

**Enzymatische Hydrolyse sterisch anspruchsvoller Nitrile
und Darstellung von chiralen α -Hydroxycarbonsäuren
durch bienzymatische Ganzzellkatalyse in Gegenwart
ionischer Flüssigkeiten**

**Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung**

**Vorgelegt von
Stefanie Fischer, geb. Baum
aus Schwäbisch Hall**

**Hauptberichter: Prof. Dr. Andreas Stolz
Mitberichter: Prof. Dr. Bernhard Hauer**

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.2022

**Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart
2023**

*„Es gibt mehr Menschen, die zu früh aufgeben,
als solche die scheitern.“
(Henry Ford)*

Für meine Familie

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Ich versichere, dass ich die Dissertation mit dem Titel „Enzymatische Hydrolyse sterisch anspruchsvoller Nitrile und Darstellung von chiralen α -Hydroxycarbonsäuren durch bienzymatische Ganzzellkatalyse in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Leinfelden-Echterdingen, den 04.01.2022

Stefanie Fischer

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas Stolz am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart durchgeführt.

Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Zusammenfassung

Enantiomerenreine α -Hydroxycarbonsäuren (und Carboxamide) sind interessante Produkte für die chemische, pharmazeutische und agrochemische Industrie, da sie als Ausgangssubstanzen zur Herstellung vieler chiraler Produkte genutzt werden können. Für die enzymatische Darstellung von α -Hydroxycarbonsäuren mit sensiblen funktionellen Gruppen bietet sich eine bienzymatische Reaktionskaskade an. Hierbei werden im ersten Schritt der Reaktion aus prochiralen Aldehyden und Cyanid enantiomerenreine Cyanhydrine mit Hilfe einer Hydroxynitril-Lyase (Oxynitrilase) synthetisiert, welche im zweiten Schritt der Kaskade durch eine enantiokonservative Nitrilase zu den korrespondierenden α -Hydroxycarbonsäuren hydrolysiert werden. Die angestrebte Biotransformation setzt in wässrigen Medien niedrige pH-Werte voraus, um die chemische Hydrocyanierung der Aldehyde und den chemischen Zerfall der gebildeten Intermediate (α -Hydroxynitrile) und die damit einhergehende Racemisierung zu verhindern.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten aliphatische α -Hydroxycarbonsäuren und sterisch anspruchsvolle α -Alkyl- α -hydroxycarbonsäuren synthetisiert werden. Hierfür wurden zunächst verschiedene Nitrilasen im Hinblick auf die Umsetzung eines aliphatischen Modellsubstrates (2-Hydroxy-3-butenitril) und eines tertiären Cyanhydrins (Acetophenoncyanhydrin) analysiert. Die Nitrilase aus *Pseudomonas fluorescens* EBC191 eignete sich am besten für die angestrebten bienzymatischen Reaktionskaskaden, da sie die größte Toleranz gegenüber sauren pH-Werten aufwies und in der Lage war die beiden Modellsubstrate zu hydrolysieren. Weiterhin setzte die Nitrilase auch andere aliphatische und sterisch anspruchsvolle Nitrile um, wenn auch zum Teil mit geringen Enzymaktivitäten. Es wurde versucht, die Aktivität gegenüber α,α -disubstituierten Nitrilen mittels gerichteter Evolution und rationalem Proteindesign zu steigern. Im Rahmen der Versuche zur gerichteten Evolution wurde eine *in-vivo*-Mutagenese mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin sowie eine Zufallsmutagenese mittels Error-prone PCR durchgeführt. Zur Selektion von Enzymvarianten mit verbesserter Substratspezifität gegenüber α,α -disubstituierten Nitrilen wurde ein Selektionssystem in Flüssigkultur mit einem sterisch anspruchsvollen Nitril (2-Methyl-2-phenylpropannitril) als einziger Stickstoff-Quelle entwickelt. Mit Hilfe dieses Selektionssystems wurden rekombinante Stämme mit einem veränderten Wachstumsverhalten angereichert. Im Rahmen des rationalen Proteindesigns wurden mit Hilfe eines Homologie-Modells verschiedene, möglicherweise an der Substratbindung beteiligte Aminosäure-Reste identifiziert, durch gerichtete Mutagenese modifiziert und im Hinblick auf die Hydrolyse von Acetophenoncyanhydrin analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Veränderungen an einem Tyrosin-Rest an Position 54 zu einer verbesserten Substratumsetzung von Acetophenoncyanhydrin führten. Weiterhin wurden Enzymvarianten gefunden, die mit einem ee-Wert von 86 und 93 % für (*R*)-Atrolactat im Vergleich zur Wildtyp-Nitrilase (ee = 51 % (*R*)-Atrolactat) eine deutlich gesteigerte Enantioselektivität aufwiesen.

Mit Hilfe eines bienzymatischen *E. coli* Ganzzellkatalysators, in dem die (*S*)-spezifische Oxyni-

trilase aus der Cassava-Pflanze (*Manihot esulenta*) und die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 simultan exprimiert wurden, gelang die Synthese von 2-Hydroxy-3-butensäure aus Acrolein und HCN sowie Atrolactat (und Atrolactamid) aus Acetophenon und HCN. Der Enantiomerenüberschuss betrug im Falle von (*S*)-Atrolactat unter optimierten Reaktionsbedingungen 92 %. Durch Kombination der Oxynitrilase mit verschiedenen Nitrilasevarianten aus der Sättigungsmutagenese an Position 54 konnte der Atrolactamid-Anteil von 29 % (bei Verwendung der Wildtyp-Nitrilase) auf 3 % gesenkt werden.

Bei der Synthese von (*S*)-Mandelsäure und (*S*)-Mandelamid aus Benzaldehyd und Cyanid in wässrigen Medien wurden bei höheren Substratkonzentrationen (≥ 25 mM Benzaldehyd) durch den „bienzymatischen Ganzzellkatalysator“ stark verringerte Produktausbeuten festgestellt. Daher wurde der Einfluss hoher Substratkonzentrationen auf den Wirtstamm (*E. coli* JM109) sowie auf die Oxynitrilase- und Nitrilase-Aktivitäten in den Ganzzellkatalysatoren untersucht. Die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 wurde bereits bei niedrigen Konzentrationen an Benzaldehyd (≥ 25 mM) stark gehemmt und die Zellen des Wirtstammes bei Benzaldehydkonzentrationen von ≥ 50 mM geschädigt. Daher wurden verschiedene hydrophobe Lösemittel und ionische Flüssigkeiten im Hinblick auf ihre Eignung als Substratreservoir für Benzaldehyd in 2-Phasensystemen vergleichend analysiert, um toxische Substratkonzentrationen in der wässrigen Phase zu vermeiden. Hierbei wurden die ionischen Flüssigkeiten 1-Butyl-1-methylpyrrolidinium-bis(trifluormethylsulfonyl)imid, 1-Butyl-3-methylimidazolium-hexafluorphosphat und 1-Butyl-3-methylimidazolium-bis(trifluormethylsulfonyl)imid als besonders geeignet identifiziert. Bei Verwendung der am besten geeigneten ionischen Flüssigkeit (1-Butyl-1-methylpyrrolidinium-bis(trifluormethylsulfonyl)imid) konnte mit Hilfe des etablierten 2-Phasensystems 0,7 M Benzaldehyd vollständig umgesetzt und (*S*)-Mandelsäure sowie (*S*)-Mandelamid mit hohen Enantiomerenüberschüssen (> 95 %) synthetisiert werden.

Abstract

Enantiomerically pure α -hydroxycarboxylic acids (and carboxylic amides) are interesting products for the chemical, pharmaceutical and agrochemical industry because they can be used as substrates for the synthesis of many chiral compounds. The enzymatic synthesis of α -hydroxycarboxylic acids with sensitive functional groups can be achieved by bienzymatic cascade reactions. In the first step of the reaction cascade enantiomerically pure cyanohydrins are synthesized from prochiral aldehydes and cyanide by an hydroxynitrile lyase (oxynitrilase), which are hydrolysed by an enantioconservative nitrilase to the corresponding α -hydroxycarboxylic acids in the second step of the cascade. This biotransformation requires low pH values in aqueous media to prevent the chemical hydrocyanation of the aldehydes and the chemical decomposition of the intermediates formed (α -hydroxynitriles) and the associated racemization.

In the course of the present work, the synthesis of aliphatic α -hydroxycarboxylic acids and sterically demanding α -alkyl- α -hydroxycarboxylic acids was studied. For this purpose, various nitrilases were initially analyzed with respect to the conversion of an aliphatic model substrate (2-hydroxy-3-butenenitrile) and a tertiary cyanohydrin (acetophenone cyanohydrin). The nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191 was most suitable for the desired bienzymatic cascade reaction due to its high tolerance against acidic pH-values and its ability to hydrolyse both model substrates. Furthermore, the nitrilase also converted other aliphatic and sterically demanding nitriles, although with low enzymatic activities. It was tried to increase the activity towards α,α -disubstituted nitriles by directed evolution and rational protein design. As part of the directed evolution experiments *in vivo* mutagenesis was carried out with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine as well as random mutagenesis using error-prone PCR. For the selection of enzyme variants with improved substrate specificity towards α,α -disubstituted nitriles, a selection system in liquid culture was developed with a sterically demanding nitrile (2-methyl-2-phenylpropanenitrile) as sole source of nitrogen. By using this selection system, recombinant strains were enriched with an altered growth behaviour. Within the framework of rational protein design, a homology model contributed to the identification of various amino acid residues possibly involved in substrate binding. These residues were modified by directed mutagenesis and analyzed with regard to the hydrolysis of acetophenone cyanohydrin. It could be shown that the exchange of a tyrosine residue at position 54 led to improved conversion of acetophenone cyanohydrin. Furthermore, enzyme variants were found which showed with ee values of 86 % and 93 % for (*R*)-atrolactate significantly increased enantioselectivities compared to the wild type nitrilase (ee = 51 % (*R*)-atrolactate).

The synthesis of 2-hydroxy-3-butenic acid from acrolein and HCN as well as atrolactate (and atrolactamide) from acetophenone and HCN was successfully achieved by using a bienzymatic whole cell catalyst, which expressed the (*S*)-specific oxynitrilase from the cassava plant (*Manihot esculenta*) and the nitrilase from *P. fluorescens* EBC191 simultaneously. The enantiomeric excess

of (*S*)-atrolactate was 92 % under optimized reaction conditions. The concentration of the atrolactamide formed as by-product could be reduced from 29 % (using the wild type nitrilase) to 3 % by combining the oxynitrilase with different nitrilase variants from the saturation mutagenesis at position 54.

The synthesis of (*S*)-mandelic acid and (*S*)-mandeloamide from benzaldehyde and cyanide by the bienzymatic whole cell catalyst in aqueous media was strongly hampered by higher substrate concentrations (≥ 25 mM benzaldehyde). Therefore, the influence of high substrate concentrations on the host strain (*E. coli* JM109) and on the nitrilase and oxynitrilase activities in the whole cell catalysts were analyzed. The nitrilase from *P. fluorescens* EBC191 was strongly inhibited already at low benzaldehyde concentrations (≥ 25 mM) and cells of the host strain were damaged at benzaldehyde concentrations ≥ 50 mM. Therefore, various hydrophobic solvents and ionic liquids were comparatively investigated with respect to their suitability as substrate reservoir for benzaldehyde in biphasic systems to avoid toxic substrate concentrations in the aqueous phase. The ionic liquids 1-butyl-1-methylpyrrolidinium-bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate and 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide were identified as particularly suitable. The application of the ionic liquid 1-butyl-1-methylpyrrolidinium-bis(trifluoromethylsulfonyl)imide in a biphasic system allowed the conversion of 0,7 M benzaldehyde to (*S*)-mandelic acid and (*S*)-mandeloamide with enantiomeric excesses of > 95 %.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	IV
Abstract	VI
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Die enzymatische Hydrolyse von Nitrilen	1
1.2 Nitrilasen	3
1.2.1 Die „Nitrilase-Superfamilie“	4
1.2.2 Untersuchungen zu den Strukturen bakterieller und pflanzlicher Nitrilasen .	5
1.2.3 Postulierter Reaktionsmechanismus	8
1.2.4 Die Nitrilase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> EBC191	11
1.3 Bedeutung und Synthese enantiomerenreiner α -Hydroxycarbonsäuren	12
1.3.1 Bienzymatische Darstellung enantiomerenreiner α -Hydroxycarbonsäuren . .	13
1.4 Bedeutung und Synthese enantiomerenreiner α -Alkyl- α -hydroxycarbonsäuren . . .	15
1.5 Ionische Flüssigkeiten	16
1.5.1 Eigenschaften ionischer Flüssigkeiten	17
1.6 Ziele der Arbeit	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Bakterienstämme und Plasmide	22
2.2 Oligonukleotide	24
2.3 Geräte	25
2.3.1 Allgemeine Laborgeräte	25
2.3.2 HPLC-Anlagen und Trennsäulen	25
2.4 Chemikalien und Enzyme	26
2.4.1 Kommerziell verfügbare Chemikalien und Enzyme	26
2.4.2 Zur Verfügung gestellte Chemikalien	26
2.4.3 Synthese von Acetophenoncyanhydrin	26
2.4.4 Synthese von Atrolactamid	27
2.5 Nährmedien, Lösungen und Antibiotika	27
2.5.1 Komplexmedien	27
2.5.2 Mineralmedien und Lösungen	28
2.5.3 Medien mit einem Nitril als einziger Stickstoffquelle	29
2.5.4 Antibiotika	30

2.6	Mikrobiologische Methoden	30
2.6.1	Stammhaltung	30
2.6.2	Kultivierung	30
2.6.3	Bestimmung der Gesamtkeimzahl	30
2.6.4	Bestimmung der Lebendkeimzahl	31
2.6.5	Anzucht von Zellen mit Oxynitrilase- und/oder Nitrilase-Aktivitäten und Herstellung von Ruhezellen	31
2.6.6	Durchführung von Ruhezellumsätzen	31
2.6.7	Bestimmung der Nitrilase- oder Oxynitrilase-Aktivität	32
2.7	Analytische Verfahren	33
2.7.1	Bestimmung der Substrat- bzw. Produktkonzentrationen mittels HPLC	33
2.7.2	Trennung von Enantiomergemischen und Bestimmung der Enantiomeren- überschüsse	35
2.7.3	Identifizierung der Enantiomere von Atrolactat und Atrolactamid	35
2.7.4	Quantifizierung von Ammonium	36
2.7.5	Bestimmung von Cyanidkonzentrationen	36
2.8	Molekulargenetische Methoden	37
2.8.1	Isolierung und Reinigung von DNA	37
2.8.2	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	37
2.8.3	Ligation von DNA-Fragmenten	37
2.8.4	Ethanol-fällung	37
2.8.5	DNA-Sequenzierung	37
2.8.6	Agarose-Gelelektrophorese	37
2.8.7	Transformation	38
2.8.8	Transformation durch Elektroporation	39
2.9	Mutagenesen	39
2.9.1	Ortsgerichtete Mutagenese (Site-Directed Mutagenesis)	39
2.9.2	Sättigungsmutagenese	40
2.9.3	<i>In-vivo</i> -Mutagenese mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)	40
2.9.4	Zufallsmutagenese mittels Error-prone PCR	41
2.10	Proteinchemische Methoden	41
2.10.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
2.11	„Bienzymatische Ganzzellkatalyse“ in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	43
2.11.1	Bestimmung der Verteilungskoeffizienten	43
2.11.2	Extraktion von HCN in ionische Flüssigkeiten	43
2.11.3	Biotransformationen im 2-Phasensystem mit ionischen Flüssigkeiten	44
2.11.4	Berechnung der durchschnittlichen Substrat- und Produktkonzentrationen im 2-Phasensystem mit ionischen Flüssigkeiten	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Biotransformation aliphatischer Nitrile	45
3.1.1	Stabilität des Modellsubstrates 2-Hydroxy-3-butennitril	45

3.1.2	Säurestabilität verschiedener Nitrilasen in rekombinanten Ganzzellsystemen	46
3.1.3	Umsatz von 2-Hydroxy-3-butennitril durch verschiedene Nitrilasen	47
3.1.4	Hydrolyse verschiedener aliphatischer Nitrile durch <i>E. coli</i> JM109(pIK9) . .	49
3.2	Bienzymatische Synthese von 2-Hydroxy-3-butensäure aus Acrolein und KCN . . .	52
3.3	Biotransformation sterisch anspruchsvoller Nitrile	54
3.3.1	Stabilität des Modellsubstrates Acetophenoncyanhydrin	55
3.3.2	Umsatz von Acetophenoncyanhydrin durch verschiedene Nitrilasen	55
3.3.3	Aktivität der Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 gegenüber quartären Nitrilen sowie tertiären Cyanhydrinen	58
3.3.4	Umsatz von 2-Methyl-2-phenylpropannitril	59
3.4	Versuche zur Entwicklung eines Selektionssystems zur Veränderung der Substratspezifität der Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191	60
3.4.1	Induktion der Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 in <i>E. coli</i> JM109(pIK9) beim Wachstum in Minimalmedium	61
3.4.2	Wachstum von <i>E. coli</i> JM109(pIK9) im wässrigen System in Minimalmedium mit 2-PPN oder Ammoniumsulfat als einziger Stickstoffquelle	63
3.4.3	Wachstum von <i>E. coli</i> JM109(pIK9) in 2-Phasensystemen mit 2-PPN als einziger Stickstoffquelle	65
3.4.4	Inkubation von <i>E. coli</i> JM109(pJOE2775) im 2-Phasensystem mit HMeN und 2-PPN als einziger Stickstoffquelle	68
3.4.5	Wachstum von <i>E. coli</i> JM109(pIK9) im 2-Phasensystem mit HMeN und unterschiedlichen Konzentrationen an 2-PPN	69
3.4.6	Wachstum von <i>E. coli</i> JM109(pIK9) auf verschiedenen Festmedien mit 2-PPN als einziger Stickstoffquelle	73
3.4.7	Wachstum von <i>E. coli</i> JM109(pIK9) in 2-Phasensystemen mit HMeN und 2-PPN als einziger Stickstoffquelle in Gegenwart unterschiedlicher Rhamnosekonzentrationen	74
3.4.8	Co-Kultur aus <i>E. coli</i> JM109(pIK9) und <i>E. coli</i> JM109(pIK7) im 2-Phasensystem	75
3.4.9	Verteilungskoeffizient von 2-Methyl-2-phenylpropannitril (MMN) im 2-Phasensystem mit HMeN	78
3.4.10	<i>In-vivo</i> -Mutagenese mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) . .	79
3.4.11	Etablierung eines Selektionssystems mit einem Nitril als einziger Stickstoffquelle nach <i>in-vivo</i> -Mutagenese mit MNNG	81
3.4.12	Nachweis des beschleunigten Wachstums der mit Hilfe des 2-Phasensystems mit MMN selektierten Stämme	86
3.4.13	Umsatz von MMN durch die im 2-Phasensystem selektierten Stämme im rein wässrigen System	88
3.4.14	Aggregation der rekombinanten <i>E. coli</i> Stämme im 2-Phasensystem mit MMN als einziger Stickstoffquelle	89
3.4.15	Zufallsmutagenese mittels fehlerbehafteter PCR (Error-prone PCR)	90

3.4.16	Selektionssystem mit einem Nitril als einziger Stickstoffquelle nach Zufalls- mutagenese mittels fehlerbehafteter PCR	91
3.4.17	Wachstum von <i>E. coli</i> JM109(pIK9) im 2-Phasensystem mit MMN als einzi- ger Stickstoffquelle	92
3.5	Veränderung der Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 durch rationales Proteinde- sign	93
3.5.1	Biotransformationen mit C-terminal verkürzten Varianten der Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 und der Enzymvariante Y141G	93
3.5.2	Homologie-Modell der Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191	95
3.5.3	Biotransformationen mit den Enzymvarianten A165W, P189A, S190T, S190Y, F191G und D238A der Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i>	96
3.5.4	Biotransformationen mit der Enzymvariante Y54A der Nitrilase aus <i>P. fluo- rescens</i> EBC191	101
3.5.5	Sättigungsmutagenese an Position Y54 in der Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191	104
3.5.6	Biotransformationen mit den Enzymvarianten Y54R, Y54I, Y54K, Y54V, Y54M, Y54F und Y54P	107
3.6	Die bienzymatische Synthese von Atrolactat und Atrolactamid	110
3.6.1	Umsatz von Acetophenon durch eine enzymatische Kaskadenreaktion unter „Standardbedingungen“	110
3.6.2	Steigerung der Produktausbeute durch Variationen der Induktions- und Re- aktionsbedingungen	111
3.6.3	Umsatz von Acetophenon und KCN durch „bienzymatische Ganzzellkataly- satoren“ mit verschiedenen Nitrilasevarianten	114
3.6.4	Umsatz von Acetophenon und KCN durch die Oxynitrilase aus <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i>	115
3.7	Einfluss hoher Substratkonzentrationen auf die Oxynitrilase- und Nitrilase-Akti- vitäten von Ganzzellkatalysatoren	116
3.7.1	Einfluss hoher Substratkonzentrationen auf die Aktivität der Oxynitrilase und Nitrilase im „bienzymatischen Ganzzellkatalysator“ unter pH-Wert Kon- trolle	117
3.7.2	Einfluss von HCN auf die Nitrilase-Aktivität von <i>E. coli</i> JM109(pIK9) . . .	118
3.7.3	Einfluss von Benzaldehyd auf die Nitrilase-Aktivität von <i>E. coli</i> JM109 (pIK9)	120
3.7.4	Toxischer Effekt von Benzaldehyd auf den Wirtsstamm <i>E. coli</i> JM109 . . .	120
3.7.5	Toxischer Effekt von Mandelsäure auf den Wirtsstamm <i>E. coli</i> JM109 . . .	121
3.8	„Bienzymatische Ganzzellkatalyse“ in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten	122
3.8.1	Auswahl eines geeigneten Substratreservoirs für Benzaldehyd und HCN . .	122
3.8.2	Bestimmung der Verteilungskoeffizienten der Substrate und Produkte in 2- Phasensystemen mit ionischen Flüssigkeiten	123
3.8.3	Vergleich der toxischen Effekte von ionischen Flüssigkeiten oder Diisopropyl- ether (DIPE) auf <i>E. coli</i> JM109	125

3.8.4	Vergleich der Biotransformationen von Benzaldehyd und HCN im 1-Phasen- bzw. 2-Phasensystem	126
3.8.5	Spontane chemische Hydrocyanierung in Gegenwart von Bmpl NTf ₂	127
3.8.6	Umsatz synthetisch relevanter Substratkonzentrationen in Gegenwart der ionischen Flüssigkeit BMpl NTf ₂	128
3.8.7	Umsatz synthetisch relevanter Substratkonzentrationen in Gegenwart der ionischen Flüssigkeit BMim PF ₆	129
3.8.8	Einfluss von BMim PF ₆ auf die Oxynitrilase- und Nitrilase-Aktivitäten von <i>E. coli</i> JM109(pIK9)(pJOE5361.1)	130
3.8.9	Umsatz synthetisch relevanter Substratkonzentrationen in Gegenwart der ionischen Flüssigkeit BMim NTf ₂	134
4	Diskussion	135
4.1	Vergleich der Stabilität verschiedener α -Hydroxynitrile	135
4.2	Säureretoleranz verschiedener Nitrilasen	136
4.3	Biotransformation aliphatischer Nitrile	137
4.4	Bienzymatische Synthese von 2-Hydroxy-3-butensäure	138
4.5	Biotransformation sterisch anspruchsvoller Nitrile	140
4.6	Versuche zur Steigerung der Umsatzraten von sterisch anspruchsvollen Nitrilen	141
4.6.1	Etablierung eines Selektionssystems mit einem Nitril als einziger Stickstoffquelle	141
4.6.2	Erstellen einer Mutantenbibliothek mittels chemischer Mutagenese durch MNNG	143
4.6.3	Analyse der mit Hilfe der chemischen Mutagenese selektierten Varianten	143
4.6.4	Erstellen einer Mutantenbibliothek mittels epPCR	144
4.7	Umsatz von Acetophenoncyanhydrin durch C-terminal verkürzte Enzymvarianten der Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191	146
4.8	Veränderung der Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 durch rationales Proteindesign	148
4.8.1	Bedeutung des Alanin-Restes an Position 165 für die Enzymaktivität, Amidbildung und Enantioselektivität der Nitrilase	148
4.8.2	Bedeutung des Tyrosin-Restes an Position 54 für die Aktivität, Amidbildung und Enantioselektivität der Nitrilase	149
4.9	Bienzymatische Synthese von Atrolactat	162
4.10	Einfluss hoher Substratkonzentrationen auf die Oxynitrilase- und Nitrilase-Aktivitäten und die Lebensfähigkeit rekombinanter <i>E. coli</i> Stämme	164
4.11	Ionische Flüssigkeiten	167
	Literaturverzeichnis	171
	A Anhang	192
	Danksagung	195

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AL	Atrolactat
ALA	Atrolactamid
Amp^R	Ampicillin resistent
APCN	Acetophenoncyanhydrin
APS	Ammoniumpersulfat
AGP	saures α 1-Glykoprotein
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BA	Benzaldehyd
bp	Basenpaare
BMim NTf₂	1-Butyl-3-methylimidazolium-bis(trifluormethylsulfonyl)imid
BMim PF₆	1-Butyl-3-methylimidazolium-hexafluorphosphat
BMpl NTf₂	1-Butyl-1-methylpyrrolidinium-bis(trifluormethylsulfonyl)imid
C	Cytosin
c	Konzentration
Cm^R	Chloramphenicol resistent
demin.	demineralisiert
DIPE	Diisopropylether
DKR	dynamisch kinetische Racematspaltung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ee	Enantiomerenüberschuss
G	Guanin
g	Gramm
h	Stunde
HbHnL	Oxynitrilase aus <i>Hevea brasiliensis</i>
HMeN	2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan
HnL	Hydroxynitril Lyase (Oxynitrilase)
HSA	humanes Serumalbumin
IL	ionische Flüssigkeit
Kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare

KbE	Kolonie-bildende Einheiten
L	Liter
LuHnL	Oxynitrilase aus <i>Linum usitatissimum</i>
M	Molar
MA	Mandelamid
MeHnL	Oxynitrilase aus <i>Manihot esculenta</i>
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
MMN	2-Methyl-2-phenylpropannitril
MMS	2-Methyl-2-phenylpropansäure
MN	Mandelonitril
MNNG	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
MS	Mandelsäure
ng	Nanogramm
NitA	Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191
NLase	Nitrilase
OD₆₀₀	optische Dichte (bei 600 nm)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute
PaHnL	Oxynitrilase aus <i>Prunus amygdalus</i>
2-PPA	2-Phenylpropanamid
2-PPN	2-Phenylpropannitril
2-PPS	2-Phenylpropansäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet^R	Tetracyclin resistent
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
U	Unit
ÜS	Überstand
ÜNK	Übernachtskultur
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Die enzymatische Hydrolyse von Nitrilen

Nitrile (R-CN) sind in der Natur weit verbreitet und kommen überwiegend in Form von Cyanoglykosiden, Cyanolipiden, Amino- und α -Hydroxynitrilen (Cyanhydrinen) in vielen Pflanzenspezies vor (Legras et al., 1990; Vetter, 2000; Gong et al., 2012; Nigam et al., 2017). Darüber hinaus wurden Nitrile (z.B. β -Cyanoalanin, Toyocamycin, α -Aminobutanitril oder die Cyanhydrine der Brenztraubensäure oder Glyoxalsäure) in Bakterien bzw. Pilzen nachgewiesen (Legras et al., 1990; Caspar und Spiteller, 2015). Nitrile sind nicht nur in der Natur weit verbreitet, sie werden auch industriell in großem Maßstab verwendet. So finden diese Verbindungen als Lösemittel (Acetonitril), Herbizide (Bromoxynil, Ioxynil, Buctril etc.), Pharmazeutika (Citalopram, Anastrozol etc.) sowie als Ausgangssubstanzen (Acrylnitril, Adiponitril) für die Herstellung von Polymeren (Polyacrylnitril, Nylon-66 Polymere) breite Anwendung (Banerjee et al., 2002; Ramteke et al., 2013). Zudem sind Nitrile wichtige Zwischenstufen für die chemische Synthese von Estern, Aldehyden, Ketonen, Aminen, heterocyclischen Verbindungen sowie Carbonsäuren und Carboxamiden (Nagasawa und Yamada, 1989; Banerjee et al., 2002; Ramteke et al., 2013; Gong et al., 2015).

Bedingt durch die mannigfaltige Verfügbarkeit von natürlichen und anthropogenen Nitrilen in der Umwelt ist deren mikrobielle Nutzung und Umsetzung von großem praktischem Interesse (Yamada et al., 1979; Jallageas et al., 1980; Benz et al., 2007; Chen et al., 2009; Gong et al., 2012; Nigam et al., 2017; Shen et al., 2020). Die Nitril-Hydrolyse stellt hierbei die am weitesten verbreitete Biotransformation dieser Verbindungen dar (Benz et al., 2007). Nitrile können durch Nitrilasen (EC 3.5.5.1) entweder direkt in die entsprechenden Carbonsäuren und Ammoniak überführt werden oder in einer 2-stufigen Reaktion durch Nitril-Hydratasen (EC 4.2.1.84) zunächst in die korrespondierenden Carboxamide und anschließend mittels Amidasen (EC 3.5.1.4) zu den Carbonsäuren und Ammoniak hydrolysiert werden (Abb. 1.1).

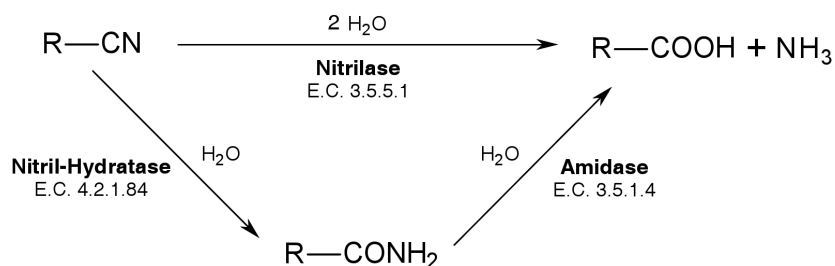


Abbildung 1.1: Die enzymatische Hydrolyse von Nitrilen durch Nitrilasen sowie durch Nitril-Hydratasen und Amidasen.

