Maßstab zeigte sich, dass die PFE ihre hohe Enantioselektivität bei der Umsetzung von **1b** ($E = 53$) bzw. **1c** ($E = 26$) beibehält. Dagegen verliert sie beim Übergang auf ein aprotisches Reaktionsmedium ihre Fähigkeit zur chiralen Diskriminierung, so dass die Acylierung von **1a** mit Vinylacetat bzw. -butyrat unspezifisch ($E = 1$) verläuft. Bei Immobilisierung des Enzyms auf S-Sepharose (ein Kationentauscher), Eupergit C oder Celite 545 ließ sich zwar die Aktivität der PFE steigern, doch hatte dies keinen Einfluss auf die Stereoselektivität. Auch bei der Acetylierung der anderen Modellverbindungen

2a/3a konnten nur *E*-Werte kleiner 5 erzielt werden. Für eine weitere Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses auf die Enantioselektivität der PFE wurde das Substratspektrum um den sterisch anspruchsvollen Alkohol 1-Phenylethanol (**5a**) ergänzt. Im Gegensatz zu den sekundären Alkoholen **1a** – **3a**, die jeweils nur sehr kleine Reste am chiralen Zentrum tragen, zeigt die PFE bei der Acetylierung von **5a** in Abhängigkeit vom verwendeten Reaktionsmedium eine moderate Selektivität von *E* = 10 (Tetrahydrofuran) bis 25 (Diethylether bzw. Acetonitril). In allen Fällen liegt die Enantioselektivität aber unter dem *E*-Wert (*E* = 34), der sich bei der Hydrolyse von 1-Phenylethylacetat (**5b**) in Wasser ergibt.

Im Vergleich zu der PFE behielt die CAL B ihre hohe Stereospezifität beim Übergang auf den g-Maßstab bei. Sowohl die Hydrolyse von **2b** in wässriger Lösung als auch die Acetylierung von **2a** in Hexan, bei der verschiedene CAL B-Immobilisate getestet wurden, ließen dabei eine Enantioselektivität größer 100 beobachten. Da in beiden Fällen eine Präferenz zugunsten des (*R*)-Enantiomers auftritt, konnte in Abhängigkeit vom gewählten Reaktionstyp (*R*)-**2b** (Acetylierung) bzw. (*S*)-**2b** (Hydrolyse) jeweils im g-Bereich in optisch reiner Form biokatalytisch synthetisiert werden.

4.3 Entwicklung eines stereoselektiven Hochdurchsatz-Testsystems

Die Charakterisierung eines Enzyms, das im Rahmen eines Testverfahrens identifiziert wurde, führt meist zur Erkenntnis, dass die Eigenschaften im Hinblick auf die Entwicklung eines rentablen Herstellungsprozesses nur unzureichend sind. Häufig weist es eine zu niedrige Enantioselektivität auf, besitzt eine geringe Stabilität unter den erforderlichen Rahmenbedingungen oder zeigt nur eine kleine Umsatzrate. Um diese Nachteile zu umgehen und ein effektives biokatalytisches Verfahren (idealer Prozess) [Burton et al., 2002] entwickeln zu können, kommen in den letzten Jahren neben den klassischen Ansätzen zur Optimierung der Reaktion (Substrat- bzw. Medien-Engineering) auch die modernen Methoden der gerichteten Evolution zum Einsatz. Die Technik der Zufallsmutagenese hat sich zu diesem Zweck mittlerweile etabliert und es existieren in der Literatur viele Beispiele für ihren erfolgreichen Einsatz (z.B. Bornscheuer und Pohl, 2001). Nach wie vor besteht aber ein großer Bedarf an geeigneten Hochdurchsatz-Testsystemen (HTS-Verfahren), die eine schnelle und zuverlässige Durchmusterung einer Mutantenbibliothek ermöglichen (z.B. Reetz, 2001). Insbesondere Testverfahren, die auf dem Einsatz der 'wahren' Substrate beruhen, erfordern extrem hohe Ausstattungskosten (z.B. NMR- oder Massenspektrometer sowie Isotopen-markierte Verbindungen) oder eine äußerst aufwendige Kalibrierung (z.B. pH-Wert Messung). Aus diesem

Grund wurde ein stereoselektives HTS-Verfahren entwickelt, das eine schnelle und zuverlässige Durchmusterung von Esterasevarianten einer Bibliothek unter Verwendung des 'wahren' Substrats erlaubt.

Als Ausgangspunkt für die Entwicklung des Hochdurchsatz-Testsystems diente die Hydrolase-katalysierte Spaltung des Acetats eines chiralen Alkohols in wässrig-gepufferter Lösung. Basierend auf einem kommerziell verfügbaren und preiswerten Testkit [Beutler, 1984], der ursprünglich für die Lebensmittelanalytik entwickelt wurde, wird die freigesetzte Essigsäure anschließend in einer Kaskade von Enzymreaktionen bestimmt (Acetat-Assay; Abb. 3-16). Die Umwandlung in der gekoppelten enzymatischen Reaktionen bewirkt eine Veränderung in der Absorption bei 340 nm aufgrund der Reduktion von NAD^+ zu NADH. Diese Änderung lässt sich spektrophotometrisch messen und erlaubt die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit für die Bildung von NADH. Aufgrund des stöchiometrischen Zusammenhangs zwischen der Essigsäurefreisetzung und der NADH-Bildung kann somit die Hydrolyseaktivität bestimmt werden. Bei Verwendung optisch reiner (*R*)- und (*S*)-Acetate ist aus dem Verhältnis der beiden Start-Reaktionsgeschwindigkeiten ein Schätzwert für die Enantioselektivität (scheinbare Enantioselektivität E_{app}) des getesteten Biokatalysators zugänglich.

Für die Entwicklung eines HTS-Verfahrens war es erforderlich, das vorgeschlagene Testprinzip auf seine Eignung zur Identifizierung von enantioselektiven Hydrolasen zu überprüfen. Hierbei wurde zudem ein Übergang auf das Mikrotiterplattenformat angestrebt, um so einen hohen Durchsatz und die Möglichkeit zur Automatisierung zu gewährleisten. Bei der Validierung des Testverfahrens konnte dabei insbesondere festgestellt werden:

- es existiert ein linearer Zusammenhang zwischen der Essigsäurebildung durch Esterhydrolyse und der Absorptionzunahme bei 340 nm über einen großen NADH-Konzentrationsbereich;
- die Parameter können so eingestellt werden, dass die Hydrolase-katalysierte Freisetzung der Essigsäure zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Gesamtsystems wird;
- die getesteten Hydrolasen hatten keinen Einfluss auf die folgende Umsetzung der Essigsäure in der Enzymkaskade (und umgekehrt);
- die Werte, die aus dem Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten der reinen Enantiomere ermittelt werden, stimmen mit den wahren *E*-Werten aus Konkurrenzexperimenten überein;
- für die zuverlässige Bestimmung der scheinbaren Enantioselektivität E_{app} ist eine Analysenzeit von wenigen Minuten (ca. 5 min) pro Test ausreichend;

- der Test ist auch bei Reaktionen in Gegenwart von Zell-Rohextrakten und Kulturüberständen anwendbar.

Nach der Validierung des Acetat-Assays wurde versucht, bei der gerichteten Evolution der PFE eine Mutantenbibliothek, die durch *error-prone* PCR erzeugt wurde, nach enantioselektiveren Enzymvarianten zu durchmustern. Als Substrat diente das Acetat **2b**, das von der Wildtyp-Form der PFE unselektiv ($E = 1,2$) umgesetzt wird. Die optisch reinen Verbindungen (*R*)- bzw. (*S*)-**2b**, die zur Bestimmung der scheinbaren Enantioselektivität der Enzymvarianten erforderlich waren, wurden dabei selbst biokatalytisch (hohe Stereospezifität der CAL B gegenüber **2a/b**) hergestellt. Obwohl 1200 Mutanten getestet wurden ließen sich bei der gerichteten Evolution der PFE keine verbesserten Enzymvarianten identifizieren. Ursache hierfür dürfte neben der kleinen Anzahl getesteter Klone eine zu niedrige Mutationsfrequenz bei der *error-prone* PCR (Einstellung durch Zugabe von Desoxynucleotiden in ungleichen Konzentrationen sowie Mn^{2+} -Ionen) sein, denn alle E_{app} -Werte der getesteten Varianten lagen im Bereich der wahren Enantioselektivität unter Konkurrenzbedingungen.

Unabhängig davon, dass bei der gerichteten Evolution der PFE keine verbesserte Enzymvariante gefunden wurde, konnte gezeigt werden, dass das entwickelte Assay-System zur Identifizierung von aktiven und insbesondere auch enantioselektiven Biokatalysatoren geeignet ist. Da bei den einzelnen Reaktionen innerhalb kürzester Zeit (ca. 5 min) eine Bestimmung der Hydrolyseaktivität möglich ist, erlaubt das Testformat einen hohen Durchsatz (HTS-Verfahren). Verbunden mit einem einfachen Pipettierschema können in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen 45 Enzyme (zwei Vertiefungen pro Biokatalysator, sechs Vertiefungen für Kontrollen) auf ihre scheinbare Enantioselektivität E_{app} untersucht werden. Damit lassen sich ca. 500 E_{app} -Werte pro Stunde bestimmen, was der Durchmusterung von mehr als 10000 Mutanten pro Tag entspricht. Bei Verkürzung der Pipettier- und Analysenzeiten durch ein leistungsfähigeres Robotersystem sollten noch weit höhere Durchsätze möglich sein. Zusätzlich ist der Acetat-Assay auch recht preiswert, da die Bestimmung eines E_{app} -Werts weniger als 0,1 € kostet. Darüber hinaus sollte die Methode nicht auf die Bestimmung der Aktivität und Enantioselektivität von Esterasen und Lipasen, die im Rahmen der Entwicklung des HTS-Verfahrens eingesetzt wurden, beschränkt sein. Einige weitere Enzymreaktionen, die unter Freisetzung von Essigsäure verlaufen, wie die Protease- oder Amidase-katalysierte Hydrolyse von Amiden, sollten mit dem hier entwickelten Testformat quantifiziert werden können.

4.4 Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein effektives Testsystem zur Identifizierung von aktiven und enantioselektiven Hydrolasen (Esterasen, Lipasen, Proteasen) entwickelt. Durch eine hierarchische Vorgehensweise werden dabei im ersten Schritt (pH-Assay) zunächst die Enzyme ausgewählt, die prinzipiell in der Lage sind sie gewünschten Substrate umzusetzen. Eine geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen (Hydrolysen in wässrig, gepufferter Lösung) stellt dabei sicher, dass die zu testenden Enzyme unter optimalen Konditionen direkt bei der Umsetzung der 'wahren' Substrate untersucht werden. Im anschließenden zweiten Schritt (Screening) werden die aktiven Hydrolasen durch Racematspaltungen im mg-Maßstab auf ihre Enantioselektivität untersucht.

Nachfolgend wurde das Testsystem auf ausgewählte Modellverbindungen angewendet und dabei 116 verschiedene Enzyme untersucht. Danach erfolgte eine nähere Charakterisierung der identifizierten Hydrolasen auf ihre Eignung für den Einsatz in einem biokatalytischen Herstellungsverfahren. In diesem Zusammenhang wurden präparative Ansätze im g-Maßstab durchgeführt, organische Lösungsmittel als Reaktionsmedien verwendet und die Enzyme immobilisiert.

Schließlich erfolgte die Entwicklung eines weiteren Hochdurchsatz-Testsystems, das insbesondere für den Einsatz zur Durchmusterung von Enzybibliotheken, die im Rahmen der gerichteten Evolution erzeugt wurden, geeignet ist. Das Testformat basiert auf der Bestimmung der Essigsäure, die bei der Hydrolase-katalysierten Spaltung eines Acetat-Ester freigesetzt wird. Durch eine gekoppelte enzymatische Reaktion wird dabei NADH gebildet, das über die Zunahme der Absorption bei 340 nm spektrophotometrisch quantifiziert werden kann. Die Validerung des Acetat-Assays ergab, dass eine schnelle und zuverlässige Untersuchung von Biokatalysatoren hinsichtlich ihrer Aktivität und Enantioselektivität möglich ist. Im Gegensatz zu anderen Hochdurchsatz-Testverfahren (HTS-Systeme) können direkt die 'wahren' Substrate eingesetzt werden und es ist keine aufwendige Ausstattung erforderlich.

5 Material und Methoden

5.1 Geräte und Verbrauchsmittel

Soweit nicht anders vermerkt, sind die jeweiligen Hersteller bzw. Vertriebsniederlassungen in Deutschland ansässig. Neben den hier aufgeführten Arbeitsmitteln und Geräten wurden gängige Laborgegenstände (Glasgeräte; Pipetten; Magnetrührer; usw.) und Verbrauchsmaterialien (Kunststoffreaktionsgefäße; Kombitips; Meßküvetten; Vials; usw.) verwendet. Die Flachboden-Mikrotiterplatten inkl. Abdeckung stammten von Greiner (Frickenhausen). Zum Verschließen der Mikrotiterplatten wurden je nach Anwendung auch AirPore Tape sheets (Qiagen; Hilden) eingesetzt.

5.1.1 Biotransformationen und chemische Synthesen

Dünnschichtchromatographie	Silica gel 60 F ₂₅₄ - Platte (Merck; Darmstadt); DC-Kammer (neoLab / Migge; Heidelberg)
Elementaranalyse	Durchgeführt als Auftragsanalysen bei der maßanalytischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie und Isotopenforschung der Universität Stuttgart.
Gaschromatographie (GC)	Tremetrics 9001 Gas Chromatograph mit µGold FID (Tremetrics Inc.; Austin; USA) und Integrator HP3396 Series II (Hewlett Packard; Waldbronn) HRGC MEGA II Series 8560 und GC 8000 Series mit Detektor FID EL 980 und Chrom-Card for Windows 1.21 (Carlo Erba; Mailand; Italien)
GC-Trennsäulen:	
Säule A:	Heptakis-(2,3)-di-O-acetyl-6-O-TBDMS-β-cyclodextrin; 25 m; 0,25 mm ID (Prof. W. A. König; Universität Hamburg)
Säule B:	Heptakis-(2,3,6-tri-O-methyl)-β-cyclodextrin / Polysiloxan 50 m; 0,25 mm ID (FS-Cyclodex beta-I/P; CS Chromato- graphie Service; Langerwehe)
Säule C:	Heptakis-(2,6-di-O-methyl-3-O-pentyl)-β-cyclodextrin mit OV 1701; 25 m; 0,25 mm ID (Hydrodex β-3P; Macherey- Nagel; Düren)
Säule D:	Heptakis-(6-TBDMS-2,3-methyl)-β-cyclodextrin verd. mit 50 % OV 1701; 25 m; 0,25 mm ID (Prof. W.A. König; Universität Hamburg)

Gefriertrockner	Finn-Aqua Lyovac GT2 (Santasalo-Sohlberg; Hürth) Christ alpha I-5 (Christ; Osterode am Harz)
Homogenisator	Ultraturrax TX25 (Janke & Kunkel – IKA Labortechnik; Staufen)
Hydrolyseaktivität (pH-stat)	Dosimat 665, Impulsomat 614, pH-Meter 620 und Rührer 649 (Metrohm; Herisau; Schweiz) mit Schreiber L 200 E (Linseis; Selb) und C1 Thermostat (Thermo Haake; Karlsruhe)
NMR-Spektroskopie (^1H ; ^{13}C)	ARX 500 (Bruker; Karlsruhe) mit 500 MHz (^1H) bzw. 126 MHz (^{13}C) Nominalfrequenz bzw. AC-250 (Bruker) mit 250 MHz (^1H) bzw. 63 MHz (^{13}C) Nominalfrequenz Durchgeführt als Auftragsanalysen bei der maßanalytischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie und Isotopenforschung der Universität Stuttgart.
pH-Meter	Digital pH-Meter pH 525 (WTW; Weilheim)
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-134, Wasserbad B-480 und Vacuum System B-172 (Büchi; Flawil; Schweiz)
Thermomixer	Thermomixer comfort (Eppendorf; Hamburg); Schutron Thermoshaker (neoLab / Migge; Heidelberg)
Waagen	MC1 Research RC 210 D (Sartorius; Göttingen) HF 2000G (A&D Engineering; Milpitas; USA)

5.1.2 Mikrobiologie und Molekulargenetik

Agarose-Gelelektrophorese	DNA Sub Cell, Mini Sub DNA Cell (Biorad; München); Video Copy Processor P66E (Mitsubishi; Cambridge; England); BWM 9X Monitor (Javelin Electronics; Schaumburg; USA); UV-Leuchttisch (MWG-Biotech; Ebersberg)
Autoklav	PACS 2000 (Getinge AB; Schweden)
Brutschränke	WTE (Binder; Tuttlingen); UM 500 (Memmert; Schwabach)
DNA-Sequenzierung	ABI Prism 377 DNA Sequencer mit Auswertungssoftware ABI Prism 377 Version 3.2 (PE Applied Biosystems; Weiterstadt)
Inkubatoren	Multitron HT Schüttler (Infors AG; Bottmingen; Schweiz)
Netzgeräte	Power Pac 3000, Power Pac 300, Model 200/2.0 Power Supply (Biorad Laboratories; München)
PCR-Geräte	Master Cycler Gradient (Eppendorf; Hamburg); DNA Thermal Cycler (PE Applied Biosystems; Weiterstadt)
Photometer	für Küvetten (1 cm): UV/VIS-Spektrometer Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech; Uppsala; Schweden) für Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen):

	FLUOstar (BMG LabTechnologies, Offenburg) für Bestimmung der DNA-Konzentration: BioPhotometer (Eppendorf; Hamburg) inkl. UVette-Küvetten 220-1600 nm
Roboter	Pipettier-Roboter: Biomek 2000 inkl. Biomek SL Incubator (Beckman; Fullerton; USA) Pick-Roboter: BioPick (BioRobotics; Cambridge; England)
SDS-PAGE	Minigel-Twin G42 (Biometra; Göttingen); Model 583 Gel Dryer (Biorad Laboratories; München) Wipptisch ROCKY (Labortechnik Fröbel; Lindau)
SpeedVac	Concentrator 5301 (Eppendorf; Hamburg)
Ultraschallgerät	Sonifier 250 (Branson; Danbury; USA)
Vortexer	für Kunststoffreaktionsgefäße: VF2 (Janke & Kunkel – IKA Labortechnik; Staufen) für Mikrotiterplatten: IKA Minishaker MS 1 (Janke & Kunkel - IKA Labortechnik; Staufen)
Zentrifugen	Centrifuge 5416, 5417 C, 5417 R und 5810 R (Eppendorf; Hamburg) mit Einsätzen für Kunststoffreaktionsgefäße (0,5 mL; 1,5 mL; 2 mL; 15 mL; 50 mL) und Mikrotiterplatten Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (DuPont Instruments; Leipzig) mit Rotor SLA3000 Super Lite und SS34

5.2 Chemikalien und Enzyme

5.2.1 Substrate

(<i>R,S</i>)-2-Hydroxy-but-3-in (<i>R,S-1a</i>) (<i>R</i>)-2-Hydroxy-but-3-in (<i>R-1a</i>) (<i>S</i>)-2-Hydroxy-but-3-in (<i>S-1a</i>)	Sigma Aldrich (Deisenhofen)
(<i>R,S</i>)-2-Acetoxy-but-3-in (<i>R,S-1b</i>), (<i>R,S</i>)-2-Butyrox-but-3-in (<i>R,S-1c</i>) sowie das Capron- (1d), Capryl- (1e) und 2-Ethyl-Capronsäure-Derivat (1f)	BASF (Ludwigshafen)
(<i>R,S</i>)-1-Methoxy-2-propanol (<i>R,S-2a</i>)	Fluka Chemie (Buchs; Schweiz)
(<i>R</i>)-1-Methoxy-2-propanol (<i>R,S-2a</i>)	Acros (Fisher Scientific; Schwerte)
(<i>R,S</i>)-1-Methoxy-2-propylacetat (<i>R,S-2b</i>)	Fluka Chemie (Buchs; Schweiz)
(<i>R,S</i>)-3-Hydroxy-tetrahydrofuran (<i>R,S-3a</i>) (<i>R</i>)-3-Hydroxy-tetrahydrofuran (<i>R-3a</i>) (<i>S</i>)-3-Hydroxy-tetrahydrofuran (<i>S-3a</i>)	Sigma Aldrich (Deisenhofen)

(<i>R,S</i>)-Pantolacton (<i>R,S</i> - 4a)	
(<i>R</i>)-Pantolacton (<i>R</i> - 4a)	Fluka Chemie (Buchs; Schweiz)
(<i>S</i>)-Pantolacton (<i>S</i> - 4a)	
(<i>R,S</i>)-1-Phenylethanol (<i>R,S</i> - 5a)	
(<i>R</i>)-1-Phenylethanol (<i>R</i> - 5a)	Fluka Chemie (Buchs; Schweiz)
(<i>S</i>)-1-Phenylethanol (<i>S</i> - 5a)	
(<i>R,S</i>)-1-Phenylethylacetat (<i>R,S</i> - 5b)	Sigma Aldrich (Deisenhofen)
(<i>R</i>)-1-Phenylethylacetat (<i>R</i> - 5b)	
(<i>S</i>)-1-Phenylethylacetat (<i>S</i> - 5b)	BASF (Ludwigshafen)

Alle weiteren racemischen bzw. enantiomerenreinen Acetate oder Butyrate wurden aus den korrespondierenden Alkoholen synthetisiert (Kap. 5.6).