Die traditionelle chemische Nitril-Hydrolyse weist eine Reihe von ökologischen und ökonomischen Nachteilen auf, wobei sich hierbei besonders stark saure oder basische Reaktionsbedingungen sowie hohe Prozesstemperaturen negativ auswirken (Nagasawa und Yamada, 1989; Wang, 2015). Die harschen Reaktionsbedingungen haben neben dem hohen Energiebedarf zur Folge, dass unerwünschte Nebenprodukte gebildet werden und große Mengen salzhaltiger Abfälle entstehen, deren Entsorgung zusätzliche Kosten verursachen (Mylerová und Martínková, 2003; Nagasawa und Yamada, 1989; Wang, 2015). Zudem ist die chemische Nitril-Hydrolyse häufig problematisch bei der Darstellung von Carbonsäuren mit sensiblen funktionellen Gruppen, die beim säure- oder basenkatalysierten Prozess abgespalten werden können (Chen et al., 2009; Mylerová und Martínková, 2003; Wang, 2015). Die Verwendung von Schutzgruppen ist möglich, erfordert jedoch weitere Syntheseschritte und erhöht folglich auch die Abfallmenge (Benz et al., 2007). Im Vergleich zur chemischen Umsetzung von Nitrilen bietet die enzymatische Nitril-Hydrolyse einige Vorteile, da Biotransformationen im allgemeinen unter milden Reaktionsbedingungen (geringe Temperatur und neutraler pH-Wert) sowie chemo- und häufig regioselektiv erfolgen (Gong et al., 2015). Dies ermöglicht die Hydrolyse von Nitrilen mit labilen funktionellen Gruppen ohne den Einsatz aufwändiger Schutzgruppen-Technik sowie aufgrund der Regioselektivität die Monohydrolyse von Dinitrilen. Der entscheidende Vorteil von Biotransformationen ist jedoch, dass Enzyme oftmals eine hohe Enantioselektivität aufweisen und damit die stereoselektive Synthese von chiralen Verbindungen ermöglichen (Gröger, 2001; Banerjee et al., 2002; Shen et al., 2020).

Aufgrund der angesprochenen Vorteile existieren bereits Prozesse, bei denen Nitrile hydrolysierende Enzyme erfolgreich zur industriellen Herstellung von Carbonsäuren und Carboxamiden eingesetzt werden. So ist die Synthese von Acrylamid aus Acrylnitril durch Nitril-Hydratasen mit einer weltweiten Jahresproduktion von ca. 400 000 Tonnen/Jahr eine der wichtigsten Biotransformationen und wird als Meilenstein in der Entwicklungsgeschichte der industriellen Biotechnologie angesehen (Liese et al., 2006; Zheng et al., 2010; Gong et al., 2012; Wu et al., 2021). Weitere industrielle Anwendungen Nitrile umsetzender Enzyme sind beispielsweise die Synthese von Nicotinsäure (Lonza AG, China) und die Synthese von 6-Hydroxypicolinsäure aus 2-Cyanopyridin durch Kombination einer Nitrilase und einer Hydroxylase (Lonza AG, Schweiz) (Liese et al., 2006; Gong et al., 2012; Nigam et al., 2017; Chhiba-Govindjee et al., 2019). Durch Applikation enantioselektiver Enzyme konnten neben diesen nicht stereoselektiven Prozessen auch enantioselektive Synthesen etabliert werden. In diesem Bereich stellt die Produktion von (*R*)-Mandelsäure mit Hilfe einer (*R*)-selektiven Nitrilase durch die BASF AG den erfolgreichsten Prozess dar (Ress-Löschke et al., 1998; Liese et al., 2006; Gröger, 2001; Gong et al., 2012; Chhiba-Govindjee et al., 2019). Nitrile hydrolysierende Enzyme spielen jedoch nicht nur für die Synthese von höherwertigen Carbonsäuren und Carboxamiden eine wichtige Rolle, sondern sind aufgrund der starken Nutzung von Nitrilen im industriellen Maßstab und der Toxizität dieser Verbindungen auch für die Entgiftung von Industrie-Abfällen oder Abwasser interessant (Banerjee et al., 2002; Wyatt und Knowles, 1995a,b; Zhou et al., 2008; Martínková et al., 2009; Li et al., 2012; Luque-Almagro et al., 2016; Sharma et al., 2019; Shen et al., 2020).

1.2 Nitrilasen

Die erste Nitrilase wurde vor mehr als 60 Jahren in den Blättern der Gerste von Thimann und Mahadevan (1958) nachgewiesen. Das Enzym wurde zunächst als Indolacetonitrilase bezeichnet, da es die Umsetzung von Indol-3-acetonitril (IAN) in das Phytohormon Indol-3-essigsäure (IAA) katalysierte. Da das Enzym zur Hydrolyse weiterer Nitrile befähigt war, wurde es später aufgrund seines breiten Substratspektrums in Nitrilase umbenannt (Thimann und Mahadevan, 1964). Seitdem wurden Nitrilasen in einer Vielzahl von Organismen gefunden; darunter Pflanzen, Bakterien, Pilze und Archaea (Gong et al., 2012; Martínková, 2019; Dennett und Blamey, 2016; Chhibi-Govindjee et al., 2019; Shen et al., 2020). Nitrilasen scheinen im Pflanzenreich ubiquitär verbreitet zu sein (Janowitz et al., 2009; Gong et al., 2012). Sie sind in höheren Pflanzen insbesondere an der Entgiftung von Blausäure beteiligt, welches auf zwei Arten freigesetzt werden kann. Zum einen entsteht HCN in allen Pflanzen als Nebenprodukt bei der Biosynthese des Phytohormons Ethylen, zum anderen in einigen Pflanzenarten bei einem (z.B. durch Frassfeinde verursachten) verwundungsinduziertem Abbau cyanogener Glykoside durch β -Glukosidasen und α -Hydroxynitril-Lyasen (Oxynitrilasen) (Piotrowski, 2008; García et al., 2019; Yadav et al., 2023). Dieser Prozess ist auf Pflanzen beschränkt, die cyanogene Glykoside enthalten (ca. 2500 Pflanzenspezies) (Piotrowski, 2008). Das entstandene HCN reagiert zunächst mit L-Cystein wodurch die nicht-proteinogene Aminosäure β -Cyanoalanin entsteht (Janowitz et al., 2009). Dieses primäre Entgiftungsprodukt wird anschließend durch die im Pflanzenreich ubiquitär verbreitete Nitrilase 4 (Nit4) zu Asparaginsäure und Asparagin umgesetzt und hierbei gleichzeitig der organisch gebundene Stickstoff in Form von Ammoniak und Asparagin zurückgewonnen (Piotrowski, 2008; Howden et al., 2009). Eine weitere Quelle für pflanzliche Nitrile sind Glucosinolate, die in Brassicaceae vorkommen und ähnlich den cyanogenen Glykosiden der Abwehr von Frassfeinden dienen (Janowitz et al., 2009). In *Arabidopsis thaliana* sind mehr als 30 verschiedene Glucosinolate bekannt und dementsprechend vielfältig ist auch das Spektrum an Nitrilen, die daraus entstehen. Diese Verbindungen können von Nitrilasen vom Typ der Nit1-Gruppe (in *A. thaliana* Nit1-Nit3) umgesetzt werden (Piotrowski, 2008). Aus einem bestimmten Glucosinolat (Glucobrassicin) entsteht IAN, das wie bereits zuvor erwähnt zu IAA hydrolysiert wird.

Bakterien und Pilze weisen im Vergleich zu Pflanzen deutlich seltener eine Nitrilase-Aktivität auf (Piotrowski, 2008; Martínková, 2019). So konnten in 2000 bakteriellen Genomen lediglich 138 Nitrilasen identifiziert werden (Sharma et al., 2017). Diese Studie deutet darauf hin, dass nur 6,8 % der Bakterien über Nitrilasegene verfügen (Chhibi-Govindjee et al., 2019). Nitrilasen scheinen auch in Bakterien eine ähnliche physiologische Rolle einzunehmen wie in Pflanzen, da sie in die Entgiftung von Nitrilen, die Stickstoffverwertung und die Synthese von Pflanzenhormonen (IAA) involviert sind (Layh et al., 1998; Howden et al., 2009; Howden und Preston, 2009; Nigam et al., 2017). Dies bietet pflanzenassoziierten Bakterien die Möglichkeit einer Modulation der Pflanzenentwicklung und -physiologie (Howden et al., 2009; Howden und Preston, 2009). Die Mehrzahl der charakterisierten Nitrilasen kann durch die Anwesenheit eines Nitrils im Nährmedium induziert werden (Banerjee et al., 2002; O'Reilly und Turner, 2003; Chhibi-Govindjee et al., 2019). Dies scheint die Vermutung zu bestätigen, dass mikrobielle Nitrilasen an der Detoxifikation und Stickstoffverwertung beteiligt sind (Howden et al., 2009).

Das biotechnologische Potential Nitrile hydrolysierender Enzyme hat dazu geführt, dass in den vergangenen Jahren viele Bakterien und Pilze angereichert wurden, die in der Lage sind, Nitrile zu hydrolysieren. Die Mehrzahl der Stämme wurde isoliert, indem in Anreicherungskulturen ein bestimmtes Nitril als einzige Stickstoff- und/oder Kohlenstoffquelle zugesetzt wurde (O'Reilly und Turner, 2003; Gong et al., 2012). Alternativ können neue Nitrilasen durch Genomanalysen identifiziert, die Gene direkt kloniert und in geeigneten Vektoren exprimiert werden (Heinemann et al., 2003; Mueller et al., 2006; Zhu et al., 2008; Seffernick et al., 2009; Bell et al., 2021). Bisher wurden mehr als 30 Nitrilasen aufgereinigt und charakterisiert, wobei die untersuchten Enzyme sehr unterschiedliche Substratspezifitäten zeigten und deshalb nach der Struktur ihrer bevorzugten Substrate in verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Martínková und Křen, 2010; Gong et al., 2012; Chhiba-Govindjee et al., 2019; Shen et al., 2020). Es wird dabei unterschieden zwischen aromatischen Nitrilasen [z.B. aus *Rhodococcus rhodochrous* J1, Kobayashi et al. (1989)], Arylacetoneitrilasen [z.B. aus *Alcaligenes faecalis* ATCC8750, Yamamoto et al. (1992)] und aliphatischen Nitrilasen [z.B. aus *Rhodococcus rhodochrous* K22, Kobayashi et al. (1990)]. Allerdings sind die natürlichen Substrate von mikrobiellen Nitrilasen im Allgemeinen nicht bekannt (Thuku et al., 2009).

1.2.1 Die „Nitrilase-Superfamilie“

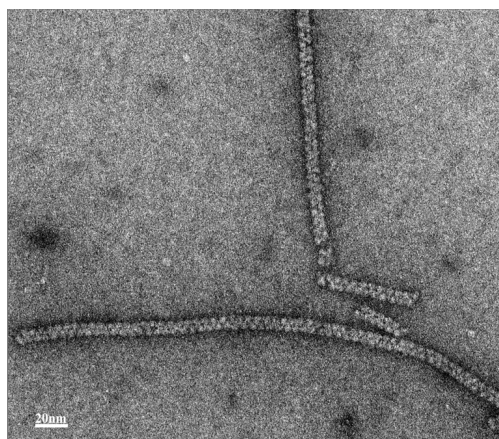
Nitrilasen gehören zu einer großen Enzymfamilie, die als „Nitrilase-Superfamilie“ bezeichnet wird und aus insgesamt 13 Untergruppen besteht (Pace und Brenner, 2001; Chhiba-Govindjee et al., 2019). Lediglich die Enzyme in Zweig 1 der Superfamilie besitzen Nitril- bzw. Cyanid-hydrolysierende Aktivitäten (Nitrilasen, Cyanid-Dihydratase und Cyanid-Hydratase). Während sich Nitrilasen durch ein breites Substratspektrum auszeichnen, sind Cyanid-Dihydratase ausschließlich auf die Hydrolyse von HCN zu Ameisensäure und Ammoniak beschränkt (O'Reilly und Turner, 2003; Ramteke et al., 2013). Cyanid-Hydratase setzen neben Cyanwasserstoff auch einfache aliphatische Nitrile mit sehr geringen Aktivitäten zu den entsprechenden Carboxamiden um, weshalb es sich eher um eine Nitril-Hydratase- als eine Nitrilase-Reaktion handelt (Yanase et al., 2000; O'Reilly und Turner, 2003). Cyanid-Dihydratase sind hauptsächlich in Bakterien vorzufinden, während Cyanid-Hydratase in filamentösen Pilzen vorkommen (O'Reilly und Turner, 2003; Thuku et al., 2009). Alle anderen Enzyme der Superfamilie zeigen entweder Amide-hydrolysierende/Amidase oder Amide-bildende Aktivitäten und in vielen Fällen ist die Enzymfunktion bisher nicht bekannt (Pace und Brenner, 2001; Brenner, 2002).

Die Zuordnung von Enzymen zur „Nitrilase-Superfamilie“ erfolgt über Homologien in deren Aminosäure-Sequenzen. Alle Mitglieder der Enzymfamilie besitzen jeweils einen konservierten Glutamat-, Lysin- und Cystein-Rest im aktiven Zentrum, die an der Katalyse beteiligt sind (Pace und Brenner, 2001; Chhiba-Govindjee et al., 2019). Neben dieser katalytischen Triade sind ein weiterer Glutamat-Rest, sowie vier Glycin-Reste konserviert (Thuku et al., 2009). Die Zugehörigkeit eines Enzyms zu einer der Untergruppen der Superfamilie wird maßgeblich von den zwei, dem katalytisch aktiven Cystein-Rest, C-terminal direkt benachbarten Aminosäuren bestimmt. So weisen Mitglieder des ersten Zweiges der Superfamilie in der Regel das Motiv Cys-Trp-Glu auf (Pace und Brenner, 2001).

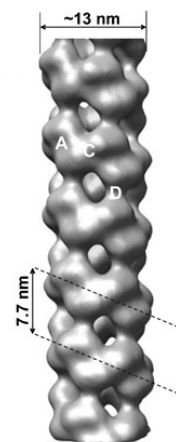
Des weiteren zeichnen sich Nitrilasen, Cyanid-Hydratasen und -Dihydratasen im Vergleich zu anderen Enzymen der Superfamilie durch eine um 40 - 100 Aminosäuren längere C-terminale Sequenz aus (Thuku et al., 2009).

1.2.2 Untersuchungen zu den Strukturen bakterieller und pflanzlicher Nitrilasen

Nitrilasen sind Homomultimere, deren Untereinheiten Molekulargewichte von 30 - 45 kDa aufweisen (O'Reilly und Turner, 2003; Thuku et al., 2009). Die Untereinheiten lagern sich zu aktiven Spiralen oder Helices unterschiedlicher Länge zusammen, deren 3-dimensionale Struktur anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen rekonstruiert werden kann (vgl. Abb. 1.2) (Thuku et al., 2007, 2009; Shen et al., 2020). Ausnahmen sind die Nitrilasen aus *Arthrobacter* sp. Stamm J1 (Bandyopadhyay et al., 1986) und *Rhodococcus rhodochrous* PA-34 (Bhalla et al., 1992), die bereits als Monomere aktiv sind bzw. die Bromoxynil-spezifische Nitrilase aus *Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae* (Stalker et al., 1988) und die Nitrilase aus *Pyrococcus abyssi* (Mueller et al., 2006), die als Dimere funktionsfähig sind. Bei den Spiralen bildenden Nitrilasen wird die Aggregation der Untereinheiten von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst und kann z.B. abhängig vom pH-Wert, der Temperatur und der Enzymkonzentration sein. In manchen Fällen findet die Oligomerisierung *in-vitro* erst nach Zugabe von Substrat statt (O'Reilly und Turner, 2003). Bei der Nitrilase aus *R. rhodochrous* J1 werden lange Spiralen nur gebildet, nachdem C-terminal 39 Aminosäuren autolytisch entfernt wurden (Thuku et al., 2007).



(a) Elektronenmikroskopische Aufnahme



(b) 3D-Rekonstruktion der Spirale

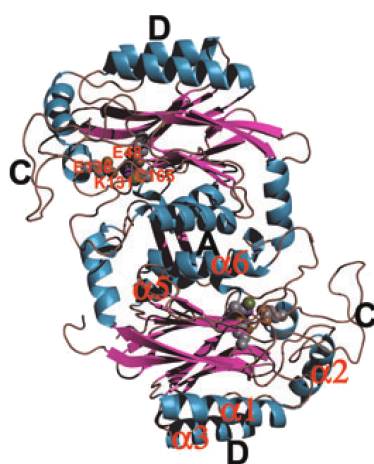
Abbildung 1.2: (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme der aufgereinigten, aktiven, rekombinant gebildeten Nitrilase aus *R. rhodochrous* J1 nach längerer Lagerung. Bei dem Enzym wurden durch die Lagerung für einen Monat bei 4°C C-terminal 39 Aminosäuren autolytisch entfernt. (b) 3-dimensionale Rekonstruktion der C-terminal um 39 Aminosäuren verkürzten Nitrilase aus *R. rhodochrous* J1. Interaktionen zwischen den Untereinheiten finden in den mit A und C gekennzeichneten Regionen statt (Thuku et al., 2007).

Die Fähigkeit von Nitrilasen, Cyanid-Hydratasen und -Dihydratasen helikale Quartärstrukturen zu bilden, verhindert offenbar die Kristallisation dieser Enzyme (Kaplan et al., 2011b; Thuku et al., 2007). Wichtige Hinweise im Hinblick auf die Enzymstruktur liefern jedoch die Kristallstrukturen von einigen entfernt verwandten Enzymen der „Nitrilase-Superfamilie“, die im Gegensatz zu den mikrobiellen Nitrilasen keine homo-oligomeren Spiralen bilden, sondern als Dimere, Tetramere, He-

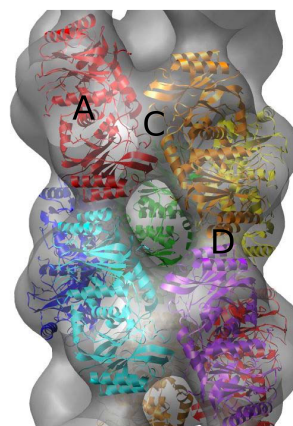
xamere oder Oktamere vorliegen. Hierzu gehören z.B. die Nit-Domäne des NitFhit-Fusionsproteins aus *Caenorhabditis elegans* [PDB-Nummer 1ems, Pace et al. (2000)], die aliphatische Amidase aus *Pseudomonas aeruginosa* [PDB 2uxy, Andrade et al. (2007)], die β -Alanin Synthase aus *Drosophila melanogaster* [PDB 2vhi, Lundgren et al. (2008)] oder die putative CN-Hydrolase aus *Saccharomyces cerevisiae* [PDB 1f89, Kumaran et al. (2003)]. Trotz geringer Sequenzidentität (ca. 20 %) besitzen alle kristallisierten Mitglieder der Superfamilie eine charakteristische Monomer-Faltung. Die Monomere assoziieren bei allen untersuchten Enzymen zu Dimeren, die eine typische $\alpha\beta\beta\alpha$ - $\alpha\beta\beta\alpha$ Sandwich-Struktur aufweisen und die „Grundbausteine“ für die Oligomerisierung darstellen (Thuku et al., 2009; Nagasawa et al., 2000).

1.2.2.1 Strukturuntersuchungen anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen

Da bis zum Jahr 2011 für keine Spiralen bildende Nitrilase, Cyanid-Hydratase oder Cyanid-Dihydratase (Enzyme aus Zweig 1 der „Nitrilase-Superfamilie“) eine Röntgenstruktur bestimmt werden konnte, wurden aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Proteine 3-dimensionale Strukturmodelle rekonstruiert (Jandhyala et al., 2003; Sewell et al., 2003; Thuku et al., 2007). Aufbauend auf den Sequenzvergleichen mit den kristallisierten Mitgliedern der „Nitrilase-Superfamilie“ wurden hierbei zunächst 3-dimensionale Strukturmodelle (Homologie-Modelle) der Dimere von Nitrilasen, Cyanid-Hydratasen und -Dihydratasen erzeugt. Die Homologie-Modelle der Dimere wurden anschließend in die, anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen, rekonstruierten Quartärstrukturen der Enzyme modelliert. Diese Untersuchungen haben es in der Nitrilase aus *R. rhodochrous* J1 ermöglicht, interagierende Regionen zwischen den Untereinheiten zu identifizieren [Abb. 1.2(b) und 1.3, Thuku et al. (2007)]. Nachfolgend werden die potentiell für die Spiralbildung relevanten Kontaktregionen genauer erläutert.



(a) Homologie-Modell (Dimer)



(b) Einfügen („fitting“) der Dimer-Struktur in die 3D-Rekonstruktion der Spirale

Abbildung 1.3: (a) Dimer-Modell der Nitrilase aus *R. rhodochrous* J1. Das Homologie-Modell wurde aufbauend auf den Kristallstrukturen von 1erz (Nakai et al., 2000), 1j31 (Sakai et al., 2004), 1ems (Pace et al., 2000) und 2vhi (Lundgren et al., 2008) generiert. Die katalytische Triade (E48, K131 und C163) sowie der zusätzliche Glutamat-Rest (E138) im aktiven Zentrum sind hervorgehoben. Interagierende Regionen (A, C und D) sind schwarz dargestellt (Thuku et al., 2009). (b) Einfügen des Dimer-Modells der Nitrilase aus *R. rhodochrous* J1 in die 3D-Rekonstruktion der zugehörigen Spirale (Thuku et al., 2007).

Region A

Die Interaktionen (Salzbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen) entlang der mit A bezeichneten Region sind Basis für die Dimerisierung der Monomere und damit der typischen $\alpha\beta\beta\alpha$ - $\alpha\beta\beta\alpha$ Sandwich-Struktur, die bei allen kristallisierten Mitgliedern der „Nitrilase-Superfamilie“ nachgewiesen wurde (Thuku et al., 2009). Durch diese Interaktion der Monomere wird zudem der katalytisch aktive Cystein-Rest innerhalb des aktiven Zentrums positioniert (Thuku et al., 2009). Dieser Aminosäure-Rest ist auf einer 3_{10} Helix lokalisiert, die Teil des sog. nukleophilen Ellenbogens mit dem Motiv β -Faltblatt-Turn- α -Helix ist (Kumaran et al., 2003).

Region C

Den Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten in Region C kommt bei der Ausbildung der spiralförmigen Quartärstruktur eine Schlüsselrolle zu. Vergleicht man die Aminosäure-Sequenzen von Spiral-bildenden Nitrilasen mit den Aminosäure-Sequenzen der kristallisierten (keine Spiralen bildenden) Enzyme der Superfamilie fällt auf, dass Nitrilasen an zwei Positionen Insertionen von 12 - 16 Aminosäuren aufweisen (Sewell et al., 2003, 2005; Thuku et al., 2009). Diese Aminosäuren bilden die Region C. Die gezielte Veränderung von Aminosäure-Resten in Region C führte bei Cyanid-Hydratasen zu einer Inaktivierung der Enzyme (Sewell et al., 2005).

Region D

Wechselwirkungen (vermutlich in Form von Salzbrücken) zwischen den Untereinheiten in der mit D bezeichneten Region finden nur statt, wenn die Spirale eine komplette Umdrehung vollzieht (Thuku et al., 2009). Es wird angenommen, dass die Interaktionen in dieser Region zur Stabilisierung der Spirale beitragen. Während die Regionen A und C auf atomarer Ebene in Nitrilase-homologen Enzymen visualisiert werden konnten, wurden die Interaktionen in Region D primär durch das Einfügen des Homologie-Modells der Nitrilase aus *R. rhodochrous* J1 in die rekonstruierte 3D-Struktur der zugehörigen Spirale abgeleitet und müssen dementsprechend erst durch Mutationsanalysen bestätigt werden (Thuku et al., 2009). In nachfolgenden Arbeiten an der Nitrilase 4 aus *Arabidopsis thaliana* wurden beispielsweise keine Interaktionen in der Region D beobachtet (Mulelu et al., 2019).

C-Terminus

Nitrilasen, Cyanid-Hydratasen und -Dihydratasen weisen im Vergleich zu anderen Enzymen aus der Superfamilie einen um 40 - 100 Aminosäuren verlängerten C-Terminus auf (vgl. Kap. 1.2.1), wobei die C-terminale Region auf der Innenseite der Spirale lokalisiert ist (Sewell et al., 2003; Thuku et al., 2007; Dent et al., 2009). Trotz der fehlenden Sequenzkonservierung im C-terminalen Bereich wurden für Nitrilasen mögliche Funktionen dieser Region vorgeschlagen. So sind einige Aminosäure-Reste des C-Terminus möglicherweise an den Interaktionen in den mit A und C bezeichneten Regionen beteiligt (Sewell et al., 2005; Dent et al., 2009; Thuku et al., 2009). Demzufolge sollte der C-terminale Bereich die Enzymaktivität beeinflussen und einen wichtigen Faktor für die Oligomerisierung darstellen (Thuku et al., 2009; Mulelu et al., 2019). Bei der Cyanid-Dihydratase aus *B. pumilus* C1 bzw. den Nitrilasen aus *R. rhodochrous* J1 und *P. fluorescens* EBC191 führten

C-terminale Deletionen um 28 bzw. 55 und 75 Aminosäuren tatsächlich zu einer vollständigen Inaktivierung der Enzyme (Sewell et al., 2005; Thuku et al., 2007; Kiziak et al., 2007).

1.2.2.2 Strukturuntersuchungen mittels Kristallisation und Kryoelektronenmikroskopie

Das Fehlen von Röntgenstrukturen macht Studien zu Struktur-Funktions-Beziehungen bei Nitrilasen schwierig (Martínková und Křen, 2010). Vielversprechend war in diesem Zusammenhang jedoch die erste kristallographische Untersuchung einer Nitrilase (*Pyrococcus abyssi*, 3klc), die im Februar 2011 von Raczynska et al. (2011) veröffentlicht wurde. Nach einer aktuellen Studie von Makumire et al. (2022) handelt es sich bei dem in Rede stehenden Enzym jedoch nicht um eine Nitrilase, sondern eine Amidase, da keinerlei Nitrilase-Aktivität festgestellt werden konnte, wohingegen Amide hydrolysiert wurden. Drei Jahre später wurde die erste Kristallstruktur einer spiral-bildenden Nitrilase (NLase aus *Synechocystis* sp. PCC6803, 3wuy) veröffentlicht (Zhang et al., 2014). Allerdings wurde das C-terminale Fragment (Aminosäuren 290 bis 346) der Nitrilase während der Kristallisation vermutlich an einer α -Chymotrypsin Spaltstelle abgeschnitten, so dass das Modell nur die Aminosäuren 5 bis 289 umfasste (Zhang et al., 2014). Dies führte zufällig zur Bildung von Filamenten mit einer Spiraldrehung von -61° mit ausreichender Flexibilität, um eine Kristallisation zu ermöglichen, veränderte aber wahrscheinlich auch die oligomere Struktur des Proteins und führte zum Aktivitätsverlust (Mulelu et al., 2019). Weitere Erkenntnisse zur Struktur von Nitrilasen wurden kürzlich durch Untersuchung der Nitrilase 4 aus *A. thaliana* mittels Kryoelektronenmikroskopie erhalten (Mulelu et al., 2019). Mit einer Auflösung von 3,4 Å konnte hierbei annähernd die Auflösung einer kristallographischen Untersuchung erreicht werden. Die Kryoelektronenmikroskopie hat dabei den Vorteil, dass im Vergleich zur Kristallisation die helikalen Quartärstrukturen erhalten bleiben und dadurch die Struktur des aktiven Proteins aufgeklärt werden kann.

1.2.3 Postulierter Reaktionsmechanismus

Bereits in den 60er Jahren wurde von Thimann und Mahadevan (1964) vorgeschlagen, dass Nitrilasen eine Thiol-Gruppe (-SH) im aktiven Zentrum aufweisen und ein erster Reaktionsmechanismus für Nitrilasen postuliert, der den nukleophilen Angriff der Thiol-Gruppe auf das C-Atom der Nitrilgruppe unter Ausbildung eines kovalent gebundenen Thioimidat-Intermediates beinhaltet (Abb. 1.4). Nach der Anlagerung eines Wassermoleküls und der Abspaltung von Ammoniak wird ein sogenannter „Acylenzym-Komplex“ gebildet, der anschließend weiter zur Säure hydrolysiert wird.

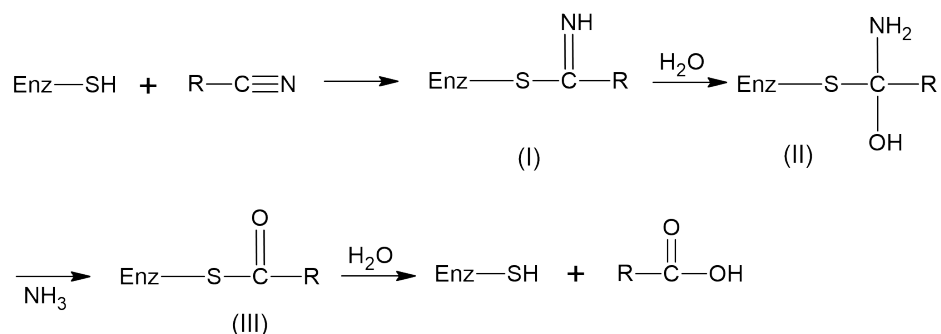


Abbildung 1.4: Postulierter Reaktionsmechanismus von Nitrilasen (Stevenson et al., 1992). (I): Thioimidat-Intermediat, (II): tetraedrischer Übergangszustand, (III): Acyl-Enzym

Der exakte Reaktionsmechanismus von Nitrilasen konnte bisher nicht zweifelsfrei aufgeklärt werden, allerdings existieren eine Reihe von Vorschlägen, die den Reaktionsmechanismus unter Beteiligung der katalytischen Triade, bestehend aus den Aminosäuren Cystein, Glutamat und Lysin, beinhalten und nachfolgend zusammengefasst werden (Abb. 1.5). Neben der katalytischen Triade ist in der „Nitrilase-Superfamilie“ ein weiterer Glutamat-Rest konserviert (vgl. Kap. 1.2.1). Es wird davon ausgegangen, dass einer der konservierten Glutamat-Reste als (allgemeine) Base fungiert und im ersten Schritt der Reaktion ein Proton von der Thiol-Gruppe des katalytisch aktiven Cystein-Restes abstrahiert (Nakai et al., 2000; Jandhyala et al., 2005). Durch den nukleophilen Angriff des aktivierten Cysteins auf das C-Atom der Nitril-Gruppe wird das Substrat kovalent an das Enzym gebunden, wobei das Thioimidat-Intermediat entsteht (Stevenson et al., 1990, 1992). Nach der Anlagerung eines Wassermoleküls, die von einer Protonierung des Stickstoff-Atoms begleitet wird, entsteht ein tetraedrisches Intermediat. Nach der Ammoniak Abspaltung wird der Thioester durch den nukleophilen Angriff eines weiteren Wassermoleküls in ein zweites tetraedrischen Zwischenprodukt überführt, das anschließend unter Freisetzung der Carbonsäure und Regenerierung des Enzyms zerfällt.

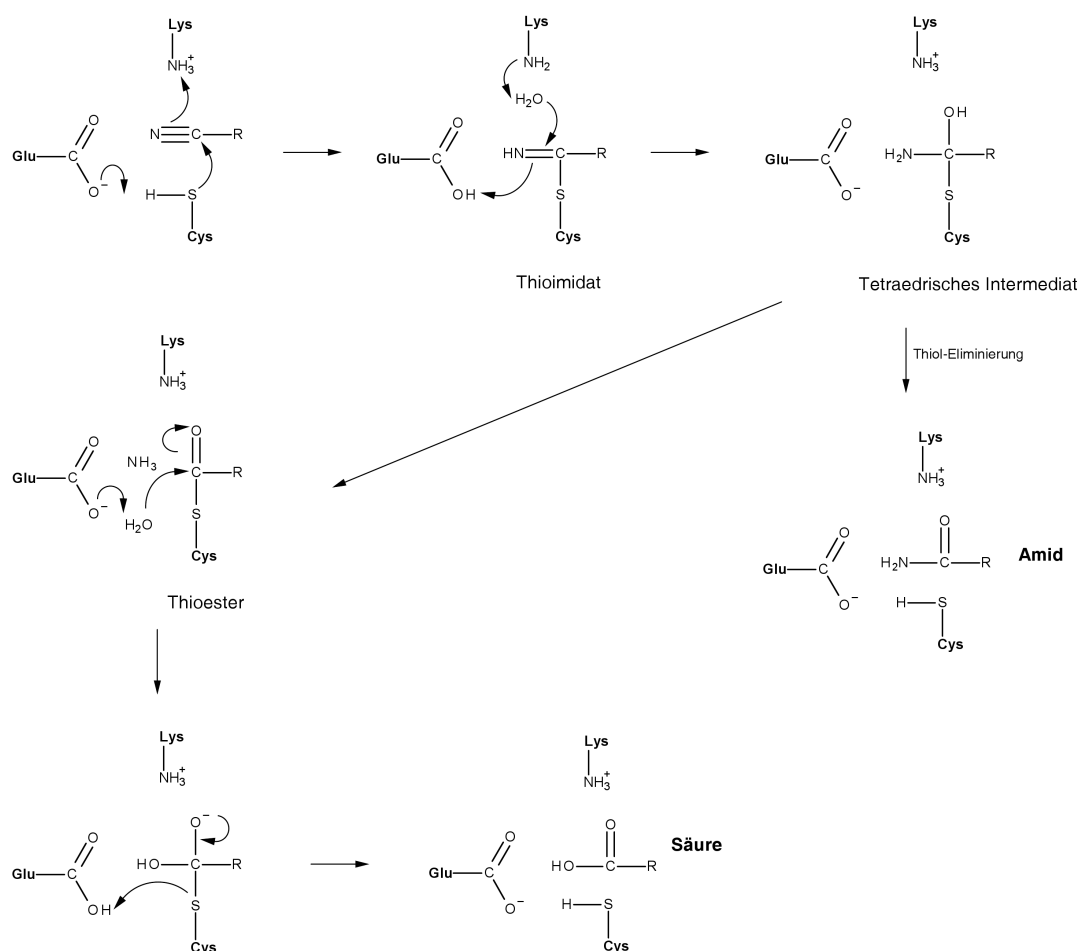


Abbildung 1.5: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus von Nitrilasen unter Berücksichtigung der Entstehung von Carbonsäuren und Carboxamiden (nach Piotrowski, 2008, verändert).

Viele Nitrilasen aus Pilzen, Bakterien und Pflanzen bilden neben den Carbonsäuren in z.T. nicht unerheblichem Maße Carboxamide als Nebenprodukte und weisen dementsprechend eine mitunter stark ausgeprägte Nitril-Hydratase Aktivität auf (Stevenson et al., 1992; Piotrowski et al., 2001; Kaplan et al., 2006; Martínková und Křen, 2010; Woodward et al., 2018). Die Abspaltung von Ammoniak aus dem tetraedrischen Intermediat erfordert eine positive Ladung am Stickstoff-Atom des Substrates, die durch den katalytisch aktiven Glutamat-Rest stabilisiert wird (Fernandes et al., 2006). Befindet sich die positive Ladung jedoch nicht am Substrat, sondern beispielsweise am Lysin-Rest, überwiegt möglicherweise die Thioeleminierung (Fernandes et al., 2006). Das Ausmaß der Amidbildung ist u.a. abhängig vom Substrat, wobei stark elektronenziehende oder sterisch anspruchsvolle Reste die Amidbildung begünstigen (Fernandes et al., 2006; Piotrowski, 2008). In diesem Zusammenhang wurde vorgeschlagen, dass elektronenziehende Gruppen die positive Ladung am Stickstoff-Atom des Substrates destabilisieren und dass andererseits sterisch anspruchsvolle Reste die stabilisierende Wirkung des Glutamat-Restes entziehen, was in beiden Fällen zu einer verstärkten Amidbildung führt (Fernandes et al., 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von NH_2 -Gruppen in den Aminosäure-Seitenketten, welche in unmittelbarer Nähe des katalytisch aktiven Cystein-Restes liegen, die Freisetzung von Amid-Produkten als Reaktionsprodukte begünstigt (Sosedov et al., 2010). Unter Umständen konkurrieren die NH_2 -Gruppen in den Aminosäure-Seitenketten dabei mit der NH_2 -Gruppe des tetraedrischen Intermediates, so dass anstelle der Protonierung und nachfolgenden Abspaltung der NH_3 -Gruppe aus dem tetraedrischen Intermediat und der damit einhergehenden Bildung der Säure, eine Thioeleminierung unter Freisetzung des Amids als Reaktionsprodukt erfolgt (Sosedov et al., 2010). Zwingend erforderlich für eine effiziente Amidproduktion scheint die Anwesenheit von Aminosäuren mit NH_2 -Gruppen (wie z.B. Glutamin oder Asparagin) in direkter Nachbarschaft zum katalytisch aktiven Cystein-Rest jedoch nicht zu sein, da pflanzliche Nitrilasen mit einer hohen Nitril-Hydratase Aktivität (z. B. Nit4 aus *A. thaliana*) die genannten Aminosäure-Reste an den entsprechenden Positionen nicht besitzen (Sosedov et al., 2010).

Ebenso wie der Reaktionsmechanismus ist auch die Rolle des zweiten konservierten Glutamat-Restes bisher nicht aufgeklärt. In der N-Carbamoyl-D-aminosäure-Amidohydrolase aus *Agrobacterium radiobacter* und der Formamidase aus *Helicobacter pylori* können zwischen dem Amid-Stickstoff des jeweiligen Substrates und den beiden Glutamat-Resten im aktiven Zentrum Wasserstoffbrücken ausgebildet werden (Chen et al., 2003; Hung et al., 2007). Da die Position beider Glutamat-Reste in den bisher bekannten Strukturen konserviert ist, wird davon ausgegangen, dass diese Interaktionen eine wichtige Rolle bei der Positionierung des Substrates spielen. Für die Amidase aus *Geobacillus pallidus* RAPc8 wurde vorgeschlagen, dass der zweite Glutamat-Rest (Position 142) als (allgemeine) Base fungiert und die Nukleophilie des Wassermoleküls erhöht, das zur Hydrolyse des Thioesters benötigt wird (Kimani et al., 2007). Aufgrund der Geometrie des aktiven Zentrums kommt der erste Glutamat-Rest (Position 59) in der Amidase aus *G. pallidus* dafür nicht in Frage, da Glu59 für die wässrige Umgebung unzugänglich „hinter“ dem Thioester-Intermediat begraben ist (Kimani et al., 2007).

1.2.4 Die Nitrilase aus *Pseudomonas fluorescens* EBC191

Anfang der neunziger Jahre wurde von Layh et al. (1992) aus einer Bodenprobe der Stamm *Pseudomonas fluorescens* EBC191 mit 2-Phenylbutannitril (Ethylbenzylcyanid; EBC) als einziger Stickstoffquelle angereichert. Die weitere Charakterisierung sowie die konventionelle Aufreinigung des für die Nitril-Hydrolyse verantwortlichen Enzyms erfolgte durch Moser (1996). Das für die Nitrilase kodierende Gen wurde anschließend von Conrath (1997) identifiziert, isoliert, das Gen mit einer His₆-tag kodierenden Sequenz versehen und im Stamm *E. coli* JM109 exprimiert. Die heterologe Expression der Nitrilase wurde im Anschluß von Kiziak (1998) eingehender untersucht, das Enzym aufgereinigt und biochemisch charakterisiert (Kiziak, 1998; Kiziak et al., 2005). Die Untersuchungen ergaben, dass die Nitrilase bevorzugt Arylacetonitrile, wie Mandelonitril, 2-Acetyloxymandelonitril, Phenylacetonitril sowie in α -Position methylierte Substrate wie beispielsweise 2-Phenylpentannitril umsetzte (Kiziak et al., 2005). Je nach Substrat wurden von der Nitrilase neben den Carbonsäuren auch die korrespondierenden Carboxamide als Nebenprodukte gebildet. Die Nitril-Hydratase Aktivität der Nitrilase wurde anschließend von Fernandes et al. (2006) und Mateo et al. (2006) eingehender untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass elektronenziehende Substituenten in α -Position die Amidbildung begünstigten (Fernandes et al., 2006). In den Arylacetonitrilen war das Ausmaß der Amidbildung jedoch auch von der absoluten Konfiguration der α -ständigen Reste abhängig. So wurde aus (*R*)-Mandelonitril lediglich 10 % Mandelamid, aus (*S*)-Mandelonitril hingegen annähernd equimolare Mengen an Mandelamid und Mandelsäure gebildet (Mateo et al., 2006). Diese Untersuchungen ergaben ferner, dass die absolute Konfiguration bei α -substituierten Substraten bei der Nitril-Hydrolyse (erwartungsgemäß) erhalten blieb und die Nitrilase Mandelonitril dementsprechend enantiokonservativ zu den entsprechenden Säuren und Amiden umsetzte. Im Vergleich zu anderen Arylacetonitrilasen wurde racemisches Mandelonitril von der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 nur mit geringen Enantiomerenüberschüssen zu (*R*)-Mandelsäure (ee = 31 %) hydrolysiert. Von der Nitrilase aus *P. fluorescens* wurden bereits zahlreiche Enzymvarianten durch zielgerichtete Mutagenese erzeugt. Hierbei wurde gezeigt, dass der dem katalytisch aktiven Cystein-Rest C-terminal direkt benachbarte (für Nitrilasen atypische) Alanin-Rest an Position 165 verantwortlich ist für die Amidbildungskapazität und die Enantioselektivität der Nitrilase (Kiziak und Stolz, 2009). Durch das Einfügen sperriger Aminosäuren an Position 165 (A165W, A165Y, A165F) konnte dabei die *R*-Selektivität der Nitrilase deutlich gesteigert und die Amidanteile stark gesenkt werden (Kiziak und Stolz, 2009). Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Kiziak und Stolz (2009) führte bei der Nitrilase aus *Rhodococcus zopfii* der Aminosäure (AS)-Austausch W167G und folglich eine Verkleinerung der AS-Seitenkette der dem katalytisch aktiven Cys-Rest C-terminal direkt benachbarten Aminosäure zu einer vollständigen Unterdrückung der Hydratations-Aktivität beim Umsatz von 2-Chlornicotinnitril, wogegen vom Wildtyp-Enzym 88 % 2-Chlornicotinamid gebildet wurde (Dai et al., 2022).

Bei dem Versuch die Nitril-Hydratase Aktivität der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 zu steigern, konnten mit Hilfe des Ansatzes der gerichteten Evolution und anschließender Selektion der Mutanten durch ein colorimetrisches Screening, einige (zuvor nicht bekannte) „hot spots“ lokalisiert werden, die zu einer verstärkten Amidbildung führten (Sosedov und Stolz, 2014). Bei diesen „hot spots“ handelte es sich um die AS-Reste Trp188, Asn206 und Tyr291 (Sosedov und Stolz,

2014). In weiterführenden Arbeiten wurde gezeigt, dass der Austausch der hoch konservierten Aminosäure Trp188 z.B. gegen Lysin ausreicht, um mehr als 90 % Mandelamid aus Mandelonitril zu bilden (Sosedov und Stolz, 2015). Interessanterweise ergab eine Sättigungsmutagenese an dieser Position, dass der Austausch des entsprechenden Trp-Restes gegen beinahe alle anderen Aminosäuren zu einer gesteigerten Amidbildung führte (Sosedov und Stolz, 2015). Darüber hinaus zeigten alle Enzym-Varianten, die keinen Trp-Rest an Position 188 enthielten, eine Präferenz zur Bildung von (*S*)-Mandelsäure und (*S*)-Mandelamid, was in starkem Gegensatz zum Wildtyp-Enzym und beinahe allen anderen bisher beschriebenen Nitrilasen steht, welche aus rac. Mandelonitril bevorzugt (*R*)-Mandelsäure bilden (Sosedov und Stolz, 2015). Der Trp-Rest an Position 188 hat folglich nicht nur einen starken Einfluss auf die Amidbildung, sondern ist zudem entscheidend für die Enantioselektivität der Nitrilase-Reaktion, da der sperrige Trp-Rest offenbar die Bindung von (*S*)-Mandelonitril behindert bzw. die Bindung von (*R*)-Mandelonitril fördert (Sosedov und Stolz, 2015). Gestützt wird diese Annahme von der Tatsache, dass in den wenigen bekannten (*S*)-selektiven Nitrilasen (1A8, 1A9, 1A10 and 5B17) der normalerweise hoch konservierte Trp-Rest durch Tyrosin oder Threonin ersetzt ist (Robertson et al., 2004; Sosedov und Stolz, 2015). Die Bedeutung der AS-Reste an den Positionen 165 und 188 für die Amidbildung wurde in der Studie von Zhang et al. (2022) bestätigt. Durch einen Sequenzvergleich mit der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 an den entsprechenden Positionen konnte eine Nitrilase aus *Paraburkholderia graminis* DSM 17151 identifiziert werden, die für Nitrilasen atypische Aminosäuren (Phe und Tyr) an den homologen Positionen aufweist und infolgedessen eine hohe Nitril-Hydratase Aktivität beim Umsatz von verschiedenen Benzylnitrilen zeigte (Zhang et al., 2022).

1.3 Bedeutung und Synthese enantiomerenreiner α -Hydroxycarbonsäuren

Enantiomerenreine α -Hydroxycarbonsäuren (und die korrespondierenden Carboxamide) sind interessante Produkte für die chemische, pharmazeutische und agrochemische Industrie, da sie als Ausgangssubstanzen zur Herstellung vieler chiraler Produkte genutzt werden können. (*R*)-Mandelsäure und seine Derivate werden beispielsweise als Intermediate für die Synthese verschiedener Pharmazeutika, wie Antiseptika, Antiadiposita, semisynthetischer β -Lactam Antibiotika (Cephalosporine und Penicilline) oder des Gerinnungshemmers (*S*)-Clopidogrel eingesetzt. Auch bei der Racematspaltung durch Diastereomerentrennung finden die Enantiomere der Mandelsäure Verwendung (Gröger, 2001; Uhm et al., 2007; He et al., 2010).

Für die enzymatische Darstellung von enantiomerenreinen α -Hydroxycarbonsäuren aus leicht zugänglichen, kostengünstigen und prochiralen Aldehyden sind drei Wege denkbar (Abb. 1.6).

Bei der ersten Methode (Abb. 1.6a) wird das (chemisch synthetisierte) racemische Cyanhydrin (α -Hydroxynitril) durch eine dynamisch kinetische Racematspaltung mit Hilfe einer enantioselektiven Nitrilase in die enantiomerenreine α -Hydroxycarbonsäure überführt. Bereits seit einigen Jahren wird diese Methode zur Synthese von (*R*)-Mandelsäure in industriellem Maßstab genutzt (Gröger, 2001; Gong et al., 2012; Chhiba-Govindjee et al., 2019). Die Anwendbarkeit dieser Methode ist jedoch stark eingeschränkt, da bisher nur wenige hochgradig enantioselektive Nitrilasen beschrieben wurden und die Enantioselektivität dieser Enzyme zudem stark von der Substratstruktur abhängt.

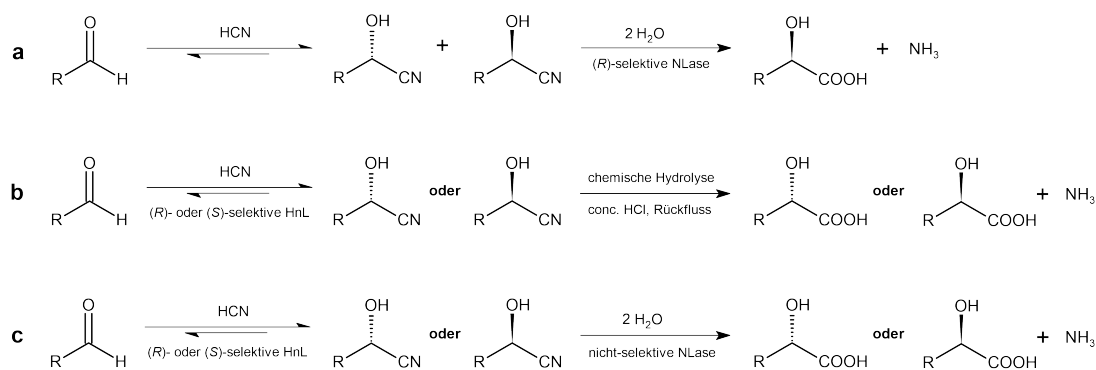


Abbildung 1.6: Synthesewege zur Darstellung von enantiomerenreinen α -Hydroxycarbonsäuren (nach Mateo et. al, 2006, verändert).

Ein weiterer Nachteil ergibt sich aus der Tatsache, dass bisher keine Nitrilasen identifiziert wurden, welche die Synthese von (S) - α -Hydroxycarbonsäuren aus den rac. Cyanhydrinen mit einer synthetisch relevanten Enantiomerenreinheit ermöglichen (Mateo et al., 2006; Robertson et al., 2004).

Diese Probleme können umgangen werden, indem Hydroxynitril-Lyasen (Oxynitrilasen; EC 4.1.2.10, EC 4.1.2.11 und EC 4.1.2.37) eingesetzt werden. Diese Enzyme spalten im Zuge der Cyanogenese in Pflanzen Cyanhydrine in die korrespondierenden Aldehyde oder Ketone und HCN . Da es sich hierbei um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, können Oxynitrilasen ebenfalls die Rückreaktion (Hydrocyanierung von Aldehyden oder Ketonen) katalysieren. Der Einsatz von Oxynitrilasen birgt mehrere Vorteile. Zum einen setzen diese Enzyme ein sehr breites Spektrum an Substraten um und weisen eine exzellente Enantioselektivität auf, zum anderen sind sie kommerziell erhältlich (Holt und Hanefeld, 2009; Bracco et al., 2016). Bei dieser Methode (Abb. 1.6b) können die mittels Oxynitrilasen synthetisierten enantiomerenreinen Cyanhydrine durch saure chemische Hydrolyse in die entsprechenden Carbonsäuren überführt werden (Effenberger, 1994). Der zweite Schritt dieser Reaktionskaskade ist jedoch nicht kompatibel mit sensiblen funktionellen Gruppen und führt zur Entstehung salzhaltiger Abfälle (vgl. Kapitel 1.1). Eine Alternative bietet die dritte Methode (Abb. 1.6c), bei der in einer bienzymatischen Reaktionskaskade das durch die Oxynitrilase synthetisierte enantiomerenreine Cyanhydrin mit Hilfe einer enantiokonservativen Nitrilase zur korrespondierenden α -Hydroxycarbonsäure hydrolysiert wird.

1.3.1 Bienzymatische Darstellung enantiomerenreiner α -Hydroxycarbonsäuren

Bei der bienzymatischen Reaktionskaskade (siehe Abb. 1.6c) hängt der Enantiomerenüberschuss der Produkte entscheidend von der Enantioselektivität der Oxynitrilase ab. In wässrigen Medien mit neutralem pH-Wert wird die enzymatische Reaktion der Oxynitrilase jedoch von der spontanen chemischen Hydrocyanierung überlagert und auch die gebildeten Intermediate (Cyanhydrine) sind unter diesen Bedingungen instabil und zerfallen in die Ausgangssubstanzen. Da bei der chemischen Hydrocyanierung racemische α -Hydroxynitrile entstehen, führt dies in Kombination mit deren Instabilität zu einer Racemisierung der Cyanhydrine und damit einer Abnahme der Enantiomerenreinheit der Produkte.

Da es sich bei der spontanen chemischen Hydrocyanierung um eine Basen-katalysierte Reaktion handelt, kann die unerwünschte Hintergrundreaktion unterdrückt werden, indem durch Oxynitrilasen katalysierte Reaktionen in Reaktionsmedien mit pH-Werten von 4 - 5 durchgeführt werden (Holt und Hanefeld, 2009; Effenberger, 1994). Das pH-Optimum von Nitrilasen liegt hingegen im neutralen bis leicht alkalischen Bereich (pH 7 - 9) und die Enzyme werden in Medien mit pH-Werten $\leq 5,5$ schnell inaktiviert (Banerjee et al., 2002).

Ein entscheidender Durchbruch gelang bei Oxynitrilase katalysierten Reaktionen als gezeigt wurde, dass die unerwünschte chemische Hydrocyanierung weitgehend unterdrückt werden kann, wenn die Reaktion in mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmitteln, wie beispielsweise Ethylacetat oder Diisopropylether, durchgeführt wird (Effenberger et al., 1987; Effenberger, 1994). Da die chemische Addition von Blausäure an Aldehyde in organischen Medien sehr langsam erfolgt, werden selbst bei Aldehyden, die schlechte Substrate für Oxynitrilasen darstellen und die deshalb nur langsam enzymkatalysiert reagieren, hohe Enantiomerenüberschüsse erzielt (Effenberger, 1994). Dementsprechend existieren eine Vielzahl von Berichten, bei denen organische Medien mit geringem Wassergehalt oder biphasische Reaktionssysteme für die Synthese enantiomerenreiner Cyanhydrine eingesetzt wurden (Han et al., 1998; Costes et al., 1999; van Langen et al., 2003; Chmura et al., 2006; Loos et al., 1995). Als besonders vorteilhaft hat sich Diisopropylether (DIPE) erwiesen, da die geringe Löslichkeit von DIPE in Wasser die Enzymaktivität und Stabilität von Oxynitrilasen erhöht (Schmidt und Griengl, 1999; Effenberger, 1994). Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der guten Löslichkeit der Aldehyde (oder Ketone) und Cyanhydrine in organischen Lösungsmitteln. Im Hinblick auf die bienzymatische Synthese von α -Hydroxycarbonsäuren ist jedoch von Nachteil, dass Nitrilasen im Vergleich zu Oxynitrilasen im allgemeinen eine geringere Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln aufweisen (Heinemann et al., 2003; Kaul und Banerjee, 2008). Voraussetzung für die erfolgreiche Synthese von enantiomerenreinen α -Hydroxycarbonsäuren durch eine bienzymatische Reaktionskaskade ist demzufolge die Anpassung der Nitrilase-Reaktion an die Reaktionsbedingungen der Oxynitrilase (Mateo et al., 2006).

Mateo et al. (2006) konnten in einem *in-vitro* Ansatz zeigen, dass die bienzymatische Synthese von α -Hydroxycarbonsäuren prinzipiell möglich ist. Hierzu wurden die (*S*)-selektive Oxynitrilase aus der Cassava-Pflanze *Manihot esculenta* sowie die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 in combi-CLEAs (cross linked enzyme aggregates) immobilisiert und für die Synthese von (*S*)-Mandelsäure und (*S*)-Mandelamid aus Benzaldehyd und HCN in einem biphasischen Medium bestehend aus 10 % (v/v) einer gepufferten wässrigen Phase (pH 5,5) und 90 % (v/v) Diisopropylether eingesetzt. Der Enantiomerenüberschuss an (*S*)-Mandelsäure betrug hierbei 98 % (Mateo et al., 2006). Der Erfolg dieser Experimente lag insbesondere darin begründet, dass sich die Nitrilase aus *P. fluorescens* im Vergleich zu anderen Nitrilasen durch ein relativ breites pH-Optimum (5,5 - 8,5) auszeichnet und in der Lage ist, sowohl (*R*)- als auch (*S*)-Mandelonitril zu hydrolysieren (Kiziak et al., 2005). In späteren Versuchen wurden analog rekombinante Ganzzellkatalysatoren zur Synthese von (*S*)-Mandelsäure und (*S*)-Mandelamid eingesetzt. Dazu wurden das Nitrilasegen aus *P. fluorescens* EBC191 sowie das Oxynitrilasegen aus *Manihot esculenta* in das Genom der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* integriert und die Enzyme unter der Kontrolle zweier separater AOX1 Promotoren exprimiert (Rustler et al., 2008b). Der resultierende Stamm *Pichia pastoris* pJOE5557.2 setzte Benzaldehyd und KCN bei einem pH-Wert von 3,8 mit Enantiomerenüberschüssen von ca. 80 % zu

(*S*)-Mandelsäure und (*S*)-Mandelamid um. Die geringeren Enantiomerenüberschüsse im Vergleich zu dem von Mateo et al. (2006) beschriebenen *in-vitro* System wurden insbesondere mit der geringen (*S*)-Oxynitrilase-Aktivität von nur 0,006 U/mg Trockenzellgewicht in Verbindung mit der nicht vollständig unterdrückten chemischen Hintergrundreaktion erklärt (Rustler et al., 2008b). Aufgrund der schwachen Expression der Oxynitrilase- und Nitrilase-Aktivität in *Pichia pastoris*, wurden die entsprechenden Enzyme in einem zweiten *in-vivo* Ansatz simultan in *E. coli* JM109 exprimiert unter der Kontrolle eines Rhamnose-induzierbaren Promotors. Der rekombinante Stamm *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) setzte Benzaldehyd und KCN bei einem pH-Wert von 5 zu (*S*)-Mandelsäure und (*S*)-Mandelamid um, wobei der Enantiomerenüberschuss an (*S*)-Mandelsäure > 99 % betrug (Sosedov et al., 2009). Dieser Stamm zeigte gegenüber dem zuvor konstruierten *Pichia*-Stamm deutlich höhere Aktivitäten. Bei der Biotransformation mit Substratkonzentrationen > 25 mM Benzaldehyd nahm der Enantiomerenüberschuss an (*S*)-Mandelsäure bei der Reaktionsführung im wässrigen System jedoch auf < 50 % ab, was auf die Alkalisierung des Mediums durch Zugabe von KCN und der damit einhergehenden Lyse des Ganzzellkatalysators sowie der Beschleunigung der unerwünschten chemischen Hintergrundreaktion zurückzuführen war (Chmura, 2010; Sosedov et al., 2009). Durch Verwendung eines biphasischen Mediums bestehend aus 70 % (v/v) Diisopropylether und 30 % (v/v) wässrigem Citratpuffer (pH 5) nahm die Umsatzrate signifikant ab, es konnten jedoch 100 mM Benzaldehyd in 7,5 Stunden durch den „biokatalytischen Ganzzellkatalysator“ zu (*S*)-Mandelsäure (ee > 99 %) und (*S*)-Mandelamid umgesetzt werden (Chmura, 2010; Sosedov et al., 2009). Im Hinblick auf die Stabilität des „biokatalytischen Ganzzellkatalysators“ war die Verwendung von DIPE als organischer Phase jedoch von Nachteil, da Lösemittel mit einem vergleichbar niedrigen log P-Wert (Verteilungskoeffizient zwischen Oktanol und Wasser; log P von DIPE = 1,9) für Bakterienzellen in der Regel toxisch sind (Aono et al., 1994; Rajagopal, 1996; Ramos et al., 2002).

1.4 Bedeutung und Synthese enantiomerenreiner α -Alkyl- α -hydroxycarbonsäuren

Neben den bereits angesprochenen α -Hydroxycarbonsäuren sind α -Alkyl- α -hydroxycarbonsäuren und die korrespondierenden Amide interessante Intermediate für die chemische Synthese verschiedener Alkaloide, Antibiotika, Insektenpheromone, Neurotransmitter-Agonisten und -Antagonisten, Vitamine, Prostaglandin-Analoga und anderer chiraler Produkte (Davis et al., 1987; Feichter et al., 1991; Noronha-Blob et al., 1992; Sugai et al., 1990; Sariaslani et al., 1996). Ein chirales quartäres Kohlenstoffzentrum stellt eine wertvolle synthetische Einheit dar, das im Fall asymmetrischer Substrate mit klassischen chemischen Mitteln nur schwer zu erhalten ist (Lanfranchi et al., 2013). Die Cyanogenese ist nicht auf die Spaltung von Aldehyd-Cyanhydrinen beschränkt, sondern wurde auch für Keton-Cyanhydrine beschrieben (Effenberger, 1994). Dementsprechend sollten Oxynitrilasen in der Lage sein, diese Verbindungen umzusetzen bzw. als Substrate zu akzeptieren. Während bei der Umsetzung von Aldehyden das Gleichgewicht der Reaktion auf der Produktseite liegt, werden bei der asymmetrischen Addition von Cyanid an Ketone deutlich geringere Ausbeuten erzielt, da hierbei sterisch anspruchsvolle Produkte (tertiäre Alkohole mit drei voluminösen Resten) entstehen (Holt und Hanefeld, 2009; Hanefeld, 2013; Lanfranchi et al., 2013; Bracco et al., 2016).