5.2.2 Hydrolasen

5.2.2.1 Kommerzielle Hydrolasen

Amano Pharmaceutical (Nagoya, Japan):

Acid Esterase	Quelle ist nicht öffentlich bekannt.
Acylase ACS	Quelle ist nicht öffentlich bekannt.
Amano S	<i>Seaprose</i>
Lipase A	<i>Aspergillus niger</i>
Lipase AH	<i>Pseudomonas cepacia</i>
Lipase AK	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Lipase AY	<i>Candida rugosa</i>
Lipase D	<i>Rhizopus delemar</i>
Lipase F	<i>Rhizopus javanicus</i>
Lipase G	<i>Penicillium cyclopium</i>
Lipase M	<i>Rhizomucor javanicus</i>
Lipase PS	<i>Pseudomonas cepacia</i>
Lipase PS; Amano PS-C	<i>Pseudomonas cepacia</i> ; immobilisiert
Lipase PS; Amano PS-D	<i>Pseudomonas cepacia</i> ; immobilisiert
Lipase R	<i>Penicillium roqueforti</i>
Papain W	<i>Carica papaya L.</i>

Asahi Kasei (Tokio; Japan):

Lipase from <i>Chromobacterium viscosum</i>	<i>Chromobacterium viscosum</i>
---------------------------------------------	---------------------------------

Gist-brocades (Sittard; Niederlande):

Lipase puur *Pseudomonas alcaligenes*

Fluka Chemie (Buchs; Schweiz):

Esterase from hog liver Schweineleber-Esterase (hog liver)
 Lipase from *Candida lipolytica* *Candida lipolytica*
 Lipase from *Rhizopus arrhizus* *Rhizopus arrhizus*
 Lipase from *Rhizopus niveus* *Rhizopus niveus*
 Protease 2A from *Aspergillus oryzae* *Aspergillus oryzae*
 Protease 6 from *Aspergillus niger* *Aspergillus niger*
 Protease from *Bacillus subtilis* *Bacillus subtilis*
 Protease from *Bacillus subtilis* var. A. *Bacillus subtilis* (var. A.)
 Protease N from *Bacillus subtilis* *Bacillus subtilis*

Novo Nordisk (Bagsværd; Dänemark):

SP 382 *Candida antarctica* (Lipase A + B)
 SP 523 *Mucor miehei*
 SP 525 *Candida antarctica* (Lipase B)

Roche Molecular Biochemicals (Mannheim):

Chirazyme L-1; lyo *Pseudomonas cepacia*
 Chirazyme L-1; lyo; c.-f. *Pseudomonas cepacia*; immobilisiert
 Chirazyme L-2; lyo *Candida antarctica* (lipase B)
 Chirazyme L-2; lyo; c.-f.; *Candida antarctica* (lipase B); immobilisiert
 Chirazyme L-2; lyo; c.-f.; C 2 *Candida antarctica* (lipase B); immobilisiert
 Chirazyme L-2; lyo; c.-f.; C 3 *Candida antarctica* (lipase B); immobilisiert
 Chirazyme L-5; lyo *Candida antarctica* (lipase A)
 Chirazyme L-6; lyo *Pseudomonas* sp.
 Chirazyme L-7; lyo Lipase aus Schweine-Pankreas (porcine pancreas)
 Chirazyme L-8; lyo *Humicola* sp.
 Chirazyme L-9; lyo *Rhizomucor miehei*
 Chirazyme L-10; lyo *Alcaligenes* sp.
 Chirazyme L-12; lyo Lipase aus thermophilem Mikroorganismus
 Chirazyme E-1; lyo Schweineleber-Esterase (pig liver)
 Chirazyme E-2; lyo Schweineleber-Esterase (hog liver)

Chirazyme E-3; Iyo	Esterase aus thermophilem Mikroorganismus
Chirazyme E-4; Iyo	Esterase aus thermophilem Mikroorganismus
Lipase aus <i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>
Lipase aus Schweine-Pankreas	Schweine-Pankreas (pig pancreas)

5.2.2.2 Rekombinante Esterasen

Folgende Esterasen wurden durch Überexpression in *E. coli* DH5 α selbst hergestellt:

Esterase	<i>Pseudomonas fluorescens</i> I (PFE) [Krebsfänger et al., 1998a, 1998b; Zocher et al., 1998]
Esterase	<i>Pseudomonas fluorescens</i> II (PFE II) [Khalameyzer et al., 1999]
Esterase	<i>Bacillus stearothermophilus</i> (BSE) [Amaki et al., 1994, 1992; Henke, 2001; Kugimiya et al., 1992; Tulin et al., 1993]

5.2.2.3 Hydrolasen aus thermophilen Mikroorganismen

Diversa (San Diego; USA):

Temperaturoptimum bei RT:	BD094	BD423			
Temperaturoptimum bei 30-40°C:	BD021	BD022	BD027	BD078	BD102
	BD104	BD105	BD133	BD135	BD213
	BD402	BD405	BD473	BD519	BD553
	BD556				
Temperaturoptimum bei 50-65°C:	BD045	BD073	BD120	BD137	BD138
	BD151	BD196	BD197	BD202	BD214
	BD236	BD240	BD265	BD266	BD273
	BD277	BD400	BD421	BD429	BD433
	BD434	BD551			
Temperaturoptimum bei 70-90°C:	BD019	BD036	BD048	BD051	BD064
	BD099	BD100	BD245	BD468	BD544

ThermoGen (Chicago; USA):

Temperaturoptimum bei 35-60°C	E001	E002	E003	E004	E005
	E006	E007	E008	E009	E010
	E011	E012	E013	E014	E015
	E016	E017b	E018b	E019	E020

5.2.3 Chemikalien und Enzyme (mikrobiologische und molekulargenetische Anwendungen)

ARK (Darmstadt)	Oligonucleotide
BASF (Ludwigshafen)	Substrate
R-Biopharm (Darmstadt) urspr. Roche Diagnostics (Penzberg)	Testkit zur Bestimmung des Acetat-Gehalts (Essigsäuregehalts)
Biorad Laboratories (München)	SDS-PAGE-Standard (<i>low molecular weight</i>) Protein-Assay-Kit inkl. BSA-Standard kb-Ladder für Agarose-Gelelektrophorese
DIFCO-Laboratories (Detroit; USA)	Bacto-Trypton; Hefeextrakt
Eppendorf (Hamburg)	für PCR: DNA <i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ μ L), 10 \times <i>Taq</i> -Puffer und MgCl ₂ -Lösung
Fluka Chemie (Buchs; Schweiz)	Agar; Gummi arabicum; Tributyrin; PEG 6000; Coomassie Brilliant Blue R-250; Ethidiumbromid- Lösung (1 % in Wasser); Lysozym (from hen egg white); <i>p</i> -Nitrophenylacetat; Celite 545; Eupergit C
Gibco BRL (Eggenstein)	dNTPs; 1 kb-DNA-Längenstandard (kb-ladder); Agarose
MBI Fermentas (St. Leon-Roth)	Restriktionsendonuclease <i>Bam</i> HI (10 U/ μ L) inkl. Puffer <i>Bam</i> HI ⁺ (10 \times); T4 DNA-Ligase (1 Weiss U/ μ L) inkl. Puffer (10 \times)
Qiagen (Hilden)	Kits für: Spin-Mini-Plasmid-Präparation; Midi-Plasmid-Präparation; (Agarose-)Gelextraktion; Ni-NTA <i>magnetic agarose beads</i>
New England Biolabs (Schwalbach)	Restriktionsendonuclease <i>Nde</i> I (20 U/ μ L)
PE Applied Biosystems (Weiterstadt) Roth (Karlsruhe)	Sequencing Kit <i>BigDye</i> /Ampli <i>Taq</i> DNA-Polymer. FS Ampicillin; Rotiphorese NF-10 \times TBE-Puffer; Rotiphorese NF-Harnstoff; Rotiphorese NF-Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 40 %; Acrylamidlösung für SDS-PAGE
Sigma Aldrich (Deisenhofen)	Kationentauscher: S-Sepharose

Alle weiteren Chemikalien und Lösungsmittel wurden von Fluka Chemie (Buchs; Schweiz) und Sigma Aldrich (Deisenhofen) bezogen; diese entsprachen mindestens der Reinheitsstufe *p.a.* Für den Einsatz bei der organischen Synthese bzw. Biotransformation wurden die Lösungsmittel zuvor über Molekularsieb (3 Å) getrocknet; Pyridin und Acetylchlorid wurden destilliert. Für die Herstellung von Elektrophorese-Puffern, Agarose-Lösungen u.a. wurde bidest. Wasser aus einer

Modulab Bioscience - Research Grade UF / Polishing System Anlage (Christ; Stuttgart) verwendet.

5.3 Lösungen, Medien und Puffer

Soweit nicht anders vermerkt, können alle Medien, Puffer und Lösungen bei Raumtemperatur gelagert werden.

5.3.1 Mikrobiologie und Molekulargenetik

5.3.1.1 Medien für *E. coli*

Soweit nicht anders angegeben wurden sämtliche Medien 20 min bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung fester Nährböden wurden die Medien vor dem Autoklavieren zusätzlich mit Agar und bei Tributyrin- / L-Rhamnose- / Agarplatten darüber hinaus noch mit Tributyrin und L-Rhamnose versetzt. Zur Selektion benötigte Antibiotika (Ampicillin) wird bei Bedarf erst kurz vor dem Gießen der Agarplatten in die auf ca. 45°C abgekühlten Medien oder in die Flüssigmedien gegeben (bei Letzteren unmittelbar vor der Verwendung).

Luria-Bertani Flüssigmedium (LB-Medium):

(modifiziert nach Luria et al., 1960 und Sambrook et al., 1989)

1 % (M/V) Bacto-Trypton, 0,5 % (M/V) Hefeextrakt und 0,5 % (M/V) Natriumchlorid; pH 7,5 einstellen; autoklaviert

Luria-Bertani / Ampicillin Flüssigmedium (LB/AMP-Medium):

Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/mL Ampicillin; sterilgefiltert; Lagerung bei -18°C
100 µg/mL Ampicillin in autoklaviertes LB-Flüssigmedium zusetzen

Luria-Bertani / DMSO / Ampicillin Flüssigmedium (LB/DMSO/AMP-Medium):

(modifiziert nach Mühlhardt, 2000)

5 % (V/V) DMSO in LB-Medium; 100 µg/mL Ampicillin in autoklaviertes LB/DMSO-Flüssigmedium zusetzen

Luria-Bertani / Ampicillin Agarplatten (LB/AMP-Platten):

1 % (M/V) Bacto-Trypton, 0,5 % (M/V) Hefeextrakt, 0,5 % (M/V) Natriumchlorid und 1,5 % (M/V) Agar; autoklavieren; 100 µg/mL Ampicillin zusetzen

Luria-Bertani / Ampicillin / Tributyrin / L-Rhamnose Agarplatten (TB/Rhamnose-Platten):

L-Rhamnose-Lösung: 20 % (M/V) L-Rhamnose in bidest. Wasser; autoklaviert

1 % (M/V) Bacto-Trypton, 0,5 % (M/V) Hefeextrakt, 0,5 % (M/V) Natriumchlorid, 1,5 % (w/v) Agar und 1 % (V/V) Tributyrin; 10 min im Ultraturrax homogenisieren (20000 U/min); autoklavieren; 100 µg/mL Ampicillin und 0,2 % (M/V) L-Rhamnose zusetzen

5.3.1.2 *Isolierung von Plasmid-DNA*

Puffer für die Schnellisolierung von Plasmid-DNA ('Flexi-Plasmidpräparation'):

Lösung A: Resuspendierungs-Puffer

100 mM Tris-HCL (pH 7,5), 10 mM EDTA; autoklavieren; 250 µg/mL RNase zusetzen

Lösung B: Lyse-Puffer

1,0 M Natronlauge, 5,3 % (M/V) SDS

Lösung C: Neutralisations-Puffer

Für 100 mL Lösung: 60 mL 5 M Kaliumacetatlösung, 11,5 mL Eisessig, 28,5 mL Wasser

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA

Puffer für die Isolierung von DNA mit Anionenaustauscher-Säulen (Qiagen-Kits):

Puffer P1: Resuspendierungs-Puffer

50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNase; Lagerung bei 4°C

Puffer P2: Lyse-Puffer

200 mM Natronlauge, 1 % (M/V) SDS

Puffer P3: Neutralisierungs-Puffer

3,0 M Kaliumacetat-Lösung; auf pH 5,5 einstellen

Puffer QBT: Äquilibrierungs-Puffer

750 mM Natriumchlorid, 50 mM MOPS (pH 7,0), 15 % (V/V) Isopropanol, 0,15 % (V/V) Triton X-100

Puffer QC: Wasch-Puffer (QIAfilter Midi)

1,0 M Natriumchlorid, 50 mM MOPS (pH 7,0), 15 % (V/V) Isopropanol

Puffer EB: Elutions-Puffer (QIAprep Spin Miniprep ; QIAquick Gel Extraction)

10 mM Tris-HCl (pH 8,5)

Puffer QF: Elutions-Puffer (QIAfilter Midi)

1,25 M Natriumchlorid, 50 mM Tris-HCL (pH 8,5), 15 % (V/V) Isopropanol

Die Zusammensetzungen von Puffer PE (QIAprep Spin Miniprep; QIAquick Gel Extraction) und Puffer QG (QIAquick Gel Extraction) sind nicht öffentlich bekannt.

5.3.1.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50×)

242 g Tris, 57 mL Eisessig, 0,5 M EDTA (pH 8,0); ad 1 L mit Wasser

DNA-Auftrags-Puffer (6×)

30 % (M/V) Glycerin, 0,2 % (w/v) BPB, 25 mM EDTA (pH 7,5)

Lösung für Agarosegel

4,0 g Agarose, 400 mL TAE-Puffer (1×); nach Aufkochen bei Lagerung bei 80°C

Ethidiumbromid-Färbung:

Zusatz von 0,1 % (V/V) Ethidiumbromid-Stammlösung (Fluka) unmittelbar vor dem Gießen des Agarosegels

kb-Ladder für Agarose-Gelelektrophorese

25 µL Stammlösung (Biorad Laboratories; München), 352 µL TAE-Puffer (1×), 150 µL DNA-Auftrags-Puffer (1×)

5.3.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Sammelgel-Puffer (4×; 'Upper Tris')

12,11 g Tris, 0,8 g SDS; ad 200 mL mit Wasser; mit Salzsäure pH 6,8 einstellen

Sammelgel (4 % Acrylamid)

0,52 mL Acrylamidlösung 30 % (M/V), 1 mL Sammelgel-Puffer (4×), 2,47 mL Wasser, 40 µL APS 10% (M/V), 4 µL TEMED

Trenngel-Puffer (4×; 'Lower Tris')

36,46 g Tris, 0,8 g SDS; ad 200 mL mit Wasser; mit Salzsäure pH 8,8 einstellen

Trenngel (12,5 % Acrylamid)

3,33 mL Acrylamidlösung 30 % (M/V), 2 mL Trenngel-Puffer (4×), 2,67 mL Wasser, 40 µL APS 10 % (M/V); 4 µL TEMED

SDS-Probenpuffer (2×) [Sambrook et al., 1989]

100 mM Tris, 200 mM DTT, 4 % (M/V) SDS, 0,2 % (M/V) BPB, 20 % (V/V) Glycerin; ad 10 mL mit Wasser

Elektrophorese-Puffer

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (M/V) SDS; mit Salzsäure pH 8,4 einstellen

Coomassie-Färbelösung

1 g Coomassie-Brilliant Blue R-250, 300 mL Methanol, 100 mL Eisessig, 600 mL Wasser

Entfärbelösung

300 mL Methanol, 100 mL Eisessig, 600 mL Wasser

Zusammensetzung des *low-molecular-weight*-Standards (Biorad Laboratories; München)

Phosphorylase b (97,4 kDa); Serumalbumin (66,2 kDa); Ovalbumin (45,0 kDa); Carboanhydrase (31,0 kDa); Trypsininhibitor (21,5 kDa); Lysozym (14,0 kDa)

5.3.1.5 Puffer und Lösungen für weitere Anwendungen

TSS-Medium für Transformation [Chung et al., 1989]:

10 % (M/V) PEG 6000, 5 % (V/V) DMSO, 50 mM Magnesiumchlorid in LB-Medium; autoklavieren; Lagerung bei 4°C

Lösungen für die Schnell-Transformation in *E. coli*:

(nach www.nwfsc.noaa.gov/protocols/rbcl.html)

Lösung TfbI

30 mM Kaliumacetat, 100 mM Rubidiumchlorid, 10 mM Calciumchlorid, 50 mM Mangan(II)chlorid, 15 % (V/V) Glycerin; pH 5,8 mit verdünnter Essigsäure einstellen

Lösung TfbII

10 mM MOPS, 75 mM Calciumchlorid, 10 mM Rubidiumchlorid, 15 % (V/V) Glycerin; pH 6,5 mit verdünnter Natronlauge einstellen

error-prone PCR:

Primer-Lösungen:

Lösungen mit jeweils einer Konzentration von 100 µM Oligonucleotid

dNTP-Lösung

je 10 mM Endkonzentration der nicht-limitierenden dNTPs; 2 mM des limitierenden dNTP; Lagerung bei -18°C

PCR-Reaktionspuffer

100 mM Tris-HCL (pH 8,3), 15 mM Magnesiumchlorid

weitere Lösungen für *error-prone* PCR

25 mM Magnesiumchlorid-Lösung
5 mM Mangan(II)chlorid-Lösung

Lösungen für Polyacrylamidgel (DNA-Sequenzierung):

5,25 % Polyacrylamidgel

18,0 g Rotiphorese NF-Harnstoff, 6,6 mL Rotiphorese NF-Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 5,0 mL Rotiphorese NF-10× TBE-Puffer; ad 50 mL mit bidest. Wasser

Resuspensionslösung für DNA-Sequenzierung

80% (V/V) Formamid, 20% (V/V) EDTA-Lösung (25 mM, pH 8,0)

Farb-Reagenz Konzentrat für die Proteingehaltsbestimmung [Bradford, 1976]:

Coomassie Brilliant Blue G-250 in einer Phosphorsäure-Methanol-Lösung (Biorad Laboratories Protein Assay)

Aufreinigung mit Ni-NTA *magnetic agarose beads* in Mikrotiterplatten:

Lyse-Puffer

50 mM Natriumdihydrogenphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 10 mM Imidazol,

0,05 % Tween20; pH 8,0 mit 0,1 n Natronlauge einstellen
vor Verwendung Lysozym (1 mg/mL Endkonzentration) zugeben

Wasch-Puffer

wie Lyse-Puffer, aber 20 mM Imidazol

Elutions-Puffer

wie Lyse-Puffer, aber 250 mM Imidazol

Lysozym-Aufschluß von *E. coli* DH5 α im Mikrotiterplattenformat:

10 mM Phosphat-Puffer (pH 7,3) mit 1 mg/mL Lysozym

5.3.2 Biotransformationen und chemische Synthesen

DC-Tauchreagenz:

25 g Molybdänphosphorsäure, 10 g Cer-(IV)-sulfat, 80 mL konz. Schwefelsäure, ad 1 L mit Wasser auffüllen.

Fließmittelgemische (DC-Entwicklung bzw. Säulenreinigung an Kieselgel):

Pantolacton (**1a**) und Pantolactonacetat (**1b**):

Petrolether / Ethylacetat 3 : 1 (V/V)

2-Hydroxy-but-3-in (**2a**) und 2-Butyroxy-but-3-in (**2c**):

n-Pentan / Diethylether 20 : 1 (V/V)

1-Methoxy-2-propanol (**3a**) und 1-Methoxy-2-propylacetat (**3b**):

n-Pentan / Diethylether 5 : 1 (V/V)

3-Hydroxy-tetrahydrofuran (**4a**) und 3-Acetoxy-tetrahydrofuran (**4b**):

Petrolether (tiefsiedend) / Ethylacetat 3 : 1 (V/V)

Ethylacetat-Assay-Lösung für den pH-stat:

10 g Ethylacetat, 4 g Gummi arabicum werden mit 200 mL deion. Wasser für 10 min im Ultraturrax emulgiert.

5.3.3 Acetat-Assay

Lösung 1

32 mL Lösung aus Triethanolamin-Puffer (pH 8,4), 134 mg L-Äpfelsäure, 67 mg Magnesiumchlorid, Stabilisatoren; Lagerung bei 4°C

Lösung 2

7 mL Lösung mit 175 mg ATP, 18 mg CoA, 86 mg NAD, Stabilisatoren; Lagerung bei 4°C; 4 Wochen haltbar

Suspension 3

400 μL Suspension aus 1100 U L-Malat-Dehydrogenase, 270 U Citrat-Synthase; Lagerung bei 4°C

Lösung 4

250 μL Lösung mit 5 U Acetyl-CoA-Synthetase; Lagerung bei 4°C; 5 Tage haltbar

Mischung der Komponenten des Acetat-Kits:

Die Mischung der Lösungen 1,2 und 4 sowie der Suspension 3 für den Acetat-Assay erfolgte in Anlehnung an das Protokoll zur Bestimmung des Essigsäuregehalts in Lebensmitteln:

Lösung 1 (Triethanolamin-Puffer; L-Äpfelsäure; MgCl_2 ; Stabilisatoren):	100
Lösung 2 (ATP; CoA; NAD):	20
bidest. Wasser	190
Suspension 3 (L-Malat-Dehydrogenase)	1
Lösung 4 (Acetyl-CoA-Synthetase)	2

Die Angaben beziehen sich auf das Verhältnis der Volumina der Lösungen 1,2 und 4 mit bidest. Wasser und der Suspension 3. Die Mischung besitzt einen pH-Wert von 8,1.

5.4 Gaschromatographie

Die Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse (%*ee*-Werte) der Modellverbindungen **1a** – **4b** erfolgte durch gaschromatographische Analyse (Tab. 5-1) mit Wasserstoff als Trägergas. Die Injektor- bzw. Detektor-Temperatur (200, 230 bzw. 250°C) war jeweils abhängig vom verwendeten Gaschromatograph.

Tab. 5-1 Übersicht über die GC-Temperaturprogramme zur Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse der Modellverbindungen **1a** – **4b**.

Substrat	Säule	Temperaturprogramm						Trägergas [psi]	Retentionszeiten der Enantiomere					
		T ₁ [°C]	Iso ₁ [min]	Ramp ₁ [°C/min]	T ₂ [°C]	Iso ₂ [min]	Ramp ₂ [°C/min]		T ₃ [°C]	Iso ₃ [min]	[min]	[min]		
1a	I	50	30	10	170	5		4	10,2	(S)	11,6	(R)		
	II	60	12	10	180	5		12	6,6	(R)	6,9	(S)		
1b	I	50	30	10	170	5		4	5,5	(R)	6,9	(S)		
	II	60	12	10	180	5		12	8,8	(R)	9,4	(S)		
	IV	50	30	10	170	5		4	6,7	(R)	9,7	(S)		
1c	I	50	30	10	170	5		4	14,7	(R)	17,2	(S)		
	II	60	12	10	180	5		12	17,5	(R)	17,7	(S)		
2a	I	32	∞					3	30,8	(?)	33,9	(?)		
2a deriv.	II	50	15	5	90	10	10	180	5	8	12,1	(R)	12,3	(S)
2b	I	32	∞						3	47,8	(?)	50,8	(?)	
	II	50	15	5	90	10	10	180	5	8	24,9	(S)	25,9	(R)

Fortsetzung Tab. 5-1

Substrat	Säule	Temperaturprogramm								Trärgas [psi]	Retentionszeiten der Enantiomere	
		T ₁ [°C]	[psi]	Ramp ₁ [°C/min]	T ₂ [°C]	Iso ₂ [min]	Ramp ₂ [°C/min]	T ₃ [°C]	Iso ₃ [min]		[min]	[min]
3a	I	80	10	10	110	10	10	170	5	8	17,7 (?)	18,7 (?)
	II	60	12	10	180	5				12	20,2 min (R,S)	
	III	60	10	5	170	5				10	13,8 min (R,S)	
	IV	110	15	10	170	5				5	11,3 (S)	12,4 (R)
3b	I	80	10	10	110	10	10	170	5	8	7,0 (?)	8,1 (?)
	II	60	12	10	180	5				12	20,8 (R)	21,0 (S)
	III	60	10	5	170	5				10	14,6 (R)	15,3 (S)
	IV	110	15	10	170	5				5	3,2 min (R,S)	
4a	I	130	10	4	170	5				9	20,9 (R)	21,9 (S)
	II	150	10	5	190	5				15	7,5 (?)	7,7 (?)
	III	130	15	10	170	5				4	12,2 (S)	12,7 (R)
	IV	130	10	4	170	5				9	15,3 (R)	15,8 (S)
4b	I	130	10	4	170	5				9	7,9 (R)	10,9 (S)
	II	150	10	5	190	5				15	10,3 min (R,S)	
	III	130	15	10	170	5				4	13,4 (?)	13,8 (?)
	IV	130	10	4	170	5				9	4,5 (R)	5,1 (S)
5a	II	110	5	5	180	5				11	11,9 (R)	12,1 (S)
5b	II	110	5	5	180	5				11	12,4 (S)	12,6 (R)

5.5 Mikrobiologische und molekulargenetische Techniken und Methoden

5.5.1 Stammhaltung, Bakterienanzucht und Expression

Der *Escherichia coli*-Stamm DH5 α [F⁻ *endA1 hsdR17* (rk⁻, mk⁺) *supE44 thi-1 λ^- gyrA96 relA1 Δ (argF-lacZya)U169*] von Clontech Laboratories (Heidelberg) wurde für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten mikrobiologischen und molekulargenetischen Arbeiten eingesetzt. Eine Resistenz von *E. coli* DH5 α gegen Antibiotika (β -Lactame), lässt sich u.a. durch Transformation (Kap. 5.5.5.2) mit dem Plasmid pJOE2792 (Kap. 6.3) [Krebsfänger et al., 1998a, 1998b] erreichen. Als Selektionsmarker (Hemmstoff) kann somit Ampicillin eingesetzt werden.