Während die (quantitative) Umsetzung von aliphatischen Methylketonen und cyclischen Ketonen durch Oxynitrilasen bereits mehrfach beschrieben wurde (Griengl et al., 1998; Kobler und Effenberger, 2006), sind die Ausbeuten bei der chemischen und enzymkatalysierten Synthese von Cyanhydrinen aus Ketonen vielfach gering (von Langermann et al., 2007; Lanfranchi et al., 2013). Insbesondere bei der enzymatischen Umsetzung von Methylphenylketon (Acetophenon) durch verschiedene Oxynitrilasen wurden lediglich geringe Ausbeuten und z.T. geringe Enantiomerenüberschüsse erzielt (Bühler et al., 2003; Chmura et al., 2006; Roberge et al., 2007; von Langermann et al., 2007; Griengl et al., 1998; Kiljunen und Kanerva, 1997; Han et al., 1998; Lin et al., 1999; Rotcenkovs und Kanerva, 2000; Andexer et al., 2007).

Mehrere nicht-enzymatische Wege, wie z.B. die asymmetrische Cyanosilylierung mit Titanisopropoxid und Trimethylsilylcyanid (TMSCN) als Cyanid-Donor wurden entwickelt, um das Gleichgewicht bei der Umsetzung von Ketonen mit HCN auf die Produktseite zu verlagern (Choi et al., 1997; Yabu et al., 2001; Brunel und Holmes, 2004; North, 2003; von Langermann et al., 2007). Diese *in-situ*-Protektion der Substrate mit TMSCN ist jedoch in Gegenwart von Enzymen nicht möglich (Holt und Hanefeld, 2009). Zudem erfordern die chemischen Synthesen wasserfreie Bedingungen, z.T. hohe Drücke und einen zusätzlichen Hydrolyse-Schritt, weshalb diese Verfahren mit hohen Kosten verbunden sind (von Langermann et al., 2007; Hanefeld, 2013). Daher ist die enzymatische Cyanhydrin-Synthese weiterhin ein interessanter Weg, um enantiomerenreine α -Alkyl- α -hydroxynitrile zu erhalten.

Im Fall von Ketonen sollte die bienzymatische Reaktionskaskade (Kapitel 1.3) besonders vorteilhaft sein, da das Intermediat der Reaktion (Cyanhydrin) durch die Nitrilase aus dem Gleichgewicht entfernt wird. Die in Kapitel 1.3.1 beschriebenen combi-CLEAs wurden dementsprechend für die Biotransformation von Acetophenon in einem biphasischen Medium bestehend aus 50 % (v/v) einer gepufferten wässrigen Phase (pH 5,5) und 50 % (v/v) Diisopropylether eingesetzt (Chmura, 2010). Es wurden hierbei lediglich 12 % des eingesetzten Ketons umgesetzt, wobei nur 30 % des gebildeten Cyanhydrins weiter zu Atrolactat hydrolysiert wurden, was vermutlich auf die Inaktivierung des Biokatalysators zurückzuführen war (Chmura, 2010).

1.5 Ionische Flüssigkeiten

Organische Lösemittel sind für Bakterienzellen in der Regel toxisch (vgl. Kap. 1.3.1). Eine interessante Alternative stellen ionische Flüssigkeiten dar, da sie teilweise eine hohe Biokompatibilität aufweisen bzw. weniger toxisch sind als konventionelle organische Lösemittel (Pfruender et al., 2006; Bräutigam et al., 2007b; Quijano et al., 2010; Wood et al., 2011; Egorova und Ananikov, 2018; Sivapragasam et al., 2020). Ionische Flüssigkeiten (ionic liquids, ILs) sind synthetisch hergestellte Salze, die im Vergleich zu natürlich vorkommenden Salzen einen wesentlich niedrigeren Schmelzpunkt aufweisen (in der Regel $< 100^\circ\text{C}$). Von besonderer Bedeutung für die Biokatalyse sind die in jüngerer Zeit entwickelten sog. RT-ILs (room temperature ionic liquids), die bereits bei Temperaturen $\leq 25^\circ\text{C}$ in flüssigem Aggregatzustand vorliegen. Die geringe Schmelztemperatur wird durch große und unsymmetrische Ionen erreicht, die den Aufbau eines geordneten Kristallgitters verhindern (Holbrey et al., 2008). Eine Auswahl gängiger Ionen, die zur Darstellung ionischer Flüssigkeiten genutzt und die bei der Biokatalyse verwendet werden, zeigt Abbildung 1.7.

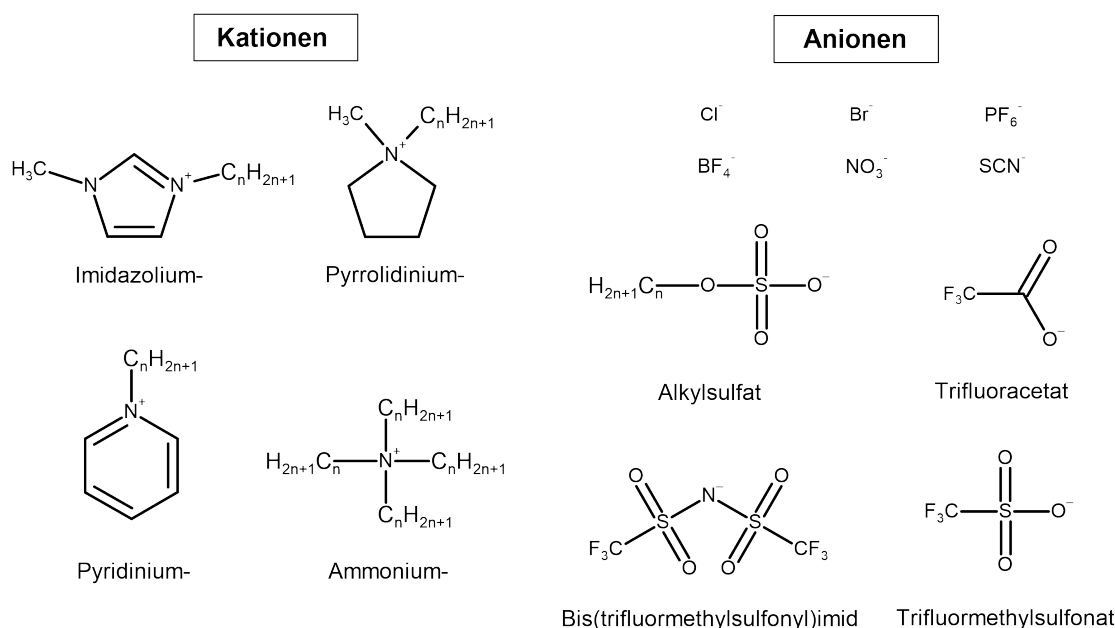


Abbildung 1.7: Beispiele für Kationen und Anionen ionischer Flüssigkeiten, die bei der Biokatalyse eingesetzt werden (nach Egorova und Ananikov, 2018, verändert).

1.5.1 Eigenschaften ionischer Flüssigkeiten

Einer Schätzung zufolge sind durch Synthese etwa 10^{18} verschiedene ionische Flüssigkeiten zugänglich (Gangu et al., 2009). Da sich die Eigenschaften von ionischen Flüssigkeiten, wie beispielsweise Schmelzpunkt, Löslichkeit, Viskosität und Dichte durch Kombination verschiedener Anionen und Kationen gezielt beeinflussen lassen, werden ionische Flüssigkeiten vielfach auch als Designer-Lösemittel bezeichnet.

Zu den Eigenschaften, die sämtliche ionische Flüssigkeiten miteinander teilen, gehören neben dem weiten Flüssigkeitsbereich, ein verschwindend geringer Dampfdruck, Nichtbrennbarkeit, eine exzellente thermische Stabilität, gute Lösemitteleigenschaften für eine Vielzahl von Verbindungen, sowie ein großes elektrochemisches Fenster (d.h. sie sind außerordentlich stabil gegen chemische und auch elektrochemische Oxidations- und Reduktionsprozesse) (Meindersma et al., 2007; Akbari et al., 2018).

Schmelzpunkt und Flüssigkeitsbereich

Der Schmelzpunkt von ionischen Flüssigkeiten entscheidet, ob die jeweilige IL für eine Anwendung, z.B. bei Raumtemperatur in Frage kommt. Mit zunehmender Größe des Anions oder Kations verringert sich der Schmelzpunkt aufgrund reduzierter Coulombkräfte (Holbrey et al., 2008; Shah et al., 2020). Neben der Größe spielt auch die Symmetrie der Ionen eine entscheidende Rolle: symmetrisch aufgebaute Kationen erhöhen den Schmelzpunkt (Rocha et al., 2013). Bei 1-Alkyl-3-methylimidazolium-Kationen nimmt mit zunehmender Länge der Alkylseitenkette der Schmelzpunkt zunächst ab, um nach dem Überschreiten eines kritischen Punktes (8 - 10 C-Atome) aufgrund zunehmender Van-der-Waals-Kräfte zwischen den Kohlenwasserstoffketten wieder anzusteigen (Holbrey et al., 2008).

Der Flüssigkeitsbereich von ionischen Flüssigkeiten, der sich aus dem Übergang zum festen oder glasartigen Zustand (bis zu -100°C) sowie durch die Zersetzungstemperatur (bis zu 450°C) ergibt, ist mit über 300°C deutlich größer als von herkömmlichen organischen Lösemitteln, wie z.B. Dichlormethan (145°C) (Holbrey et al., 2008; Meindersma et al., 2007).

Viskosität

Die Viskosität von ionischen Flüssigkeiten, die durch Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen bestimmt wird, ist sehr unterschiedlich und reicht bei Raumtemperatur von $10\text{ mPa} \cdot \text{s}$ bis über $1000\text{ mPa} \cdot \text{s}$. Im Vergleich zu den üblichen Lösemitteln, die beispielsweise Viskositäten von $0,2\text{ mPa} \cdot \text{s}$ (Diethylether), $1\text{ mPa} \cdot \text{s}$ (Wasser), $16\text{ mPa} \cdot \text{s}$ (Ethylenglycol) oder $934\text{ mPa} \cdot \text{s}$ (Glycerin) aufweisen, sind ILs damit in den meisten Fällen deutlich viskoser (Holbrey et al., 2008; Yang und Pan, 2005; Meindersma et al., 2007). Bei Verlängerung der Alkylkettenlänge nimmt die Viskosität von ionischen Flüssigkeiten aufgrund stärkerer Van-der-Waals-Kräfte zwischen den Kationen zu (Yang und Pan, 2005). Anionen, die Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können, erhöhen diese ebenfalls. Die Viskosität von ionischen Flüssigkeiten ist stark temperaturabhängig und nimmt allgemein mit steigender Temperatur ab. Bei 1-Butyl-3-methyl-imidazolium-hexafluorphosphat (BMim PF₆) wird die Viskosität durch eine Temperatursteigerung von 20°C auf 25°C beispielsweise um 27 % verringert (Zhang et al., 2006). Verunreinigungen wie Chlor (z.B. aus dem Syntheseprozess) oder Wasser haben ebenfalls einen starken Einfluss auf die Viskosität. Während Chloridkonzentrationen von 1,5 - 6 % (w/v) die Viskosität bestimmter ILs um 30 - 600 % erhöhen, bewirkt Wasser den gegenteiligen Effekt (Holbrey et al., 2008). Eine hohe Viskosität kann sich hierbei negativ auf den Stofftransport auswirken (Yang und Pan, 2005).

Dichte

Die meisten ionischen Flüssigkeiten weisen mit Werten von 1 - 1,6 g/mL eine höhere Dichte als Wasser auf (Meindersma et al., 2007). Die Dichte steigt im allgemeinen mit der Molekularmasse des Anions und nimmt dem entgegengesetzt mit der Größe des Kations ab (Meindersma et al., 2007). Verunreinigungen und die Temperatur beeinflussen die Dichte sehr viel weniger stark als die Viskosität. In 2-Phasensystemen bestimmt die Dichte der ionischen Flüssigkeit die Geschwindigkeit der Phasentrennung (Bräutigam et al., 2007b).

Polarität

Die Polarität eines Lösemittels hat nicht nur einen starken Einfluss auf dessen Lösungs(mittel)-eigenschaften, sondern auch auf den Verlauf einer chemischen Reaktion und die Lage des Gleichgewichts (Reichardt, 2005). Ionische Flüssigkeiten werden als polare Lösemittel erachtet, deren Polarität im Allgemeinen zwischen Wasser und chlorierten Lösemitteln liegt (Holbrey et al., 2008). Auf 1,3-Dialkyl-imidazolium-Ionen-basierende ILs weisen auf der normalisierten Polaritätsskala, bei der Tetramethylsilan den Wert 0 und Wasser den Wert 1 besitzt, beispielsweise Polaritäten von 0,6 - 0,7 auf und liegen damit im Bereich von kurzkettigen (primären) Alkoholen (Aki et al., 2001; Muldoon et al., 2001; Carmichael und Seddon, 2000). Die Polarität von ILs mit Tetraalkylphosphat- oder

Tetraalkylammonium-Kationen ist hingegen vergleichbar mit polaren, aprotischen Lösemitteln wie Dimethylsulfoxid (Reichardt, 2005).

Löslichkeiten

Im Hinblick auf die Verwendung von ionischen Flüssigkeiten als Alternative zu organischen Lösemitteln in 2-Phasensystemen sind deren Lösemittleigenschaften sowie die Mischbarkeit mit Wasser von entscheidendem Interesse. Wie bereits angesprochen, weisen die meisten ionischen Flüssigkeiten bezüglich ihrer Polarität ähnliche Lösungsmittleigenschaften auf wie kurzkettige Alkohole und polare, aprotische Solventien (Holbrey et al., 2008). Durch Verlängerung der Alkylseitenketten im Kation nimmt die Lipophilie der ionischen Flüssigkeiten zu und die Löslichkeit unpolarer Stoffe wird erhöht (Holbrey et al., 2008). Die Mischbarkeit von ionischen Flüssigkeiten mit Wasser hängt stark vom Anion ab. So können ionische Flüssigkeiten entweder vollständig mit Wasser mischbar sein (z.B. 1-Butyl-3-methyl-imidazolium-tetrafluorborat, BMim BF₄) oder im Fall von BMim PF₆ und 1-Butyl-3-methyl-imidazolium-bis(trifluormethylsulfonyl)-imid (BMim NTf₂) trotz gleicher Polarität eine zweite Phase ausbilden (van Rantwijk et al., 2003). Mit Wasser nicht mischbare ILs sind hygroskopisch (van Rantwijk et al., 2003) und in gewissem Maße wasserlöslich, wobei die Löslichkeit in Wasser nicht nur von den Anionen und Kationen, sondern auch von der Temperatur abhängt. Bei 25°C, 35°C und 50°C nimmt die Wasserlöslichkeit von BMim PF₆ beispielsweise von 20 auf 22 bzw. 27 g/L zu (Anthony et al., 2001). Alkane und andere apolare organische Lösemittel sind in der Regel nicht mit ILs mischbar und können dementsprechend zur Extraktion (unpolarer Reaktionsprodukte) verwendet werden (Holbrey et al., 2008). Hingegen scheinen polare Lösemittel (z.B. Chloroform, Acetonitril und Methanol) mit annähernd allen ionischen Flüssigkeiten vollständig mischbar zu sein (Holbrey et al., 2008).

Toxizität

Ionische Flüssigkeiten wurden bis etwa Ende des 20. Jahrhunderts generell als grüne Lösemittel bezeichnet. Aufgrund ihres verschwindend geringen Dampfdruckes wurde angenommen, dass sie nur einen geringen Einfluss auf die Umwelt haben. Viele Studien haben inzwischen jedoch gezeigt, dass ILs z.T. eine hohe akute Toxizität z.B. gegenüber Pflanzen, aquatischen Organismen sowie Mikroorganismen aufweisen (Wells und Coombe, 2006; Pretti et al., 2006, 2009; Bernot et al., 2005; Stolte et al., 2007; Docherty und Kulpa, 2005; Samorì, 2011; Sivapragasam et al., 2020; Kumari et al., 2020; Flieger und Flieger, 2020). Alle Untersuchungen zur biologischen Wirkung von ILs auf Mikroorganismen zeigen, dass die Toxizität mit zunehmender Länge der Alkylseitenketten und folglich mit der Lipophilie des Kations steigt (Wood et al., 2011; Samorì, 2011; Egorova und Ananikov, 2018). Auch die Kopfgruppe spielt eine Rolle, wobei (gemäß der bisher existierenden Daten) Cholinium- und Imidazolium-ILs mit kurzen Alkylketten offenbar am besten für die Ganzzellbiokatalyse geeignet sind (Egorova und Ananikov, 2018). Ebenso erhöht im Allgemeinen die Lipophilie des Anions die Toxizität, wobei das Anion im Vergleich zum Kation im Hinblick auf die Toxizität eine untergeordnete Rolle spielt (Sivapragasam et al., 2020; Kumari et al., 2020). Organische Lösemittel weisen mit steigendem log P-Wert (Logarithmus des Verteilungskoeffizienten eines Lösemittels zwischen Oktanol und Wasser) hingegen eine verminderte Toxizität gegenüber

Bakterien auf (Aono et al., 1994; Rajagopal, 1996; León et al., 1998; Ramos et al., 2002). Die Toxizität einer ionischen Flüssigkeit ist neben dem Kation und dem Anion auch stark vom untersuchten Organismus abhängig. Während die Gattung *Penicillium* die höchste IL-Toleranz zeigt, weist *S. cerevisiae* eine hohe Empfindlichkeit gegenüber den meisten ionischen Flüssigkeiten auf (Egorova und Ananikov, 2018). Die Schädigung der Zellmembran ist einer der Hauptgründe für die Toxizität von ionischen Flüssigkeiten, da ILs (insbesondere mit langen Alkylseitenketten) in die Lipiddoppelschicht eindringen und so deren Struktur beeinträchtigen, was schlussendlich zur Zellyse führt (Egorova und Ananikov, 2018; Sivapragasam et al., 2020; Kumari et al., 2020; Flieger und Flieger, 2020).

Entscheidender Vorteil von ionischen Flüssigkeiten im Vergleich zu org. Lösemitteln ist jedoch deren Besonderheit, dass ihre chemischen und auch toxischen Eigenschaften durch Kombination verschiedener Kationen und Anionen verändert und folglich an die gewünschten Versuchsbedingungen angepasst werden können.

1.6 Ziele der Arbeit

Die Synthese enantiomerenreiner Cyanhydrine durch Oxynitrilasen stellt in Verbindung mit der enantiokonservativen Hydrolyse der Cyanhydrine durch Nitrilasen eine vielversprechende Reaktionskaskade zur umweltfreundlichen Darstellung von enantiomerenreinen α -Hydroxycarbonsäuren (und Amiden) dar, die sich aufgrund der milden Reaktionsbedingungen insbesondere für die Synthese von Verbindungen mit labilen funktionellen Gruppen eignet. Der Fokus der „bienzymatischen Ganzzellkatalyse“ lag bisher primär auf der Synthese von (*S*)-Mandelsäure und/oder (*S*)-Mandelamid aus Benzaldehyd und Cyanid. Neben den angesprochenen Verbindungen stellen jedoch enantiomerenreine tertiäre α -Hydroxycarbonsäuren (α -Alkyl- α -hydroxycarbonsäuren) ebenfalls interessante Produkte für die chemische, pharmazeutische und agrochemische Industrie dar. Die bienzymatische Synthese dieser Verbindungen setzt voraus, dass Nitrilasen zur Verfügung stehen, die sterisch anspruchsvolle Nitrile mit drei voluminösen Resten am zur Nitril-Gruppe α -ständigen C-Atom umsetzen. Bisher wurden keine Nitrilasen beschrieben, die quartäre Nitrile oder tertiäre Cyanhydrine zu den entsprechenden Carbonsäuren hydrolysieren können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein tertiäres α -Hydroxynitril (Acetophenoncyanhydrin) synthetisiert, das als Modellsubstrat für sterisch anspruchsvolle Nitrile dienen sollte. Anschließend sollte geprüft werden, ob die aus vorangehenden Arbeiten zur Verfügung stehenden rekombinanten Nitrilasen in der Lage sind, das Modellsubstrat zu hydrolysieren, und im Folgenden sollte die am besten geeignete Nitrilase zur Konstruktion des entsprechenden „bienzymatischen Ganzzellkatalysators“ eingesetzt werden, um die Synthese von enantiomerenreinem Atrolactat zu ermöglichen. Darüber hinaus wurde das synthetische Potential von Nitrilasen hinsichtlich der Biotransformation weiterer sterisch anspruchsvoller Nitrile untersucht. Neben den bisher angesprochenen Verbindungen sind auch aliphatische α -Hydroxycarbonsäuren interessante Produkte für die chemische Industrie. Aus diesem Grund sollte die Biotransformation aliphatischer Nitrile sowie die Anwendbarkeit der „bienzymatischen Ganzzellkatalyse“ in Bezug auf die Umsetzung eines aliphatischen Modellsubstrates (Acrolein) untersucht werden.

Weiterhin war eine gezielte Veränderung der Substratspezifität von Nitrilasen von Interesse. Zur

Veränderung der Enzymeigenschaften sind zwei verschiedene Ansätze denkbar; die Methode des rationalen Proteindesigns und der gerichteten Evolution. Die Anreicherung von Stämmen mit Nitril-hydrolysierenden Aktivitäten aus Umweltproben erfolgt in der Regel mit einem Nitril als einziger Stickstoffquelle. Ob diese Methode auch für die Selektion von (nach Zufallsmutagenese) veränderten Nitrilasevarianten in einem rekombinanten *E. coli* Stamm geeignet ist, wurde (eingehend) analysiert. Parallel sollte(n) die Nitrilase(n) durch rationales Proteindesign verändert und die entsprechenden Nitrilasevarianten hinsichtlich der Umsetzung von Arylacetonitrilen und sterisch anspruchsvollen Nitrilen charakterisiert werden.

In vorangegangenen Arbeiten gelang es nicht, größere Substratmengen mit Hilfe des „bienzymatischen Ganzzellkatalysators“ enantiomerenrein umzusetzen. Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bestand deshalb in der Analyse der Reaktionslimitierungen, die bei der Synthese von (*S*)-Mandelsäure und (*S*)-Mandelamid aus Benzaldehyd und Cyanid durch den „bienzymatischen Ganzzellkatalysator“ in wässrigen Medien auftraten. Hierzu wurde der Einfluss hoher Substratkonzentrationen auf die Stabilität des Wirtsstammes (*E. coli*) sowie auf die Oxynitrilase- und Nitrilase-Aktivitäten in den entsprechenden Ganzzellkatalysatoren untersucht. In diesem Zusammenhang sollte auch die Löslichkeit von Benzaldehyd und HCN in verschiedenen (zellkompatiblen) Lösungsmitteln bestimmt, sowie geeignete ionische Flüssigkeiten ausgewählt und vergleichend analysiert werden. Die (optimierten) 2-Phasensysteme sollten im Anschluss auf ihre Eignung geprüft werden synthetisch relevante Benzaldehydkonzentrationen zu enantiomerenreiner Mandelsäure und/oder enantiomerenreinem Mandelamid umzusetzen.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

In dieser Arbeit wurden die in Tab. 2.1 aufgeführten Organismen verwendet.

Tabelle 2.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Organismen und deren genetische Marker.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> BW3110	W3110 <i>rhaB</i> ⁻	Stumpp et al. (2000)
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17</i> (r ⁻ _k , m ⁺ _k) <i>relA1 supE44</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) [F' <i>traD36 proAB laq1_qZΔM15</i>]	Promega
<i>E. coli</i> TFB 5α	F ⁻ Φ80d <i>lacZΔM15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r ⁻ _k , m ⁺ _k) <i>phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1 fhuA</i> (T1 ^R)	Transformation Biosciences
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r ⁻ _k , m ⁺ _k) <i>supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac1_qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^R)]	Stratagene
<i>E. coli</i> XL10-Gold	Tet ^R Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lac1_qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^R Amy Cam ^R)]	Stratagene
<i>Pichia pastoris</i> pJOE5537.4	<i>P. pastoris</i> X-33 mit Nitrilasegen aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> EBC191	Rustler et al. (2008b)
<i>Pichia pastoris</i> pJOE5557.2	<i>Pichia pastoris</i> X-33 mit Nitrilasegen aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 und Oxynitrilasegen aus <i>Manihot esculenta</i>	Rustler et al. (2008b)

Die in dieser Arbeit verwendeten oder konstruierten Plasmide sind in Tab. 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und ihre Eigenschaften.

Plasmid	Resistenz	relevante Charakteristik	Referenz
pJOE2775	Amp	P _{rhaBAD} (Expressionsvektor mit der Sequenz zur Einführung eines C-terminalen His ₆ -tags)	Stumpp et al. (2000)
pIK9	Amp	Plasmid pJOE2775 mit Nitrilasegen aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> EBC191	Kiziak et al. (2005)
pIK7	Amp	Plasmid pJOE2775 mit Nitrilasegen aus <i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC8750	Kaufmann (1997)

Plasmid	Resistenz	relevante Charakteristik	Referenz
pDHE22	Amp	Plasmid pJOE2775 mit Nitrilasegen aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	Heinemann et al. (2003)
pJOE5263.3	Amp	Plasmid pJOE2775 mit Nitrilasegen aus <i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1	Baum et al. (2012)
pJOE2775-NitNc	Amp	Plasmid pJOE2775 mit Nitrilasegen aus <i>Neurospora crassa</i> OR74A	Petříčková et al. (2012)
pJOE2775-NitAn	Amp	Plasmid pJOE2775 mit Nitrilasegen aus <i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	Petříčková et al. (2012)
pCK103	Amp	C-terminal deletierte Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 mit einem Stopcodon im Nitrilasegen nach Basenpaar 909 (-47 AS)	Kiziak et al. (2007)
pCK104	Amp	C-terminal deletierte Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 mit einem Stopcodon im Nitrilasegen nach Basenpaar 885 (-55 AS)	Kiziak et al. (2007)
pCK105	Amp	C-terminal deletierte Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 mit einem Stopcodon im Nitrilasegen nach Basenpaar 870 (-60 AS)	Kiziak et al. (2007)
pCK106	Amp	C-terminal deletierte Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 mit einem Stopcodon im Nitrilasegen nach Basenpaar 849 (-67 AS)	Kiziak et al. (2007)
pIK9-F191G	Amp	kodiert für Variante der Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 mit dem AS-Austausch F191G	S. Bürger, unveröffentlicht
pIK9-Y141G	Amp	kodiert für Variante der Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 mit dem AS-Austausch Y141G	diese Arbeit
pIK9-Y54X	Amp	kodiert für Varianten der Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 mit verschiedenen AS-Austauschen an Position Y54, wobei X für eine der 19 kanonischen Aminosäuren steht	diese Arbeit
pIK9-A165W	Amp	kodiert für Variante der Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 mit dem AS-Austausch A165W	diese Arbeit
pIK9-S190T	Amp	kodiert für Variante der Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 mit dem AS-Austausch S190T	diese Arbeit
pIK9-S190Y	Amp	kodiert für Variante der Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 mit dem AS-Austausch S190Y	diese Arbeit
pIK9-P189A	Amp	kodiert für Variante der Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 mit dem AS-Austausch P189A	diese Arbeit

Plasmid	Resistenz	relevante Charakteristik	Referenz
pIK9-D238A	Amp	kodiert für Variante der Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 mit dem AS-Austausch D238A	diese Arbeit
pJOE5361.1	Cm	Plasmid pAW229 mit Oxynitrilasegen aus <i>Manihot esculenta</i>	Rustler et al. (2008b)
pSOM4	Cm	Plasmid pAW229 mit Oxynitrilasegen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	Sosedov (2013)
pRMS1205.1	Amp	kodiert für Variante der Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 mit dem AS-Austausch P17S	diese Arbeit
pRMS1305.1	Amp	kodiert für Nitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191	diese Arbeit

2.2 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Übersicht über die in dieser Arbeit zur Sequenzierung und Mutagenese eingesetzten Oligonukleotide (Eurofins, Hamburg).

Oligonukleotide	Sequenz (5' → 3')
pJ-F	gagaaggtcgcaattcaggc
pJ-R	tctgtttatcagaccgcttctgc
pORI-F	cgcggtgctggcgttttccatag
pORI-R	agatcaaaggatcttcttgatcc
pRHA	gttcagtgaagcccagtagcagc
Y141G-F	tggagcgtcagtcggcgagaaggcgacg
Y141G-R	cgtegecttctccgccgactgagcgtcca
D238A-F	tcgacgaactgattgcttctccggccaagcc
D238A-R	gccttggccggagaagcaatcagttcgtcga
Y54A-F	gtggctgccgggggctccctggtggatc
Y54A-R	gatccaccaggagccccggcagccac
Y54NNS-F	gtggctgccggggnnscctggtggatc
Y54NNS-R	gatccaccagggsnnccccggcagccac
Y54D-F	ggctgccggggatccctggtgg
Y54D-R	ccaccagggatccccggcagcc
Y54E-F	gtggctgccgggggagccctggtggatct
Y54E-R	agatccaccagggtccccggcagccac
Y54T-F	gtggctgccggggactccctggtggatc
Y54T-R	gatccaccaggagtccccggcagccac
Y54S-F	gtggctgccggggagtccctggtggatc
Y54S-R	gatccaccaggactccccggcagccac
Y54Q-F	gtggctgccggggcagccctggtggatct
Y54Q-R	agatccaccagggtgccccggcagccac
Y54N-F	ggctgccggggaatccctggtgg
Y54N-R	ccaccagggattccccggcagcc
Y54I-F	gtggctgccggggattccctggtggatc
Y54I-R	gatccaccagggaatccccggcagccac

Oligonukleotide	Sequenz (5' → 3')
S190T-F	cgcgccctggcctaccttttcggtatacc
S190T-R	ggtataccgaaaaggtagccaggccgcg
S190Y-F	catatcgcgccctggcctatttttcggtataccggggg
S190Y-R	ccccgggtataccgaaaaataaggccaggccgcgatatg
A165W-F	ggtgccttgctgctgctgggagcatatccagcc
A165W-R	ggctggatatgctcccagcagcacaaggcacc
P189A-F	catatcgcgccctgggctagcttttcggtat
P189A-R	ataccgaaaagctagccaggccgcgatatg

2.3 Geräte

Es wurden nachfolgende Laborgeräte verwendet.