5.5.1.1 Stammhaltung [Sambrook et al., 1989]

Um Reinkulturen zu erhalten, wurden Verdünnungsausstriche auf LB/AMP-Platten hergestellt, diese über Nacht bei 37°C inkubiert, luftdicht verschlossen und bei 4°C gelagert. Alle 4 - 6 Wochen wurden die relevanten Stämme auf neue Agarplatten überimpft und visuell auf Reinheit und Identität überprüft. Die Herstellung von *E. coli* Dauerkulturen erfolgte durch Animpfen von 3 mL LB/AMP-Medium mit einer Einzelkolonie, Inkubation (37°C, 200 Upm) über Nacht und

anschließender Verdünnung eines 500 µL Aliquots dieser Kulturlösung mit 500 µL Glycerin (87 %; autoklaviert). Bei -80°C sind diese Glycerol-Stocks über Jahre haltbar.

5.5.1.2 Bakterienanzucht

Ausgehend von einer Dauerkultur oder einer Einzelkultur wurden 3 mL LB/AMP-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert (37°C, 200 Upm). Die Inokulation der Hauptkulturen in LB/AMP-Medium erfolgte im Verhältnis 1:1000 aus diesen Vor- bzw. Übernacht-Kulturen. Die weitere Kultivierung bis zur gewünschten Zelldichte wurde ebenfalls bei 37°C und 200 Upm im Inkubator durchgeführt. Durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) lässt sich das Wachstum der Kulturen kontrollieren. Für *E. coli* gilt allgemein: Anzahl der Zellen / mL ist gleich $OD_{600} \times 5 \times 10^8$.

Die Anzucht und Kultivierung von *E. coli* DH5 α zur Herstellung von kompetenten Zellen (Kap. 5.5.5.2) erfolgte in reinem LB-Medium.

5.5.1.3 Expression der Esterase I aus *Pseudomonas fluorescens* [Krebsfänger et al., 1998b]

In einem 2 L Erlenmeyer-Kolben mit Schikane wurde eine 500 mL Kultur (Kap. 5.5.1.2) von *E. coli* DH5 α , die das Plasmid pJOE2792 tragen, beim Erreichen der frühen Exponentiellen Phase ($OD_{600} \approx 0,5 - 0,6$; ca. 4 h) mit 5 mL L-Rhamnose-Lösung (20 %; V/V) induziert. Nach Expression über Nacht (37°C, 200 Upm, ca. 16 h), wurden jeweils 250 mL dieser Kultur separat abzentrifugiert (4°C, 6000 g, 10 min), die Zellpellets 2 \times mit Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5, 4°C) gewaschen, in 15 mL Phosphat-Puffer resuspendiert und bei -18°C über Nacht eingefroren. Der Aufschluss der Zellen erfolgte nach dem Auftauen auf Eis mit Ultraschall (2 \times 1 min; duty cycle 35 % s⁻¹, output control 4; Eiskühlung). Schließlich wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (4°C, 3220 g, 10 min), die Überstände vereinigt und lyophilisiert.

Die Herstellung der Esterase II aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE II) und der Esterase aus *Bacillus stearothermophilus* (BSE) erfolgte analog. Als Expressionsvektor diente in beiden Fällen ebenfalls pJOE2792.

5.5.1.4 Optimierung des Zellaufschlusses

Für die Optimierung des Zellaufschlusses wurde eine Parallelbestimmung mit fünf Ansätzen (A - E) zur Herstellung der Esterase I aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE) nach Kap. 5.5.1.3

durchgeführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte hierbei durch unterschiedliche Protokolle (Tab. 3-2). Nach Resuspension der Ansätze in Phosphat-Puffer wurden A + B sofort mit Ultraschall (duty cycle 35 % s⁻¹, output control 4; Eiskühlung) behandelt, wogegen C – E zusätzlich über Nacht bei -18°C gelagert wurden. Anschließend wurde mit Ultraschall behandelt (Ansatz C), sofort abzentrifugiert (Ansatz D) oder erneut bei -18°C kurz eingefroren (Ansatz E). Nach Entfernung der Zelltrümmer durch Abzentrifugieren (4°C, 3220 g, 10 min) und Lyophilisation der Überstände ließen sich die unterschiedlichen Aufschlussbedingungen durch eine Aktivitätsmessung (Kap. 5.5.6.3.1) der fünf unterschiedlichen Präparationen vergleichen.

5.5.1.5 Stammhaltung, Bakterienanzucht und Expression in Mikrotiterplatten

Die Stammhaltung (Dauerkultur) der Klone einer Mutanten-Bibliothek erfolgte in Mikrotiterplatten mit 384 Vertiefungen (Nunc; Wiesbaden). Hierzu wurden 80 µL LB/DMSO/AMP-Medium pro Vertiefung vorgelegt, mit je einer einzelnen Kolonie (Klon) inokuliert, über Nacht inkubiert (37°C, 200 Upm) und anschließend bei -80°C eingefroren.

Für das Screening nach Mutanten mit verbesserten Eigenschaften, wurde kurzzeitig bei RT aufgetaut und auf Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (200 µL LB/AMP-Medium pro Vertiefung) übergeimpft. Nach Inkubation (37°C, 200 Upm, ca. 7 h) bis zu einem Anstieg der optischen Dichte bei 580 nm um 0,25 Extinktionseinheiten lässt sich durch Zugabe von 20 µL L-Rhamnose-Lösung (2 %; V/V) je Vertiefung die Produktion der PFE induzieren. Die Expression (37°C, 200 Upm) wurde durch Zentrifugation (4°C, 3220 g, 10 min) nach 16 h gestoppt, die Überstände abdekantiert und die Zellpellets direkt für das Screening (Kap. 5.7.2.3) eingesetzt.

5.5.2 Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA

5.5.2.1 Isolierung und Reinigung von Plasmid DNA aus E. coli

5.5.2.1.1 Schnellisolierung von Plasmid-DNA [Birnboim und Doly, 1979]

Prinzip:

Mit dieser Methode wird Plasmid-DNA für Anwendungen isoliert, die weder besonders viel noch besonders reine DNA erfordern (z.B. analytischer Restriktionsverdau). Sie beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Nach vollständiger Lyse der Zellmembran mit Hilfe von SDS wird

die enthaltene RNA durch Natronlauge und RNase A hydrolysiert, während die chromosomale DNA und die Plasmid-DNA denaturieren. Durch Absenken des pH-Werts renaturiert die Plasmid-DNA, während die chromosomale DNA ein Netzwerk bildet, das zusammen mit den Proteinen ein Präzipitat bildet, das sich durch Abzentrifugieren entfernen lässt. Die Plasmid-DNA bleibt in Lösung und kann durch Isopropanolfällung konzentriert und gereinigt werden.

Durchführung:

2 mL einer Übernacht-Kultur (5.5.1.2) wurden in einem 2 mL Kunststoffreaktionsgefäß abzentrifugiert (20800 g, 1 min), das entstandene Pellet in 200 µL Lösung A resuspendiert, mit 200 µL Lösung B versetzt und vorsichtig durch Schütteln vermischt. Nach Zugabe von 200 µL Lösung C und mehrmaligem Invertieren des Gefäßes bildete sich ein Präzipitat aus chromosomaler DNA, Zelltrümmern und Proteine, welches sich abzentrifugieren (20800 g, 5 min) lässt. Die überstehende Lösung wurde in ein frisches Gefäß überführt, die Plasmid-DNA durch Zugabe von 420 µL Isopropanol gefällt, 10 min bei RT stehen gelassen und abzentrifugiert (4°C, 20800 g, 20 min). Zum Waschen des Pellets wurde mit 200 µL Ethanol (70 %, V/V) überschichtet, 5 min stehen gelassen, abzentrifugiert (4°C, 20800 g, 5 min), der Überstand abdekantiert und das Pellet im Vakuum (SpeedVac; 45°C, 5 min) getrocknet. Nach Resuspension des Pellets in 20 µL TE-Puffer ließ sich die Plasmid-DNA-Lösung bei -18°C aufbewahren.

5.5.2.1.2 Isolierung reiner Plasmid-DNA mit Ionenaustauschersäulen

Prinzip:

Für Anwendungen, die besonders reine Plasmid-DNA erfordern (PCR-Reaktionen; Sequenzierung; präparativer Restriktionsverdau) wird diese Präparationsmethode verwendet. Sie beruht ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Zellen (Kap. 5.5.2.1.1). Nach Abtrennung anderer Zellbestandteile wird die Plasmid-DNA über eine Ionenaustauschersäule gereinigt. Die spezifische Bindung der negativ geladenen DNA erfolgt an einem Anionentauscher. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt mit kommerziell erhältlichen Kits (Qiagen; Hilden).

Durchführung:

Mini-Plasmid-DNA-Isolierung (bis 20 µg Plasmid-DNA; QIAprep Spin Miniprep)

Nach Abtrennung der Zellen einer Übernacht-Kultur (Kap. 5.5.1.2) durch Zentrifugation (20800 g, 1 min) und Verwerfen des Kulturüberstandes erfolgte die weitere Durchführung der Plasmid-Isolierung entsprechend des QIAprep Spin Miniprep Protokolls für die Verwendung einer Zentrifuge.

Midi-Plasmid-DNA-Isolierung (bis 100 µg Plasmid-DNA; QIAgen Midi Plasmid Purification)

Eine 50 mL Übernacht-Kultur (Kap. 5.5.1.2) wurde abzentrifugiert (4°C, 3220 g, 10 min) und die Plasmid-Isolierung entsprechend dem QIAfilter Midi Protokoll durchgeführt. Die Elution im letzten Schritt des Protokolls erfolgte mit 250 µL Wasser.

5.5.2.2 *Präzipitation von DNA mit Alkohol*

Prinzip:

Die Präzipitation mit Alkohol ist eine einfache Möglichkeit zur Konzentrierung oder Reinigung von DNA. Dabei ist die Fällung der DNA aus wässrigen Lösungen mit Ethanol üblich. In Anwesenheit von Alkohol und einem monovalenten Salz bildet die DNA bei niedrigen Temperaturen ein Präzipitat, das sich durch Zentrifugation pelletieren lässt. Durch anschließendes Waschen mit Ethanol (70 %, V/V) lassen sich Salzreste entfernen. Ein Nebeneffekt der Methode ist, dass neben dem Salz auch viele andere kleine, wasserlösliche Substanzen im Überstand gelöst bleiben, so dass ein gewisser Reinigungseffekt erzielt wird.

Durchführung:

Ethanol-Fällung

Zu einer DNA-Lösung wurden 10 % (V/V) 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8) und Ethanol zugesetzt, so dass die Endkonzentration an Alkohol 70 % (V/V) betrug. Nach kurzem Mischen wurde die Lösung 1 h bei -80°C gehalten, abzentrifugiert (4°C, 20800 g, 30 min), der Überstand entfernt, das Pellet mit 500 µL Ethanol (70 %, V/V) überschichtet und 5 min bei RT stehen gelassen. Schließlich ließ sich das Pellet nach dem Abzentrifugieren (4°C, 20800 g, 15 min), Entfernung der Überstandes und Trocknung im Vakuum (SpeedVac; 45°C, 5 min), in reiner Form isolieren. Schließlich wurde die DNA in einer geeigneten Menge Wasser (20 µL) gelöst und bei -18°C gelagert.

Isopropanol-Fällung

Diese Methode zur Konzentrierung wird angewendet, wenn die DNA-Fällung in größeren Volumina erfolgt (z.B. Midi-Plasmid-DNA-Isolierung; Kap. 5.5.2.1)

5.5.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration [Mühlhardt, 2000]

Prinzip:

Die Menge der ultravioletten Strahlung, die von einer DNA-Lösung absorbiert wird, ist ihrem DNA-Gehalt direkt proportional. Bei Verwendung von Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm lässt sich die Konzentration folgendermaßen berechnen:

$$\text{doppelsträngige DNA-Moleküle: } c(\text{dsDNA}) = \text{OD}_{260} \times 50 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Anhand der UV-Absorption kann auch die Reinheit einer DNA-Präparation überprüft werden. Bei einer reinen DNA-Probe liegt das Verhältnis der Extinktion bei 260 und 280 nm bei 1,8. Geringere Werte weisen auf eine Verunreinigung z.B. mit Protein hin.

Durchführung:

2 μL einer nach Kap. 5.5.2.1 erhaltenen DNA-Lösung wurde mit 48 μL Wasser verdünnt und die UV-Absorption gegen das reine Lösungsmittel (Wasser) als Referenz gemessen.

5.5.3 error-prone PCR [Cadwell und Joyce, 1992; Leung et al., 1989; Vartanian et al., 1996]

Prinzip:

Die Polymerasenkettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nucleinsäuren, d.h. spezifische DNA-Sequenzen können *in vitro* in einem einzigen Reaktionszyklus mit hoher Ausbeute amplifiziert werden [Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1985, 1988]. Das Reaktionsprinzip entspricht der Replikation in der Zelle: eine DNA-Polymerase synthetisiert neue DNA an einer vorhandenen Nucleinsäure-Matrize (Template). Neben der Hitze-unempfindlichen DNA-Polymerase, sind dabei die Zugabe der Desoxyribonucleotide (dNTPs) sowie zwei kurze, synthetisch hergestellte Oligonucleotide nötig. Diese Oligonucleotide (Primer) haben die Aufgabe, als Startpunkte für die DNA-Replikation zu dienen. Sie sind aus den flankierenden

Bereichen des Templates abgeleitet, d.h. das zu amplifizierende DNA-Fragment liegt zwischen ihnen.

Die Vervielfältigung der DNA wird durch eine Dreischrittsequenz erreicht, die üblicherweise 20 bis 30 mal durchlaufen wird:

1. Denaturierung: Die zu amplifizierende DNA wird bei einer Temperatur ($> 90^{\circ}\text{C}$) in ihre Einzelstränge aufgetrennt.

2. Primer-Anlagerung (Annealing): Die Primer lagern sich bei einer Temperatur von 37 bis 72°C (abhängig von der Sequenz) an die Zielregionen der DNA-Einzelstränge an. An der so gebildeten Bereichen doppelsträngiger DNA beginnt die Polymerase mit der Synthese.

3. Synthese (Extension): Bei 72°C (Optimum für die Polymerase aus *Thermus aquaticus*) verlängert die Polymerase die gebildeten Bereiche doppelsträngiger DNA in 5' – 3'-Richtung; das Template wird kopiert.

Für eine erfolgreiche Amplifikation ist es erforderlich, die Bedingungen so zu wählen, dass die Fehlerrate beim Einbau der Nucleotide durch die Polymerase so niedrig wie möglich gehalten wird. Unter optimalen Bedingungen liegt die Fehlerrate bei 0,001 bis 0,02 % [Cadwell und Joyce, 1992; Tindall und Kunkel, 1988]. Die Fehler sind dabei über das ganze Produkt verteilt. Hauptsächlich tritt ein Austausch der Basen, bevorzugt Cytosin gegen Thymin, auf, Deletionen oder Insertionen einer Base kommen sehr selten (1 Leserastermutation / 50000 Basen), komplexere Mutationen gar nicht vor.

Durch gerichtete Mutagenese mittels PCR ist die Parallelerzeugung vieler Mutanten und damit ein Protein-Engineering zur Untersuchung der Funktionalität von Proteindomänen in Bezug auf ihre Wirkung möglich geworden. Darüber hinaus lassen sich durch Zufallsmutagenese die Eigenschaften eines Genprodukts, d.h. eines Proteins bzw. im Spezialfall eines Biokatalysators, verändern. Eine Durchführung der PCR unter suboptimalen Bedingungen, die zu einer Erhöhung der Mutationsrate führt, wird als *error-prone* (fehlerhafte) PCR (*epPCR*) bezeichnet. So lässt sich durch Zusatz von Mangan(II)chlorid und dNTP-Mischungen, bei denen einzelne Basen signifikant im Überschuss enthalten sind, die Fehlerrate bei der Amplifikation auf über 1 % steigern. Die *error-prone* PCR stellt die wichtigste Methode bei der gerichteten Evolution von Enzymen dar.

Durchführung:

Zu 10 μL PCR-Reaktionspuffer in einem 500 μL Kunststoffreaktionsgefäß wurden jeweils 1 μL Primer (*epPFE 1*), 1 μL Primer (*epPFE 2*), ein Aliquot DNA-Lösung (0,1 μg DNA-Matrize), 10 μL dNTP-Lösung (üblicherweise bei 4 Parallelansätzen je ein anderes dNTP im Unterschuss), 23 μL Magnesiumchlorid- und 10 μL Mangan(II)chlorid-Lösung zugesetzt. Nach Zugabe von 5 U *Taq*-DNA-Polymerase wurde der Ansatz mit Wasser ad 100 μL aufgefüllt, die *error-prone* PCR-Lösung anschließend in den Thermocycler eingestellt und das Temperaturprogramm gestartet (Tab. 5-2).

Tab. 5-2: Temperaturprogramm für die *error-prone* PCR (Lid-Temperatur des Thermocyclers: 105°C; Abkühlung des Thermoblocks nach Ablauf des PCR-Programms auf 8°C)

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95	10,0	1
Denaturierung	95	1,5	
Anlagerung	62	1,5	25
Extension	72	6,0	
Synthese	72	10,0	1

5.5.4 Charakterisierung von DNA-Molekülen

5.5.4.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese [Sambrook et al., 1989; Sharp et al., 1973]

Prinzip:

Die Agarose-Gelelektrophorese ist die einfachste und effektivste Methode, DNA-Fragmente voneinander zu trennen und zu identifizieren. Das Prinzip beruht auf der Wanderung der negativ geladenen DNA-Moleküle (Phosphat-Reste) bei Anlegung eines elektrischen Feldes (Gleichspannung). Die Auftrennung (analytisch oder präparativ) der Fragmente ist abhängig von der Größe (Molekulargewicht) und der Konformation der DNA-Moleküle. Zirkulare DNA-Fragmente besitzen bei gleicher Anzahl an Basen eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit als lineare Fragmente und legen somit eine größere Strecke im Agarosegel zurück. Darüber hinaus wird die Wanderungsgeschwindigkeit vom Agarosegehalt des Gels beeinflusst. Um die aufgetrennten DNA-Banden sichtbar zu machen, wird beim Gießen des Agarosegels Ethidiumbromid zugesetzt, welches in die DNA-Helices interkaliert und im UV-Durchlicht eines

Transilluminators fluoresziert [LePecq und Paoletti, 1967]. Es ist hierbei zu beachten, dass bei Anlegung eines elektrischen Feldes das positiv geladene Ethidiumbromid entgegengesetzt zur DNA in Richtung der Kathode wandert, so dass kleinere DNA-Moleküle bei gleicher Konzentration ein schwächeres Signal geben. Weiterhin wandern zirkuläre Plasmide aufgrund ihrer kompakten Struktur (*super-coiled*) schneller als lineare DNA-Fragmente gleicher Größe. Die Zuordnung der DNA-Banden erfolgt über einen Vergleich mit einem externen Längenstandard (kb-ladder).

Ein Aliquot (analytisch) bzw. die gesamte (präparativ) DNA-Probe wird mit einer Bromphenolblau-Glycerin-Lösung (DNA-Auftrags-Puffer) im Verhältnis 1:1 bis 5:1 (V/V) vermischt und aufgetragen. Das Glycerin erhöht hierbei die Dichte, so dass die Proben in die angelegten Taschen im Agarosegel absinken. Der negativ geladene Farbstoff Bromphenolblau dient als Indikator, welcher die zurückgelegte Laufstrecke im elektrischen Feld anzeigt.

Für präparative Trennungen können die Banden anschließend aus dem Agarosegel ausgeschnitten, die DNA isoliert und gereinigt werden. Nach Auflösung des Agarosegels in einem geeigneten Puffersystem erfolgt die weitere Behandlung der DNA-Lösung entsprechend Kap. 5.5.2.1.2.

Durchführung:

40 mL 1 % Agarose-Lösung (M/V) wurden mit 4 µL Ethidiumbromid-Stammlösung vermischt und auf einen Gelträger mit eingesetztem 'Probentaschenkamm' gegossen. Aus dem erstarrten Agarosegel (ca. 20 min) konnte der 'Kamm' entfernt und das Agarosegel in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt werden. Nach Überschichtung mit TAE-Puffer wurden die mit dem Auftrags-Puffer vermischten DNA-Proben in die Taschen eingefüllt und eine konstante Spannung von 120 V für 40 min angelegt. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte im UV-Durchlicht eines Transilluminators. Zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert und bei präparativer Trennung die gewünschten Banden ausgeschnitten. Die anschließende Isolierung und Reinigung der DNA erfolgte entsprechend des QIAquick Gel Extraction Kit Protokolls für die Verwendung einer Zentrifuge (Kap. 5.5.2.1.2).

5.5.4.2 Restriktionsspaltung von DNA

Prinzip:

Restriktionsendonucleasen ermöglichen es, DNA sequenzspezifisch zu schneiden. Die Restriktionsspaltung erzeugt Fragmente, die nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel anhand des Bandenmusters Rückschlüsse auf die Sequenz der untersuchten DNA zulassen. So lässt sich z.B. schnell und einfach überprüfen, ob ein DNA-Molekül (Plasmid) ein bestimmtes Fragment (Gen) enthält oder nicht. Die Analytische Restriktionsspaltung kann somit einen ersten Aufschluss geben, ob eine Klonierung erfolgreich war. Diese analytische Kontrolle erfolgt üblicherweise in einem Reaktionsvolumen von 10 µl.

Die präparative Restriktionsspaltung dient dazu, einen Vektor und ein DNA-Molekül (Insert; Gen) mit definierten Endonucleasen so zu spalten, dass nach Aufreinigung (Agarose-Gelelektrophorese) eine Ligation (Kap. 5.5.5.1) der beiden geschnittenen Fragmente an den kompatiblen Schnittstellen möglich ist.

Durchführung: (Werte für die analytische Restriktionsspaltung sind in Klammern gesetzt.)

Zu 20 µL (4 µL) einer DNA-Präparation nach Kap. 5.5.2.1 oder 5.5.2.2 bzw. zu 100 µL einer DNA-Lösung im Anschluss an eine *error-prone* PCR (Kap. 5.5.3) wurden 2 µL (0,5 µL) *Bam*HI, 5 µL (0,5 µL) *Nde*I, 10 µL (1 µL) Puffer *Bam*HI⁺ zugesetzt und auf 100 µL (10 µL) mit Wasser aufgefüllt. Die Restriktionsspaltung erfolgte bei 37°C. Nach 2 h (1 h) wurde die Restriktionsspaltung gestoppt (Abkühlung auf < 0°C) und eine DNA-Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 5.5.4.1) durchgeführt.