2.3.1 Allgemeine Laborgeräte

Agarosegelkammer Wide Mini-Sub CellGT	Biorad, Richmond, USA
Autoklav Tuttnauer 3870 EL	Systemec, Wettenberg
Elektroporationsgerät Gene pulser II	Biorad, Richmond, USA
Filterstation	Pall Gelman Sciences, Dreieich
Geldokumentationsstation	Herolab, Wiesloch
Geltrocknungsapparatur SLAB Dryer Model 483	Biorad, Richmond, USA
HCN-Detektor Pac 7000	Dräger, Lübeck
Inkubationsschüttler	Infors HT, Einsbach
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Netzgerät Pharmacia GPS 200/400	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
PCR-Gerät TGradient	Biometra, Göttingen
pH-Elektrode Sartorius PY-P12, -P20	Sartorius, Göttingen
pH-Meter Sartorius Basic Meter	Sartorius, Göttingen
SDS-Elektrophoresekammer Mini-Protean 3 Cell	Biorad, Richmond, USA
Standzentrifuge Avanti J-25	Beckman, Krefeld
Standzentrifuge Sigma 3K-1 und 4K10	Sigma, Osterode
Thermoblock neoBlock 1	neoLab, Heidelberg
Thermoschüttler Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Centrifuge 5417C und	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Mikro 22R	Hettich, Tuttlingen
UV/VIS Spectrophotometer Cary 100 Bio	Varian, Darmstadt
Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Vortexer Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Waage Sartorius analytic und Sartorius laboratory	Sartorius, Göttingen

2.3.2 HPLC-Anlagen und Trennsäulen

Agilent 1100er Serie

Quaternary Pump G1311A	
Autosampler G1329A	
Diode Array Detector G1315B	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Vacuum Degasser G1322	
Software ChemStation LC3D	

Waters

Waters HPLC pump 510
 Autosampler 717plus
 996 Photodiode Array Detektor Waters, Milford, MA, USA
 Waters System Interface Module
 Software Millennium32 Chromatography

Trennsäulen

Lichrospher 100 RP-8 (125 x 4 mm, 5 μ m)	Trentec Analysentechnik, Rutesheim
Lichrospher 100 RP-18 (250 x 4 mm, 5 μ m)	Trentec Analysentechnik, Rutesheim
ProC18-Aq (125 x 4 mm, 5 μ m)	Trentec Analysentechnik, Rutesheim
Chromolith SpeedROD RP-18 (50 x 4,6 mm, 2 μ m)	Merck, Darmstadt
Chiral HSA (150 x 4 mm, 5 μ m)	ChromTech, Apple Valley, MN, USA
Chiral AGP (100 x 4 mm, 5 μ m)	ChromTech, Apple Valley, MN, USA

2.4 Chemikalien und Enzyme

2.4.1 Kommerziell verfügbare Chemikalien und Enzyme

Es wurden analysenreine Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), Lancaster (Mühlheim/Main), Frinton Laboratories Inc. (Vineland, NJ, USA) und TCI (Tokyo, Japan) verwendet. Die ionischen Flüssigkeiten 1-Butyl-1-methylpyrrolidinium-bis(trifluormethylsulfonyl)imid (BMpl NTf₂), 1-Butyl-3-methylimidazolium-bis(trifluormethylsulfonyl)imid (BMim NTf₂) und 1-Butyl-3-methylimidazolium-hexafluorophosphat (BMim PF₆) besaßen mit Ausnahme von BMpl NTf₂ hochreine Qualität und stammten von der Firma Merck (Darmstadt). 2-Methyl-2-phenylpropannitril und 2-Methyl-2-phenylpropansäure wurden bei der Firma Accela ChemBio Inc. (San Diego, CA, USA) bezogen. 2-Hydroxy-2-phenylpropansäure (Atrolactat) und (*S*)-Atrolactat stammten von der Firma aber GmbH (Karlsruhe).

Biochemikalien und Enzyme sowie die zugehörigen Puffer stammten von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim), New England Biolabs (Frankfurt/Main) und Fermentas (St. Leon-Rot).

2.4.2 Zur Verfügung gestellte Chemikalien

2-Acetyloxy-2-methylphenylacetonitril sowie 2-Hydroxy-2-methyl-3-phenylpropannitril wurden freundlicherweise von S. van Pelt (van Pelt et al., 2011) bzw. A. Chmura, TU Delft zur Verfügung gestellt. 2-Hydroxy-3-butenitril, 2-Hydroxy-3-butenensäure und 2-Hydroxy-3-butenamid wurden ebenfalls von A. Chmura synthetisiert (Rustler et al., 2008a). Die Synthese von 2-Methoxy-2-trifluormethylphenylacetonitril und 2-Ethyl-2-phenylbutannitril erfolgte durch einen ehemaligen Mitarbeiter des Institutes für Mikrobiologie (Jan Wacker).

2.4.3 Synthese von Acetophenoncyanhydrin

Acetophenoncyanhydrin wurde im Wesentlichen nach der Methode von Gassman und Talley (1978) synthetisiert. 0,1 mol (12 g) Acetophenon wurden in einem Rundkolben vorgelegt und trockenes Dichlormethan (ca. 30 mL) hinzugefügt. Zu dieser Mischung wurden 0,11 mol (11 g) Trimethylsilylcyanid unter Eiskühlung langsam zugetropft. Nach der Zugabe von ZnI₂ (Spatelspitze) wurde

6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Spaltung des Silylethers wurde unter Eiskühlung eine Mischung aus 50 mL Salzsäure (20 %, v/v) und 50 mL Tetrahydrofuran (THF) zugegeben und weitere 2 Stunden unter Eiskühlung gerührt. Das entstandene Acetophenoncyanhydrin wurde dreimal mit Diethylether (insgesamt ca. 100 mL) extrahiert und die vereinigten Etherphasen zur Extraktion des nicht-umgesetzten Acetophenons mit einer annähernd gesättigten Dinatriumdisulfidlösung ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen der vereinigten Etherphasen mit MgSO_4 wurde der Ether abrotiert. Zur Entfernung des in der Lösung verbliebenen Ethers wurde der Rundkolben über Nacht an eine Ölpumpe angeschlossen. Die Auswaage betrug 14,2 g (Ausbeute: 97 %).

^1H -NMR (CDCl_3 , 250 MHz): δ 7.32 (d, 2H, Ph), 7.18 (m, 3H, Ph), 4.40 (br s, 1H, OH), 1.61 (s, 3H, Me); IR (Film): 3420 (OH), 2243 (CN) cm^{-1} .

2.4.4 Synthese von Atrolactamid

Atrolactamid wurde nach der Methode von Zha et al. (2004) aus Acetophenoncyanhydrin synthetisiert. Unter Eiskühlung wurden zu 40 mmol (6 g) Acetophenoncyanhydrin 70 mL kalte, konzentrierte Salzsäure gegeben. Die Mischung wurde unter Rühren im Eisbad 20 min mit HCl-Gas gesättigt und der Rundkolben für 7,5 Stunden im Eisbad stehengelassen (ohne rühren), wobei sich der Kolben von 0°C auf Raumtemperatur erwärmte. Zur Einstellung des pH-Wertes auf 9 wurden nach erneuter Kühlung im Eisbad langsam 200 mL 20 %ige (w/v) NaOH-Lösung und einige NaOH-Plätzchen zugegeben. Das ausgefällte Atrolactamid wurde dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert und die vereinigten Extrakte zur Entfernung von NaCl zweimal mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der Extrakte mit Na_2SO_4 und dem Abrotieren des Ethylacetats wurde die Lösung mit Ether versetzt und über Nacht zur Rekristallisation von Atrolactamid kühl gestellt. Das weiße Pulver wurde unter Vakuum im Exikator getrocknet. Die Auswaage betrug 2,8 g (70 % Ausbeute).

^1H -NMR (DMSO, 500 MHz): δ 7,53 (m, 2H, Ph), 7,3-7,23 (m, 4H, Ph und NH), 7,07 (s, 1H, NH), 5,91 (s, 1H, OH), 1,6 (s, 3H, Me); ^{13}C -NMR (DMSO, 125 MHz): δ 177, 145, 128, 127, 125, 75, 26; IR (KBr-Pressling): 1669 (C=O), 3266-3314 (NH), 3453 (OH) cm^{-1} ; MS: 165 (M).

2.5 Nährmedien, Lösungen und Antibiotika

Nährmedien und Lösungen wurden 20 min bei 121°C und 1,2 bar sterilisiert. Zur Herstellung von Festmedien wurde den entsprechenden Flüssigmedien 15 g/L Agar zugesetzt. Falls erforderlich wurden zur Selektion rekombinanter Stämme Antibiotika unter sterilen Bedingungen zugegeben.

2.5.1 Komplexmedien

Es wurden nachfolgende Komplexmedien verwendet.

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) (Sambrook et al., 1989)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
deionisiertes Wasser	ad 1 L

dYT-Medium

Trypton	16 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g
deionisiertes Wasser	ad 1 L

YPD-Medium

Pepton	20 g
Hefeextrakt	10 g
Glucose (20 %, w/v)	100 mL
deionisiertes Wasser	ad 1 L

YPG-Medium

Pepton	20 g
Hefeextrakt	10 g
K-Phosphatpuffer (1 M, pH 6)	100 mL
Glycerin (10 %, v/v)	100 mL
deionisiertes Wasser	ad 1 L

YPM-Medium

Pepton	20 g
Hefeextrakt	10 g
K-Phosphatpuffer (1 M, pH 6)	100 mL
Methanol	5 mL
deionisiertes Wasser	ad 1 L

2.5.2 Mineralmedien und Lösungen

Es wurden nachfolgende Mineralmedien und Lösungen verwendet.

Minimalmedium (MM) mit anorganischer Stickstoffquelle

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	6,96 g
KH_2PO_4	2,00 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,05 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1,00 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	1,00 g
Fe(III)citrat $\times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,02 g
SL-6 (Spurenelementlösung ohne EDTA und FeSO_4)	1,00 mL
Glycerin (10 %ig)	100 mL
deionisiertes Wasser (Millipore)	ad 1 L

Die entsprechenden Stammlösungen wurden getrennt autoklaviert und anschließend nach obigem Rezept gemischt. Da es nach längerem Stehenlassen des Mediums zu einer leichten Salzausfällung kam, wurden die Stammlösungen direkt vor der Verwendung stets frisch gemischt. Dem Medium wurden zusätzlich 7,5 µg/mL Thiamin und (falls erforderlich) 0,2 % (w/v) Rhamnose zugegeben.

Spurenelementlösung ohne EDTA und Eisen, SL-6 (1000 x), nach Pfennig (1966)

ZnSO ₄ x 2 H ₂ O	100 mg
H ₃ BO ₃	300 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	30 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	20 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	30 mg
deionisiertes Wasser	ad 1 L

Mineralmedium (M9) [DSMZ Medium Nr. 382]

M9-Salze (10 x)	100 mL
MgSO ₄ (1 M)	1 mL
CaCl ₂ (0,1 M)	1 mL
Glucose (20 %)	10 mL
deionisiertes Wasser	900 mL

Dem Medium wurden 7,5 µg/mL Thiamin zugegeben.

M9-Salze (10 x)

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	75,2 g
KH ₂ PO ₄	30 g
NH ₄ Cl	10 g
NaCl	5 g
deionisiertes Wasser	ad 1 L

Phosphatgepufferte Saline (PBS) (Sambrook und Russel, 2001)

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
deionisiertes Wasser	ad 1 L

2.5.3 Medien mit einem Nitril als einziger Stickstoffquelle**Minimalmedium mit einem Nitril als einziger Stickstoffquelle (2-Phasensysteme)**

Die Zusammensetzung der wässrigen Phase entsprach dem in Kapitel 2.5.2 aufgeführten Minimalmedium (MM), jedoch ohne anorganische Stickstoffquelle (Ammoniumsulfat). Die Rhamnosekonzentration in der wässrigen Phase variierte zwischen 0 % - 0,2 % (w/v). Als organische Phase (Phasenanteil: 6,5 % oder 25 %, v/v) wurde entweder 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan (HMeN) oder n-Oktan eingesetzt. Der organischen Phase wurde 2-Phenylpropannitril (2-PPN) oder 2-Methyl-2-phenylpropannitril (MMN) in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt.

Festmedien mit 2-Phenylpropannitril als einziger Stickstoffquelle

Die Zusammensetzung der Festmedien entsprach dem in Kapitel 2.5.2 aufgeführten Minimalmedium, jedoch ohne anorganische Stickstoffquelle (Ammoniumsulfat). Rhamnose wurde in einer

Konzentration von 0,2 % (w/v) eingesetzt. 2-PPN wurde dem Medium direkt in einer Konzentration von 2 mM (aus methanolischer 0,2 M Stammlösung) zugegeben. Als Geliermittel wurden entweder 15 g/L LE (Low Electroendosmosis) Agarose (Biozym), Ultra pure Agarose (Invitrogen), Bacto Agar (Difco) oder 30 g/L Low-melt Agarose (Biozym) verwendet.

2.5.4 Antibiotika

Zur Kultivierung von Bakterienstämmen mit Antibiotikaresistenzen wurden den Medien die in Tab. 2.4 angegebenen Antibiotika zugesetzt. Die Antibiotika-Lösungen wurden sterilfiltriert (0,22 µm Filter, Millipore), aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.4: Stammlösungen und Arbeitskonzentrationen der verwendeten Antibiotika.

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/mL in 50 % (v/v) Ethanol	100 µg/mL
Chloramphenicol	20 mg/mL in 50 % (v/v) Ethanol	20 µg/mL
Tetracyclin	10 mg/mL in 50 % (v/v) Ethanol	10 µg/mL

2.6 Mikrobiologische Methoden

2.6.1 Stammhaltung

Für die Stammhaltung wurden die Bakterienstämme aus Glycerinkulturen auf LB- oder M9-Agarplatten ausgestrichen, bei 30°C oder 37°C über Nacht angezogen und die Platten bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die Stammhaltung von *Pichia pastoris* erfolgte auf YPD-Agarplatten. Alle 6 - 8 Wochen wurden die Stämme auf frische Agarplatten überimpft.

Die langfristige Stammhaltung erfolgte in Form von Glycerin-Dauerkulturen. Hierzu wurden 0,7 mL einer Übernachtskultur (ÜNK) mit 0,7 mL Glycerin (86 %, v/v) versetzt, die Kryo-Röhrchen in Flüssigstickstoff eingefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

2.6.2 Kultivierung

Flüssigkulturen von *E. coli* wurden in Reagenzgläsern mit 5 mL LB- oder dYT-Medium bei 37°C und 145 rpm für 14 - 16 Stunden angezogen. Für Wachstumsexperimente erfolgte die Anzucht von *E. coli* bei 37°C in 100 mL-Schikanenkolben mit 10 mL Minimalmedium für 24 Stunden unter Schütteln. *P. pastoris* Stämme wurden gemäß dem EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 18 Stunden in YPG-Medium bei 30°C und 100 rpm inkubiert.

2.6.3 Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Um das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur zu verfolgen, erfolgte eine Messung der optischen Dichte mit Hilfe eines UV/VIS-Photometers. Die Extinktion der Kulturen wurden hierzu bei 600 nm in Kunststoffküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gegen steriles Kulturmedium gemessen. Ab Extinktionswerten von 0,3 wurden die Proben mit Kulturmedium verdünnt, um die Linearität zwischen Zellzahl und Extinktion sicherzustellen. Eine optische Dichte (OD_{600}) von 1 entspricht näherungsweise einer *E. coli* Zellzahl von 10^9 Zellen pro mL (Sambrook et al., 1989).

2.6.4 Bestimmung der Lebendkeimzahl

Für die Bestimmung der Lebendkeimzahl von *E. coli* Stämmen wurde aus dem Kulturmedium ein Aliquot (100 μL) entnommen und dekadische Verdünnungen in PBS oder Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) erstellt. Je 100 μL dieser Verdünnungen wurden mittels steriler Glasperlen oder Drigalskispatel auf LB-Agar (falls erforderlich mit entsprechendem Antibiotikum) plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurden nur die Verdünnungsstufen ausgezählt, bei denen zwischen 20 und 900 Kolonie-bildende Einheiten (KbE) auf den Agarplatten vorhanden waren. Die Lebendkeimzahl (KbE/mL) ergibt sich aus der Multiplikation des arithmetischen Mittelwerts der Doppelbestimmung mit dem Kehrwert der entsprechenden Verdünnungsstufe.

2.6.5 Anzucht von Zellen mit Oxynitrilase- und/oder Nitrilase-Aktivitäten und Herstellung von Ruhezellen

Rekombinante *E. coli* Stämme wurden in dYT- oder LB-Medium aus einer Vorkultur im Verhältnis 1:100 (v/v) angeimpft. Das Flüssigmedium wurde mit 0,2 % (w/v) Rhamnose versetzt, um die Expression der Oxynitrilase- und/oder Nitrilasegene zu induzieren. Bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase wurden die Kulturen in der Regel 17 h bei 30°C inkubiert, die Zellen anschließend durch Zentrifugation (4°C, 5000 rpm, 15 min) geerntet und zweimal in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5) oder Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) gewaschen. Hierbei wurden Zellen, bei denen der Nitril-Umsatz über die Ammonium-Bildung untersucht werden sollte, in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) gewaschen, da Tris/HCl-Puffer den Ammoniumtest störte (Heinemann, 2003). Nach dem Entfernen des Waschpuffers wurden die Zellen entweder direkt für Ruhezellumsätze eingesetzt oder die Zellpellets bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren.

Die Induktion der Nitrilase- und Oxynitrilase-Aktivitäten in den rekombinanten *P. pastoris* Stämmen erfolgte gemäß dem Manual des EasySelect™ Pichia Expression Kits (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Die Stämme wurden hierfür in YPG-Medium angezogen (Kapitel 2.6.2) und die Zellen nach 18 h Inkubation geerntet (5000 rpm, 10 min, 4°C). Anschließend wurden die Zellen zweimal in K-Phosphatpuffer (0,1 M, pH 6) gewaschen, für die Genexpression in YPM-Medium transferiert ($\text{OD}_{600} = 1$) und bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Alle 24 h wurden die Kulturen mit 0,5 % (v/v) Methanol versetzt. Nach 4 Tagen wurden die Zellen geerntet (5000 rpm, 10 min, 4°C), in K-Phosphatpuffer (0,1 M, pH 6) gewaschen und nach dem Entfernen des Waschpuffers direkt für Ruhezellumsätze eingesetzt oder die Zellpellets bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren.

2.6.6 Durchführung von Ruhezellumsätzen

Ruhezellen wurden zunächst im entsprechenden Umsatzpuffer resuspendiert (Tab. 2.5). Nach dem Einstellen einer geeigneten optischen Dichte (600 nm) wurden die Reaktionen durch Zugabe von Nitril (aus 0,05 - 0,2 M Stammlösungen in Methanol) gestartet, so dass die Nitrilkonzentration in den Ansätzen 5 - 10 mM betrug. Die Reaktionsansätze wurden in der Regel bei 30°C und 1100 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert, in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die Reaktionen durch Zugabe von je 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Substrat- bzw. Produktkonzentrationen in den Überständen mittels HPLC bestimmt. Als Kontrolle dienten Standardlösungen (5 - 10

mM) der jeweiligen Substrate im entsprechenden Umsatzpuffer. Ein Abstoppen der Reaktion mit 10 % (v/v) 1 M HCl erfolgte nicht, wenn die Ammoniumkonzentrationen in den Überständen mittels Aquaquant Test (Kapitel 2.7.4) bestimmt wurden. Die Reaktionen wurden in diesem Fall abgestoppt durch Abzentrifugieren der Zellen.

Tabelle 2.5: Bei der enzymatischen Hydrolyse verschiedener Nitrile verwendete Umsatzpuffer.

Nitril	Umsatzpuffer
Mandelonitril	Na-Citratpuffer (100 mM, pH 5 oder 4,5)
Acetophenoncyanhydrin	Na-Citratpuffer (100 mM, pH 4,5)
2-Hydroxy-3-butennitril	Kaliumhydrogenphthalatpuffer (50 mM, pH 5)
2-Phenylpropanitril	Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7)
2-Methyl-2-phenylpropanitril	Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7)
Benzonitril	Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7)

Ruhezellumsätze mit „bienzymatischen Ganzzellkatalysatoren“ (*E. coli* oder *P. pastoris* Stämme mit Oxynitrilase- und Nitrilase-Aktivitäten) wurden entweder in 100 mM Kaliumhydrogenphthalatpuffer (pH 5 oder 4) bzw. 100 mM Citratpuffer (pH 5, 4,5 oder 4) durchgeführt. Hierzu wurde eine geeignete Menge der Ruhezellen in einem der genannten Puffersysteme mit 10 mM Acrolein, Benzaldehyd oder Acetophenon und der 1 - 3-fachen Menge an KCN (aus einer 2 M Stammlösung in Wasser) bei 30°C und 1100 rpm im Thermoschüttler inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen (jeweils 90 µL) und die Reaktionen durch Zugabe von 10 µL HCl (1 M) abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Substrat- bzw. Produktkonzentrationen in den Überständen mittels HPLC bestimmt. Als Kontrolle wurden die jeweiligen Ansätze mit den Substraten (10 mM) und KCN (10 - 30 mM) in Abwesenheit der Zellen im entsprechenden Umsatzpuffer mitgeführt.

Wurde von den oben genannten Standardbedingungen abgewichen, ist dies an entsprechender Stelle vermerkt.

2.6.7 Bestimmung der Nitrilase- oder Oxynitrilase-Aktivität

Die spezifischen Aktivitäten der Nitrilasen und/oder Oxynitrilasen (in U/mg Protein) wurden in den Überständen der Ruhezellumsätze anhand des Substratverbrauchs bzw. der Produktbildung bestimmt. Als eine Enzymeinheit (1 U) wird dabei die Enzymmenge definiert, die benötigt wird, um 1 µmol Substrat pro Minute umzusetzen bzw. 1 µmol Produkt pro Minute zu bilden. Der Proteingehalt von Ruhezellensuspensionen wurde aus der optischen Dichte (600 nm) der Zellen abgeleitet. Für eine *E. coli*-Suspension mit einer OD₆₀₀ von 1 wurde ein Trockengewicht von 250 mg/L ermittelt (Rustler, pers. Mitteilung). Da für Bakterienzellen in der Regel mit einem Proteinanteil von ca. 50 % am Trockengewicht kalkuliert wird (Neidhardt und Umbarger, 1996), entsprach eine OD₆₀₀ von 1 demzufolge ca. 0,125 mg Protein/mL.

In einigen Versuchen wurde die Aktivität von Nitrilasen anhand der Ammoniakfreisetzung in den Überständen der Ruhezellumsätze ermittelt, da bei der Hydrolyse eines Nitrils durch Nitrilasen zu gleichen Anteilen die korrespondierende Säure und Ammoniak entstehen. Der gebildete Ammoniak liegt bei den im Umsatzpuffer herrschenden pH-Werten praktisch vollständig protoniert in Form von Ammoniumionen vor. Diese Methode fand insbesondere dann Anwendung, wenn für

die entsprechenden Nitrile keine Säurestandards zur Verfügung standen oder die Nitrile keine oder lediglich eine sehr schwache UV-Absorption aufwiesen (Kapitel 2.7.4).

2.7 Analytische Verfahren

2.7.1 Bestimmung der Substrat- bzw. Produktkonzentrationen mittels HPLC

Die chromatographische Trennung von Substanzgemischen erfolgte mittels Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Substrat- bzw. Produktkonzentrationen wurden mit Hilfe der in Tab. 2.6 aufgeführten Methoden bestimmt. Die Fließmittel wurden vor der Verwendung mit Hilfe einer Filterstation entgast. Zur Quantifizierung wurden bei jedem Säulen- und/oder Fließmittelwechsel Kalibriergeraden mit den entsprechenden Standardsubstanzen erstellt.

Tabelle 2.6: Analysenparameter für den Nachweis und die Quantifizierung verschiedener Nitrile, Aldehyde, Ketone, Amide und Säuren mittels HPLC.

Substanz	Säulentyp	Detektion (nm)	Fluß (mL/min)	Fließmittel	Retentionszeit (min)
Benzaldehyd	Lichrospher RP-8	210	0,6	A	9,3
Mandelonitril	Lichrospher RP-8	210	0,6	A	6,8
Mandelsäure	Lichrospher RP-8	210	0,6	A	4,4
Mandelamid	Lichrospher RP-8	210	0,6	A	3,4
Benzaldehyd ¹	ProC18-Aq	254	0,6	B	11,3
Mandelonitril ¹	ProC18-Aq	254	0,6	B	8,6
Mandelsäure ¹	ProC18-Aq	254	0,6	B	4,9
Mandelamid ¹	ProC18-Aq	254	0,6	B	3,5
Benzaldehyd ²	SpeedROD RP-18	254	1	D	13
Mandelonitril ²	SpeedROD RP-18	254	1	D	8,3
Mandelsäure ²	SpeedROD RP-18	254	1	D	3,1
Mandelamid ²	SpeedROD RP-18	254	1	D	2,2
Benzaldehyd ³	Lichrospher RP-18	254	0,6	C	11,5
Mandelonitril ³	Lichrospher RP-18	254	0,6	C	7,8
Mandelsäure ³	Lichrospher RP-18	254	0,6	C	5,8
Mandelamid ³	Lichrospher RP-18	254	0,6	C	4,9
Benzonitril	Lichrospher RP-18	210	0,9	E	10,6
Benzoesäure	Lichrospher RP-18	210	0,9	E	5,8
2-Phenylpropanitril	Lichrospher RP-8	210	0,6	A	9,7
2-Phenylpropansäure	Lichrospher RP-8	210	0,6	A	8,3
2-Phenylpropanamid	Lichrospher RP-8	210	0,6	A	4,3
Acetophenon	Lichrospher RP-18	215	0,7	F	10,1
Acetophenoncyanhydrin	Lichrospher RP-18	215	0,7	F	7,6
Atrolactat	Lichrospher RP-18	215	0,7	F	4,4
Atrolactamid	Lichrospher RP-18	215	0,7	F	3,7

Substanz	Säulentyp	Detektion (nm)	Fluß (mL/min)	Fließmittel	Retentionszeit (min)
2-Acetyloxy-2-phenylpropannitril	Lichrospher RP-18	215	0,7	F	15,7
2-Acetyloxy-2-phenylpropansäure ⁴	Lichrospher RP-18	215	0,7	F	8
2-Acetyloxy-2-phenylpropanamid ⁴	Lichrospher RP-18	215	0,7	F	5,1
2-Methyl-2-phenylpropannitril	Lichrospher RP-8	210	0,9	G	5,1
2-Methyl-2-phenylpropansäure	Lichrospher RP-8	210	0,9	G	3,1
2-Hydroxy-3-butennitril	Lichrospher RP-18	195	0,7	H	11,2
Acrolein	Lichrospher RP-18	195	0,7	H	9,6
2-Hydroxy-3-butensäure	Lichrospher RP-18	195	0,7	H	7,2
2-Hydroxy-3-butenamid	Lichrospher RP-18	195	0,7	H	
2-Hydroxy-2-methyl-3-phenylpropannitril	Lichrospher RP-18	215	1	I	13,4
Phenylaceton ⁵	Lichrospher RP-18	215	1	I	12,9
2-Hydroxy-2-methyl-3-phenylpropansäure ⁶	Lichrospher RP-18	215	1	I	6
2-Hydroxy-2-methyl-3-phenylpropanamid ⁶	Lichrospher RP-18	215	1	I	3,9

¹ Methode verwendet bei Biotransformationen im 2-Phasensystem mit ionischen Flüssigkeiten (s. Kap. 2.11.3)

² Methode verwendet bei der Bestimmung der Verteilungskoeffizienten (s. Kap. 2.11.1)

³ Methode verwendet bei dem Experiment in Abb. 3.54(b)

⁴ Mutmaßliche Reaktionsprodukte, keine Standards zur Identifizierung und Quantifizierung vorhanden

⁵ Mutmaßliches Zerfallsprodukt, kein Standard zur Identifizierung und Quantifizierung vorhanden

⁶ Mutmaßliche Reaktionsprodukte, verifiziert über einen Umsatz mit *Rhodococcus erythropolis* MP50, keine Standards zur Identifizierung und Quantifizierung vorhanden

A: Wasser / Methanol / Phosphorsäure (59,7:40:0,3, v/v/v)

B: Wasser / Methanol / Essigsäure (59,75:40:0,25, v/v/v)

C: Wasser / Methanol / Phosphorsäure (49,7:50:0,3, v/v/v)

D: Wasser / Trifluoressigsäure (99,9:0,1, v/v)

E: Wasser / Acetonitril / Phosphorsäure (69,7:30:0,3, v/v/v)

F: Wasser / Acetonitril / Phosphorsäure (59,8:40:0,2, v/v/v)

G: Wasser / Acetonitril / Phosphorsäure (49,8:50:0,2, v/v/v)

H: lineares Gradientensystem:

0 min: Wasser / Acetonitril / Phosphorsäure (99,3:0,5:0,2, v/v/v)

3 min: Wasser / Acetonitril / Phosphorsäure (99,3:0,5:0,2, v/v/v)

15 min: Wasser / Acetonitril / Phosphorsäure (69,8:30:0,2, v/v/v)

16 min: Wasser / Acetonitril / Phosphorsäure (99,3:0,5:0,2, v/v/v)

I: Wasser / Acetonitril / Phosphorsäure (69,8:30:0,2, v/v/v)

2.7.2 Trennung von Enantiomergemischen und Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse

Ein wichtiges Maß für die Reinheit von chiralen Produkten ist der prozentuale Enantiomerenüberschuss *ee* (enantiomeric excess). Dieser beziffert den Überschuss des höher konzentrierten Enantiomers (c_H) gegenüber dem niedriger konzentrierten Enantiomer (c_L) und wird nach folgender Formel berechnet:

$$ee (\%) = \frac{c_H - c_L}{c_H + c_L} \cdot 100$$

Zur Trennung von Enantiomergemischen wurden die in Tab. 2.7 aufgeführten HPLC-Methoden verwendet.

Tabelle 2.7: Analysenparameter für die Trennung von Substanzgemischen in die Enantiomere mittels HPLC. Die Retentionszeiten der zugehörigen Aldehyde bzw. Ketone sind ebenfalls aufgeführt.