5.5.4.3 Sequenzierung

Prinzip:

Die Sequenzierung der DNA erfolgt nach der von Sanger entwickelten enzymatischen Ketten-Abbruch-Methode [Sanger et al., 1977], die auch als 'Enzymatische DNA-Sequenzierung' oder 'Didesoxy-Sequenzierung' bezeichnet wird. Die Methode beruht auf der enzymatischen Synthese einer komplementären Kopie des zu sequenzierenden, einzelsträngigen Matrizenstrangs. Hierbei werden unterschiedlich lange DNA-Fragmente durch kontrollierte Unterbrechung der Amplifikation mittels spezifischer Terminatoren (2',3'-Didesoxynucleosid-5'-triphosphate;

ddNTPs), die zusätzlich zu den 2'-Desoxynucleotiden im Reaktionsansatz enthalten sind, erzeugt. Aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe der ddNTPs, bricht die Kettenverlängerung eines entstehenden DNA-Fragments nach dem statistischen Einbau dieses Terminator ab, da die Ausbildung einer Phosphodiester-Bindung zu einem weiterem Nucleotid nicht mehr möglich ist. Bei der ursprünglich entwickelten Sanger-Methode wurden 4 separate Reaktionen, jede mit einem anderem, radioaktiv markiertem ddNTP als Terminator angesetzt und anschließend nebeneinander durch Polycrylamidgel-Elektrophorese analysiert. Hierbei lassen sich DNA-Moleküle trennen, die sich in der Länge nur um ein Nucleotid unterscheiden. Aus der Abfolge der Banden im Autoradiogramm lässt sich direkt die DNA-Sequenz ablesen.

Als Variante der Sanger-Methode werden an Stelle von radioaktiv markierten ddNTPs, Terminatoren mit Fluoreszenzmarkern eingesetzt [Ansorge et al., 1987; Freeman et al., 1990], wobei jedes der 4 Didesoxy-Nucleotide mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff kovalent verbunden ist. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die so markierten DNA-Fragmente zusammen in einer Spur des Polyacrylamidgels aufgetragen werden können [Prober et al., 1987]. Die Detektion bei dieser Vierfarbentechnik erfolgt durch 2 Argonlaser mit Emissionsbanden von 488 und 514 nm. Das senkrecht hierzu emittierte Fluoreszenzlicht wird von Photodioden hinter dem Gel gemessen und die Datenauswertung erfolgt online durch ein angeschlossenes EDV-System.

Eine weitere Steigerung der Effizienz und des Durchsatzes lässt sich durch die Verwendung thermostabiler Polymerasen erreichen. Diese Methode erfolgt analog zur PCR (Kap. 5.5.3). Bei der enzymatischen Sequenzierung wird eine DNA-Replikation bis zum statistischen Einbau eines Fluoreszenz-markierten ddNTPs, mit einem Primer über mehrere Zyklen durchgeführt. Aufgrund der wiederholten Synthese neuer DNA-Fragmente sind nur geringe Mengen an Ausgangs-DNA erforderlich. Darüber hinaus lassen sich durch die Verwendung jeweils nur eines Primers die beiden komplementären Sequenzen eines doppelsträngigen DNA separat analysieren.

Eine weitere Verbesserung dieser *Cycle-Sequencing-Methode* lässt sich auch durch spezielle DNA-Polymerasen erreichen. PE Applied Biosystems (Weiterstadt) bietet hierfür die sogenannte *AmpliTag*-Polymerase FS an. Es handelt sich hierbei um eine Doppelmutante der bekannten *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase; Kap. 5.5.3), deren 5'-3'-Nuclease-Aktivität (Mutation G46D) verringert und die Akzeptanz gegen Didesoxynucleotide (Mutation F667Y) erhöht wurde.

Durchführung:

Gießen des Polyacrylamidgels

Die Lösung für das Polyacrylamidgel (Kap. 5.3.1.5) wurde durch eine Membran (0,2 µM) filtriert, und entgast. Der Start der Polymerisation erfolgte durch Zusatz von 24 µL TEMED und 180 µL 10 % (M/V) APS. Zum Aushärten des Gels wurde die Lösung umgehend zwischen die durch Abstandshalter (Spacer) getrennten, gründlichst gereinigten Glasplatten gegossen, der 'Vorkamm' eingesetzt und die Platten während der zweistündigen Polymerisationszeit abgedichtet. Anschließend tauschte man den 'Vorkamm' gegen den sogenannten 'Haifisch-Kamm' aus und setzte das Gel in den Sequenzer ein. Nach Kontrolle des Basissignals erfolgte ein einstündiger Vorlauf.

Sequenzierungsreaktion

200 bis 500 ng DNA (2 bis 4 µL DNA-Lösung nach Kap. 5.5.2.1) wurden in einem 0,5 mL Kunststoffreaktionsgefäß mit 4 µL *BigDye/Ampli Taq* DNA-Polymerase, 8 µL Primer (1 µM; Primer *seqPFE 1*, *seqPFE 2* oder *seqPFE 3*) und 1 µL DMSO versetzt. Die Lösung wurde schließlich ad 20 µL mit Wasser aufgefüllt, in den Thermocycler eingestellt und das Temperaturprogramm (Tab. 5-3) gestartet.

Tab. 5-3: Temperaturprogramm für die PCR der Sequenzierungsreaktion (Lid-Temperatur des Thermocyclers: 105°C; Abkühlung des Thermoblocks nach Ablauf des PCR-Programms auf 8°C)

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95	3	1
Denaturierung	95	0,7	
Anlagerung	55	0,5	26
Extension	60	4	
Synthese	60	4	1

Probenaufarbeitung nach der Sequenzierungsreaktion

Der Ansatz wurde ad 100 µL mit Wasser aufgefüllt und die DNA durch Zusatz von 10 µL 3 M Natriumacetatlösung so wie 250 µL Ethanol (absolut) gefällt und die Lösung für 20 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (16°C, 20800 g, 30 min) wurde der Überstand entfernt, das Pellet

mit Ethanol 70% (V/V) gewaschen, erneut für 10 min abzentrifugiert und im Vakuum getrocknet (SpeedVac; 45°C, 5 min). Schließlich nahm man das Pellet in 4 µL Resuspensionslösung auf und denaturierte die DNA für 5 min bei 95°C. Anschließend wurde auf Eis abgekühlt, kurz abzentrifugiert (*short spin*) und die Lösung in eine Tasche des in das Sequenziergerät eingesetzten Polyacrylamidgels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte nach den vom Hersteller empfohlenen Programmparametern (Handbuch zum Sequenzierautomaten) für eine Dauer von 12 h.

5.5.5 Ligation und Transformation in *E. coli*

Die Grundlage der molekularen Klonierungstechnik liegt darin, einen Vektor (präparierte Plasmid-DNA) mit einer Fremd-DNA (Gen; Insert) unter Zusatz einer Polynucleotid-Ligase kovalent zu einem zirkularen Molekül (Hybrid-DNA oder chimäre DNA) zu verbinden. Dieser Vorgang wird als Ligation bezeichnet. DNA-Ligasen schließen die Phosphodiester-Bindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe an einem DNA-Ende und der 3'-OH-Gruppe am anderen Ende einer doppelsträngigen DNA. Das neu gebildete, zirkuläre Plasmid lässt sich wieder in Bakterien einschleusen (transformieren). Die Transformation bezeichnet die Aufnahme freier, löslicher DNA aus dem Medium durch einen Rezipienten. Die natürliche Aufnahmebereitschaft für DNA (Kompetenz) ist für eine Vielzahl von Bakterien (*Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* u.a.) beschrieben worden [Schlegel, 1992]. Bei Mikroorganismen (z.B. *E. coli*), die hierfür kein aktives System besitzen, können die Zellen aber durch eine geeignete Vorbehandlung ebenfalls transformationskompetent werden. Der Mechanismus des Plasmid-Transfers in die *E. coli*-Zelle ist bislang noch nicht aufgeklärt, aber entgegen früherer Ansichten [Hanahan, 1983] geht man heute von einer passiven Aufnahme der DNA, z.B. induziert durch eine Hitzeschock-Behandlung (42°C) oder Elektroporation, aus.

5.5.5.1 Ligation mit der T4 DNA-Ligase

Die Ligation erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers der T4 DNA-Ligase in einem Volumen von 20 µL. In einem 500 µL Kunststoffreaktionsgefäß wurde eine Mischung von Insert- und Vektor-DNA-Lösung vorgelegt und beachtet, dass die Insert-DNA etwa im 3–5 fachen Überschuss im Vergleich zur Vektor-DNA enthalten war. Nach Zugabe von 2 µL T4 DNA-Ligase (2 Weiss U) und 2 µL Ligations-Puffer (10×) wurde mit Wasser ad 20 µL aufgefüllt und die Lösung über Nacht bei 16°C gehalten.

5.5.5.2 Transformation in *E. coli*

5.5.5.2.1 Transformation nach der PEG/DMSO-Methode [Chung et al., 1989]

Herstellung kompetenter Zellen:

50 mL LB-Medium wurden mit 500 μ L einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α (Kap. 5.5.1.2) angeimpft, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 inkubiert (37°C, 200 Upm) und die Zellen anschließend abzentrifugiert (4°C, 6000 g, 8 min). Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in 2 mL TSS-Medium resuspendiert und in 200 μ L Aliquots aufgeteilt. Diese konnten entweder nach 20 min Inkubation auf Eis direkt zur Transformation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C aufbewahrt werden.

Hitzeschock-Transformation:

Zu 200 μ L der kompetenten *E. coli* DH5 α -Zellen (eventuell nach Auftauen auf Eis) wurden 1 μ L DNA-Lösung (Kap. 5.5.2.1) gegeben und die Zellen auf Eis gestellt. Nach 30 min erfolgte die Transformation durch einen Hitzeschock (42°C, 45 s). Die Zellen wurden anschließend sofort auf Eis gestellt, 800 μ L LB-Medium zugegeben und inkubiert (37°C, 200 Upm, 1 h). Nach Zentrifugation (4°C, 1300 g, 2 min), Abdekantieren des Überstandes und Resuspension der Zellen im Rücklauf wurde auf einer LB/AMP-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.5.5.2.2 Schnell-Transformation (Rubidiumchlorid-Methode)

(modifiziert nach www.nwfsc.noaa.gov/protocols/rbcl.html sowie Pope und Kent, 1996)

Herstellung superkompetenter Zellen:

20 mL LB-Medium wurden mit 2 mL einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α (Kap. 5.5.1.2) angeimpft, bis zu einer OD₆₀₀ \approx 0,2 – 0,9 inkubiert (37°C, 200 Upm) und anschließend in 100 mL frisches LB-Medium überführt. Nach Inkubation bis zu einer OD₆₀₀ \approx 0,5 – 0,9 impfte man mit dieser 100 mL Vorkultur 500 mL LB-Medium an und hält die Kultur bei 37°C und 200 Upm. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ \approx 0,6 wurden die Zellen unter Schütteln in Eiswasser abgeschreckt (15 min), zentrifugiert (4°C, 5000 g, 10 min), der Überstand abdekantiert und das Pellet in 100 mL eisgekühlter TfbI-Lösung resuspendiert. Nach Inkubation auf Eis (5 min) isolierte man die Zellen wieder durch Zentrifugation (4°C, 5000 g, 10 min). Der Überstand wurde erneut abdekantiert, die Zellen in 20 mL eisgekühlter TfbII-Lösung resuspendiert und anschließend aliquotiert (je 200 μ L in vorgekühlte 2 mL Kunststoffreaktionsgefäße). Die Aliquots konnten

direkt zur Transformation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt werden.

Schnell-Transformation:

Zu einem Aliquot (200 μL) der kompetenten Zellen wurden 20 μL eines Ligationsansatzes (Kap. 5.5.5.1) pipettiert, kurz gevortext (eventuell nach Auftauen auf Eis) und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde auf einer vorgewärmten (37°C) LB/AMP-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.5.6 Charakterisierung von Proteinen

5.5.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Prinzip:

Mittels PAGE können Proteine in analytischem oder präparativem Maßstab nach Größe (SDS- und Native-PAGE) oder nach dem relativen Gehalt an sauren und basischen Gruppen (Isoelektrische Fokussierung; IEF) aufgetrennt werden [Lämmli, 1970]. Dabei wandern die Proteine unter dem Einfluss des angelegten elektrischen Feldes durch die Poren eines Polyacrylamidgels, wobei die Wanderungsrichtung und -geschwindigkeit von der Ladung der Proteine, der Porengröße des Gels und der angelegten Spannung abhängen. Während die Auftrennung der Proteine bei der nativen PAGE im nicht-denaturierten Zustand erfolgt, werden die Proteine zur Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht durch Bindung des Detergenz SDS proportional zu ihrer Größe negativ geladen (z.B. 1,4 g SDS/g Protein in 1 %igen SDS-Lösungen) und denaturiert. Die Denaturierung wird durch eine vorherige Reduktion der Proteine mit Mercaptoethanol oder DTT noch unterstützt. SDS unterbindet darüber hinaus die Ausbildung von Protein-Protein-Wechselwirkungen (Quartärstrukturen). Die SDS-Protein-Komplexe verschiedener Proteine unterscheiden sich damit für viele Meßmethoden nur noch in ihrer Größe (Molekulargewicht bzw. Stokes-Radius) und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften.

Durchführung:

Herstellung des SDS-Gels:

Nach Start der Polymerisation durch Zusatz APS und TEMED wurde die Trenngel-Lösung zum Aushärten des Gels umgehend zwischen die durch Abstandshalter (Spacer) getrennten, gründlichst gereinigten Glasplatten gegossen, zum Erzielen einer geraden Geloberfläche mit 200 μL Isopropanol überschichtet und für 30 min bei RT stehen gelassen. Anschließend konnte das Isopropanol abdekantiert und die Geloberfläche mit Wasser nachgespült werden. Danach erfolgte die Herstellung des Sammelgels. Hierzu wurde die Sammelgel-Lösung auf das gereinigte Trenngel gegossen, der Probenaschen-Kamm eingesetzt und erneut 30 min bei RT zur Polymerisation stehen gelassen. Nach Entfernung des Kamms und der Spacer wurde die Probenaschen gründlich gespült und die Glasplatten mit dem Polyacrylamidgel in die bereits mit Puffer befüllte Elektrophorese-Apparatur luftblasenfrei eingesetzt.

Vorbehandlung der Protein-Proben:

10 μL der in Puffer gelösten Protein-Probe (ca. 20 μg Protein) wurden mit 10 μL SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C gekocht, auf Eis abgekühlt und nach Zentrifugation (*short spin*) auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker diente der *low-molecular-weight*-Standard (Auftragung 10 μL).

Elektrophorese-Bedingungen:

Die Elektrophorese erfolgte für 10 min mit 10 mA (pro Gel) und anschließend mit 25 mA (pro Gel) bis die blaue BPB-Bande das Ende des Gels erreicht hatte.

Coomassie-Färbung des Polyacrylamidgels:

Nach beendeter Elektrophorese wurden die Glasplatten entfernt, das Gel 1 h in Coomassie-Färbelösung gelegt und anschließend in Entfärbelösung mindestens so lange entfärbt, bis deutliche Proteinbanden sichtbar waren bzw. das Gel klar war. Zur Aufbewahrung bzw. Dokumentation wurde das Gel luftblasenfrei zwischen ein Filterpapier und eine Cellophan-Folie gelegt und im Geltrockner 2 h bei 80°C im Vakuum getrocknet.

5.5.6.2 Bestimmung des Proteingehalts

Die Bestimmung des Proteingehalts wurde nach der Methode von Bradford [Bradford, 1976] mit dem Protein Assay Kit von Biorad durchgeführt. Der Test beruht auf der Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum der Farbe verschiebt (465 nm ohne Protein; 595 nm mit Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm (OD_{595}) ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Messlösung. Der Proteingehalts lässt sich über eine externe Kalibrierung mit BSA als Referenz berechnen.

5.5.6.3 Aktivitätsmessung von Hydrolasen

5.5.6.3.1 pNPA-Assay

Prinzip:

Die Bestimmung der Hydrolase-Aktivität mit dem pNPA-Assay basiert auf der enzymkatalysierten Spaltung von *p*-Nitrophenylacetat. Das bei der Spaltung freiwerdende *p*-Nitrophenol kann photometrisch bei 410 nm bestimmt werden [Bornscheuer und Kazlauskas, 1999]. Die Methode wurde ursprünglich zur Messung der Aktivität von Lipasen gegen *p*-Nitrophenylpalmitat entwickelt (z.B. [Purdy und Kolattukudy, 1973]). Aus dem Anstieg der Absorption bei 410 nm, lässt sich die Aktivität berechnen. Die Eine Einheit (U) Hydrolase-Aktivität entspricht der Menge an Enzym, die 1 μ mol *p*-Nitrophenol pro Minute unter den gewählten Reaktionsbedingungen freisetzt.

Es gilt:

$$\text{Aktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right]_{\text{pNPA-Assay}} = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d \cdot c_{\text{Enzym}}}$$

hierbei ist: ΔE : Anstieg der Absorption bei 410 nm [1/min]

ϵ : molarer Absorptionskoeff. *p*-Nitrophenol bei pH 7,5 [14500 L/(mol · cm)]

d : Schichtdicke der Messküvette [cm]

c_{Enzym} : Konzentration an Enzym in der Assay-Lösung [mg/mL]

Bei Kenntnis des Proteingehalts einer Enzympräparation ist die Berechnung der spezifischen Aktivität [U/mg Protein] möglich.

Durchführung:

900 μL Phosphat-Puffer (pH 7,5; 50 mM) mit einer bekannten Hydrolase-Konzentration wurden zum Starten der Reaktion in einer Messküvette (1 mL; Schichtdicke 1 cm) mit 100 μL *p*-Nitrophenylacetat-Lösung (10 mM in DMSO) versetzt. Die Konzentration des Enzyms wurde für eine Bestimmung im Bereich von 0,0001 bis 1 mg/mL variiert. Die einzelnen Messungen einer Verdünnungsreihe erfolgten dabei parallel (6 fach Wechselprobenhalter im Photometer) bei RT gegen eine aktive Referenz (900 μL Phosphat-Puffer ohne Enzym). Für jede Enzympräparation wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

5.5.6.3.2 pH-stat-Assay

Prinzip:

Grundlage für die Bestimmung der Hydrolase-Aktivität im pH-stat-Assay ist die enzymatische Spaltung einer Esterverbindung. Zur Bestimmung der Aktivität von Lipasen wurde ursprünglich Olivenöl als Substrat eingesetzt (z.B. [Tietz und Fiereck, 1966]). Durch Verwendung von definierten Triglyceriden ließ sich die Reproduzierbarkeit der Methode erhöhen [Peled und Krenz, 1981]. Die bei der Hydrolyse freigesetzten Fettsäuren (allg. Carbonsäuren) werden automatisch mit Natronlauge titriert, um den pH-Wert der Lösung konstant zu halten. Aus dem Verbrauch an Natronlauge, der auf einem X/Y-Schreiber in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen wird, lässt sich die Aktivität berechnen. Eine Einheit (1 U) Hydrolase-Aktivität entspricht der Menge an Enzym, die 1 μmol Fettsäure (allg. Carbonsäure) pro Minute unter den gewählten Reaktionsbedingungen freisetzt.

Es gilt:

$$\text{Aktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right]_{\text{pH-stat-Assay}} = \frac{f_x \cdot f_y \cdot c_{\text{Natronlauge}}}{M} \cdot \frac{\Delta x}{\Delta y}$$

hierbei ist: f_x : Schreiberparameter bez. des Natronlauge-Verbrauchs [$\mu\text{L}/\text{mm}$]
 f_y : Schreiberparameter bezüglich der Reaktionszeit [mm/min]
 $c_{\text{Natronlauge}}$: Konzentration der Natronlauge [mol/L]
 M : eingesetzte Menge an Enzym [mg]
 $\Delta x / \Delta y$: Steigung der Messgeraden [mm/mm]

Bei Kenntnis des Proteingehalts einer Enzym-Präparation ist die Berechnung der spezifischen Aktivität [U/mg Protein] möglich.

Neben der Aktivitätsbestimmung lässt sich auch über den Verbrauch an titrierter Natronlauge der Umsatz einer Hydrolase-katalysierten Reaktion verfolgen. Für präparative Zwecke (Synthese; GC-Untersuchung) ist es somit möglich, die Hydrolyse gezielt beim Erreichen eines bestimmten Umsatzes abzustoppen und die Assay-Lösung zu extrahieren.

Durchführung:

Die Bestimmung der hydrolytischen Aktivität der Esterasen erfolgte mit einer Standardemulsion (Assay-Lösung): 10 g Ethylacetat und 4 g Gummi arabicum wurden mit 100 mL Wasser versetzt und 10 min mittels Ultraturrax emulgiert. 20 mL dieser Assay-Lösung wurden in das Reaktionsgefäß (Reaktor) gegeben, auf 37°C temperiert, mit Natronlauge (0,1 M) auf pH 7,0 (Startpunkt) eingestellt und anschließend eine bekannte Menge an Enzym zugesetzt. Die Titration der freiwerdenden Essigsäure auf den vorgegebenen konstanten pH-Wert (pH 7,0) erfolgte mit 0,1 M Natronlauge. Für jede Enzympräparation wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

5.6 Chemische Synthesen

5.6.1 Synthese von (*R,S*)-3-Acetoxy-tetrahydrofuran (**3b**)

Eine Lösung von (*R,S*)-3-Hydroxy-tetrahydrofuran (45 mmol; 4,0 g) in 75 mL Dichlormethan wurde unter Eiskühlung mit Pyridin (200 mmol; 16,1 mL) und Acetylchlorid (200 mmol; 14,2 mL) versetzt und die Reaktionslösung bei RT für 24 h unter Feuchtigkeitsausschluss gerührt. Anschließend wurde Wasser (50 mL) zugegeben, mit Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit verdünnter Salzsäure (0,1 mol/L), gesättigter Natriumcarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt **3b** durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt, wobei die Ausbeute an reinem **3b** 2,7 g (46 %) betrug.

¹H-NMR (CDCl₃; 500 MHz; TMS): $\delta_{\text{H}} = 2,02$ (m, 1 H, 4-H); 2,07 (s, 3 H, COCH₃); 2,17 (m, 1 H, 4-H); 3,88 (m, 4 H, 2-H/5-H); 5,29 (m, 1 H, 3-H)

¹³C-NMR (CDCl₃; 126 MHz; TMS): $\delta_{\text{C}} = 21,13; 32,69; 67,00; 73,14; 74,83; 170,91$

Elementaranalyse:	$C_6H_{10}O_3$	Ber. C 55,37	H 7,74
		Gef. C 55,41	H 7,79

5.6.2 Synthese von (*R,S*)-Pantolactonacetat (2-Acetoxy-3,3-dimethyl- γ -butyrolacton; **4b**)

Zu einer Lösung von (*R,S*)-Pantolacton (75 mmol; 9,8 g) in 75 mL Pyridin wurde unter Eiskühlung Acetylchlorid (105 mmol; 7,5 mL) zugesetzt und die Reaktionslösung bei RT für 19 h unter Feuchtigkeitsausschluss gerührt. Anschließend erfolgte die weitere Aufarbeitung wie unter Kap. 5.6.1 beschrieben, wobei die Ausbeute an reinem **4b** 6,4 g (50 %) betrug.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; 500 MHz; TMS): Die $^1\text{H-NMR}$ -Daten stimmen mit den Literaturangaben überein [Gamalevich und Serebryakov, 1997].

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ; 126 MHz; TMS): $\delta_{\text{C}} = 19,89$; 20,55; 23,03; 40,16; 75,06; 76,21; 169,79; 172,46

Elementaranalyse:	$C_8H_{12}O_4$	Ber. C 55,81	H 7,02
		Gef. C 55,69	H 7,11

5.6.3 Synthese von (*R,S*)-3-Butyroxyl-but-3-in (**1c**)

Die Synthese erfolgte nach Nakamura et al. [Nakamura et al., 1998] ausgehend von (*R,S*)-3-Hydroxy-but-3-in (**1a**; 10,5 g; 150 mmol), Pyridin (60 mL; 750 mmol), Butyrylchlorid (78,5 mL; 750 mmol) und 150 mL Dichlormethan als Lösungsmittel. Nach Extraktion (vgl. Kap. 5.6.1) wurde das erhaltene Rohprodukt **1c** durch Destillation gereinigt, wobei die Ausbeute an reinem **1c** 12,3 g (59 %) betrug.

Die analytischen Daten der Verbindung **1c** stimmen mit den Literaturangaben [Nakamura et al., 1998] überein.

5.6.4 Synthese der enantiomerenreinen Acetate **1b** – **4b** und des Butyrats **1c**

0,75 mmol des enantiomerenreinen Alkohls **1a** (ca. 55 μL), **2a** (ca. 73 μL), **3a** (ca. 50 μL) oder **4a** (ca. 53 mg) wurden in 750 μL Pyridin gelöst, mit 1,05 mmol Acetylchlorid (75 μL) bzw. Butyrylchlorid (110 μL) versetzt und unter Luftabschluss über Nacht bei RT gerührt. Anschließend erfolgte die weitere Aufarbeitung wie unter Kap. 5.6.1 beschrieben. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel bis auf ca. 5 mL durch Abblasen mit

Stickstoff entfernt und der Extrakt über Kieselgel abfiltriert. Mit Ausnahme von **1b** (Volatilität!) wurde anschließend das Lösungsmittel durch Abblasen mit Stickstoff entfernt.

Die Überprüfung der Reinheit der synthetisierten Verbindungen erfolgte durch GC-Analyse unter Verwendung chiraler Trennsäulen. Durch Vergleich der Retentionszeiten mit den racemischen Acetaten **1b** – **4b** und des Butyrats **1c** ließen sich dabei die optisch reinen Esterverbindungen identifizieren.

5.7 Testsysteme

5.7.1 pH-Assay

5.7.1.1 Selektion aktiver Hydrolasen

Die Testreaktionen wurden in Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) durchgeführt, wobei die erforderlichen Pipettierschritte automatisiert (Pipettier-Roboter) erfolgten. Nach Vorlage von 180 μL Phosphat-Puffer (10 mM; pH 7,3) mit einer Hydrolase-Konzentration von ca. 1 mg/mL Phosphat-Puffer wurden zum Starten der Reaktion 20 μL einer Lösung des Substrats (**1b** – **4b**, **1c** oder Tributyrin; je 20 mM) und Bromthymolblau (0,75 mM) in DMSO zugesetzt. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten luftdicht verschlossen, inkubiert (RT, 37, 40, 50 oder 80°C) und hinsichtlich visuell sichtbarer Farbänderungen beobachtet. Als Blindwerte dienten Reaktionsansätze ohne Substrat bzw. Enzym.

5.7.1.2 Testreaktionen im mg-Maßstab zur Bestimmung der Enantioselektivität

Nach Zugabe des Acetats **1b** – **4b** bzw. Butyrats **1c** (50 mM) zu einer Enzymlösung (ca. 1 mg/mL) in Phosphat-Puffer (10 mM; pH 7,3) wurden die Reaktionsansätze bei RT, 37, 40, 50 oder 80°C geschüttelt und zur Analyse der Enantiomerenüberschüsse (Reaktionszeiten siehe Tab. 3-5 und Anhang) ein 500 μL Aliquot entnommen. Die Extraktion der Reaktionsprodukte aus der wässrigen Lösung erfolgte mit 250 μL Ethylacetat (**1b** / **1c** / **3b**) oder 500 bzw. 250 μL Dichlormethan (**2b** bzw. **4b**). Die organische Phase wurde abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und nach Verdünnung direkt zur GC-Analyse eingesetzt. Im Fall von **2b** musste dagegen vor Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse derivatisiert werden. Hierzu wurde dem Extrakt Trifluoressigsäureanhydrid (0,1 mmol) zugesetzt, 20 min kräftig geschüttelt, 500 μL Wasser zugegeben und erneut für 10 min geschüttelt. Nach Abtrennung der organischen Phase, Trocknung über Natriumsulfat und Verdünnung erfolgte die GC-Analyse.

5.7.2 Acetat-Assay

5.7.2.1 Hydrolyse von 1-Phenylethylacetat (5b) im mL-Maßstab

Die Hydrolyse von **5b** erfolgte analog Kap. 5.7.1.2, wobei anstelle des Phosphat-Puffers eine Mischung der Testkit-Komponenten eingesetzt wurde. Zum spektralphotometrischen Nachweis der NADH-Bildung wurde die PFE-Lösung vorgelegt, mit **5b** versetzt und anschließend die Absorption bei 340 nm gemessen.

5.7.2.2 Allgemeine Vorschrift zur Bestimmung von Essigsäure im Mikrotiterplattenformat

Zu einer Mischung der Testkit-Komponenten (150 µL) wurde eine Lösung von PFE (20 µL; 2 mg Lyophilisat/mL, falls nicht anders angegeben) oder CAL B (2 mg/mL) pipettiert. Der Start der Reaktionen erfolgte durch Zugabe einer Lösung des Substrats (**1b** – **5b**) bzw. Natriumacetats (20 µL; die Konzentrationen sind im Text und in den Abbildungslegenden in mg/mL enthalten) in Phosphat-Puffer (10 mM; pH 7,3). Jede Bestimmung wurde mindestens vierfach durchgeführt und anschließend die Einzelergebnisse zur Auswertung gemittelt. Als Kontrollen (Blindwerte) dienten Mischungen des Testkits mit Zugabe von Puffer ohne Substrat bzw. Enzym.

5.7.2.3 Bestimmung der Aktivität von Hydrolase-haltigen Kulturüberständen

Zur Bestimmung der Hydrolase-Aktivität von Kulturüberständen im Mikrotiterplattenformat wurden die Pellets (Kap. 5.5.1.5) jeweils in 200 µL Phosphat-Puffer (10 mM; pH 7,3) resuspendiert und anschließend durch zwei Gefrier-Auftau-Zyklen (-80°C / RT) aufgeschlossen. Nach Entfernung der Zelltrümmer durch Abzentrifugieren (4°C, 3220 g, 10 min) ließen sich die Überstände direkt zur Bestimmung der Hydrolyseaktivität verwenden. Für die Ermittlung der scheinbaren Enantioselektivität wurde der Esterase-haltige Kulturüberstand aus einer Vertiefung zur Spaltung der optisch reinen Formen des Substrats aufgeteilt (bei jeder der beiden Testreaktionen jeweils 20 µL des Zellysats). Als Kontrolle (Blindwerte) dienten die Überstände von Kulturen, bei denen keine Expression der PFE erfolgte.

Beim Lyozym-Aufschluss der *E. coli* DH5α-Zellen wurde das Pellet in 150 µL Phosphat-Puffer (10 mM; pH 7,3) mit 1 mg/mL Lyozym resuspendiert, 15 min bei RT inkubiert und die Zellen entsprechend Protokoll 1 (Zellyse unter nativen Bedingungen) des Ni-NTA *magnetic agarose beads* Handbuchs (Qiagen; Hilden) aufgeschlossen.

5.7.2.4 *Aufreinigung der Esterase I aus Pseudomonas fluorescens an einer Ni-NTA Matrix im Mikrotiterplattenformat*

Die Aufreinigung der PFE erfolgte entsprechend des Ni-NTA *magnetic agarose beads* Handbuchs (Qiagen; Hilden). Die Pellets wurden dazu in 200 μL Lyse-Puffer resuspendiert, 15 min bei RT inkubiert und die Zellen entsprechend Protokoll 1 (Zelllyse unter nativen Bedingungen) aufgeschlossen. Die Reinigung erfolgte nach Protokoll 7 (Aufreinigung in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen) ohne Zusatz von DNase I und RNase A. Hierzu wurde eine Mischung aus 100 μL des Zellysats, 100 μL Lyse-Puffer und 20 μL der Ni-NTA *magnetic agarose beads* Suspension eingesetzt.

5.8 Biotransformationen

5.8.1 Allgemeines Verfahren für die enantioselektive Hydrolyse im g-Maßstab

Die enantioselektiven Hydrolysen wurden vergleichbar den Testreaktionen im mg-Maßstab zur Bestimmung der Enantioselektivität (Kap. 5.7.1.2) durchgeführt. Die Biotransformationen erfolgten zur Kontrolle des pH-Werts in einer pH-stat-Apparatur, so dass sich die Umsätze durch Zugabe von 0,1 oder 1,0 n Natronlauge verfolgen ließen. Für die präparativen Arbeiten wurden im Reaktionsgefäß 20 mL Phosphat-Puffer (10 mM; pH 7,3) vorgelegt, auf das Temperaturoptimum des eingesetzten Biokatalysators temperiert, das Substrat zugesetzt und die Hydrolyse durch Zugabe des Enzyms gestartet. Die jeweiligen Reaktionsbedingungen sowie die eingesetzten Substrat- und Enzymmengen sind in Tab. 3-6 enthalten. Nach Erreichung des gewünschten Umsatzes wurde die Biotransformation durch Extraktion mit Diethylether gestoppt. Nach Vereinigung der organischen Phasen, Trocknung über Natriumsulfat und Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum erfolgte die Trennung des Alkohols und des nicht-umgesetzten Esters durch Säulenchromatographie an Kieselgel. Die Enantiomerenüberschüsse der isolierten Verbindungen wurden gaschromatographisch bestimmt, wobei der Nachweis ihrer chemischen Identität zusätzlich durch NMR-Spektroskopie und Elementaranalyse erfolgte.

5.8.2 Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeiten und Startaktivitäten bei der 'Trennung' von 1b – 1f

Die Hydrolysen von **1b – 1f** wurden analog Kap. 5.8.1 in einer pH-stat-Apparatur durchgeführt, wobei die eingesetzten Substrat- und Enzymmengen in Tab. 3-7 enthalten sind. Nach Erreichung eines Umsatzes von 20 % erfolgte die Bestimmung der erzielten Enantiomerenüberschüsse für **1a**

durch GC-Analyse. Hierzu wurde ein 1 mL Aliquot der Reaktionslösung entnommen, mit 500 μ L Ethylacetat extrahiert und der Extrakt nach Trocknung über Natriumsulfat direkt zur gaschromatographischen Bestimmung eingesetzt. Die Analyse des zeitlichen Verlaufs der PFE-katalysierten Hydrolyse von **1b** erfolgte durch wiederholte Probenahme nach unterschiedlichen Zeitintervallen (Abb. 3-10).

5.8.3 Allgemeines Verfahren für die Hydrolase-katalysierte Acylierung in einem organischen Lösungsmittel

In einem Rundkolben wurden 2,5 mL des organischen Lösungsmittels (getrocknet), aktiviertes Molsieb, Substrat (0,75 bzw. 1,5 mmol) und das Enzym (20 bis 50 mg) vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe eines fünffachen Überschusses an Vinylacetat bzw. Vinylbutyrat gestartet und anschließend unter Rühren auf 37°C gehalten. Die Acetylierung von **2a** in größerem Maßstab erfolgte in 40 mL Hexan mit 500 mg CAL B (c.-f.; C2) und 30 mmol Alkohol. Zur Bestimmung der erzielten Enantiomerenüberschüsse wurde ein Aliquot entnommen, mit Natriumsulfat versetzt und zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion abzentrifugiert. Nach Abtrennung des Enzyms konnte der Extrakt evtl. nach Verdünnung bzw. Derivatisierung (**2a**; Kap. 5.7.1.2) direkt zur gaschromatographischen Analyse eingesetzt werden. Für präparative Arbeiten wurde nach Erreichung des gewünschten Umsatzes die Reaktion durch Abtrennung des Enzyms gestoppt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (Tab. 5-4).

Tab. 5-4 Übersicht über die PFE-katalysierten Acylierungs-Reaktionen in organischen Lösungsmitteln (log P-Werte nach Laane et al., 1987).

Sub	Lösungsmittel	log P-Wert	PFE [mg]	Bedingungen [°C / h]	Ester [%ee]	Alkohol [%ee]	Umsatz [%]	E-Wert
1a	Diethylether	0,9	20	37 / 22	1b 14 (<i>R</i>)	6 (<i>S</i>)	30	1,4
1a	TBME	1,4	20	37 / 46	1b 18 (<i>R</i>)	2 (<i>S</i>)	12	1,5
1a	Hexan	3,5	50	37 / 3	1b 14 (<i>R</i>)	9 (<i>S</i>)	39	1,4
1a	Isooctan	5,1	20	37 / 22	1b 18 (<i>R</i>)	19 (<i>S</i>)	51	1,7
1a	Hexan	3,5	20	37 / 22	1c 18 (<i>R</i>)	8 (<i>S</i>)	32	1,6
2a	Hexan	3,5	30	37 / 74	2b 52 (<i>R</i>)	48 (<i>S</i>)	48	5,0
3a	Hexan	3,5	30	37 / 3	3b 11 (<i>S</i>)	3 (<i>R</i>)	19	1,3
5a	Dioxan	-1,3	20	37 / 41	5b -----	-----	----	-----
5a	Acetonitril	-0,3	20	37 / 41	5b 92 (<i>R</i>)	6 (<i>S</i>)	6	24,7
5a	Tetrahydrofuran	0,5	20	37 / 41	5b 82 (<i>R</i>)	4 (<i>S</i>)	5	10,6
5a	Diethylether	0,9	20	37 / 33	5b 91 (<i>R</i>)	15 (<i>S</i>)	14	25,1
5a	TBME	1,4	20	37 / 33	5b 88 (<i>R</i>)	9 (<i>S</i>)	9	16,4
5a	Hexan	3,5	20	37 / 21	5b 83 (<i>R</i>)	11 (<i>S</i>)	12	11,7
5a	Isooctan	5,1	20	37 / 21	5b 80 (<i>R</i>)	14 (<i>S</i>)	10	10,3
5a	Decan	5,6	20	37 / 41	5b 89 (<i>R</i>)	17 (<i>S</i>)	16	20,7

5.9 Immobilisierung der Esterase I aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE)

Vorbehandlung der Träger Celite 545 und Eupergit C:

Die Vorbehandlung des Celite 545 erfolgte durch Waschen mit deion. Wasser und Ethanol (95 %; V/V). Nach Trocknung bei 80°C wurde das Trägermaterial mit 5 %iger Salpetersäure vermischt, für 4 h bei 80°C gerührt, mit deion. Wasser neutral gewaschen und anschließend über Nacht bei 80°C getrocknet.

Die S-Sepharose wurde unmittelbar vor Gebrauch abzentrifugiert, der Überstand abgetrennt und anschließend mehrmals mit Phosphat-Puffer (10 mM; pH 7,3) gewaschen.

Immobilisierung:

In einem Rundkolben wurde Phosphat-Puffer vorgelegt, das Trägermaterial (Mengenangaben sind in Tab. 3-9 enthalten) suspendiert und nach Zugabe der PFE über Nacht gerührt (4°C; 100 Upm). Zur Abtrennung des Immobilisats wurde anschließend über einem Büchner-Trichter abfiltriert und mit eisgekühltem Aceton (5× 5 mL) gewaschen. Die Untersuchung der Immobilisierungsrate erfolgte durch Bestimmung der Hydrolyseaktivität (Kap. 5.5.6.3.2) des gesammelten Filtrats bzw. durch eine direkte Aktivitätsmessung des Immobilisats nach der Lyophilisation.

Biotransformationen:

Der Einsatz der Immobilisate zur Katalyse der Acetylierung von **1a** in einem organischen Lösungsmittel (Kap. 5.8.3) bzw. der 'Trennung' von **1b** im mg-Maßstab in wässriger Lösung (Kap. 5.7.1.2) erfolgte analog der Ansätze, bei denen direkt ein PFE-Rohextrakt verwendet wurde. Die bei den Reaktionen eingesetzten Aktivitätsmengen sind dabei in Abb. 3-15 enthalten bzw. explizit im Text aufgeführt.

6 Anhang

6.1 Ergebnisse der Racematspaltungen im mg-Maßstab

Tab. 6-1 Zusammenstellung der Ergebnisse der Racematspaltungen im mg-Maßstab (Screening-Reaktionen) bei Verwendung der in der ersten Stufe des Testsystems (pH-Assay) selektierten Hydrolasen. Die Enzyme mit den höchsten Enantioselektivitäten bzw. mit umgekehrter (inverser) Stereospezifität sind hervorgehoben.

Name der Hydrolase bzw. Ursprung	Bedingungen [°C / h]	Ester [%ee]	Alkohol [%ee]	Umsatz [%]	<i>E</i> -Wert ⁷
Substrat: 2-Acetoxy-but-3-in (1b):					
Acylase ACS	37 / 26	41 (<i>R</i>)	47 (<i>S</i>)	47	4
<i>Alcaligenes sp.</i>	37 / 26	> 99 (<i>S</i>)	33 (<i>R</i>)	75	20
<i>Aspergillus niger</i>	37 / 26	98 (<i>R</i>)	44 (<i>S</i>)	69	11
<i>Bacillus stearoth. (BSE)</i>	37 / 1	45 (<i>R</i>)	84 (<i>S</i>)	35	18
<i>Candida antarctica B</i>	37 / 2 min	86 (<i>S</i>)	50 (<i>R</i>)	64	8
Chirazyme E3	37 / 5 min	53 (<i>R</i>)	50 (<i>S</i>)	52	5
Chirazyme E4	37 / 5 min	6 (<i>S</i>)	8 (<i>R</i>)	45	1
<i>Chromobacterium viscosum</i>	37 / 1	11 (<i>R</i>)	9 (<i>S</i>)	58	1
hog liver (Chirazyme E2)	37 / 2 min	28 (<i>R</i>)	3 (<i>S</i>)	90	1
pig liver (Chirazyme E1)				nicht analysiert	
<i>Rhizopus delemar</i>	37 / 26	98 (<i>R</i>)	32 (<i>S</i>)	76	8
<i>Pseud. fluorescens (PFE)</i>	37 / 2 min	> 99 (<i>R</i>)	69 (<i>S</i>)	59	75
<i>Pseudomonas sp.</i>	37 / 1	27 (<i>R</i>)	19 (<i>S</i>)	60	2
Asp. oryzae (Protease)	37 / 26	70 (<i>R</i>)	60 (<i>S</i>)	54	8
<i>Bac. subtilis var.A (Prot.)</i>	37 / 26	6 (<i>S</i>)	46 (<i>R</i>)	11	3
BD019	80 / 1	18 (<i>R</i>)	53 (<i>S</i>)	26	4
BD021	37 / 26	99 (<i>R</i>)	58 (<i>S</i>)	63	19
BD045	50 / 1	24 (<i>R</i>)	34 (<i>S</i>)	42	3
BD048	80 / 1	41 (<i>R</i>)	33 (<i>S</i>)	55	3
BD073	80 / 1	20 (<i>R</i>)	47 (<i>S</i>)	30	3
BD100	80 / 2 min	3 (<i>R</i>)	4 (<i>S</i>)	41	1
BD102	37 / 26	11 (<i>S</i>)	46 (<i>R</i>)	19	3
BD104	50 / 26	24 (<i>S</i>)	70 (<i>R</i>)	25	7
BD120	50 / 2 min	97 (<i>R</i>)	65 (<i>S</i>)	64	13
BD133	37 / 26	28 (<i>R</i>)	92 (<i>S</i>)	24	30
BD213	37 / 26	80 (<i>R</i>)	85 (<i>S</i>)	48	30
BD236	50 / 2 min	30 (<i>R</i>)	70 (<i>S</i>)	30	8
BD240	50 / 1	58 (<i>R</i>)	88 (<i>S</i>)	40	29
BD245	80 / 1	13 (<i>R</i>)	47 (<i>S</i>)	22	3
BD265	50 / 22	43 (<i>R</i>)	93 (<i>S</i>)	32	43
BD277	50 / 1	23 (<i>R</i>)	90 (<i>S</i>)	20	25
BD400	50 / 1	20 (<i>R</i>)	84 (<i>S</i>)	19	14
BD402	37 / 26	37 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----
BD405	37 / 26	27 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----

⁷ berechnet nach Chen et al., 1982

Fortsetzung Tab. 6-1

Name der Hydrolase bzw. Ursprung	Bedingungen [°C / h]	Ester [%ee]	Alkohol [%ee]	Umsatz [%]	<i>E</i> -Wert
BD423	RT / 1	19 (R)	34 (S)	36	2
BD544	80 / 2 min	1 (R)	6 (S)	14	1
BD556	37 / 26	37 (R)	86 (S)	30	19
E001	40 / 5 min	50 (R)	22 (S)	69	2
E002	40 / 5 min	30 (R)	27 (S)	53	2
E004	40 / 5 min	20 (R)	31 (S)	39	2
E005	40 / 5 min	48 (R)	17 (S)	73	2
E009	40 / 5 min	16 (R)	28 (S)	36	2
E010	40 / 5 min	12 (R)	34 (S)	26	2
E011	40 / 5 min	21 (R)	29 (S)	42	2
E012	40 / 1	94 (R)	18 (S)	84	4
E013	40 / 5 min	17 (R)	31 (S)	35	2
E015	40 / 5 min	22 (R)	29 (S)	43	2
E016	40 / 1	29 (R)	23 (S)	55	2
E018b	40 / 1	52 (R)	68 (S)	43	9
E019	40 / 5 min	34 (R)	25 (S)	57	2
E020	40 / 1	75 (R)	12 (S)	86	2
Substrat: 2-Butyroxy-but-3-in (1c):					
Acylase ACS	37 / 5	43 (R)	35 (S)	55	3
<i>Alcaligenes sp.</i>	37 / 5	36 (S)	33 (R)	52	3
<i>Bacillus stearoth.</i> (BSE)	37 / 1	54 (R)	77 (S)	42	13
<i>Candida antarctica A</i>	37 / 2 min	> 99 (R)	50 (S)	67	29
<i>Candida antarctica B</i>	37 / 30 s	36 (S)	33 (R)	52	3
<i>Candida lipolytica</i>				nicht analysiert	
<i>Candida rugosa</i>	37 / 20 min	35 (S)	17 (R)	67	2
Chirazyme E3	37 / 2 min	10 (R)	1 (S)	89	1
Chirazyme E4	37 / 2 min	2 (R)	1 (S)	68	1
Chirazyme L12	37 / 23	14 (R)	12 (S)	54	1
<i>Chromobacterium viscosum</i>	37 / 2 min	29 (S)	39 (R)	43	3
hog liver (Chirazyme E2)	37 / 30 s	7 (R)	1 (S)	87	1
pig liver (Chirazyme E1)				nicht analysiert	
porcine pancreas	37 / 1	1 (S)	24 (R)	4	2
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	37 / 2 min	4 (S)	5 (R)	42	1
<i>Pseud. cepacia</i> (Amano)	37 / 20 min	> 99 (S)	67 (R)	60	68
<i>Pseud. cepacia</i> (Roche)	37 / 20 min	> 99 (S)	24 (R)	80	15
<i>Pseud. fluorescens</i> (PFE)	37 / 10 min	75 (R)	87 (S)	46	33
<i>Pseud. fluorescens</i> (PFE II)	40 / 22	22 (R)	46 (S)	32	3
<i>Pseudomonas sp.</i>	37 / 2 min	7 (R)	2 (S)	79	1
<i>Rhizopus delemar</i>	37 / 1	16 (R)	48 (S)	25	3
<i>Seaprose</i> (Amano S)	37 / 2	4 (S)	17 (R)	20	1
<i>Asp. oryzae</i> (Protease)	37 / 24	4 (S)	14 (R)	20	1
<i>Bac. subtilis var.A</i> (Prot.)	37 /	25 (S)	57 (R)	31	5
BD021	37 / 1	67 (R)	67 (S)	50	10
BD036	80 / 1	8 (R)	60 (S)	11	4
BD045	50 / 1	17 (R)	37 (S)	31	3
BD048	80 / 1	33 (R)	21 (S)	61	2
BD073	80 / 2 min	9 (R)	13 (S)	41	1
BD094	RT / 24	31 (R)	57 (S)	35	5
BD100	80 / 2 min	5 (R)	4 (S)	57	1
BD104	37 / 24	43 (S)	85 (R)	34	18
BD120	50 / 2 min	33 (R)	17 (S)	65	2
BD133	37 / 24	15 (R)	88 (S)	14	18
BD138	50 / 1	16 (R)	81 (S)	16	11
BD202	50 / 24	5 (R)	31 (S)	14	2