Substanz	Säulentyp	Detektion (nm)	Fluß (mL/min)	Fließmittel	Retentionszeit (min)
(<i>R</i>)-Mandelsäure	HSA	210	0,7	A	10,8
(<i>S</i>)-Mandelsäure	HSA	210	0,7	A	7,1
(<i>R</i>)-Mandelamid	HSA	210	0,7	A	2,6
(<i>S</i>)-Mandelamid	HSA	210	0,7	A	3,2
Benzaldehyd	HSA	210	0,7	A	5,2
(<i>S</i>)-2-Phenylpropanamid	AGP	210	0,6	B	8,2
(<i>R</i>)-2-Phenylpropanamid	AGP	210	0,6	B	6,2
(<i>S</i>)-2-Phenylpropansäure	AGP	210	0,6	B	4,4
(<i>R</i>)-2-Phenylpropansäure	AGP	210	0,6	B	3,9
(<i>R</i>)-Atrolactat	HSA	210	0,8	C	13,6
(<i>S</i>)-Atrolactat	HSA	210	0,8	C	9,9
(<i>R</i>)-Atrolactamid	HSA	210	0,8	C	2,3
(<i>S</i>)-Atrolactamid	HSA	210	0,8	C	3,8
Acetophenon	HSA	210	0,8	C	6,6

A: 50 mM Phosphatpuffer (pH 7) / Acetonitril (97:3, v/v)

B: 100 mM Phosphatpuffer (pH 5,9) / Isopropanol (99,9:0,1, v/v)

C: 25 mM Phosphatpuffer (pH 7) / Isopropanol (98:2, v/v)

2.7.3 Identifizierung der Enantiomere von Atrolactat und Atrolactamid

Die Zuordnung der Enantiomere von Atrolactat erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen (*S*)-Atrolactat Standards (Kapitel 2.4). Racemisches Atrolactamid wurde nach der in Kapitel 2.4.4 aufgeführten Methode synthetisiert. Bei der Analyse des Racemates mit Hilfe einer chiralen HSA-Säule (Methode vgl. Kapitel 2.7.2) wurden zwei Signale mit Retentionszeiten von 2,3 und 3,8 min erhalten. Um die Signale den entsprechenden Enantiomeren zuzuordnen, wurde Acetophenon und KCN mit dem rekombinanten Stamm *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) umgesetzt, der die (*S*)-selektive Oxynitrilase aus *Manihot esculenta* sowie die Nitrilase aus *P. fluorescens* synthetisiert. Da mit diesem Stamm aus Acetophenon und KCN vornehmlich (*S*)-Atrolactat gebildet wurde, war davon auszugehen, dass bei diesem Umsatz ebenfalls hauptsächlich (*S*)-Atrolactamid entstand.

Der Amid-Peak mit einer Retentionszeit von 3,8 min wurde dementsprechend dem (*S*)-Enantiomer zugeordnet.

2.7.4 Quantifizierung von Ammonium

Die Ammoniumkonzentrationen in den Überständen von Ruhezellumsätzen wurden mit Hilfe eines kolorimetrischen Tests (Aquaquant 1.14428.001, Fa. Merck) nach einem von Ute Heinemann modifizierten Verfahren bestimmt (Heinemann, 2003). Bei dem Test wird eine von der Ammoniumkonzentration abhängige Grünfärbung des Testansatzes beobachtet, die photometrisch bei 690 nm in 1 cm Küvetten gegen einen Reagenzienblindwert quantifiziert wird. Da bei Verwendung hoher Zelldichten auch ohne Nitrilzugabe eine schwache Grünfärbung des Testansatzes beobachtet werden konnte, wurden stets Ruhezellen mit der gleichen optischen Dichte wie im Reaktionsansatz, jedoch ohne Zugabe von Substrat, als Kontrolle mitgeführt. Zur Bestimmung der Nitrilaseaktivität wurde die Ammoniumfreisetzung im Reaktionsansatz deshalb um die Ammoniumfreisetzung der Zellen ohne jeweilige Nitrilzugabe korrigiert. Als weitere Kontrolle dienten 10 mM des jeweiligen Substrates im entsprechenden Umsatzpuffer.

Der Einfluss verschiedener Verbindungen auf die Nachweisbarkeit von Ammoniumionen in dem Testsystem wurde bereits untersucht (Heinemann, 2003). Hierbei hatte sich gezeigt, dass Tris/HCl-Puffer den Ammoniumtest störte und dass in Gegenwart von Hydroxynitrilen keine Grünfärbung des Testansatzes beobachtet werden konnte (Heinemann, 2003). Der Einfluss verschiedener Umsatzpuffer, wie beispielsweise Kaliumhydrogenphthalatpuffer (50 mM, pH 5) oder Citratpuffer (100 mM, pH 5), die in der vorliegenden Arbeit regelmäßig Verwendung fanden, auf das Testsystem wurde von U. Heinemann jedoch nicht untersucht. Dementsprechend wurde der Einfluss dieser Puffer auf die Nachweisbarkeit von Ammoniumionen analysiert. Die zuvor genannten Umsatzpuffer störten den kolorimetrischen Test nicht, da die Ammoniumwiederfindung (92 μ M bzw. 49,5 μ M) in den Puffern 107 bzw. 109 % betrug.

2.7.5 Bestimmung von Cyanidkonzentrationen

Die Cyanidkonzentrationen in wässrigen HCN-Lösungen oder ionischen Flüssigkeiten wurden photometrisch mit Hilfe eines Cyanid Testkits (Spectroquant 1.09701.0001, Fa. Merck) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Hierbei bilden Cyanid-Ionen mit einem Chlorierungsmittel (Reagenz CN-3) Chlorcyan, das mit 1,3-Dimethylbarbitursäure (Reagenz CN-4) zu einem blauen Farbstoff reagiert (pyridinfreie König-Reaktion). Da in der beiliegenden Anleitung keine Messwellenlänge angegeben war, wurde zunächst das Absorptionsmaximum eines Testansatzes mit Hilfe einer Cyanid-Standardlösung (0,5 mg/L) durch Aufnahme eines Spektrums bestimmt. Das Absorptionsmaximum lag bei 600 nm.

Sicherheitshinweis: Kaliumcyanid und Cyanwasserstoff sind stark toxisch. Alle Arbeiten mit KCN-haltigen Lösungen wurden unter einem funktionierenden Abzug in Gegenwart eines HCN-Detektors (Pac 7000, Dräger) durchgeführt. Informationen zum sicheren Umgang mit HCN können der GESTIS-Stoffdatenbank des Instituts für Arbeitsschutz (IFA) der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (DGUV) entnommen werden.

2.8 Molekulargenetische Methoden

2.8.1 Isolierung und Reinigung von DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mittels eines „NucleoSpin Plasmid Kits“ (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers. Zur Reinigung von DNA aus Agarosegelen (PCR-Ansätze oder mittels Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA) sowie zum Umpuffern von DNA-Lösungen wurde das „NucleoSpin Extract II Kit“ von Macherey-Nagel (Düren) eingesetzt.

2.8.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Spaltung von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in den vom Enzymhersteller mitgelieferten Reaktionspuffern für mindestens 2 h bei 37°C. Die Restriktionsansätze umfassten dabei ein Volumen von 30 - 70 µL und enthielten 10 - 20 U Enzym. Für einen analytischen Ansatz wurden 200 ng DNA und für präparative Ansätze (zur Gewinnung von geschnittenem Vektor oder geschnittenem PCR-Produkt) entsprechend größere Mengen eingesetzt. Die Reaktionen wurden entweder durch Einfrieren bei -20°C oder durch Vermischen mit DNA-Ladepuffer und direktes Auftragen der Ansätze auf Agarosegele gestoppt.

2.8.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation linearisierter Plasmid-DNA mit entsprechend geschnittenen DNA-Fragmenten erfolgte mittels T4 DNA-Ligase (NEB, New England Biolabs), wobei ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von ca. 1:3 eingesetzt wurde. Die Ansätze wurden in der Regel bei RT für 2 h inkubiert.

2.8.4 Ethanolfällung

Ligationsansätze wurden zum Entsalzen und zur Entfernung der Ligase mit 1/10-Volumen Kaliumacetat (3 M, pH 5) sowie dem 2,5-fachem Volumen eiskaltem Ethanol versetzt und die DNA 2 h bei -70°C gefällt. Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert (20 min, 13500 rpm, 4°C), die gefällte DNA mit 200 µL 70 % (v/v) Ethanol (-20°C) gewaschen und die DNA nach dem Trocknen bei RT in sterilem demineralisiertem Wasser aufgenommen.

2.8.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Zur Sequenzierung wurden entweder die Primer pJ-F und pJ-R oder die Primer pORI-F und pORI-R oder pRHA (Tab. 2.3) verwendet.

2.8.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese. Die Agarosekonzentration betrug dabei entweder 0,75 oder 1,0 % (w/v). Zur Sichtbarmachung der DNA wurde den Gelen Ethidiumbromid (1 µg/mL) hinzugefügt. Die DNA-Proben wurden mit 1/6-Volumen 6-fach Ladepuffer (Loading Dye, Fermentas) versetzt und die Elektrophorese in

1-fach TAE-Puffer bei 120 V durchgeführt. Für den TAE-Puffer wurde nachfolgende Stammlösung angesetzt.

50-fach TAE-Puffer:	242 g	Tris
	57,1 mL	Essigsäure
	100 mL	EDTA (0,5 M, pH 8)
	ad 1 L	demin. Wasser

Als Molekulargewichtsstandard wurde der „GeneRuler™ DNA-Ladder Mix“ von Fermentas eingesetzt. Die Dokumentation erfolgte in Form eines Thermodruckes.

2.8.7 Transformation

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde der jeweilige *E. coli* Stamm in 5 mL LB-Medium über Nacht bei 37°C angezogen. Nach dem Überimpfen (1:200, v/v) in 50 mL frisches Kulturmedium wurden die Zellen bei 37°C und 145 rpm bis zum Erreichen einer optischen Dichte (600 nm) von etwa 0,5 inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde die Kultur bei 5000 rpm (4°C, 10 min) zentrifugiert und das Zellpellet in 25 mL eiskalter Tfb-I-Lösung resuspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 10 min auf Eis inkubiert, erneut zentrifugiert (4000 rpm, 4°C, 5 min) und das Zellpellet vorsichtig in 2 mL eiskalter Tfb-II-Lösung aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 50 µL-Portionen in vorgekühlte 1,5 mL-Eppendorfgefäße aliquotiert, in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert. Die beiden verwendeten Tfb-Puffer hatten nachfolgende Zusammensetzung.

Tfb-I:	30 mM	KOAc
	50 mM	MnCl ₂
	100 mM	KCl
	10 mM	CaCl ₂
	15 % (w/v)	Glycerin
Tfb-II:	10 mM	Na-MOPS (pH 7)
	75 mM	CaCl ₂
	10 mM	KCl
	15 % (w/v)	Glycerin

Zur Transformation wurden 50 µL kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit ca.10 ng Plasmid-DNA (oder: 1 - 3 µL PCR-Ansatz) gemischt und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeschock-Behandlung für 35 s bei 42°C im Thermoblock. Nach dem Abkühlen der Zellen auf Eis für 2 min, wurden 400 µL dYT-Medium zugefügt und der Ansatz zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz bei 37°C für 60 min schüttelnd inkubiert. Je nach erwarteter Transformationsrate wurden zwischen 30 - 450 µL des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum plattiert und die Agarplatten über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.8.8 Transformation durch Elektroporation

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurde der jeweilige *E. coli* Stamm in der Regel in 5 mL LB-Medium über Nacht bei 37°C angezogen. Nach dem Überimpfen (1:1000, v/v) in 200 mL frisches Kulturmedium wurden die Bakterienkulturen bei 37°C und 125 rpm bis zum Erreichen einer optischen Dichte (600 nm) von 0,7 inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Zellen bei 5000 rpm (4°C, 15 min) abzentrifugiert und die Zellpellets in insgesamt 40 mL eiskalter Glycerin-Lösung (10 %, v/v) aufgenommen. Nach erneuter Sedimentation (5000 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Zellen weitere 5-mal in eiskalter Glycerin-Lösung (10 %, v/v) gewaschen, wobei das Volumen der Glycerin-Lösung kontinuierlich von 40 auf 0,8 mL reduziert wurde. Die Zellsuspension (0,8 mL) wurde in 50 µL-Portionen in vorgekühlte 1,5 mL-Eppendorfgefäße aliquotiert, in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

Zur Transformation wurden 50 µL elektrokompente Zellen auf Eis aufgetaut und in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette mit 2 - 20 ng Plasmid-DNA oder 5,5 µL Ligationsansatz versetzt. Die DNA wurde mit einer Spannung von 1,8 kV und einer Kapazität von 25 µF in die Zellen eingebracht. Unmittelbar nach dem Puls wurden 950 µL Minimal- oder LB-Medium zugesetzt und der Ansatz in einem 1,5 mL Eppendorfgefäß zur Ausprägung der Ampicillinresistenz bei 37°C für 60 min schüttelnd inkubiert. Je nach erwarteter Transformationsrate wurden zwischen 30 - 50 µL des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/mL) plattiert und die Agarplatten über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.9 Mutagenesen

2.9.1 Ortsgerichtete Mutagenese (Site-Directed Mutagenesis)

Für den Einzelaustausch von Aminosäuren wurde das „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene (La Jolla, USA) verwendet. Als Template für die PCR diente doppelsträngige dam-methylierte Plasmid-DNA aus *E. coli* JM109(pIK9). Die eingesetzten Primerpaare waren (entsprechend den Herstellerangaben) komplementär zueinander und zwischen 25 - 45 bp lang, wobei die zu mutierende Stelle in der Mitte der Primer lag. Ein Standard-PCR-Ansatz enthielt 10 ng Plasmid-DNA, 0,2 mM dNTP-Mix (Genaxxon), je 125 ng Vorwärts- und Rückwärts-Primer (Eurofins), 1-fach PCR-Puffer (Stratagene) sowie 2,5 U *PfuTurbo* DNA-Polymerase (Stratagene) in einem Reaktionsvolumen von insgesamt 50 µL. Mit Hilfe der DNA-Polymerase wurde hierbei das vollständige Plasmid amplifiziert. Das zugehörige Temperaturprofil der PCR ist in Tabelle 2.8 angegeben. Die parentalen Plasmide, die als Matrize gedient hatten, wurden im Anschluss an die PCR mit 25 - 30 U *DpnI* (NEB), welches nur dam-methylierte DNA schneidet, für 1,5 h bei 37°C verdaut. Die Ansätze wurden nachfolgend in chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert und positive Klone auf LB-Agarplatten mit 100 µg/mL Ampicillin selektiert. Die Plasmid-DNA einer Einzelkolonie wurde anschließend isoliert und mit Hilfe der Primer pJ-F und pJ-R sequenziert. War die angestrebte Punktmutation in der Plasmid-DNA enthalten, wurde die entsprechende Plasmid-Präparation zur Transformation von *E. coli* JM109 eingesetzt.

Tabelle 2.8: Temperaturprofil der PCR bei der ortsgerichteten Mutagenese

	Schritt	Temperatur	Zeit
1 x	Aktivierung der <i>PfuTurbo</i> DNA-Polymerase	95°C	30 s
16 x	Denaturierung	95°C	30 s
	Annealing	60°C	1 min
	Elongation	68°C	8 min
1 x	Finale Elongation	68°C	12 min

2.9.2 Sättigungsmutagenese

Für die Sättigungsmutagenese an Position Y54 in der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 wurde ein degeneriertes Primerpaar (Eurofins) eingesetzt, das in der Mitte (an der zu mutierenden Stelle) ein Triplet mit dem Basenmotiv „NNS“ (N: A/C/G/T; S: C/G) aufwies. Dieses randomisierte Codonmotiv sollte den Einbau aller 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren ermöglichen. Zur Erzeugung der Enzymvarianten wurde ebenfalls das „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ verwendet. Die Durchführung entsprach Kapitel 2.9.1, der Reaktionsansatz enthielt jedoch zusätzlich 6 % (v/v) DMSO, da ohne DMSO kein PCR-Produkt erhalten wurde. Das Temperaturprofil der PCR ist in Tabelle 2.9 dargestellt. Nach Abschluss der PCR wurden 30 U *DpnI* (New England Biolabs) zu den PCR-Ansätzen gegeben und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Die methylierte Template-DNA wurde dabei mit dem Restriktionsenzym verdaut, die neu synthetisierte DNA aus der Mutagenese-Reaktion jedoch nicht. Kompetente Zellen von *E. coli* XL1-Blue oder *E. coli* XL10-Gold wurden anschließend mit den mutagenisierten Plasmiden transformiert und positive Klone auf LB-Agarplatten mit 100 µg/mL Ampicillin selektiert. Die Plasmid-DNA von 20 ausgewählten Klonen/Kolonien der Bibliothek wurde anschließend isoliert und sequenziert.

Tabelle 2.9: Temperaturprofil der PCR bei der Sättigungsmutagenese

	Schritt	Temperatur	Zeit
1 x	Aktivierung der <i>PfuTurbo</i> DNA-Polymerase	96°C	1 min
14 x	Denaturierung	96°C	1 min
	Annealing	55°C	1 min
	Elongation	68°C	12 min
1 x	Finale Elongation	68°C	14 min

2.9.3 *In-vivo*-Mutagenese mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)

Für die chemische *in-vivo*-Mutagenese wurde *E. coli* BW3110(pIK9) in dYT-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin bei 37°C angezogen. Nach dem Überimpfen (1:200, v/v) in LB-Medium (pH 6,85) mit Ampicillin (100 µg/mL) wurde die Kultur bis zum Erreichen einer optischen Dichte (600 nm) von 0,4 bei 37°C und 140 rpm inkubiert, die Zellen anschließend in Portionen zu 10 bzw. 20 mL aliquotiert und mit MNNG (100 mg/mL in DMSO) in Endkonzentrationen von 20 - 1000 µg/mL versetzt und für 16 Stunden bei 37°C unter Schütteln weiter inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA isoliert und mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Als Kontrolle (Nullwert) wurden aus der LB-Kultur mit einer optischen Dichte von 0,4 zum Zeitpunkt der MNNG-Zugabe 10 bzw. 20 mL entnommen (entsprechend obigem Aliquotiervolumen) und ebenfalls die Plasmid-DNA isoliert.

2.9.4 Zufallsmutagenese mittels Error-prone PCR

Die fehlerbehaftete PCR (error-prone PCR) ist eine Technik mit deren Hilfe Aminosäuren in Proteinen ungerichtet ausgetauscht werden können, indem durch Verwendung fehleranfälliger DNA-Polymerasen oder durch Anwendung nicht idealer Reaktionsbedingungen während der PCR Mutationen im Zielgen erzeugt werden. Zur Einführung von ungerichteten Basensubstitutionen wurde das „GeneMorph II Random Mutagenesis Kit“ von Stratagene eingesetzt. Durch die im Kit enthaltene Polymerase Mutazym II (Gemisch aus 2 verschiedenen Polymerasen) werden die Nukleotide G, A, T und C in einem ausgewogenen Verhältnis gegeneinander ausgetauscht. Als Template für die PCR diente das Plasmid pIK9 aus *E. coli* JM109. Der PCR-Ansatz enthielt 150 ng Plasmid-DNA, 0,8 mM dNTP-Mix (Stratagene), je 125 ng Vorwärts- und Rückwärts-Primer (pJ-F bzw. pJ-R), 1-fach PCR-Puffer (Stratagene) sowie 2,5 U Mutazym II DNA-Polymerase (Stratagene) in einem Reaktionsvolumen von insgesamt 50 μ L, wobei das Volumen vor der PCR gleichmäßig auf 2 Ansätze verteilt wurde. Das Temperaturprofil der PCR ist in Tab. 2.10 angegeben. Nach der PCR wurde der Ansatz auf ein 1 %iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und das PCR-Produkt mittels „NucleoSpin[®] Extract II Kit“ (Macherey-Nagel) aus dem Gel extrahiert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde nacheinander mit den Restriktionsendonukleasen *Nde*I (Roche) und *Bam*HI (NEB) geschnitten und mit T4-DNA Ligase in den entsprechend restringierten Vektor pIK9 ligiert. Anschließend wurden Zellen von *E. coli* TFB 5 α mit dem gefällten und resuspendierten Ligationsansatz transformiert und positive Klone auf LB-Agarplatten mit 100 μ g/mL Ampicillin selektiert. Zur Ermittlung der Mutageneserate wurden 20 Klone zufällig gepickt, deren Plasmid-DNA isoliert und extern von einer Firma sequenziert. Bei der Ligation wurde eine Vektorkontrolle mitgeführt, wobei nach der Transformation keine Kolonien auf den LB-Agarplatten mit 100 μ g/mL Ampicillin vorhanden waren. Eine Verunreinigung mit religiertem Vektor konnte somit ausgeschlossen werden.

Tabelle 2.10: Temperaturprofil der PCR bei der Zufallsmutagenese

	Schritt	Temperatur	Zeit
1 x	Aktivierung der Mutazym II DNA-Polymerase	95°C	2 min
30 x	Denaturierung	95°C	30 s
	Annealing	55°C	30 s
	Elongation	72°C	1 min 20 s
1 x	Finale Elongation	72°C	10 min

2.10 Proteinchemische Methoden

2.10.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970). Die SDS-Gele bestanden aus einem Sammelgel [5 % (v/v) Acrylamid] sowie einem Trenngel [10 % (v/v) Acrylamid]. Für die Elektrophorese wurden 10 μ L einer Zellsuspension mit einer OD₆₀₀ von ca. 5 mit 2-fach Lade-puffer (10 μ L) versetzt, die Proben zum Aufbrechen der Zellstrukturen und zur Denaturierung der Proteine 10 min auf 100°C im Thermoblock erhitzt und das gesamte Volumen in die Geltaschen aufgetragen. Dies entsprach dem Auftragen von etwa 5 μ g Protein pro Spur. Die hitzedenaturierten

und durch Natriumdodecylsulfat (SDS) stark negativ geladenen Proteine wurden anschließend in 1-fach Laufpuffer bei einer Spannung von 145 V in einer vertikalen Gelapparatur getrennt. Als Größenstandard wurde der „Precision Plus Protein All Blue Standards“ (Biorad) verwendet. Die Proteinbanden wurden nach dem Lauf für 30 min mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt, der Hintergrund im Anschluss über Nacht in Entfärbelösung entfärbt und die Gele in demineralisiertem Wasser gelagert. Um die SDS-Gele haltbar zu machen, wurden sie luftblasenfrei auf Whatman-Papier aufgebracht und unter Vakuum für 1,5 Stunden bei 80°C getrocknet.

Trenngel (10 %):	3,75 mL	Tris/HCl-Puffer (1 M, pH 8,8)
	3,56 mL	Acrylamid-Lösung (Rotiphorese® Gel 30)
	3,4 mL	demin. Wasser
	0,2 mL	SDS (5 %, w/v)
	0,08 mL	APS (10 %, w/v)
	0,008 mL	TEMED

Sammelgel (5 %):	2,5 mL	Tris/HCl-Puffer (0,25 M, pH 6,8)
	1,55 mL	demin. Wasser
	0,85 mL	Acrylamid-Lösung (Rotiphorese® Gel 30)
	0,1 mL	SDS (5 %, w/v)
	0,06 mL	APS (10 %, w/v)
	0,006 mL	TEMED

Ladepuffer (2-fach):	4,8 mL	Tris/HCl-Puffer (0,5 M, pH 6,8)
	1 mL	Glycerin
	2 mL	SDS (10 %, w/v)
	0,5 mL	Bromphenolblau (0,5 %, w/v)
	0,5 mL	β-Mercaptoethanol

Laufpuffer (5-fach):	15 g	Tris
	72 g	Glycerin
	5 g	SDS
	ad 1 L	demin. Wasser

Färbelösung:	2 g	Coomassie Brilliant Blue R250
	100 mL	Essigsäure (99,7 %, v/v)
	425 mL	Ethanol
	50 mL	Methanol
	ad 1 L	demin. Wasser

Entfärbelösung:	200 mL	Methanol
	140 mL	Essigsäure (99,7 %, v/v)
	ad 2 L	demin. Wasser

2.11 „Bienzymatische Ganzzellkatalyse“ in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten

2.11.1 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten

Die Verteilungskoeffizienten (log D-Werte) zwischen ionischen Flüssigkeiten (ILs) oder organischen Lösemitteln und dem Umsatzpuffer wurden in Reaktionsansätzen (1000 μL) bestehend aus 80 % (v/v) Citratpuffer (100 mM, pH 5) - der die zu untersuchende Substanz in einer Konzentration von 10 mM enthielt - sowie 20 % (v/v) IL oder organischem Lösemittel bestimmt. Die Ansätze wurden in HPLC-Vials in einem Ölbad bei 30°C unter starkem Rühren (mittels Rührfisch) für eine Stunde inkubiert. Zur Trennung der Phasen wurden die Ansätze zunächst in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, 10 min bei RT und 13200 rpm zentrifugiert und die Substanzkonzentration in der Puffer-Phase mittels HPLC analysiert. Der Verteilungskoeffizient (log D) wurde anschließend mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\log D_{\text{IL oder org. Lösemittel/Puffer}} = \log \left[\frac{(c_{\text{S},0} - c_{\text{S}}) \cdot (\varphi^{-1} - 1)}{c_{\text{S}}} \right]$$

- mit: $c_{\text{S},0}$ vorgelegte Konzentration der Substanz in der Puffer-Phase (mmol/L)
 c_{S} in der Puffer-Phase gemessene Konzentration der Substanz nach Einstellung des Gleichgewichtes zwischen IL oder org. Lösemittel und Puffer (mmol/L)
 φ Phasenanteil der ionischen Flüssigkeit oder des org. Lösemittels

Die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von Mandelonitril war erschwert, da α -Hydroxynitrile bei neutralem pH-Wert instabil sind und Mandelonitril auch bei pH 5 spontan in Benzaldehyd zerfällt. Aus diesem Grund wurden die Versuchsansätze, die 10 mM Mandelonitril [gelöst in 100 mM Citratpuffer (pH 5)] sowie 20 % (v/v) IL (BMpl NTf₂ oder BMim PF₆) enthielten, lediglich für ein paar Sekunden stark geschüttelt. Nach der Trennung der Phasen (13200 rpm, 10 min, 4°C) wurde ein Aliquot der Puffer-Phase (10 μL) direkt mittels HPLC analysiert. Die Proben wurden vor der Injektion auf Eis gehalten.

Die Cyanidkonzentrationen in der Puffer-Phase wurden mit Hilfe eines Cyanid-Testkits (Spectroquant, Merck) bestimmt (Kapitel 2.7.5).

Bei den im Ergebnisteil dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen.

2.11.2 Extraktion von HCN in ionische Flüssigkeiten

Zur Extraktion von HCN in ionische Flüssigkeiten wurde eine von van Langen et al. (2003) beschriebene Methode modifiziert. Hierfür wurden in einem Abzug unter Verwendung eines HCN-Detektors 130 mg KCN mit 220 mg Citronensäure x H₂O in 0,36 mL demineralisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurde die Lösung in einem Eis-Wasserbad gekühlt und mit 0,4 mL ionischer

Flüssigkeit versetzt. Nach starkem Schütteln wurde die IL-Phase entnommen und die HCN-Konzentration in der ionischen Flüssigkeit mit Hilfe eines Cyanid-Testkits (Spectroquant, Merck) bestimmt (Kapitel 2.7.5).

2.11.3 Biotransformationen im 2-Phasensystem mit ionischen Flüssigkeiten

Für Biotransformations-Reaktionen im 2-Phasensystem mit ionischen Flüssigkeiten wurden bei -70°C eingefrorene Ruhezellen von *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) zunächst in Citratpuffer (100 mM, pH 5) resuspendiert und eine geeignete optische Dichte eingestellt ($\text{OD}_{600} = 67$). Anschließend wurden 800 μL der Zellsuspension in 2 mL-Glasgefäße mit Rührfisch vorgelegt und mit 200 μL ionischer Flüssigkeit, welche die Substrate (Benzaldehyd und HCN) enthielt, versetzt. Die fest verschlossenen Reaktionsansätze (Schraubverschluss mit Septum) wurden unter intensivem Rühren bei 30°C im Wasserbad inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben aus beiden Phasen entnommen (108 μL aus der Puffer-Phase sowie 27 μL aus der IL-Phase), wobei die Reaktion in der wässrigen Phase durch Zugabe von 12 μL 1 M HCl abgestoppt wurde. Anschließend wurden die Proben (Puffer- und IL-Phase separat) zentrifugiert (10 min, 4°C , 13500 rpm), die wässrigen Überstände 1:25 verdünnt und mittels HPLC analysiert. Da sich die ionischen Flüssigkeiten aufgrund ihrer höheren Dichte am Boden der Reaktionsgefäße sammelten, enthielten die aus der IL-Phase entnommenen Proben stets einen gewissen Anteil Puffer-Phase, welcher nach der Zentrifugation entfernt wurde. Aliquots aus der IL-Phase wurden danach in geeigneter Weise mit Methanol verdünnt (zwischen 1:40 und 1:20) und ebenfalls mittels HPLC analysiert.

Alle Reaktionen wurden unter dem Abzug durchgeführt und die HCN-Konzentration kontinuierlich mit Hilfe eines HCN-Detektors überwacht.

2.11.4 Berechnung der durchschnittlichen Substrat- und Produktkonzentrationen im 2-Phasensystem mit ionischen Flüssigkeiten

Wie im vorangehenden Kapitel beschrieben, wurde die Konzentration der einzelnen Verbindungen (Mandelsäure, Mandelamid, Benzaldehyd und Mandelonitril) separat in der IL- und Puffer-Phase mittels HPLC bestimmt. Die Ergebnisse dieser Quantifizierungen wurden kombiniert, indem die durchschnittliche Konzentration jeder Verbindung bezogen auf das gesamte Reaktionsvolumen berechnet wurde, wobei die IL- und Puffer-Phasen während der gesamten Reaktion in einem Verhältnis von 1:4 vorlagen. Betrug die Mandelsäurekonzentration zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Puffer-Phase z.B. 50 mM und in der IL-Phase 5 mM, wurde eine durchschnittliche Konzentration von 41 mM berechnet. Aufgrund der erschwerten Probennahme aus der IL-Phase (vgl. Kapitel 2.11.3), waren leichte Variationen im Phasenverhältnis nicht zu vermeiden.

3 Ergebnisse

3.1 Biotransformation aliphatischer Nitrile

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die in der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie vorhandenen Nitrilasen in der Lage sind, aliphatische α -Hydroxynitrile zu den korrespondierenden Säuren zu hydrolysieren. Als Modellsubstrat sollte 2-Hydroxy-3-butennitril eingesetzt werden, da diese Verbindung aufgrund der Doppelbindung im Vergleich zu gesättigten aliphatischen Nitrilen eine deutlich stärkere UV-Absorption aufweist und dementsprechend mit den zur Verfügung stehenden Analysemethoden (Kapitel 2.7) untersucht werden konnte. Im Anschluss sollte 2-Hydroxy-3-butensäure aus Acrolein und HCN durch eine bienzymatische Reaktionskaskade dargestellt werden (Abb. 3.1).

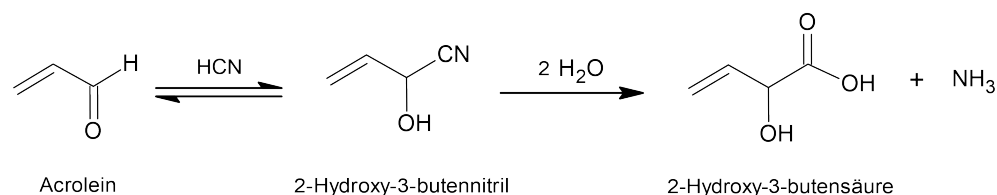


Abbildung 3.1: Bienzymatische Reaktionskaskade zur Darstellung von 2-Hydroxy-3-butensäure.

3.1.1 Stabilität des Modellsubstrates 2-Hydroxy-3-butennitril

Bei der Synthese enantiomerenreiner α -Hydroxycarbonsäuren aus Aldehyden und Cyanid mit Hilfe eines „bienzymatischen Ganzzellkatalysators“ wird der Enantiomerenüberschuss (ee) der Produkte von der chemischen Hydrocyanierung der Aldehyde sowie der chemischen Stabilität der Intermediate (α -Hydroxynitrile) beeinflusst. Während α -Hydroxynitrile bei neutralem pH-Wert bekanntermaßen schnell in die korrespondierenden Aldehyde und Blausäure zerfallen, können Cyanhydrine in wässrigen Medien durch niedrige pH-Werte stabilisiert und die unerwünschte Hintergrundreaktion (chemische Addition von Cyanid an Aldehyde) stark vermindert werden (Rustler et al., 2007; Holt und Hanefeld, 2009). Es wurde daher zunächst untersucht, bei welchem pH-Wert das Modellsubstrat 2-Hydroxy-3-butennitril in wässrigen Medien eine ausreichende Stabilität aufweist. Die Verbindung wurde hierzu zunächst bei einer Temperatur von 30°C in KH-Phthalatpuffern mit unterschiedlichen pH-Werten (pH 4, pH 5 oder pH 6) inkubiert. Der spontane chemische Zerfall des Modellsubstrates wurde ferner bei 4°C analysiert, um den Einfluss der Temperatur auf die Stabilität von 2-Hydroxy-3-butennitril zu charakterisieren. Die Untersuchungen ergaben, dass die enantiokonservative Biotransformation von 2-Hydroxy-3-butennitril pH-Werte ≤ 5 erfordert (Abb. 3.2(a)). Der spontane Zerfall dieser Verbindung in den korrespondierenden Aldehyd (Acrolein) kann auch durch niedrige Temperaturen (um 4°C) stark vermindert werden (Abb. 3.2(b)).

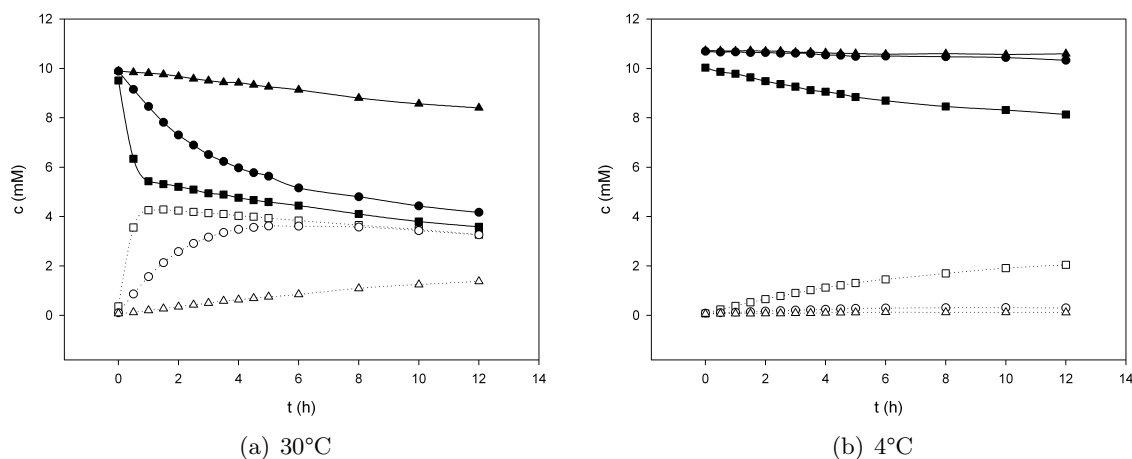


Abbildung 3.2: Spontaner chemischer Zerfall von 2-Hydroxy-3-butennitril bei 30°C (a) bzw. 4°C (b). Die Reaktionsansätze enthielten zum Reaktionsbeginn jeweils 10 mM 2-Hydroxy-3-butennitril (aus einer 200 mM Stammlösung in Methanol) in 50 mM KH-Phthalatpuffer verschiedener pH-Werte. In regelmäßigen Abständen wurden Proben (je 5 μ L) mittels eines automatischen Probengebers entnommen und der Zerfall von 2-Hydroxy-3-butennitril (pH 6: ■, pH 5: ●, pH 4: ▲) in Acrolein (pH 6: □, pH 5: ○, pH 4: △) mittels HPLC untersucht.

3.1.2 Säurestabilität verschiedener Nitrilasen in rekombinanten Ganzzellsystemen

Für die enzymatische Hydrolyse des Modellsubstrates 2-Hydroxy-3-butennitril unter sauren Bedingungen kamen zunächst vier verschiedene Nitrilasen in Frage, deren Gene im Rahmen vorangegangener Arbeiten in den gleichen Expressionsvektor (pJOE2775) kloniert worden waren. Hierbei handelte es sich um die Nitrilasen aus *Pseudomonas fluorescens* EBC191, *Alcaligenes faecalis* ATCC8750, *Synechocystis* sp. PCC6803 und *Rhodococcus rhodochrous* J1.

Mikroorganismen sind bestrebt einen annähernd neutralen cytoplasmatischen pH-Wert auch unter sauren Umweltbedingungen aufrechtzuerhalten (Baker-Austin und Dopson, 2007). Allerdings können Organismen, die bevorzugt bei neutralem pH wachsen (wie z.B. *E. coli*), im Allgemeinen nur einen internen pH-Wert von maximal zwei Einheiten über dem externen pH aufrechterhalten (Foster, 2004). Daher kann eine starke Ansäuerung des Reaktionsmediums auch zu einer Abnahme des cytoplasmatischen pH-Wertes führen (Richard und Foster, 2003).

Während die pH-Optima der aufgereinigten Nitrilasen bereits bekannt waren, lagen keine Untersuchungen zur Säuretoleranz der Nitrilasen aus *A. faecalis* ATCC8750, *Synechocystis* sp. PCC6803 und *R. rhodochrous* J1 in den entsprechenden rekombinanten *E. coli* Stämmen vor. Anhand von Ruhezellumsätzen bei zwei verschiedenen pH-Werten (pH 5 und 7) wurde die Säureresistenz der Nitrilasen in den rekombinanten Stämmen verglichen. Als Substrate wurden 2-Phenylpropanitril (2-PPN) bzw. Benzonitril eingesetzt, da diese Nitrile bei den untersuchten pH-Werten stabil sind. Mit Hilfe der Ruhezellumsätze konnte gezeigt werden, dass die Nitrilase aus *P. fluorescens* die größte Toleranz gegenüber einem pH-Wert von 5 aufweist (Tab. 3.1). Vor allem die Enzymaktivitäten der Nitrilasen aus *A. faecalis* und *R. rhodochrous* nahmen bei der Expression in *E. coli* unter sauren Bedingungen sehr stark ab (Tab. 3.1). Diese Nitrilasen waren demnach auch in Ganzzellsystemen nicht zur Biokatalyse bei pH-Werten ≤ 5 geeignet.

Tabelle 3.1: Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Nitrilasen aus *P. fluorescens* EBC191, *A. faecalis* ATCC8750, *R. rhodochrous* J1 und *Synechocystis* sp. PCC6803 in den rekombinanten *E. coli* JM109 Stämmen bei pH 5 und 7 mit den Substraten 2-PPN bzw. Benzonitril.

Herkunft der Nitrilase	Plasmid	Substrat	pH-Wert	spez. Aktivität ¹ (U/mg Protein)	rel. Aktivität ² (%)
<i>P. fluorescens</i> EBC191	pIK9	2-PPN	7	1,9	100
			5	0,55	29
<i>A. faecalis</i> ATCC8750	pIK7	2-PPN	7	0,4	100
			5	0,007	1,8
<i>R. rhodochrous</i> J1	pJOE5263.3	Benzonitril	7	14,1	100
			5	0,002	0,01
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	pDHE22	Benzonitril	7	0,1	100
			5	0,006	6

¹ Die Anzucht der rekombinanten *E. coli* Stämme und die Induktion der Nitrilasegene erfolgte wie in Kapitel 2.6.5 beschrieben. Die Nitrilase-Aktivitäten der Ruhezell-Suspensionen wurden anhand der Umsätze von 2-PPN bzw. Benzonitril entsprechend Kapitel 2.6.6 untersucht, wobei für Umsätze bei einem pH-Wert von 5 Na-Citratpuffer (100 mM) und für Umsätze bei einem pH-Wert von 7 Na/K-Phosphatpuffer (50 mM) verwendet wurde. Die Berechnung der spezifischen Aktivitäten erfolgte aus der Umsetzung von 2-PPN bzw. Benzonitril gemäß Kapitel 2.6.7.

² Die spezifische Aktivität bei pH 7 wurde als Bezugsgröße zur Berechnung der relativen Aktivität bei pH 5 herangezogen.

3.1.3 Umsatz von 2-Hydroxy-3-butennitril durch verschiedene Nitrilasen

Die vorhergehenden Untersuchungen hatten gezeigt, dass insbesondere die Nitrilasen aus *A. faecalis* und *R. rhodochrous* auch in den rekombinanten Stämmen nur eine geringe Toleranz gegenüber sauren pH-Werten aufwiesen. Ferner ergaben die Stabilitätsuntersuchungen, dass der chemische Zerfall von 2-Hydroxy-3-butennitril bei niedriger Inkubationstemperatur deutlich geringer ist als bei höheren Temperaturen. Dementsprechend wurden Ruhezellumsätze mit dem Modells substrat 2-Hydroxy-3-butennitril zunächst bei pH 6 und einer Inkubationstemperatur von 6°C durchgeführt, um die Enzymaktivitäten der Nitrilasen aus *P. fluorescens* EBC191, *A. faecalis* ATCC8750, *Synechocystis* sp. PCC6803 und *R. rhodochrous* J1 zu vergleichen. Bei jedem Umsatz wurden 10 mM 2-Hydroxy-3-butennitril in 50 mM KH-Phthalatpuffer (pH 6) ohne Zellen sowie Ruhezellen mit der gleichen optischen Dichte wie im Reaktionsansatz, jedoch ohne Zugabe von 2-Hydroxy-3-butennitril, als Kontrollen mitgeführt. Alle Nitrilasen waren in der Lage, 2-Hydroxy-3-butennitril zur entsprechenden Carbonsäure zu hydrolysieren (Abb. 3.3), die Nitrilase aus *Synechocystis* zeigte jedoch nur eine sehr geringe spez. Aktivität von 0,05 U/mg Protein (Tab. 3.2). Am schnellsten wurde das Modells substrat von der Nitrilase aus *P. fluorescens* umgesetzt (0,65 U/mg Protein). Bei einem pH-Wert von 5 und einer Inkubationstemperatur von 30°C nahm die relative Aktivität dieser Nitrilase gegenüber dem Umsatz bei pH 6 auf 72 % ab. Eine geringere Inkubationstemperatur (6°C) bei gleichzeitig niedrigem pH-Wert (pH 5) verlangsamte die Bildung von 2-Hydroxy-3-butensäure durch diese Nitrilase noch stärker (Tab. 3.2).

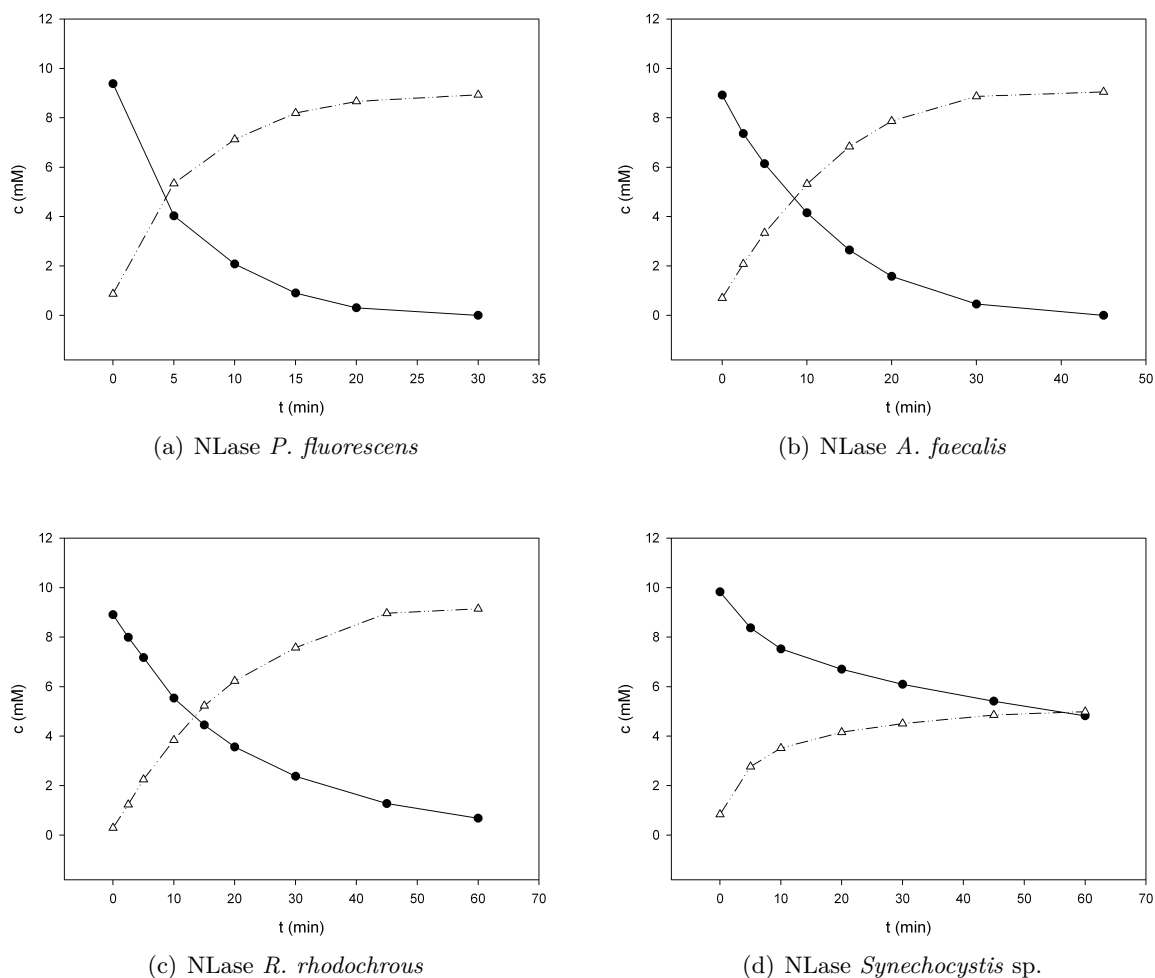


Abbildung 3.3: Umsatz von 2-Hydroxy-3-butennitril durch (a) *E. coli* JM109(pIK9), (b) *E. coli* JM109(pIK7), (c) *E. coli* JM109(pJOE5263.3) und (d) *E. coli* JM109(pDHE22). Die rekombinanten *E. coli*-Stämme wurden in dYT-Medium mit Ampicillin (100 µg/mL) und 0,2 % (w/v) L-Rhamnose bei 30°C kultiviert. Nach dem Ernten und Waschen der Zellen in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5) wurden die Ruhezellen aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren. Für die Umsätze wurden die jeweiligen Ruhezellen (*E. coli* JM109(pIK9): OD₆₀₀ = 33, *E. coli* JM109(pIK7): OD₆₀₀ = 45, *E. coli* JM109(pJOE5263.3): OD₆₀₀ = 50, *E. coli* JM109(pDHE22): OD₆₀₀ = 70) in KH-Phthalatpuffer (50 mM, pH 6) resuspendiert und mit 10 mM 2-Hydroxy-3-butennitril (aus einer 200 mM Stammlösung in Methanol) im Thermoschüttler bei 6°C und 1300 rpm inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und die Reaktionen mit 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Konzentrationen an 2-Hydroxy-3-butennitril (●) und 2-Hydroxy-3-butensäure (Δ) in den Überständen mittels HPLC bestimmt.

Die Entstehung von 2-Hydroxy-3-butensäure wurde in keiner der mitgeführten Kontrollen beobachtet. Zudem wurde die Bildung von 2-Hydroxy-3-butensäure in den Reaktionsansätzen durch Aufstockung mit der entsprechenden Standardlösung überprüft. Eine Peakaufspaltung konnte hierbei nicht festgestellt werden. Im Vergleich zu Mandelonitril stellt das aliphatische Modellsubstrat für die Nitrilase aus *P. fluorescens* ein schlechtes Substrat dar, da das Enzym mit 2-Hydroxy-3-butennitril unter identischen Reaktionsbedingungen (pH 5, 30°C) lediglich rund 3 % der Aktivität mit Mandelonitril erreichte (nicht dargestellt).

Tabelle 3.2: Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Nitrilasen aus *P. fluorescens* EBC191, *A. faecalis* ATCC8750, *R. rhodochrous* J1 und *Synechocystis* sp. PCC6803 in rekombinanten *E. coli* JM109 Stämmen beim Umsatz von 2-Hydroxy-3-butennitril.

Herkunft der Nitrilase	Plasmid	pH-Wert	Temp (°C)	spez. Aktivität (U/mg Protein)	rel. Aktivität ¹ (%)
<i>P. fluorescens</i> EBC191	pIK9	6	6	0,65	100
		5	30	0,47	72
		5	6	0,02	3
<i>A. faecalis</i> ATCC8750	pIK7	6	6	0,21	32
<i>R. rhodochrous</i> J1	pJOE5263.3	6	6	0,11	17
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	pDHE22	6	6	0,05	8

¹ Die Aktivität von *E. coli* JM109(pIK9) bei pH 6 und 6°C wurde als Bezugsgröße zur Berechnung der relativen Aktivität herangezogen.

3.1.4 Hydrolyse verschiedener aliphatischer Nitrile durch *E. coli* JM109(pIK9)

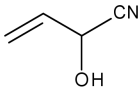
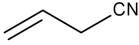
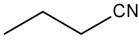
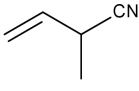
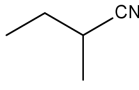
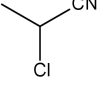
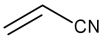
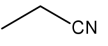
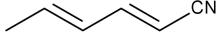
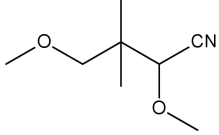
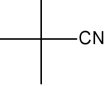
Bisher lagen nur wenige Untersuchungen zum Umsatz aliphatischer Nitrile durch die Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* vor. Um den Einfluss der Substratstruktur aliphatischer Nitrile auf die Umsatzrate von *E. coli* JM109(pIK9) zu charakterisieren, wurde zunächst eine geeignete Menge der Ruhezellen in 50 mM KH-Phthalatpuffer resuspendiert. Alle Umsätze wurden bei einem pH-Wert von 5 durchgeführt, um die Vergleichbarkeit mit den zuvor bestimmten Umsatzraten für 2-Hydroxy-3-butennitril sicherzustellen. Gestartet wurden die Ruhezellumsätze durch Zugabe von 10 mM Nitril. Es wurden zunächst Verbindungen eingesetzt, die strukturelle Ähnlichkeiten zu 2-Hydroxy-3-butennitril aufwiesen (3-Butennitril, 2-Methyl-3-butennitril, Butannitril, 2-Methylbutannitril). Zur Bestätigung der daraus abgeleiteten Zusammenhänge zwischen Substratstruktur und Nitrilase-Aktivität wurden die aliphatischen Substrate Propannitril, Acrylnitril, 2-Chlorpropannitril und 2,4-Hexadiennitril untersucht. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte im Thermoschüttler bei 30°C und 1300 rpm. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und die Reaktionen durch sofortiges Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) beendet. Da gesättigte aliphatische Nitrile und Säuren lediglich eine sehr schwache UV-Absorption aufweisen und vielfach keine Säurestandards zur Verfügung standen, wurden zur Ermittlung der Nitrilase-Aktivitäten die Ammoniumkonzentrationen in den Überständen mit Hilfe eines colorimetrischen Tests (Aquaquant 1.14428.001, Fa. Merck) bestimmt. Dieser Test beruht auf der sog. Berthelot-Reaktion. Hierbei werden (die bei der Hydrolyse der Nitrile freiwerdenden) Ammoniumionen durch Zugabe einer alkalischen Tartratlösung zunächst in Ammoniak überführt, welcher anschließend mit Natriumhypochlorit (NaClO) quantitativ zu Monochloramin (NH₂Cl) umgesetzt wird. Durch Zugabe des Katalysators Nitroprussid entsteht aus Monochloramin und einem Molekül Thymol zunächst N-Chlor-2-isopropyl-5-methylchinon-monoimin, das mit einem weiteren Thymolmolekül zu Indophenol reagiert, das im alkalischen Medium in seiner blauen Form vorliegt (Heinemann, 2003). Aufgrund der gelben Eigenfärbung des Reagenzienblindwerts (hervorgerufen durch den Katalysator) erscheint die Messlösung grün.

Bei der Verwendung hoher Zelldichten wurde vielfach auch ohne Nitrilzugabe eine schwache Grünfärbung des Testansatzes beobachtet. Daher wurden stets Ruhezellen mit der gleichen optischen Dichte wie im Reaktionsansatz, jedoch ohne Zugabe von Substrat, als Kontrolle mitgeführt. Zur Be-

stimmung der Aktivität wurde die Ammoniumfreisetzung im Reaktionsansatz deshalb um die Ammoniumfreisetzung der Zellen ohne jeweilige Nitrilzugabe korrigiert. Als weitere Kontrolle dienten 10 mM des jeweiligen Substrates in KH-Phthalatpuffer (50 mM, pH 5) in Abwesenheit von Zellen. Die Versuche zeigten, dass Nitrile mit einer Doppelbindung besser umgesetzt wurden als die gesättigten Strukturanaloga (Tab. 3.3: vgl. 3-Butennitril mit Butannitril sowie 2-Methyl-3-butennitril mit 2-Methylbutannitril oder Acrylnitril mit Propannitril). Durch elektronenschiebende Gruppen (z.B. Methyl-Substituenten) am zur Nitril-Funktion α -ständigen C-Atom wurde die Aktivität der Nitrilase im Vergleich zum unsubstituierten Nitril nur geringfügig herabgesetzt (vgl. 3-Butennitril mit 2-Methyl-3-butennitril und Butannitril mit 2-Methylbutannitril). Elektronenziehende Gruppen erhöhten hingegen die Enzymaktivität zum Teil stark (vgl. 2-Hydroxy-3-butennitril mit 3-Butennitril bzw. 2-Chlorpropannitril mit Propannitril). Da es sich bei der Nitrilase aus *P. fluorescens* um eine Arylacetonitrilase handelt, werden Verbindungen mit einer aromatischen Struktur, wie beispielsweise Mandelonitril und 2-PPN, erfahrungsgemäß sehr gut umgesetzt. Mit 2,4-Hexadiennitril (zwei konjugierte Doppelbindungen) wurde vermutlich aufgrund der *trans, trans*-Konfiguration der Verbindung keine höhere Aktivität im Vergleich zu Substraten mit lediglich einer Doppelbindung erzielt. Auch die Lage der Doppelbindung spielt vermutlich eine Rolle, da Substrate mit einer Doppelbindung an Position 3 (3-Butennitril, 2-Methyl-3-butennitril und 2-Hydroxy-3-butennitril) etwas besser umgesetzt wurden als Acrylnitril oder 2,4-Hexadiennitril, die eine Doppelbindung am α -Kohlenstoffatom aufweisen. Vor allem bei 2,4-Hexadiennitril kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass zudem auch sterische Effekte eine Rolle gespielt haben. Letzteres trifft vermutlich auch auf die Substrate 2,4-Dimethoxy-3,3-dimethylbutannitril und Pivalonitril zu, die von der Nitrilase nicht hydrolysiert wurden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Nitrilase aus *P. fluorescens* in der Lage ist, aliphatische Verbindungen umzusetzen, im Vergleich zu den bevorzugten Substraten 2-Phenylpentannitril, Phenylacetonitril, Mandelonitril und 2-PPN jedoch mit deutlich geringeren Enzymaktivitäten.

Tabelle 3.3: Umsatz verschiedener aliphatischer Nitrile durch die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191.

Substrat	Struktur	rel. Aktivität ¹ (%)
2-Hydroxy-3-butennitril		100
3-Butennitril		53 ± 3
Butannitril		10 ± 1,5
2-Methyl-3-butennitril		32 ± 5,9
2-Methylbutannitril		2,9 ± 0,1
2-Chlorpropannitril		131 ± 7
Acrylnitril		20 ± 7,5
Propannitril		4,3 ± 1,5
2,4-Hexadiennitril		13 ± 1,9
2,4-Dimethoxy-3,3-dimethylbutannitril		0
Pivalonitril		0

E. coli JM109(pIK9) wurde in dYT-Medium mit Ampicillin (100 µg/mL) und 0,2 % (w/v) L-Rhamnose bei 30°C kultiviert. Nach dem Ernten und Waschen der Zellen in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) wurden die Ruhezellen aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren. Für die Umsätze wurden die Ruhezellen in KH-Phthalatpuffer (50 mM, pH 5) resuspendiert, eine geeignete optische Dichte eingestellt und mit 10 mM Nitril (aus 200 mM Stammlösungen in Methanol) im Thermoschüttler bei 30°C und 1100 rpm inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und die Reaktionen durch sofortiges Entfernen der Zellen durch Zentrifugation abgestoppt (13500 rpm, 4°C, 10 min). Die Ammoniumkonzentrationen in den Überständen wurden anschließend mittels Aquaquant Test entsprechend Kapitel 2.7.4 bestimmt. Die Berechnung der spez. Aktivitäten erfolgte im linearen Bereich der Umsatzkurven.

¹ bezogen auf die Aktivität mit 2-Hydroxy-3-butennitril (= 0,47 U/mg Protein; Wert ermittelt durch HPLC-Analyse, da α-Hydroxynitrile den Ammoniumtest stören (Heinemann, 2003))

3.2 Bienzymatische Synthese von 2-Hydroxy-3-butensäure aus Acrolein und KCN

Die enzymatische Darstellung von α -Hydroxycarbonsäuren aus einfachen Ausgangssubstanzen (Aldehyde und Cyanid) kann durch Kombination einer Oxynitrilase und einer Nitrilase erreicht werden (Kapitel 1.3.1). Da *E. coli* JM109(pIK9) 2-Hydroxy-3-butennitril von allen untersuchten rekombinanten *E. coli* Stämmen mit der höchsten spez. Aktivität hydrolysierte und darüber hinaus auch die größte Toleranz gegenüber einem pH-Wert von 5 aufwies, wurde für die bienzymatische Synthese von 2-Hydroxy-3-butensäure aus Acrolein (2-Propenal) und KCN der Stamm *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) eingesetzt. Bei diesem rekombinanten Stamm stehen das Oxynitrilasegen aus *Manihot esculenta* und das Nitrilasegen aus *P. fluorescens* EBC191 unter der Kontrolle desselben Rhamnose-induzierbaren Promotors, was eine simultane Expression der Enzyme durch Zugabe von Rhamnose zum Kulturmedium erlaubt (Sosedov et al., 2009).

E. coli JM109(pIK9)(pJOE5361.1) wurde in dYT-Medium angezogen und die Oxynitrilase- und Nitrilase-Aktivitäten mit Rhamnose induziert (Kapitel 2.6.5). Nach ca. 17 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und in Na/K-Phosphat-Puffer gewaschen. Ein Teil der Ruhezellen wurde direkt für die Biotransformation eingesetzt, der andere Teil bei -70°C eingefroren, um zu ermitteln, ob die Enzymaktivität nach dem Einfrieren der Zellen abnimmt. Die Ruhezellumsätze wurden entsprechend Kapitel 2.6.6 durchgeführt. Acrolein wurde vom „bienzymatischen Ganzzellkatalysator“ bei einem pH-Wert von 5 innerhalb von 140 min Inkubation annähernd vollständig zu 2-Hydroxy-3-butensäure umgesetzt (Abbildung 3.4(a)). Da die Enzymaktivität bei Verwendung der eingefrorenen Ruhezellen nicht abnahm, sind die Mittelwerte aus beiden Umsätzen dargestellt.