Fortsetzung Tab. 6-1

Name der Hydrolase bzw. Ursprung	Bedingungen [°C / h]	Ester [%ee]	Alkohol [%ee]	Umsatz [%]	<i>E</i> -Wert
BD236	50 / 2 min	26 (R)	40 (S)	40	3
BD240	50 / 1	68 (R)	63 (S)	52	9
BD245	80 / 1	19 (R)	8 (S)	70	1
BD265	50 / 24	11 (R)	88 (S)	11	18
BD266	50 / 1	40 (R)	24 (S)	63	2
BD273	50 / 24	10 (R)	61 (S)	14	5
BD277	50 / 2 min	15 (R)	77 (S)	16	9
BD423	RT / 1	2 (R)	1 (S)	52	1
BD429	50 / 2 min	10 (R)	49 (S)	16	3
BD434	50 / 24	12 (R)	77 (S)	14	9
BD544	80 / 1	2 (S)	9 (R)	17	1
BD556	37 / 24	54 (R)	66 (S)	45	8
E001	40 / 5 min	25 (R)	18 (S)	59	2
E002	40 / 5 min	21 (R)	22 (S)	48	2
E003	40 / 5 min	17 (R)	34 (S)	33	2
E004	40 / 5 min	45 (R)	19 (S)	70	2
E005	40 / 1 min	14 (R)	10 (S)	58	1
E006	40 / 5 min	27 (R)	24 (S)	52	2
E007	40 / 5 min	27 (R)	24 (S)	53	2
E008	40 / 1	50 (R)	34 (S)	60	3
E009	40 / 5 min	27 (R)	27 (S)	51	2
E010	40 / 1	40 (R)	35 (S)	54	3
E011	40 / 5 min	30 (R)	29 (S)	51	2
E012	40 / 1	76 (R)	38 (S)	67	5
E013	40 / 1	35 (R)	34 (S)	51	3
E014	40 / 5 min	26 (R)	59 (S)	31	5
E015	40 / 5 min	23 (R)	39 (S)	38	3
E016	40 / 1	29 (R)	26 (S)	52	2
E017b	40 / 5 min	30 (R)	56 (S)	35	5
E018b	40 / 22	13 (R)	51 (S)	20	3
E019	40 / 5 min	34 (R)	13 (S)	72	2
E020	40 / 5 min	37 (R)	16 (S)	70	2
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>					
Substrat: 1-Methoxy-2-propylacetat (2b):					
<i>Alcaligenes sp.</i>	37 / 24	32 (S)	32 (R)	50	3
<i>Candida antarctica</i> A	37 / 23	21 (R)	24 (S)	47	2
<i>Candida antarctica</i> B	37 / 1	> 99 (S)	> 99 (R)	50	> 100
Chirazyme E3	37 / 1	2 (R)	16 (S)	14	1
Chirazyme E4	37 / 1	19 (S)	31 (R)	38	2
Chirazyme L12	37 / 1	5 (S)	54 (R)	8	4
<i>Chromobacterium viscosum</i>	37 / 23	92 (S)	33 (R)	74	6
hog liver (Chirazyme E2)	37 / 1	13 (R)	24 (S)	34	2
pig liver (Chirazyme E1)	37 / 1	16 (R)	46 (S)	25	3
<i>Pseud. fluorescens</i> (PFE)	37 / 1	3 (S)	8 (R)	25	1
<i>Pseudomonas sp.</i>	37 / 17	78 (S)	71 (R)	52	14
<i>Pseudomonas cepacia</i>	37 / 23	62 (S)	62 (R)	50	8
BD019	80 / 1	10 (R)	10 (S)	49	1
BD021	37 / 1	27 (R)	79 (S)	26	11
BD048	80 / 1	19 (S)	37 (R)	33	3
BD073	80 / 1	12 (S)	53 (R)	18	4
BD100	80 / 23	19 (S)	3 (R)	87	1
BD120	50 / 90 min	40 (R)	72 (S)	36	9
BD236	50 / 23	15 (S)	41 (R)	27	3
BD240	50 / 23	8 (S)	13 (R)	37	1
BD245	80 / 1	5 (S)	35 (R)	13	2

Fortsetzung Tab. 6-1

Name der Hydrolase bzw. Ursprung	Bedingungen [°C / h]	Ester [%ee]	Alkohol [%ee]	Umsatz [%]	<i>E</i> -Wert
BD265	50 / 23	4 (<i>R</i>)	16 (<i>S</i>)	21	1
BD266	50 / 23	26 (<i>R</i>)	12 (<i>S</i>)	69	2
BD277	50 / 90 min	3 (<i>R</i>)	29 (<i>S</i>)	10	2
BD423	RT / 23	10 (<i>S</i>)	46 (<i>R</i>)	15	4
BD434	50 / 23	4 (<i>S</i>)	29 (<i>R</i>)	12	2
BD544	80 / 23	43 (<i>S</i>)	23 (<i>R</i>)	65	2
E001	37 / 1	43 (<i>R</i>)	45 (<i>S</i>)	49	4
E002	37 / 24	60 (<i>R</i>)	39 (<i>S</i>)	61	4
E003	37 / 1	27 (<i>R</i>)	44 (<i>S</i>)	39	3
E004	37 / 24	26 (<i>R</i>)	27 (<i>S</i>)	48	2
E005	37 / 1	67 (<i>R</i>)	23 (<i>S</i>)	74	3
E006	37 / 24	67 (<i>R</i>)	24 (<i>S</i>)	74	3
E007	37 / 1	41 (<i>R</i>)	41 (<i>S</i>)	50	4
E008	37 / 1	13 (<i>R</i>)	22 (<i>S</i>)	38	2
E009	37 / 24	9 (<i>R</i>)	26 (<i>S</i>)	26	2
E010	37 / 1	12 (<i>R</i>)	31 (<i>S</i>)	27	2
E011	37 / 1	14 (<i>R</i>)	32 (<i>S</i>)	30	2
E012	37 / 1	4 (<i>R</i>)	12 (<i>S</i>)	24	1
E013	37 / 1	13 (<i>R</i>)	40 (<i>S</i>)	24	3
E014	37 / 24	10 (<i>R</i>)	48 (<i>S</i>)	17	3
E015	37 / 1	13 (<i>R</i>)	26 (<i>S</i>)	32	2
E016	37 / 24	44 (<i>R</i>)	35 (<i>S</i>)	56	3
E017b	37 / 24	17 (<i>R</i>)	38 (<i>S</i>)	31	3
E018b	37 / 24	25 (<i>S</i>)	20 (<i>R</i>)	56	2
E019	37 / 1	44 (<i>R</i>)	42 (<i>S</i>)	52	4
E020	37 / 1	41 (<i>R</i>)	41 (<i>S</i>)	50	3
Substrat: 3-Acetoxy-tetrahydrofuran (3b):					
<i>Alcaligenes sp.</i>	37 / 23	12 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----
<i>Aspergillus niger</i>	37 / 23	8 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----
<i>Bacillus stearoth.</i> (BSE)	37 / 23	6 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----
<i>Candida antarctica B</i>	37 / 30 min	90 (<i>R</i>)	37 (<i>S</i>)	69	6
<i>Chromobacterium viscosum</i>	37 / 23	26 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----
Chirazyme E3	37 / 23	6 (<i>R</i>)	4 (<i>S</i>)	62	1
Chirazyme E4	37 / 1	42 (<i>S</i>)	38 (<i>R</i>)	52	3
Chirazyme L12	37 / 23	17 (<i>S</i>)	37 (<i>R</i>)	31	3
hog liver (Chirazyme E2)	37 / 23	3 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----
pig liver (Chirazyme E1)				nicht analysiert	
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	37 / 23	racemisch	-----	zu klein	----
<i>Pseudomonas cepacia</i>	37 / 23	7 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----
<i>Pseudomonas sp.</i>	37 / 23	25 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----
<i>Pseud. fluorescens</i> (PFE)	37 / 22	31 (<i>R</i>)	40 (<i>S</i>)	43	3
BD019	80 / 22	1 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----
BD021	37 / 22	1 (<i>S</i>)	-----	zu klein	----
BD073	80 / 22	1 (<i>S</i>)	-----	zu klein	----
BD100	80 / 22	34 (<i>S</i>)	33 (<i>R</i>)	51	3
BD120	37 / 22	2 (<i>S</i>)	-----	zu klein	----
BD213	37 / 22	9 (<i>S</i>)	-----	zu klein	----
BD236	37 / 22	1 (<i>S</i>)	-----	zu klein	----
BD265	37 / 22	12 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----
BD423	RT / 23	5 (<i>S</i>)	-----	zu klein	----
BD544	80 / 22	11 (<i>S</i>)	36 (<i>R</i>)	24	2
E002	40 / 22	2 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----
E004	40 / 22	racemisch	-----	zu klein	----
E005	40 / 22	2 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----

Fortsetzung Tab. 6-1

Name der Hydrolase bzw. Ursprung	Bedingungen [°C / h]	Ester [%ee]	Alkohol [%ee]	Umsatz [%]	<i>E</i> -Wert
E008	40 / 22	1 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----
E009	40 / 22	racemisch	-----	zu klein	----
E010	40 / 22	racemisch	-----	zu klein	----
E011	40 / 22	racemisch	-----	zu klein	----
E013	40 / 22	4 (<i>S</i>)	-----	zu klein	----
E015	40 / 22	1 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----
E017b	40 / 22	1 (<i>S</i>)	-----	zu klein	----
E018b	40 / 22	9 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----
E020	40 / 22	2 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----
<hr/>					
Substrat: Pantolactonacetat (4b):					
Acylase ACS	37 23	24 (<i>R</i>)	93 (<i>S</i>)	21	36
<i>Aspergillus niger</i>	37 / 17	> 99 (<i>R</i>)	78 (<i>S</i>)	56	> 100
<i>Bacillus stearoth. (BSE)</i>	40 / 24	84 (<i>R</i>)	82 (<i>S</i>)	51	26
<i>Candida antarctica</i> A	37 / 39	72 (<i>R</i>)	68 (<i>S</i>)	51	11
<i>Candida antarctica</i> B	37 6	4 (<i>S</i>)	33 (<i>R</i>)	10	2
Chirazyme E3	37 1	62 (<i>R</i>)	59 (<i>S</i>)	51	7
Chirazyme E4	37 1	21 (<i>R</i>)	13 (<i>S</i>)	62	2
Chirazyme L12	37 1	33 (<i>R</i>)	78 (<i>S</i>)	30	11
hog liver (Chirazyme E2)				nicht analysiert	
pig liver (Chirazyme E1)				nicht analysiert	
porcine pancreas				nicht analysiert	
<i>Pseudomonas</i> sp.				nicht analysiert	
<i>Pseud. fluorescens</i> (PFE)	37 / 22	20 (<i>R</i>)	81 (<i>S</i>)	20	12
<i>Asp. oryzae</i> (Protease)	37 / 39	83 (<i>R</i>)	95 (<i>S</i>)	47	> 100
BD019	80 / 6	98 (<i>R</i>)	26 (<i>S</i>)	79	6
BD021	37 6	2 (<i>S</i>)	19 (<i>R</i>)	10	1
BD073	80 / 6	68 (<i>R</i>)	94 (<i>S</i>)	42	66
BD094	RT / 39	49 (<i>R</i>)	> 99 (<i>S</i>)	33	> 100
BD104	37 17	5 (<i>S</i>)	25 (<i>R</i>)	16	2
BD105	37 17	5 (<i>R</i>)	71 (<i>S</i>)	7	6
BD236	50 / 6	21 (<i>R</i>)	88 (<i>S</i>)	19	19
BD245	80 / 24	54 (<i>R</i>)	91 (<i>S</i>)	37	36
BD265	50 / 6	23 (<i>R</i>)	87 (<i>S</i>)	21	19
BD277	50 / 6	10 (<i>R</i>)	88 (<i>S</i>)	10	18
BD400	50 / 6	19 (<i>R</i>)	> 99 (<i>S</i>)	16	> 100
BD405	37 / 17	25 (<i>R</i>)	> 99 (<i>S</i>)	20	> 100
BD423	RT / 17	25 (<i>S</i>)	59 (<i>R</i>)	30	5
E002	40 / 24	19 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----
E004	40 / 24	26 (<i>S</i>)	75 (<i>R</i>)	26	9
E005	40 / 24	22 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----
E008	40 / 24	24 (<i>S</i>)	75 (<i>R</i>)	24	9
E009	40 / 24	16 (<i>S</i>)	78 (<i>R</i>)	17	10
E011	40 / 24	18 (<i>S</i>)	77 (<i>R</i>)	19	9
E013	40 / 24	12 (<i>S</i>)	70 (<i>R</i>)	15	6
E015	40 / 24	16 (<i>S</i>)	77 (<i>R</i>)	17	9
E017b	40 / 24	12 (<i>S</i>)	80 (<i>R</i>)	13	10
E018b	40 24	86 (<i>R</i>)	82 (<i>S</i>)	51	29
E020	40 / 24	15 (<i>R</i>)	-----	zu klein	----

6.2 Racematspaltungen für die Validierung des Acetat-Assay

Tab. 6-2 Zusammenstellung der Ergebnisse der Racematspaltungen im mg-Maßstab für die Validierung des Acetat-Assays. Die hier bestimmten *E*-Werte geben die wahren Enantioselektivitäten bei der 'Trennung' von **2b** wieder. Die Reaktionen wurden gemäß Kap. 3.2.3 durchgeführt.

Name der Hydrolase bzw. Ursprung	Bedingungen [°C / h]	Ester [% <i>ee</i>]	Alkohol [% <i>ee</i>]	Umsatz [%]	<i>E</i> -Wert ⁸
Acid Esterase	37 / 23	racemisch	-----	-----	----
Acylase ACS	37 / 23	racemisch	-----	-----	----
<i>Alcaligenes sp.</i> (Chir. L10)	37 / 24	32 (<i>S</i>)	32 (<i>R</i>)	50	2,4
<i>Aspergillus niger</i>	37 / 23	racemisch	-----	-----	----
<i>Bacillus stearoth.</i> (BSE)	37 / 23	racemisch	-----	-----	----
<i>Candida antarctica</i> B	37 / 1	> 99 (<i>S</i>)	> 99 (<i>R</i>)	50	> 100
Chirazyme L12 ⁹	37 / 3	3 (<i>S</i>)	-----	4	5,1
Chirazyme E3	37 / 30 min	4 (<i>R</i>)	31 (<i>S</i>)	10	1,4
Chirazyme E4	37 / 30 min	19 (<i>S</i>)	32 (<i>R</i>)	38	2,3
<i>Chromobacterium viscosum</i>	37 / 17	29 (<i>S</i>)	57 (<i>R</i>)	34	4,9
hog liver (Chirazyme E2)	37 / 30 min	14 (<i>R</i>)	24 (<i>S</i>)	37	1,9
<i>Humicola sp.</i> (Chir. L8)	37 / 23	racemisch	-----	-----	----
pig liver (Chirazyme E1)	37 / 30 min	20 (<i>R</i>)	29 (<i>S</i>)	41	2,6
porcine pancreas (Chir. L7)	37 / 23	racemisch	-----	-----	----
<i>Pseud. fluorescens</i> (PFE)	37 / 1	3 (<i>S</i>)	8 (<i>R</i>)	25	1,2
<i>Pseudomonas sp.</i> (Chir. L6)	37 / 17	56 (<i>S</i>)	75 (<i>R</i>)	43	12,1

⁸ berechnet nach Chen et al., 1982

⁹ Bei Chirazyme L12 wurde die Reaktion in einer pH-stat-Apparatur durchgeführt.

6.3 DNA-Sequenz der Esterase I aus *Pseudomonas fluorescens*

Die folgende DNA-Sequenz stellt einen Ausschnitt aus dem Plasmid pJOE2792 dar. Das Gen der PFE (*pfe*-Gen), der *his*-tag, die Restriktionsschnittstellen (*Nde*I, *Bam*HI und *Hind*III) und die Bindungsstellen der verwendeten Primer sind eingezeichnet. Hierbei ist zu beachten, dass bei *ep*PFE 2 (*seq*PFE 3) nur die relative Lage auf dem Plasmid eingezeichnet ist, da dieser Primer am komplementären DNA-Strang bindet.

```

4861  gaaggagctg actgggttga aggcctctcaa gggcatcggg cgacgctctc ccctatgcca ctctgcatt aggaagcagc ccagtagtag
                                     seqPFE 1
4951  gttgaggccg ttgagcaccg ccgcccaag gaatggtgca tgcacgcgac accacaattc agcaaattgt gaacatcatc acgttcatct
                                     epPFE 1
5041  ttccctgggt gccaatggcc cattttctcg toagtaacga gaaggtcgcg aattcaggcg ctttttagac tggctgtaat gaac
1    aattcttaag aaggagatat acatatgagc acatttgttg caaaagacgg taccagatc tatttcaagg actggggcag cggtaaaccg
                                     NdeI
                                     pfe-Startcodon
91   gtgttggttca gccacggttg gctactggat gccgacatgt gggaatacca gatggagtac ctacagagcc ggggctatcg caccatcgcc
181  tttgaccgcc gcggctttgg ccgctcggac caacctgga ccggcaacga ctacgacacc ttcgccgagc acatcgcca gttgatgaa
271  cacctggacc tcaaggaggt gaccctggtg ggctttctca tgggcggcgg cgatgtggcc cgctacatcg ccgcccacgg cagcgcaecg
361  gtggccggcc tgggtgctgct gggcgccgtc accccgctgt tcggccagaa gcccgactat ccgcagggtg tcccgcctga tgtgttcgca
451  aggttcaaga ctgagctgct gaaggatcgc gcgcagttca tcagcgattt caacgcaccg ttctatggca tcaacaaggg ccaggtcgtc
541  toccaaaggc tgcaagacca gaccctgcaa atcgccctgc tggcctcgtc caaggccacg gtggattgcy tcaccgcgtt cgccgaaacc
                                     seqPFE 2
631  gacttccgcc cggacatggc caagatcgac gtaccacccc tgggtgatcca tggcgatggc gaccagatcg tgccgttoga gaccaccggc
721  aaagtggcgg cggagttgat caagggcgcc gaactgaagg tgtacaagga cgcgccccac gggttcggcg tgaccacgcg ccagcagttg
811  aacgaagacc tgttggcggt cttgaaacgc ggatcccatc atcatcatca tcattgactg cagccaagct tctgttttgg cggatgagag
                                     BamHI                                     HindIII
                                     letztes Codon des pfe-Gens his-tag und Stopcodon
901  aagatthtca gcctgatata gattaatatca gaacgcagaa gcggtctgat aaaacagaat ttgcctggcg gcagtagcgc ggtggtccca
991  cctgaccca tgccgaactc agaagtgaag gcgcgtagcg ccgatggtag tgtggggtct ccccatgcga gagtagggaa ctgccagcca
                                     epPFE 2

```

Primer für die *error-prone* PCR (*ep*PCR):

*ep*PFE 1: 5'-GAACATCATCACGTTTCATCTTTCCC-3'

*ep*PFE 2: 5'-TGGCAGTTCCTACTCTCGCATGGG-3'

Primer für die Sequenzierung:

*seq*PFE 1: 5'-ATCGGTCGACGCTCTCCCTTATGCG-3'

*seq*PFE 2: 5'-TGCAGACCCAGACCCTGCAAATCGC-3'

*seq*PFE 3: 5'-TGGCAGTTCCTACTCTCGCATGGG-3' (entspricht Primer *ep*PFE 2)

7 Literaturverzeichnis

- Adams, M.W.W. und Kelly, R.M. (1998), Finding and using hyperthermophilic enzymes, *Trends Biotechnol.* **16**, 329-332.
- Amaki, Y., Nakano, H. und Yamane, T. (1994), Role of cysteine residues in esterase from *Bacillus stearothermophilus* and increasing its thermostability by the replacement of cysteines, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 664-668.
- Amaki, Y., Tulin, E.E., Ueda, S., Ohmiya, K. und Yamane, T. (1992), Purification and properties of a thermostable esterase of *Bacillus stearothermophilus* produced by recombinant *Bacillus brevis*, *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 238-241.
- Amann, R.I., Ludwig, W. und Schleifer, K.H. (1995), Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.
- Anderson, E.M., Larsson, K.M. und Kirk, O. (1998), One biocatalyst - many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis, *Biocatal. Biotransform.* **16**, 181-204.
- Ansorge, W., Sproat, B., Stegemann, J., Schwager, C. und Zenke, M. (1987), Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis, *Nucl. Acids Res.* **15**, 4593-4602.
- Antranikian, G. (2001), Extremophile Mikroorganismen als Quelle stabiler Biokatalysatoren, *Biospektrum - Sonderausgabe 'Biokatalyse'* (Hrsg. Heiden S, Erb R), 44-48.
- Antranikian, G. und Grote, R. (1997), Die biotechnologische Bedeutung extremophiler Mikroorganismen und ihrer Enzyme. In: *Biokonversion nachwachsender Rohstoffe*, **10**, 25-31, Landwirtschaftsverlag, Münster.
- Arnold, F.H. (1998), Design by directed evolution, *Acc. Chem. Res.* **31**, 125-131.
- Arnold, F.H. (2001), Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design, *Nature* **409**, 253-257.
- Arnold, F.H. und Moore, J.C. (1997), Optimizing industrial enzymes by directed evolution, *Adv. Biochem. Eng. / Biotechnol.* **58**, 1-14.
- Arnold, F.H. und Volkov, A.A. (1999), Directed evolution of biocatalysts, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 54-59.
- Arpigny, J.L. und Jaeger, K.E. (1999), Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties, *Biochem. J.* **343**, 177-183.
- Badalassi, F., Wahler, D., Klein, G., Crotti, P. und Reymond, J.L. (2000), A versatile periodate-coupled fluorogenic assay for hydrolytic enzymes, *Angew. Chem.* **112**, 4233-4236.
- Balkenhohl, F., Ditrich, K., Hauer, B. und Ladner, W. (1997), Optically active amines via lipase-catalyzed methoxyacetylation, *J. Prakt. Chem.* **339**, 381-384.
- Bal-Tembe, S., Bhedi, D.N., Mishra, A.K., Rajagopalan, R., Ghate, A.V., Subbarayan, P., Punekar, N.S. und Kulkarni, A.V. (1997), HL 752: a potent and long-acting antispasmodic agent, *Bioorg. Med. Chem.* **5**, 1381-1387.
- Battersby, B.J. und Trau, M. (2002), Novel miniaturized systems in high-throughput screening, *Trends Biotechnol.* **20**, 167-173.
- Beaulieu, P.L., Anderson, P.C., Cameron, D.R., Croteau, G., Gorys, V., Grand-Maitre, C., Lamarre, D., Liard, F., Paris, W., Plamondon, L., Soucy, F., Thibeault, D., Wernic, D. und Yoakim, C. (2000), 2',6'-Dimethylphenoxyacetyl: a new achiral high affinity P₃-P₂ ligand for peptidomimetic-based HIV protease inhibitors, *J. Med. Chem.* **43**, 1094-1108.

- Belitz, H.D. und Grosch, W. (1992), Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 4. Aufl., Springer Verlag, Berlin.
- Berglund, P. (2001), Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis, *Biomol. Eng.* **18**, 13-22.
- Beutler, H.O. (1984). In: *Methods of Enzymatic Analysis*. (Hrsg. Bergmeyer, H. U.), 3. Aufl., **6**, S. 639-645, Weinheim, Wiley-VCH.
- Bevinakatti, H.S., Banerji, A.A. und Newadkar, R.V. (1989), Resolution of secondary alcohols using lipase in diisopropyl ether, *J. Org. Chem.* **54**, 2453-2455.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979), A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucl. Acids. Res.* **7**, 1513-1523.
- Bisswanger, H. (2000), Enzymkinetik, 3. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim.
- Bornscheuer, U.T. (1998), Gerichtete Evolution von Enzymen, *Angew. Chem.* **110**, 3285-3288.
- Bornscheuer, U.T. (1999), Recent advances in the lipase-catalyzed biotransformation of fats and oils, *Recent Res. Devel. Oil Chem.* **3**, 93-106.
- Bornscheuer, U.T. (2000a), Enzymes in Lipid Modifications, Wiley-VCH, Weinheim.
- Bornscheuer, U.T. (2000b), Directed evolution of enzymes, *Chim. Oggi / Chem. Today* **18**, 65-67.
- Bornscheuer, U.T. (2001), Directed evolution of enzymes for biocatalytic applications, *Biocatal. Biotransform.* **19**, 84-96.
- Bornscheuer, U.T. (2002), Microbial carboxyl esterases - classification, properties and application in biocatalysis, *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 73-81.
- Bornscheuer, U.T., Altenbuchner, J. und Meyer, H.H. (1998), Directed evolution of an esterase for the stereoselective resolution of a key intermediate in the synthesis of Epothilones, *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 554-559.
- Bornscheuer, U.T., Altenbuchner, J. und Meyer, H.H. (1999), Directed evolution of an esterase: Screening of enzyme libraries based on pH-indicators and a growth assay, *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 2169-2173.
- Bornscheuer, U.T. und Kazlauskas, R.J. (1999), Hydrolases in Organic Synthesis — Regio- and Stereoselective Biotransformations, Wiley-VCH, Weinheim.
- Bornscheuer, U.T. und Pohl, M. (2001), Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 137-143.
- Bradford, M.M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Briggs, G.E. und Haldane, J.B.S. (1925), A note on the kinetics of enzyme action, *Biochem. J.* **19**, 338-339.
- Brunner, H. und Tracht, T. (1998), Asymmetric catalysis. Part 128: diastereomeric rhodium(I) complexes in the enantioselective hydrogenation of ketopantolactone, *Tetrahedron: Asymmetry* **9**, 3773-3780.
- Bull, A.T., Goodfellow, M. und Slater, J.H. (1992), Biodiversity as a source of innovation in biotechnology, *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 219-252.
- Bull, A.T., Ward, A.C. und Goodfellow, M. (2000), Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 573-606.
- Burton, S.G., Cowan, D.A. und Woodley, J.M. (2002), The search for the ideal biocatalyst, *Nat. Biotechnol.* **20**, 37-45.

- Cadwell, R.C. und Joyce, G.F. (1992), Randomization of genes by PCR mutagenesis, *PCR Meth. Appl.* **2**, 28-33.
- Cardenas, F., Alvarez, E., de Castro-Alvarez, M.S., Sanchez-Montero, J.M., Valmaseda, M., Elson, S.W. und Sinisterra, J.V. (2001a), Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **14**, 111-123.
- Cardenas, F., de Castro, M.S., Sanchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V., Valmaseda, M., Elson, S.W. und Alvarez, E. (2001b), Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media, *Enzyme Microb. Technol.* **28**, 145-154.
- Carrea, G. und Riva, S. (2000), Enzyme in organischen Lösungsmitteln: Eigenschaften und Einsatz in der Synthese, *Angew. Chem.* **112**, 2312-2341.
- Chen, C.S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G. und Sih, C.J. (1982), Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7294-7299.
- Chen, C.S. und Sih, C.J. (1989), Enantioselektive Biokatalyse in organischen Solventien am Beispiel Lipase-katalysierter Reaktionen, *Angew. Chem.* **101**, 711-724.
- Chen, C.S., Wu, S.H., Girdaukas, G. und Sih, C.J. (1987), Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. 2. Enzyme-catalyzed esterification in water-organic solvent biphasic systems, *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 2812-2817.
- Cheng, I.C. und Tsai, S.W. (2000), Quantitative analysis of enantioselective enzymatic hydrolysis with non-enantioselective removal of chiral products, *Biochem. Eng. J.* **5**, 243-248.
- Cherry, J.R., Lamsa, M.H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A., Jones, A. und Pedersen, A.H. (1999), Directed evolution of a fungal peroxidase, *Nat. Biotechnol.* **17**, 379-384.
- Choi, K.D., Jeohn, G.H., Rhee, J.S. und Yoo, O.J. (1990), Cloning and nucleotide sequence of an esterase gene from *Pseudomonas fluorescens* and expression of the gene in *Escherichia coli*, *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2039-2045.
- Chung, C.T., Niemela, S.L. und Miller, R.H. (1989), One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2172-2175.
- Clausen, I.G. (1997), Aspects in lipase screening, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **3**, 139-146.
- Coco, W.M., Levinson, W.E., Crist, M.J., Hektor, H.J., Darzins, A., Pienkos, P.T., Squires, C.H. und Monticello, D.J. (2001), DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes, *Nat. Biotechnol.* **19**, 354-359.
- Cohen, N., Abramov, S., Dror, Y. und Freeman, A. (2001), *In vitro* enzyme evolution: the screening challenge of isolating the one in a million, *TIBTECH* **19**, 507-510.
- Copeland, G.T. und Miller, S.J. (1999), A chemosensor-based approach to catalyst discovery in solution and on solid support, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 4306-4307.
- Cotteril, A.S. und Gill, M. (1993), Synthesis of (S)-(-)-Austrocorticin and (S)-(+)-Dermolactone: absolute stereochemistry of the natural products, *Tetrahedron Lett.* **34**, 3155-3158.
- Cotteril, A.S., Gill, M., Gimenez, A. und Milanovic, N.M. (1994), Pigments of fungi. Part 38. Synthesis of Austrocorticinic Acid and (S)-(-)-Austrocorticin; absolute stereochemistry of natural Austrocorticin, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 3269-3276.
- Cramer, A., Raillard, S.A., Bermudez, E. und Stemmer, W.P.C. (1998), DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution, *Nature* **391**, 288-291.
- Cramer, A. und Stemmer, W.P.C. (1995), Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of mutant and wild-type sequences, *BioTechniques* **18**, 194-196.
- Dalboge, H. und Lange, L. (1998), Using molecular techniques to identify new microbial biocatalysts, *Trends Biotechnol.* **16**, 265-272.

- Demirjian, D.C., Moris-Varas, F. und Cassidy, C.S. (2001), Enzymes from extremophiles, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 144-151.
- Demirjian, D.C., Shah, P.C. und Moris-Varas, F. (1999), Screening for novel enzymes, *Top. Curr. Chem.* **200**, 1-29.
- Dodson, G. und Wlodawer, A. (1998), Catalytic triads and their relatives, *Trends Biochem. Sci.* **23**, 347-352.
- Effenberger, F., Eichhorn, J. und Roos, J. (1995), Enzyme catalyzed addition of hydrocyanic acid to substituted pivaldehydes - a novel synthesis of (*R*)-pantolactone, *Tetrahedron: Asymmetry* **6**, 271-282.
- Ettmayer, P., Billich, A., Hecht, P., Rosenwirth, B. und Gstach, H. (1996), Paracyclophanes: a novel class of water-soluble inhibitors of HIV proteinase, *J. Med. Chem.* **39**, 3291-3299.
- Faber, K. (2000), Biotransformations in Organic Chemistry, 4. Aufl., Springer, Berlin.
- Farinas, E.T., Bulter, T. und Arnold, F.H. (2001), Directed enzyme evolution, *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 545-551.
- Feringa, B.L. und van Delden, R.A. (1999), Absolute asymmetrische Synthese: Ursprung, Beeinflussung und Verstärkung von Chiralität, *Angew. Chem.* **111**, 3624-3645.
- Fernández-Lorente, G., Terreni, M., Mateo, C., Bastida, A., Fernández-Lafuente, R., Dalmases, P., Huguet, J. und Guisán, J.M. (2001), Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilization: enantioselective hydrolysis of a chiral ester by immobilized *Pseudomonas* lipase, *Enzyme Microb. Technol.* **28**, 389-396.
- Fersht, A. (1999), Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding, Freeman, New York.
- Firestine, S.M., Salinas, F., Nixon, A.E., Baker, S.J. und Benkovic, S.J. (2000), Using an AraC-based three-hybrid system to detect biocatalysts in vivo, *Nat. Biotechnol.* **18**, 544-547.
- Freeman, M., Baehler, C. und Spotts, S. (1990), Automated laser-fluorescence sequencing, *Bio/Technology* **8**, 147-148.
- Gais, H.J., Jungen, M. und Jadhav, V. (2001), Activation of pig liver esterase in organic media with organic polymers. Application to the enantioselective acylation of racemic functionalized secondary alcohols, *J. Org. Chem.* **66**, 3384-3396.
- Gamalevich, G.D. und Serebryakov, E.P. (1997), Chemistry of natural compounds and bioorganic chemistry - enantioselectivity of enzymatic acylation of some structurally various racemic alcohols in anhydrous aprotic media, *Russ. Chem. Bull.* **46**, 171-183.
- Ghosh, A.K., Kincaid, J.F., Walters, D.E., Chen, Y., Chaudhuri, N.C., Thompson, W.J., Culberson, C., Fitzgerald, P.M.D., Lee, H.Y., McKee, S.P., Munson, P.M., Duong, T.T., Darke, P.L., Zugay, J.A., Schleif, W.A., Axel, M.G., Lin, J. und Huff, J.R. (1996), Nonpeptidal P₂ ligands for HIV protease inhibitors: structure-based design, synthesis, and biological evaluation, *J. Med. Chem.* **39**, 3278-3290.
- Giver, L. und Arnold, F.H. (1998), Combinatorial protein design by *in vitro* recombination, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 335-338.
- Glänzer, B.I., Faber, K. und Griengl, H. (1988), Microbial resolution of *O*-acetylpanthoyl lactone, *Enzyme Microb. Technol.* **10**.
- Govardhan, C.P. und Margolin, A.L. (1995, September 4), Extremozymes for industry - from nature and by design, *Chem. Ind.*, 689-693.
- Guo, J., Wu, J., Siuzdak, G. und Finn, M.G. (1999), Bestimmung von Enantiomerenüberschüssen durch kinetische Racematspaltung und Massenspektrometrie, *Angew. Chem.* **111**, 1868-1871.
- Hanahan, D. (1983), Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.

- Hauer, B., Breuer, M., Ditrich, K., Matuschek, M., Ress-Löschke, M. und Stürmer, R. (1999), The development of enzymes for the preparation of chemicals, *Chimia* **53**, 613-616.
- Haughton, L., Williams, J.M.J. und Zimmermann, J.A. (2000), Enzymatic kinetic resolution of pantolactone: relevance to chiral auxiliary chemistry, *Tetrahedron: Asymmetry* **11**, 1697-1701.
- Henke, E. (2001), Untersuchungen zur Erweiterung der Substratspezifität von CarboxylEsterhydrolasen, Dissertation Mathematische-Naturwissenschaftliche Fakultät, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Greifswald.
- Henke, E. und Bornscheuer, U.T. (1999), Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens*. Random mutagenesis by error-prone PCR or a mutator strain and identification of mutants showing enhanced enantioselectivity by a resorufin-based fluorescence assay, *Biol. Chem.* **380**, 1029-1033.
- Henke, E., Schuster, S., Yang, H. und Bornscheuer, U.T. (2000), Lipase-catalyzed resolution of ibuprofen, *Chem. Month.* **131**, 633-638.
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R. und Stüber, D. (1988), Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent, *Bio/Technology* **6**, 1321-1325.
- Hochuli, E., Döbeli, H. und Schacher, A. (1987), New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues, *J. Chromatogr.* **411**, 177-184.
- Hofmann, B., Tölzer, S., Pelletier, I., Altenbuchner, J., van Pée, K.H. und Hecht, H.J. (1998), Structural investigation of the cofactor-free chloroperoxidases, *J. Mol. Biol* **279**, 889-900.
- Hönig, H., Shi, N. und Polanz, G. (1994), Enzymatic resolutions of heterocyclic alcohols, *Biocatalysis* **9**, 61-69.
- Hough, D.W. und Danson, M.J. (1999), Extremozymes, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 39-46.
- Hughes, J.B., Hellmann, J.J., Ricketts, T.H. und Bohannon, B.J.M. (2001), Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4399-4406.
- Jaeger, K.E., Eggert, T., Eipper, A. und Reetz, M.T. (2001), Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 519-530.
- Jaeger, K.E. und Wohlfarth, S. (1993), Bakterielle Lipasen: Biochemie, Molekulargenetik und biotechnologische Bedeutung, *BioEng.* **9**, 39-46.
- Janes, L.E. und Kazlauskas, R.J. (1997), Quick E. A fast spectrophotometric method to measure the enantioselectivity of hydrolases, *J. Org. Chem.* **62**, 4560-4561.
- Janes, L.E., Löwendahl, A.C. und Kazlauskas, R.J. (1998), Quantitative screening of hydrolase libraries using pH indicators: identifying active and enantioselective hydrolases, *Chem. Eur. J.* **4**, 2324-2331.
- John, G.T. und Heinzle, E. (2001), Quantitative screening method for hydrolases in microplates using pH-indicators: determination of kinetic parameters by dynamic pH monitoring, *Biotech. Bioeng.* **72**, 620-627.
- Kammann, M., Laufs, J., Schell, J. und Gronenborn, B. (1989), Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR), *Nucl. Acids Res.* **17**, 5404.
- Katchalski-Katzir, E. und Kraemer, D.M. (2000), Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **10**, 157-176.
- Kauffmann, I. und Schmidt-Dannert, C. (2001), Conversion of *Bacillus thermocatenulatus* lipase into an efficient phospholipase with increased activity towards long-chain fatty acyl substrates by directed evolution and rational design, *Protein Eng.* **14**, 919-928.

- Kazlauskas, R.J. und Bornscheuer, U.T. (2000), Biotransformations with lipases. In: *Biotechnology-Series*. (Hrsg. Rehm, H. J., Reed, G., Pühler, H. and Stadler, P. J. W.), 2. Aufl., **8a**, S. 39-191, Wiley-VCH, Weinheim.
- Kazlauskas, R.J., Weissfloch, A.N.E., Rappaport, A.T. und Cuccia, L.A. (1991), A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*, *J. Org. Chem.* **56**, 2656-2665.
- Kelly, R.M. und Brown, S.H. (1993), Enzymes from high-temperature microorganisms, *Curr. Opin. Biotechnol.* **4**, 188-192.
- Kessler, M., Hauer, B., Friedrich, T. und Mattes, R. (1999), Patent Offenlegungsschrift DE 199 52 501 A 1 (BASF AG Ludwigshafen).
- Khalameyzer, V., Fischer, I., Bornscheuer, U.T. und Altenbuchner, J. (1999), Screening, nucleotide sequence, and biochemical characterization of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* with high activity towards lactones, *Appl. Environm. Microbiol.* **65**, 477-482.
- Khosla, C. und Harbury, P.B. (2001), Modular enzymes, *Nature* **409**, 247-252.
- Kim, K.K., Hwang, K.Y., Choi, K.D., Kang, J.H., Yoo, O.J. und Suh, S.W. (1993), Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of arylesterase from *Pseudomonas fluorescens*, *Proteins* **15**, 213-215.
- Kim, K.K., Song, H.K., Shin, D.H., Hwang, K.Y., Choe, S., Yoo, O.J. und Suh, S.W. (1997), Crystal structure of carboxylesterase from *Pseudomonas fluorescens*, an α/β hydrolase with broad substrate specificity, *Structure* **5**, 1571-1584.
- Kim, M.J., Choi, Y.K., Choi, M.Y., Kim, M.J. und Park, J. (2001), Lipase/Ruthenium-catalyzed dynamic kinetic resolution of hydroxy acids, diols, and hydroxy aldehydes protected with a bulky group, *J. Org. Chem.* **66**, 4736-4738.
- Klein, G. und Reymond, J.L. (2001), An enzyme assay using pM, *Angew. Chem.* **113**, 1821-1823.
- Klibanov, A.M. (2001), Improving enzymes by using them in organic solvents, *Nature* **409**, 241-246.
- Ko, M.S.H. (1990), An 'equalized cDNA library' by the reassociation of short double-stranded cDNAs, *Nucl. Acids Res.* **18**, 5705-5711.
- Koeller, K.M. und Wong, C.H. (2001), Enzymes for chemical synthesis, *Nature* **409**, 232-240.
- Koshland, D.E. (1994), Das Schlüssel-Schloß-Prinzip und die Induced-fit-Theorie, *Angew. Chem.* **106**, 2468-2472.
- Krebsfänger, N., Schierholz, K. und Bornscheuer, U.T. (1998a), Enantioselectivity of a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens* towards alcohols and carboxylic acids, *J. Biotechnology* **60**, 105-111.
- Krebsfänger, N., Zocher, F., Altenbuchner, J. und Bornscheuer, U.T. (1998b), Characterization and enantioselectivity of a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens*, *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 641-646.
- Kugimiya, W., Otani, Y. und Hashimoto, Y. (1992), Molecular cloning and structure of the gene for esterase from a thermophilic bacterium, *Bacillus stearothermophilus* IFO 12550, *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 2074-2075.
- Kurtzman, A.L., Govindarajan, S., Vahle, K., Jones, J.T., Heinrichs, V. und Patten, P.A. (2001), Advances in directed protein evolution by recursive genetic recombination: applications to therapeutic proteins, *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 361-370.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K. und Veeger, C. (1987), Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents, *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 81-87.

- Lämmli, U.K. (1970), Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **277**, 680-685.
- Lange, S., Musidlowska, A., Schmidt-Dannert, C., Schmitt, J. und Bornscheuer, U.T. (2001), Cloning, functional expression, and characterization of recombinant pig liver esterase, *ChemBiochem* **2**, 576-582.
- Leo, A., Hansch, C. und Elkins, D. (1971), Partition coefficients and their uses, *Chem. Rev.* **71**, 525-616.
- LePecq, J.B. und Paoletti, C. (1967), A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids, *J. Mol. Biol.* **27**, 87-106.
- Leung, D.W., Chen, E. und Goeddel, D.V. (1989), A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction, *Technique* **1**, 11-15.
- Lide, D.R. (1998), CRC Handbook of chemistry and physics, 79. Aufl., Boca Raton, CRC Press LLC.
- Liese, A., Seelbach, K. und Wandrey, C. (2000), Industrial Biotransformations, Wiley-VCH, Weinheim.
- Liu, A.M.F., Somers, N.A., Kazlauskas, R.J., Brush, T.S., Zocher, F., Enzelberger, M.M., Bornscheuer, U.T., Horsman, G.P., Mezzetti, A., Schmidt-Dannert, C. und Schmid, R.D. (2001), Mapping the substrate selectivity of new hydrolases using colorimetric screening: lipases from *Bacillus thermocatenulatus* and *Ophiostoma piliferum*, esterases from *Pseudomonas fluorescens* and *Streptomyces diastatochromogenes*, *Tetrahedron: Asymmetrie* **12**, 545-556.
- Luria, S.E., Adams, J.N. und Ting, R.C. (1960), Transduction of lactose utilizing ability among strains of *E. coli* and *S. dysenteria* and the properties of the transducing phage particle, *Virology* **12**, 348-390.
- Ma, L., Gong, X. und Yeung, E.S. (2000), Combinatorial screening of enzyme activity by using multiplexed capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* **72**, 3383-3387.
- Marrel, C., Boss, G., van de Waterbeemd, H. und Testa, B. (1985), L-DOPA esters as potential prodrugs, *Eur. J. Med. Chem.* **20**, 459-465.
- Marrs, B., Delagrave, S. und Murphy, D. (1999), Novel approaches for discovering industrial enzymes, *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 241-245.
- Medou, M., Priem, G., Rocheblave, L., Pepe, G., Meyer, M., Chermann, J.C. und Kraus, J.L. (1999), Synthesis and anti-HIV activity of α -thiophenoxy-hydroxyethylamide derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* **34**, 625-638.
- Michaelis, L. und Menten, M.L. (1913), Die Kinetik der Invertinwirkung, *Biochem. Zeitschrift* **49**, 333-369.
- Miller, C.A. (2000), Advances in enzyme discovery technology: capturing diversity, *INFORM* **11**, 489-495.
- Moris-Varas, F., Hartman, L., Shah, A. und Demirjian, D.C. (2001), Screening of hydrolase libraries using pH-shift reagents: rapid evaluation of enantioselectivity, *ACS Symp. Ser.* **776**, 41-54.
- Moris-Varas, F., Shah, A., Aikens, J., Nadkarni, N.P., Rozzell, J.D. und Demirjian, D.C. (1999), Visualization of enzyme-catalyzed reactions using pH Indicators: rapid screening of hydrolase libraries and estimation of the enantioselectivity, *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 2183-2188.
- Mühlhardt, C. (2000), Der Experimentator: Molekularbiologie, 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986), Specific Enzymatic Amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.
- Musidlowska, A., Lange, S. und Bornscheuer, U.T. (2001), Durch Überexpression in der Hefe *Pichia pastoris* zu erhöhter Enantioselektivität: neue Aspekte bei der Anwendung von Schweineleber-Esterase, *Angew. Chem.* **113**, 2934-2936.
- Nakamura, K., Takenaka, K. und Ohno, A. (1998), Lipase-catalyzed kinetic resolution of 3-butyn-2-ol, *Tetrahedron: Asymmetrie* **9**, 4429-4439.
- Neidleman, S.L. (2001), Selected historical perspectives in biocatalysis, 1752-1960, *ACS Symp. Ser.* **776**, 14-40.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M. und Antranikian, G. (1999), Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 711-729.
- Ogawa, J. und Shimizu, S. (1999), Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods, *Trends Biotechnol.* **17**, 13-21.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolo, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L., Verschueren, K.H.G. und Goldman, A. (1992), The α/β hydrolase fold, *Protein Eng.* **5**, 197-211.
- Olsen, M., Iverson, B. und Georgiou, G. (2000), High-throughput screening of enzyme libraries, *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 331-337.
- Ostermeier, M., Shim, J.H. und Benkovic, S.J. (1999), A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology, *Nat. Biotechnol.* **17**, 1205-1209.
- Overbeeke, P.L.A., Jongejan, J.A. und Heijnen, J.J. (2000), Solvent effect on lipase enantioselectivity. Evidence for the presence of two thermodynamic states, *Biotech. Bioeng.* **70**, 278-290.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N. und Soccol, V.T. (1999), The realm of microbial lipases in biotechnology, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29**, 119-131.
- Patel, R.N. (2001a), Biocatalytic synthesis of intermediates for the synthesis of chiral drug substances, *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 587-604.
- Patel, R.N. (2001b), Enzymatic synthesis of chiral intermediates for drug development, *Adv. Synth. Catal.* **343**, 527-546.
- Peled, N. und Krenz, M.C. (1981), A new assay of microbial lipases with emulsified trioleoyl glycerol, *Anal. Biochem.* **112**, 219-222.
- Pelletier, I. und Altenbuchner, J. (1995), A bacterial esterase is homologous with non-haem haloperoxidases and displays brominating activity, *Microbiology* **141**, 459-468.
- Phythian, S.J. (2000), Esterases. In: *Biotechnology-Series*. (Hrsg. Rehm, H. J., Reed, G., Pühler, H. and Stadler, P. J. W.), 2. Aufl., **8a**, S. 193-241, Weinheim, Wiley-VCH.
- Pleiss, J., Scheib, H. und Schmid, R.D. (2000), The *His gap* motif in microbial lipases: A determinant of stereoselectivity toward triacylglycerols and analogs, *Biochimie* **82**, 1043-1052.
- Pope, B. und Kent, H.M. (1996), High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*, *Nucl. Acids Res.* **24**, 536-537.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. und Belfrage, G. (1975), Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, *Nature* **258**, 598-599.
- Powell, K.A., Ramer, S.W., del Cardayré, S.B., Stemmer, W.P.C., Tobin, M.B., Longchamp, P.F. und Huisman, G.W. (2001), Gerichtete Evolution und Biokatalyse, *Angew. Chem.* **113**, 4068-4080.

- Prelog, V. (1964), Specification of the stereospecificity of some oxido-reductases by diamond lattice sections, *Pure Appl. Chem.* **9**, 119-130.
- Prober, J.M., Trainor, G.L., Dam, R.J., Hobbs, F.W., Robertson, C.W., Zagursky, R.J., Cocuzza, A.J., Jensen, M.A. und Baumeister, K. (1987), A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides, *Science* **238**, 336-341.
- Purdy, R.E. und Kolattukudy, P.E. (1973), Depolymerization of a hydroxy fatty acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from *Fusarium solani f. pisi*: isolation and some properties of the enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.* **159**, 61-69.
- Reetz, M.T. (2000), Evolution in the test tube as a means to create enantioselective enzymes for use in organic synthesis, *Sci. Prog.* **83**, 157-172.
- Reetz, M.T. (2001), Kombinatorische und evolutionsgesteuerte Methoden zur Bildung enantioselektiver Katalysatoren, *Angew. Chem.* **113**, 292-320.
- Reetz, M.T. (2002), Neue Methoden für das Hochdurchsatz-Screening von enantioselektiven Katalysatoren und Biokatalysatoren, *Angew. Chem.* **114**, 1391-1394.
- Reetz, M.T., Becker, M.H., Klein, H.W. und Stöckigt, D. (1999), Eine Methode zum High-Throughput-Screening von enantioselektiven Katalysatoren, *Angew. Chem.* **111**, 1872-1875.
- Reetz, M.T., Becker, M.H., Kühling, K.M. und Holzwarth, A. (1998), Zeitaufgelöste IR-thermographische Detektion und Screening von enantioselektiven katalytischen Reaktionen, *Angew. Chem.* **110**, 2792-2795.
- Reetz, M.T., Hermes, M. und Becker, M.H. (2001b), Infrared-thermographic screening of the activity and enantioselectivity of enzymes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 531-536.
- Reetz, M.T. und Jaeger, K.E. (1999), Superior biocatalysts by directed evolution, *Top. Curr. Chem.* **200**, 31-57.
- Reetz, M.T. und Jaeger, K.E. (2000), Enantioselective enzymes for organic synthesis created by directed evolution, *Chem. Eur. J.* **6**, 407-412.
- Reetz, M.T., Kühling, K.M., Deege, A., Hinrichs, H. und Belder, D. (2000), Super-Hochdurchsatz-Screening von enantioselektiven Katalysatoren mittels parallelisierter Kapillarelektrophorese, *Angew. Chem.* **112**, 4049-4052.
- Reetz, M.T., Wilensek, S., Zha, D. und Jaeger, K.E. (2001a), Gerichtete Evolution eines enantioselektiven Enzyms durch kombinatorische multiple Kassetten-Mutagenese, *Angew. Chem.* **113**, 3701-3703.
- Reetz, M.T., Zonta, A., Schimossek, K., Liebeton, K. und Jaeger, K.E. (1997), Erzeugung enantioselektiver Biokatalysatoren für die Organische Chemie durch In-vitro-Evolution, *Angew. Chem.* **109**, 2961-2963.
- Reisch, J., Spitzner, W. und Schulte, K.E. (1967), Zur Frage der mikrobiologischen Wirksamkeit einfacher Acetylen-Verbindungen, *Arzneim. Forschung* **17**, 816-825.
- Rogers, R.S. (1999), Companies turn to biocatalysis, *Chem. Eng. News* **77**, 87-91.
- Rondon, M.R., Goodman, R.M. und Handelsman, J. (1999), The earth's bounty: assessing and accessing the microbial diversity, *Trends Biotechnol.* **17**, 403-409.
- Rotticci, D., Norin, T. und Hult, K. (2000), Mass transport limitations reduce the effective stereospecificity in enzyme-catalyzed kinetic resolution, *Org. Lett.* **2**, 1373-1376.
- Rouhi, A.M. (1999, January 4), Chemistry from unknown microbes, *Chem. Eng. News* **77**, 21-23.
- Ruttloff, H. (1994), Industrielle Enzyme, 2. Aufl., Behr's Verlag, Hamburg.
- Saha, B.C. und Demirjian, D.C. (2001), Advances in enzyme development and applied industrial biocatalysis, *ACS Symp. Ser.* **776**, 2-12.

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988), Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* **239**, 487-491.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N. (1985), Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science* **230**, 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning: a laboratory manual*, New York, Cold Spring Harbour.
- Sami, S.M., Remers, W.A. und Bradner, W.T. (1989), Preparation and antitumor activity of additional Mitomycin A analogues, *J. Med. Chem.* **32**, 703-708.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Scheib, H. (1999), Untersuchungen zur Regio- und Stereoselektivität von Lipasen durch computergestütztes Molecular Modeling und molekularbiologische Methoden, Dissertation Fakultät Chemie, Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Schlegel, H.G. (1992), *Allgemeine Mikrobiologie*, 7. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. und Witholt, B. (2001), Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature* **409**, 258-268.
- Schmid, R.D. (2002), *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Schmid, R.D. und Verger, R. (1998), Lipasen: Grenzflächen-Enzyme mit attraktiven Anwendungen, *Angew. Chem.* **110**, 1694-1720.
- Schmidt-Dannert, C. (2001), Directed evolution of single proteins, metabolic pathways, and viruses, *Biochemistry* **40**, 13125-13136.
- Schmidt-Dannert, C., Umeno, D. und Arnold, F.H. (2000), Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways, *Nat. Biotechnol.* **18**, 750-753.
- Schmitt, J., Hess, H. und Stunnenberg, H.G. (1993), Affinity purification of histidine-tagged proteins, *Mol. Biol. Reports* **18**, 223-230.
- Schulze, B. und Wubbolts, M. (1999), Biocatalysis for industrial production of fine chemicals, *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 609-615.
- Schumacher, K., Heine, E. und Höcker, H. (2001), Extremozymes for improving wool properties, *J. Biotechnology* **89**, 281-288.
- Schürch, M., Künzle, N., Mallat, T. und Baiker, A. (1998), Enantioselective hydrogenation of ketopantolactone: effect of stereospecific product crystallization during reaction, *J. Catal.* **176**, 569-571.
- Secundo, F., Riva, S. und Carrea, G. (1992), Effects of medium and of reaction conditions on the enantioselectivity of lipases in organic solvents and possible rationales, *Tetrahedron: Asymmetry* **3**, 267-280.
- Selifonova, O., Valle, F. und Schellenberger, V. (2001), Rapid evolution of novel traits in microorganisms, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3645-3649.
- Sellek, G.A. und Chaudhuri, J.B. (1999), Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles, *Enzyme Microb. Technol.* **25**, 471-482.
- Shao, Z., Zhao, H., Giver, L. und Arnold, F.H. (1998), Random-priming *in vitro* recombination: an effective tool for directed evolution, *Nucl. Acids Res.* **26**, 681-683.
- Sharp, P.A., Sugden, B. und Sambrook, J. (1973), Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis, *Biochemistry* **12**, 3055-3063.

- Shimizu, S. (2000), Vitamins and related compounds: microbial Production. In: *Biotechnology-Series*. (Hrsg. Rehm, H. J., Pühler, H., Reed, G. and Stadler, P. J. W.), 2. Aufl., **10**, S. 319-340, Weinheim, Wiley-VCH.
- Shimizu, S. und Kataoka, M. (1996a), Biotechnology for industrial production of fine chemicals, *Chimia* **50**, 409-410.
- Shimizu, S. und Kataoka, M. (1996b), Optical resolution of pantolactone by a novel fungal enzyme, lactonohydrolase, *Ann. NY Acad. Sci.* **799**, 650-658.
- Shimizu, S., Kataoka, M., Shimizu, K., Hirakata, M., Sakamoto, K. und Yamada, H. (1992), Purification and characterization of a novel lactonohydrolase, catalyzing the hydrolysis of aldonate lactones and aromatic lactones, from *Fusarium oxysporum*, *Eur. J. Biochem.* **209**, 383-390.
- Shimizu, S., Ogawa, J., Kataoka, M. und Kobayashi, M. (1997), Screening of novel microbial enzymes for the production of biologically and chemically useful compounds, *Adv. Biochem. Eng.* **58**, 45-87.
- Short, J.M. (1997), Recombinant approaches for accessing the biodiversity, *Nat. Biotechnol.* **15**, 1322-1323.
- Smals, A.O., Schroder Leiros, H.K., Os, V. und Peder, N. (2000), Cold adapted enzymes, *Biotechnol. Ann. Rev.* **6**, 1-57.
- Smith, G.P. (1994), The progeny of sexual PCR, *Nature* **370**, 324-325.
- Spee, J.H., de Vos, W.M. und Kuipers, O.P. (1993), Efficient random mutagenesis method with adjustable mutation frequency by use of PCR and dITP, *Nucl. Acids Res.* **21**, 777-778.
- Stemmer, W.P.C. (1994a), Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling, *Nature* **370**, 389-391.
- Stemmer, W.P.C. (1994b), DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10747-10751.
- Stemmer, W.P.C. (1995), Searching sequence space, *Bio/Technology* **13**, 549-553.
- Sterner, R. und Liebl, W. (2001), Thermophilic adaptation of proteins, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **36**, 39-106.
- Stinson, S.C. (1999, October 11), Chiral drug interactions, *Chem. Eng. News* **77**, 101-120.
- Stinson, S.C. (2001a, October 1), Chiral pharmaceuticals, *Chem. Eng. News* **79**, 79-97.
- Stinson, S.C. (2001b, May 14), Chiral chemistry, *Chem. Eng. News* **79**, 45-56.
- Stinson, S.C. (2001c, July 9), Fine chemicals, *Chem. Eng. News* **79**, 65-84.
- Stroh, W.H. (1998), Industrial enzyme market, *Gen. Eng. News* **18**, 11.
- Stumpp, T., Wilms, B. und Altenbuchner, J. (2000), Ein neues, L-Rhamnose-induzierbares Expressionssystem für *Escherichia coli*, *Biospektrum* **6**, 33-36.
- Sutherland, J.D. (2000), Evolutionary optimisation of enzymes, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 263-269.
- Takashiro, E., Watanabe, T., Nitta, T., Kasuya, A., Miyamoto, S., Ozawa, Y., Yagi, R., Nishigaki, T., Shibayama, T., Nakagawa, A., Iwamoto, A. und Yabe, Y. (1998), Structure-activity relationship of HIV-1 protease inhibitors containing AHPBA. Part III: Modification of P₂ site, *Bioorg. Med. Chem.* **6**, 595-604.
- Talipov, R.F., Gaisin, A.M., Sabirova, G.I., Sagitdinova, K.F. und Safarov, M.G. (1993), Synthesis of 3-Hydroxytetrahydrofuryl esters, *Russ. J. Org. Chem.* **29**, 1205-1207.
- Tann, C.M., Qi, D. und Distefano, M.D. (2001), Enzyme design by chemical modification of protein scaffolds, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 696-704.

- Taran, F., Gauchet, C., Mohar, B., Meunier, S., Valleix, A., Renard, P.Y., Créminon, C., Grassi, J., Wagner, A. und Mioskowski, C. (2002), High-throughput screening of enantioselective catalysts by immunoassay, *Angew. Chem.* **114**, 132-135.
- Tawaki, S. und Klibanov, A.M. (1992), Inversion of enzyme enantioselectivity mediated by the solvent, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 1882-1884.
- Terfort, A. und Brunner, H. (1996), Phosphane ligands with two binding sites of differing hardness for enantioselective Grignard cross coupling, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1467-1479.
- Thayer, A.M. (2001, May 21), Biocatalysis, *Chem. Eng. News* **79**, 27-34.
- Tietz, N.W. und Fiereck, E.A. (1966), A specific method for serum lipase determination, *Clin. Chim. Acta* **13**, 352-358.
- Tindall, K.R. und Kunkel, T.A. (1988), Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Biochemistry* **27**, 6008-6013.
- Tischer, W. und Wedekind, F. (1999), Immobilized enzymes: methods and applications, *Top. Curr. Chem.* **200**, 95-126.
- Tobin, M.B., Gustafsson, C. und Huisman, G.W. (2000), Directed evolution: the 'rational' basis for 'irrational' design, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 421-427.
- Tsubaki, K., Nuruzzaman, M., Kusumoto, T., Hayashi, N., Bin-Gui, W. und Fuji, K. (2001), Visual enantiomeric recognition using chiral phenolphthalein derivatives, *Org. Lett.* **3**, 4071-4073.
- Tulin, E.E., Amaki, Y., Nagasawa, T. und Yamane, T. (1993), A *Bacillus stearothermophilus* esterase produced by a recombinant *Bacillus brevis* stabilized by sulfhydryl compounds, *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 856-857.
- Vartanian, J.P., Henry, M. und Wain-Hobson, S. (1996), Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions, *Nucl. Acids Res.* **24**, 2627-2631.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J. und Haas, M.J. (2000), Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **9**, 113-148.
- Vorderwülbecke, T., Kieslich, K. und Erdmann, H. (1992), Comparison of lipases by different assays, *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 631-639.
- Vorlop, K.D. und Jekel, M. (1997), Immobilisierte Biokatalysatoren. In: *Biokonversion nachwachsender Rohstoffe*, **10**, 25-31, Landwirtschaftsverlag, Münster.
- Wahler, D., Badalassi, F., Crotti, P. und Reymond, J.L. (2001), Enzyme fingerprints by fluorogenic and chromogenic substrate arrays, *Angew. Chem.* **113**, 4589-4592.
- Wahler, D. und Reymond, J.L. (2001), High-throughput screening for biocatalysts, *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 535-544.
- Waldo, G.S., Standish, B.M., Berendzen, J. und Terwilliger (1999), Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein, *Nat. Biotechnol.* **17**, 691-695.
- Wei, Y., Schottel, J.L., Derewenda, U., Swenson, L., Patkar, S. und Derewenda, Z.S. (1995), A novel variant of the catalytic triad in the *Streptomyces scabies* esterase, *Nat. Struct. Biol.* **2**, 218-223.
- Weiß, S., John, G.T., Heinzle, E., Schultheiss, E., Jose, J., Arain, S., Krause, C., Klimant, I., Waltenberger, H., Maier, J. und Rübiger, T. (2001), Screening von Biokatalysatoren mit Sauerstoff- und pH-Mikrotiterplatten, *Biospektrum - Sonderausgabe 'Biokatalyse'* (Hrsg. Heiden S, Erb R), 54-59.
- Weissfloch, A.N.E. und Kazlauskas, R.J. (1995), Enantioselectivity of lipase from *Pseudomonas cepacia* toward primary alcohols, *J. Org. Chem.* **60**, 6959-6969.

- Wescott, C.R. und Klivanov, A.M. (1994), The solvent dependence of enzyme specificity, *Biochim. Biophys. Acta* **1206**, 1-9.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C. und Wiebe, W.J. (1998), Prokaryotes: The unseen majority, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6578-6583.
- Whittaker, R.G., Manthey, M.K., Le Brocque, D.S. und Hayes, P.J. (1994), A microtiter plate assay for the characterization of serine proteases by their esterase activity, *Anal. Biochem.* **220**, 238-243.
- Wigley, C.W., Stidham, R.D., Smith, N.M., Hunt, J.F. und Thomas, P.J. (2001), Protein solubility and folding monitored *in vivo* by structural complementation of a genetic marker protein, *Nat. Biotechnol.* **19**, 131-136.
- Wolff, A., Straathof, A.J.J., Jongejan, J.A. und Heijnen, J.J. (1997), Solvent induced change of enzyme enantioselectivity: rule or exception?, *Biocatal. Biotransform.* **15**, 175-184.
- Yang, H., Henke, E. und Bornscheuer, U.T. (1999), Highly efficient double enantioselection by lipase-catalyzed transesterification of (*R,S*)-carboxylic acid vinyl esters with (*RS*)-1-phenylethanol, *Tetrahedron: Asymmetry* **10**, 957-960.
- Yang, H., Henke, E. und Bornscheuer, U.T. (1999), The use of vinyl esters significantly enhanced enantioselectivities and reaction rates in lipase-catalyzed resolutions of arylaliphatic carboxylic acids, *J. Org. Chem.* **64**, 1709-1712.
- You, L. und Arnold, F.H. (1994), Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide, *Protein Eng.* **9**, 77-83.
- Zaks, A. (2001), Industrial biocatalysis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 130-136.
- Zhao, H., Chockalingam, K., Chen, Z. (2002), Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis, *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 104-110.
- Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J.A. und Arnold, F.H. (1998), Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination, *Nat. Biotechnol.* **16**, 258-261.
- Zocher, F., Krebsfänger, N., Yoo, O.J. und Bornscheuer, U.T. (1998), Enantioselectivity of a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens*, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **5**, 199-202.
- Zocher, F., Trauthwein, H., Riermeier, T.H. und Dingerdissen, U. (2001), Neue Wege in der Biokatalyse, *Chemie in unserer Zeit* **35**, 238-249.

8 Veröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Referierte Arbeiten

Baumann, M., Hauer, B.H., Bornscheuer, U.T. (2000), Rapid screening of hydrolases for the enantioselective conversion of 'difficult-to-resolve' substrates, *Tetrahedron: Asymmetry* **11**, 4781-4790.

Baumann, M., Stürmer, R., Bornscheuer, U.T. (2001), A high-throughput-screening method for the identification of active and enantioselective hydrolases, *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 4201-4204. Eine Hochdurchsatz-Screening-Methode zur Identifizierung aktiver und enantioselektiver Hydrolasen, *Angew. Chem.* **113**, 4329-4333. ('hot-paper')

Henke, E., Baumann, M., Musidlowska-Persson, A., Bornscheuer, U.T. (2002), Innovative Methoden zur Erzeugung stereoselektiver Esterasen, *Bioforum* **25**, 218-219.

Kongresse

Baumann, M., Hauer, B.H., Bornscheuer, U.T., Rapid Screening of Hydrolases for the Enantioselective Conversion of "Difficult-to-Resolve Substrates". 19. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Leipzig, 13. – 15. März 2001. Vortrag.

Baumann, M., Hauer, B.H., Bornscheuer, U.T., A high-throughput screening method for the identification of active and enantioselective hydrolases. BioTrans 2001 - 5th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformation, Darmstadt, 2. – 7. September 2001

Patente

Short, J., Mathur, E.J., Baumann, M., Bornscheuer, U.T., Hydrolase enzymes and their use in kinetic resolution. United States Patent Application No: 09/999,162. Filed: November 30, 2001.

Baumann, M., Bornscheuer, U.T., BASF AG Ludwigshafen, Nachweisverfahren zur Identifizierung von Hydrolasen. Patentanmeldung beim deutschen Patent- und Markenamt 21. Mai 2001. PCT-Antrag gestellt (Stand: Mai 2002).

Frühere Veröffentlichungen auf anderen Themengebieten

Baumann, M., Lenz, P., Waizenegger, W., Armbruster, W. (1999), Optimierte LHKW-Bestimmung in Wasser, *LaborPraxis* **23**, 98-102.

Lederer, M.O., Baumann, M. (2000) Formation of a phospho-linked pyrrolcarbaldehyde from model reactions of D-Glucose and 3-Deoxyglucosone with phosphatidyl ethanolamine, *Bioorg. Med. Chem.* **8**, 115-121.

9 Lebenslauf

Name: Markus Baumann
Adresse: Rechbergstr. 18/1
73669 Lichtenwald
Geburtsdatum: 6. April 1972
Geburtsort: Esslingen am Neckar
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schule

1978 – 1982 Grundschule Lichtenwald
1982 – 1991 Gymnasium Plochingen in Plochingen (Abitur)

Zivildienst

Aug. 1991 – Okt. 1992 Werkstatt für Behinderte Esslingen-Zell

Universität

Okt. 1992 – Sept. 1996 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Stuttgart
Okt. 1996 – Sept. 1997 Fortsetzung des Studiums der Lebensmittelchemie an der Universität Hohenheim
Abschluß: Erstes Staatsexamen (Hauptprüfung Teil A)
Nov. 1997 – Okt. 1998 Praktisches Jahr am Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart (Sitz: Fellbach)
Abschluß: Zweites Staatsexamen (Hauptprüfung Teil B)
Jan. 1999 – Jul. 2001 Doktorarbeit am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart (Prof. Rolf Schmid) unter Betreuung durch Prof. Uwe Bornscheuer, Institut für Technische Chemie & Biotechnologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Thema: 'Identifizierung aktiver und enantioselektiver Hydrolasen für den industriellen Einsatz'
Jul. 2001 Verleihung des akademischen Grades Diplom-Lebensmittelchemiker (Dipl.-LMchem) der Universität Hohenheim
Thema: 'Bildung eines Phospholipid-verknüpften Pyrrolcarbaldehyds aus Modellreaktionen von Glucose und 3-Desoxyglucoson mit Phosphatidylethanolamin' (Betreuer: PD Markus Lederer)

Sonstiges

seit 1996 Mitarbeiter der Universitätsbibliothek Hohenheim