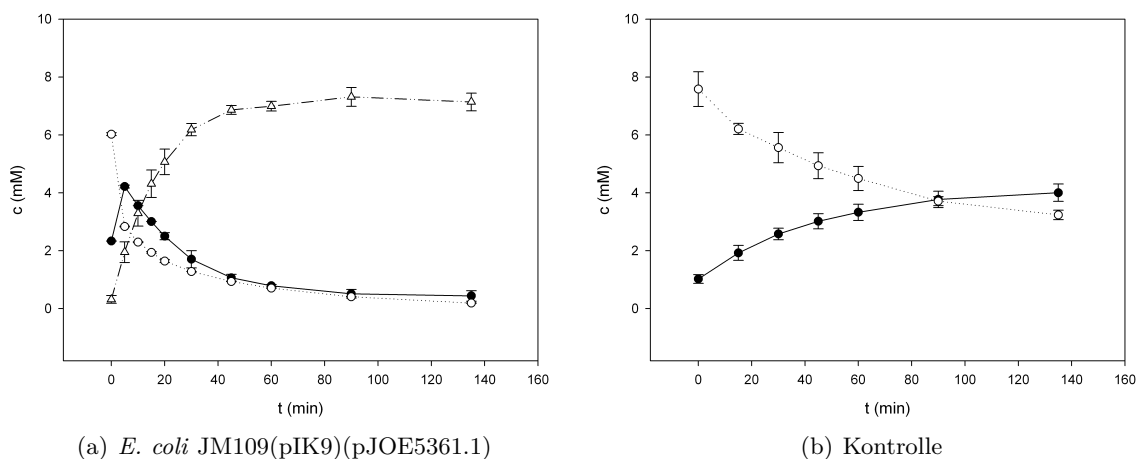


Abbildung 3.4: Umsatz von Acrolein in Anwesenheit von Ruhezellen von *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) (a) bzw. in Abwesenheit von Ruhezellen (b). Die Reaktionsansätze (1000 μL) enthielten 100 mM KH-Phthalatpuffer (pH 5), 10 mM Acrolein (aus einer 400 mM Stammlösung in Methanol) und 10 mM KCN (aus einer 2 M Stammlösung in Wasser). Bei (a) wurden Ruhezellen mit einer optischen Dichte (600 nm) von 44 eingesetzt. Die Ansätze wurden im Thermoschüttler bei 30°C und 1300 rpm inkubiert, in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die Reaktion mit 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C , 10 min) wurden die Konzentrationen an Acrolein (○), 2-Hydroxy-3-butennitril (●) und 2-Hydroxy-3-butensäure (Δ) in den Überständen mittels HPLC bestimmt.

In den Reaktionsansätzen kam es zu einer zeitweiligen Akkumulation des Intermediates (2-Hydroxy-3-butenitril). Die Nitrilase-Reaktion war folglich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der bienzymatischen Kaskade. Das zeigte, dass die Nitrilase aus *P. fluorescens* nicht in der Lage war, mit der enzymatischen Cyanhydrin Synthese durch die Oxynitrilase aus *M. esculenta* Schritt zu halten. Zur Anhäufung des Intermediates trug aber auch die unerwünschte Hintergrundreaktion (spontane chemische Addition von Cyanid an Acrolein) bei, die bei einem pH-Wert von 5 nicht vollständig unterdrückt werden konnte (Abb. 3.4(b)). Nach Inkubation von *E. coli* JM109(pIK9) mit Acrolein und KCN konnte dementsprechend unter identischen Reaktionsbedingungen auch in Abwesenheit der Oxynitrilase aus *M. esculenta* 2-Hydroxy-3-butensäure detektiert werden; jedoch in deutlich geringerer Menge (Abb. 3.5).

Beim Umsatz höherer Substratkonzentrationen (20 mM Acrolein) bei einem pH-Wert von 4,5 wurden neben 2-Hydroxy-3-butensäure auch geringe Mengen 2-Hydroxy-3-butenamid gebildet (0,4 %) (nicht dargestellt).

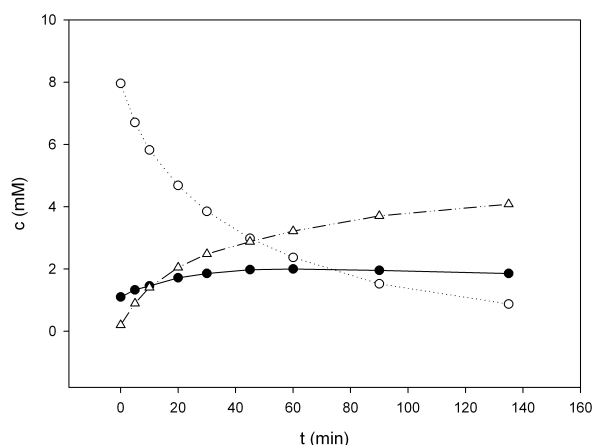


Abbildung 3.5: Umsatz von Acrolein und Cyanid durch *E. coli* JM109(pIK9). Der Reaktionsansatz (800 μ L) enthielt KH-Phthalatpuffer (100 mM, pH 5), 10 mM Acrolein (aus einer 400 mM Stammlösung in Methanol), 10 mM KCN (aus einer 2 M Stammlösung in Wasser) sowie Ruhezellen mit einer optischen Dichte von 44. Der Ansatz wurde bei 30°C und 1300 rpm im Thermoschüttler inkubiert, in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die Reaktion mit 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Konzentrationen an Acrolein (O), 2-Hydroxy-3-butenitril (●) und 2-Hydroxy-3-butensäure (Δ) in den Überständen mittels HPLC bestimmt.

Aufgrund der chemischen Hydrocyanierung in Kombination mit der langsamen Hydrolyse des Intermediates, wäre bei der Biotransformation von Acrolein ein pH-Wert < 5 vorteilhaft. Durch die Senkung des pH-Wertes auf 4 konnte die unerwünschte Hintergrundreaktion im Vergleich zu einem pH-Wert von 5 deutlich reduziert werden (vgl. Abb. 3.4(b) mit Abb. 3.6). In vorangegangenen Arbeiten wurde das Nitrilasegen aus *P. fluorescens* EBC191 sowie das Oxynitrilasegen aus *M. esculenta* in das Genom der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* integriert und die Gene unter der Kontrolle zweier separater AOX1 Promotoren exprimiert (Rustler et al., 2008b). Ruhezellen von *Pichia pastoris* pJOE5557.2 waren in der Lage, Benzaldehyd und KCN bei einem pH-Wert von 3,8 zu Mandelsäure und Mandelamid umzusetzen (Rustler et al., 2008b). Dementsprechend wurde die Biotransformation von Acrolein und Cyanid bei einem pH-Wert von 4 durch *Pichia pastoris* pJOE5557.2 untersucht. Es bildete sich in diesem Fall ein unbekanntes Reaktionsprodukt

mit einer Retentionszeit von 7,8 min (nicht dargestellt). Dass es sich hierbei nicht um 2-Hydroxy-3-butensäure handelte, wurde durch einen Vergleich der Retentionszeit mit einem authentischen Standard sowie durch eine Standard-Addition verifiziert.

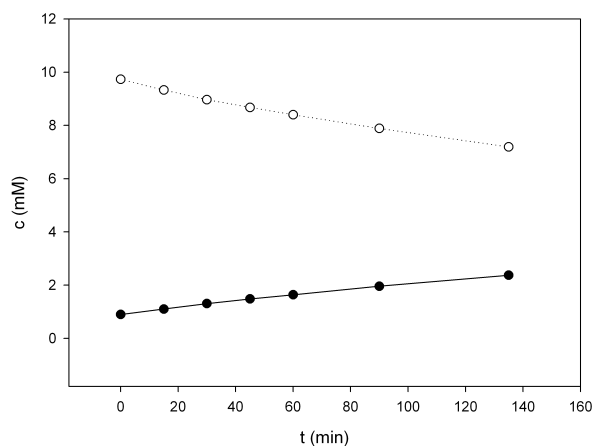


Abbildung 3.6: Spontane chemische Bildung von 2-Hydroxy-3-butenitril (●) aus Acrolein (○) bei einem pH-Wert von 4. 10 mM Acrolein (aus einer 400 mM Stammlösung in Methanol) wurden mit 10 mM KCN (aus einer 2 M Stammlösung in Wasser) in KH-Phthalatpuffer (100 mM, pH 4) bei 30°C inkubiert und in regelmäßigen Abständen Proben entnommen. Die Reaktion wurde mit 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt und die Proben mittels HPLC untersucht.

Während die bienzymatische Synthese von 2-Hydroxy-3-butensäure mit Hilfe des rekombinanten *E. coli* Ganzzellkatalysators gelang, eignete sich der korrespondierende rekombinante *P. pastoris* Ganzzellkatalysator hingegen nicht für die angestrebte Biotransformation.

3.3 Biotransformation sterisch anspruchsvoller Nitrile

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bestand in der Synthese von α -Hydroxycarbonsäuren aus Ketonen und Cyanid durch Ganzzellkatalysatoren. Bei der bienzymatischen Synthese entsteht dabei als Intermediat ein sterisch anspruchsvolles Cyanhydrin, das am α -ständigen C-Atom neben der Hydroxy-Gruppe zwei Kohlenstoff-Substituenten aufweist. Die einfachste chemische Verbindung, welche durch Addition von Cyanid aus einem aromatischen Keton gebildet werden kann, ist 2-Hydroxy-2-phenylpropannitril (Acetophenoncyanhydrin). Die zugehörige bienzymatische Reaktionskaskade zur Darstellung von Atrolactat aus Acetophenon ist in Abb. 3.7 dargestellt.

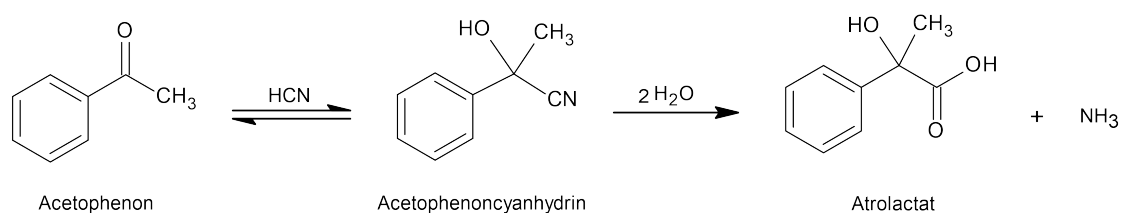


Abbildung 3.7: Bienzymatische Reaktionskaskade zur Darstellung von Atrolactat.

Da Acetophenoncyanhydrin sowie das korrespondierende α -Hydroxycarboxamid kommerziell nicht erhältlich waren, wurden die Verbindungen mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe von

Prof. D. Geffken an der Universität Hamburg synthetisiert. Die erzielten Ausbeuten sowie die entsprechenden NMR-, IR- und MS-Daten können dem Material und Methoden-Teil entnommen werden (Kapitel 2.4.3 und 2.4.4).

3.3.1 Stabilität des Modellsubstrates Acetophenoncyanhydrin

Es wurde zunächst die Stabilität von Acetophenoncyanhydrin in wässrigen Medien, aus den bereits in Kapitel 3.1.1 erwähnten Gründen, untersucht. Das Nitril (10 mM) wurde hierfür in Na-Citratpuffern (100 mM) mit unterschiedlichen pH-Werten (pH 5, pH 4,5 und pH 4) im Thermoschüttler bei 30°C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben aus den Reaktionsansätzen entnommen und Aliquots direkt mittels HPLC analysiert. Zudem wurde die Stabilität von Acetophenoncyanhydrin bei einem pH-Wert von 6 und einer Inkubationstemperatur von 6°C untersucht. Niedrigere pH-Werte wurden bei dieser Temperatur nicht analysiert, da in den vorangegangenen Versuchen die Enzymaktivität der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 bei der Kombination ungünstiger Reaktionsbedingungen (pH 5, 6°C) sehr stark abgenommen hatte (Kapitel 3.1.3). In allen Reaktionsansätzen wurde ein merklicher Zerfall des Modellsubstrates in Acetophenon und HCN festgestellt (Abb. 3.8). Bei einem pH-Wert von 5 lag nach etwa 30 min Inkubation nur noch die Hälfte der ursprünglichen Substratkonzentration vor. Acetophenoncyanhydrin war damit deutlich instabiler als beispielsweise 2-Hydroxy-3-butenitril, dessen Halbwertszeit unter gleichen Bedingungen (pH 5, 30°C) ca. sechs Stunden betrug. Für die enantiokonservative Biotransformation von (enantiomerenreinem) Acetophenoncyanhydrin wären daher wahrscheinlich pH-Werte ≤ 4 von Vorteil. Die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 weist unter derart sauren Bedingungen jedoch nur geringe Enzymaktivitäten auf (Rustler et al., 2008b). Für Biotransformationsreaktionen mit dem sterisch anspruchsvollen Modellsubstrat sollte bei einer Inkubationstemperatur von 30°C folglich als Kompromiss ein pH-Wert von 4,5 verwendet werden. Alternativ können Ruhezellumsätze mit Nitrilasen, die in Ganzzellsystemen nicht zur Biokatalyse unter stark sauren Bedingungen geeignet sind (vgl. Kap. 3.1.2) bei einer Inkubationstemperatur von 6°C und einem pH-Wert von 6 durchgeführt werden, da der spontane Zerfall von Acetophenoncyanhydrin unter diesen Bedingungen in etwa gleich schnell verlief wie bei pH 4,5 und 30°C (Abb. 3.8).

3.3.2 Umsatz von Acetophenoncyanhydrin durch verschiedene Nitrilasen

Die rekombinanten *E. coli* Stämme, welche die Nitrilasen aus *A. faecalis* ATCC8750, *Synechocystis* sp. PCC6803 und *R. rhodochrous* J1 bildeten, wurden bei 6°C und pH 6 mit Acetophenoncyanhydrin inkubiert. Hierbei zeigte sich, dass keine der Nitrilasen in der Lage war Acetophenoncyanhydrin zur korrespondierenden α -Hydroxycarbonsäure (Atrolactat) zu hydrolysieren (nicht dargestellt). Das Modellsubstrat wurde jedoch von *E. coli* JM109(pIK9) bei einem pH-Wert von 4,5 und einer Inkubationstemperatur von 30°C umgesetzt (Abb. 3.9(a)). Bei der enzymatischen Hydrolyse entstand neben Atrolactat auch das korrespondierende Amid (Atrolactamid) mit einem rel. Anteil von 22 % (Abb. 3.9(a)). Die chirale Analyse der Überstände ergab, dass die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 aus racemischem Acetophenoncyanhydrin vorzugsweise (*R*)-Atrolactat bildete (Abb. 3.9(b)). Der zugehörige Enantiomerenüberschuss bei etwa 30 % Substratumsatz lag bei ee = 51 %. Der ee-Wert für Atrolactamid konnte nicht bestimmt werden, da das Signal

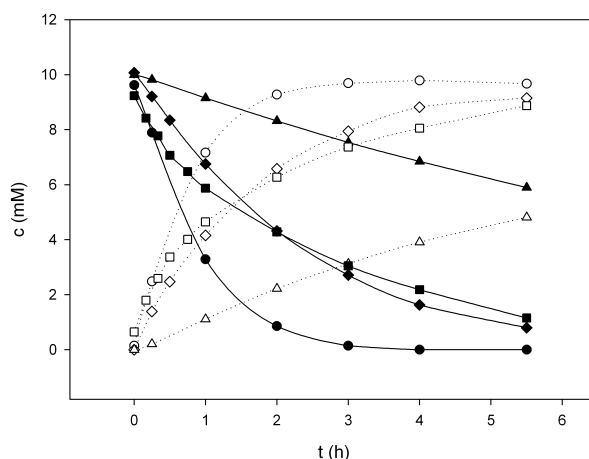


Abbildung 3.8: Spontaner Zerfall von Acetophenoncyanhydrin bei verschiedenen pH-Werten. Das Nitril wurde in 100 mM Na-Citratpuffer bei 30°C (pH 4, 4,5 bzw. 5) oder 6°C (pH 6) im Theroschüttler bei 1300 rpm inkubiert. Aus den Reaktionsansätzen (1000 μ L), die zum Reaktionsbeginn jeweils 10 mM Acetophenoncyanhydrin (aus einer 200 mM Stammlösung in Methanol) enthielten, wurden nach unterschiedlichen Zeitintervallen Proben entnommen und der Zerfall von Acetophenoncyanhydrin (pH 6: ■, pH 5: ●, pH 4,5: ◆, pH 4: ▲) in Acetophenon (pH 6: □, pH 5: ○, pH 4,5: ◇, pH 4: △) mittels HPLC analysiert.

von (*R*)-Atrolactamid mit Citrat aus dem Umsatzpuffer sowie mit undefinierten Verbindungen, die von den Ruhezellen exkretiert wurden, coeluierte. Anhand der gebildeten Menge an (*R,S*)-Atrolactamid (achirale Analyse) im Vergleich zu (*S*)-Atrolactamid (chirale Analyse) kann jedoch gesagt werden, dass aus racemischem Acetophenoncyanhydrin durch die *Pseudomonas*-Nitrilase primär (*S*)-Atrolactamid mit einem ee-Wert von ca. 90 % gebildet wurde.

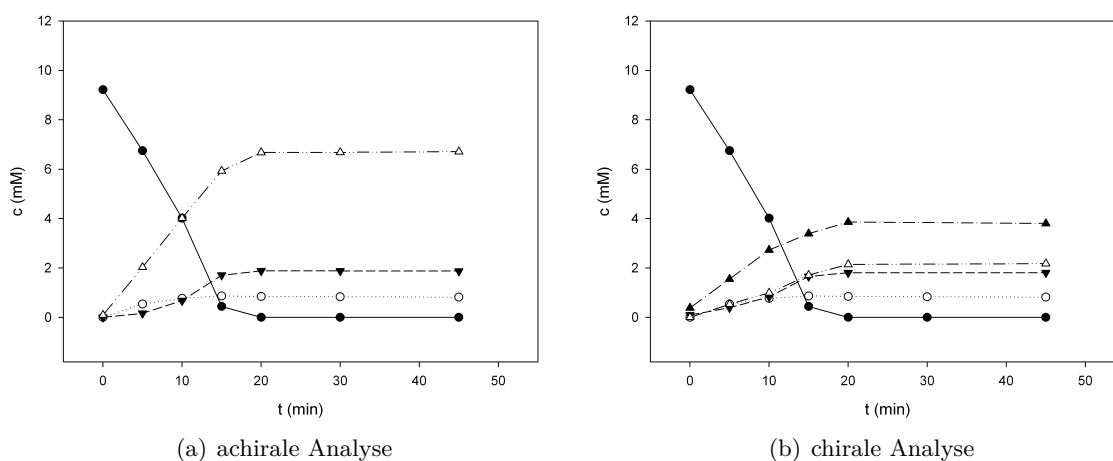


Abbildung 3.9: Umsatz von Acetophenoncyanhydrin durch *E. coli* JM109(pIK9). Ruhezellen ($OD_{600} = 42$) wurden in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 4,5) mit 10 mM Acetophenoncyanhydrin (aus einer 200 mM Stammlösung in Methanol) bei 30°C und 1250 rpm inkubiert. Aus dem Reaktionsansatz (1000 μ L) wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die Reaktion mit 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurde bei (a) der Gehalt an Atrolactat (Δ), Atrolactamid (\blacktriangledown), Acetophenon (\circ) und Acetophenoncyanhydrin (\bullet) in den Überständen mittels reversed-phase Chromatographie bestimmt. Anschließend wurden die Konzentrationen an (*S*)-Atrolactat (Δ), (*R*)-Atrolactat (\blacktriangle), (*S*)-Atrolactamid (\blacktriangledown), Acetophenon (\circ) und Acetophenoncyanhydrin (\bullet) in den Überständen mittels chiraler HPLC analysiert (b).

Neben den bereits angesprochenen Enzymen wurden auch die Nitrilasen aus den filamentösen Pilzen *Neurospora crassa* OR74A und *Aspergillus niger* CBS 513.88, hinsichtlich der Biotransformation von Acetophenoncyanhydrin analysiert. Die Nitrilasegene wurden ursprünglich von einer kooperierenden, tschechischen Arbeitsgruppe mit Hilfe des Genome Mining identifiziert, synthetisiert, in *E. coli* exprimiert und bestätigt, dass es sich um Nitrilasegene handelte (Kaplan et al., 2011a). Für die hier beschriebenen Untersuchungen wurden die beiden synthetischen Nitrilasegene in die relevanten *Nde*I und *Bam*HI Schnittstellen des Expressionsvektors pJOE2775 kloniert und lagen damit im gleichen Expressionsvektor wie das Nitrilasegen aus *P. fluorescens* EBC191 vor. Die resultierenden rekombinanten *E. coli* Stämme waren in der Lage, Arylacetoneitrile wie Mandelonitril und 2-PPN umzusetzen und zeichneten sich darüber hinaus durch eine hohe Toleranz gegenüber einem pH-Wert von 4,5 aus. So wurden bei pH 5 bzw. pH 4,5 noch jeweils 60 bzw. 40 % der maximalen spez. Aktivität (bei pH 7) erreicht (Petříčková et al., 2012).

Die Nitrilasen aus *N. crassa* und *A. niger* hydrolysierten Acetophenoncyanhydrin tatsächlich zur korrespondierenden Säure. Aufgrund der geringen Enzymaktivität konnten die beiden pilzlichen Nitrilasen jedoch nicht mit dem chemischen Zerfall des Cyanhydrins in Acetophenon konkurrieren (Abb. 3.10).

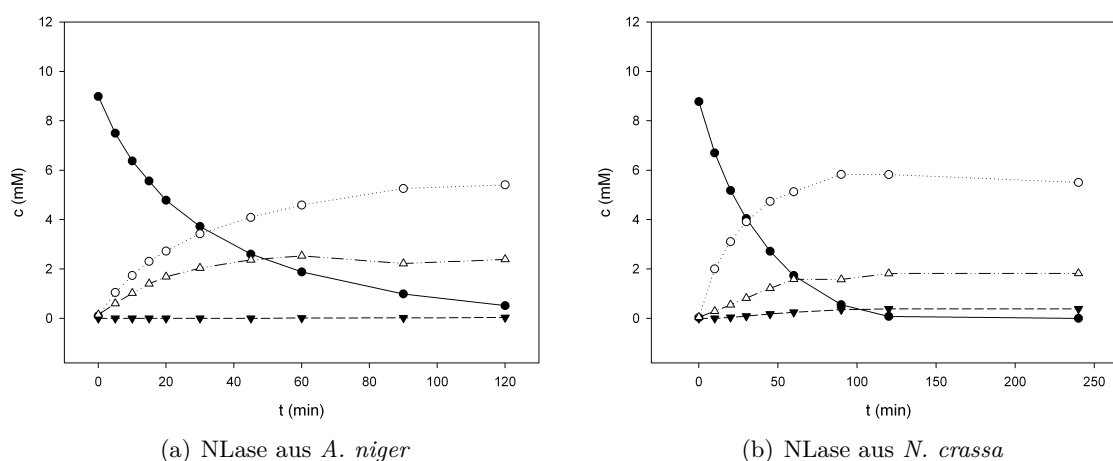


Abbildung 3.10: Umsatz von Acetophenoncyanhydrin durch (a) *E. coli* JM109 NitAn (synthetisiert die Nitrilase aus *A. niger*) und (b) *E. coli* JM109 NitNc (synthetisiert die Nitrilase aus *N. crassa*). Die rekombinanten *E. coli*-Stämme wurden in LB-Medium mit Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und 0,2 % (w/v) L-Rhamnose bei 30°C kultiviert. Nach dem Ernten und Waschen der Zellen in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5), wurden die Ruhezellen in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 4,5) resuspendiert (bei (a): $\text{OD}_{600} = 94$ bzw. bei (b): $\text{OD}_{600} = 93$) und mit 10 mM Acetophenoncyanhydrin (aus einer 200 mM Stammlösung in Methanol) bei 30°C und 1100 rpm inkubiert. Aus den Reaktionsansätzen (1000 μL) wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die Reaktionen mit 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Konzentrationen an Atrolactat (Δ), Atrolactamid (\blacktriangledown), Acetophenon (\circ) und Acetophenoncyanhydrin (\bullet) in den Überständen mittels HPLC bestimmt.

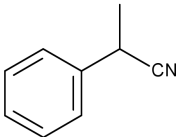
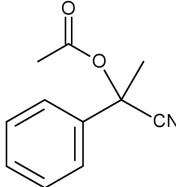
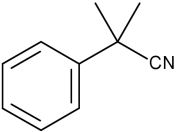
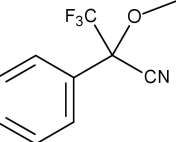
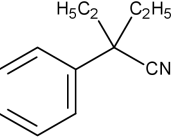
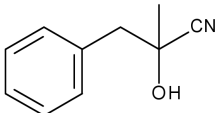
Zur enantiokonservativen Umsetzung von Acetophenoncyanhydrin wäre ein pH-Wert $< 4,5$ vorteilhaft (vgl. Kap. 3.3.1). Neben dem in Kapitel 3.2 beschriebenen *Pichia* Stamm, der das Nitrilasegen aus *P. fluorescens* EBC191 sowie das Oxynitrilasegen aus *M. esculenta* exprimiert, wurde von Rustler et al. (2008b) ein weiterer *Pichia* Stamm (*P. pastoris* pJOE5537.4) erzeugt, bei dem lediglich das Nitrilasegen aus *P. fluorescens* in das Genom integriert und unter der Kontrolle des AOX1

Promotors exprimiert wurde. Ruhezellen von *P. pastoris* pJOE5537.4 hydrolysierten Mandelonitril bei pH-Werten ≥ 3 zu Mandelsäure und Mandelamid. Der rekombinante *Pichia*-Stamm war damit deutlich säuretoleranter als *E. coli* JM109(pIK9) (Rustler et al., 2008b). Aus diesem Grund wurde Acetophenoncyanhydrin mit Ruhezellen von *P. pastoris* pJOE5537.4 bei einem pH-Wert von 4 umgesetzt. Bei einer optischen Dichte (600 nm) von 120 wurden nach 2 Stunden Inkubation lediglich < 3 mM Atrolactat gebildet, was wahrscheinlich auf die schwache Expression des Nitrilasegens in diesem Stamm zurückzuführen war (nicht dargestellt).

3.3.3 Aktivität der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 gegenüber quartären Nitrilen sowie tertiären Cyanhydrinen

Die zuvor beschriebenen Versuche zeigten, dass von den getesteten Nitrilasen offenbar das Enzym aus *P. fluorescens* EBC191 am Besten zum Umsatz sterisch anspruchsvoller Nitrile geeignet war. Zur Bestimmung des von der Nitrilase umgesetzten Substratspektrums im Hinblick auf sterisch anspruchsvolle Nitrile wurden daher Ruhezellumsätze mit verschiedenen α,α -disubstituierten Phenylacetonitrilen durchgeführt. Die Enzymaktivitäten wurden anhand der Ammoniumfreisetzung in den Überständen der Ruhezellumsätze bestimmt (siehe Kap. 3.1.4). Als Vergleichssubstrat diente das in der α -Position nur einfach substituierte Arylacetonitril 2-PPN. Die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 konnte einige der untersuchten α,α -disubstituierten Phenylacetonitrile wie beispielsweise 2-Acetyloxy-2-methylphenylacetonitril, 2-Methyl-2-phenylpropannitril und 2-Methoxy-2-trifluormethylphenylacetonitril hydrolysieren (Tab. 3.4). Hierdurch wurde erstmals gezeigt, dass Nitrilasen derartige sterisch anspruchsvolle Substrate umsetzen können. Erstaunlich war insbesondere die hohe relative Aktivität mit 2-Acetyloxy-2-methylphenylacetonitril (48 % bezogen auf den Umsatz von 2-PPN). Esterbindungen können in Gegenwart von Wasser durch chemische oder enzymatische Hydrolyse gespalten werden. Die Überstände des Ruhezellumsatzes mit 2-Acetyloxy-2-methylphenylacetonitril wurden aus diesem Grund zusätzlich mittels HPLC untersucht, um sicherzustellen, dass keine Hydrolyse der Estergruppe stattfand. Es wurde hierfür dieselbe HPLC-Methode verwendet wie zur Quantifizierung von Acetophenoncyanhydrin. Die Retentionszeit von 2-Acetyloxy-2-methylphenylacetonitril unterschied sich deutlich von der Retentionszeit von Acetophenoncyanhydrin (15,7 min gegenüber 7,6 min) und auch das mutmaßliche Reaktionsprodukt (2-Acetyloxy-2-phenylpropansäure) eluierte wesentlich später von der Säule als Atrolactat (8 min gegenüber 4,4 min). In den Chromatogrammen waren im Verlauf der Reaktion weder ein Acetophenoncyanhydrin-Peak, noch ein Atrolactat-Peak zu erkennen. Daher gab es keinen Hinweis auf eine chemische oder enzymatische Hydrolyse der Acetatgruppe. Ferner nahm die Substratkonzentration in der mitgeführten zellfreien Kontrolle (5 mM 2-Acetyloxy-2-methylphenylacetonitril in 100 mM Na-Citratpuffer, pH 5) nicht ab. Dies zeigte, dass die Nitrilase tatsächlich 2-Acetyloxy-2-methylphenylacetonitril hydrolysierte.

Tabelle 3.4: Umsatz sterisch anspruchsvoller Nitrile durch die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191.

Substrat	Struktur	rel. Aktivität ¹ (%)
2-Phenylpropannitril		100
2-Acetyloxy-2-methylphenylacetonitril		48
2-Methyl-2-phenylpropannitril		3
2-Methoxy-2-trifluormethylphenylacetonitril		0,3
2-Ethyl-2-phenylbutannitril		0
2-Hydroxy-2-methyl-3-phenylpropannitril		0 ²

Die Anzucht von *E. coli* JM109(pIK9) und die Induktion des Nitrilasegens erfolgten wie in Kapitel 2.6.5 beschrieben. Für die Umsätze wurden die Ruhezellen in KH-Phthalatpuffer (50 mM, pH 5) oder Na-Citratpuffer (100 mM, pH 5) resuspendiert, eine geeignete optische Dichte eingestellt und mit 5 - 10 mM Nitril (in der Regel aus 200 mM Stammlösungen in Methanol) im Thermoschüttler bei 30°C und 1100 rpm inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und die Reaktionen durch sofortiges Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) abgestoppt. Die Ammoniumkonzentrationen in den Überständen wurden anschließend mittels Aquaquant Test entsprechend Kapitel 2.7.4 bestimmt. Die Berechnung der spez. Aktivitäten erfolgte im linearen Bereich der Umsatzkurven.

¹ bezogen auf die Aktivität mit 2-Phenylpropannitril (= 0,3 U/mg Protein)

² Wert ermittelt durch HPLC-Analyse, da α -Hydroxynitrile den Ammoniumtest stören (Heinemann, 2003)

3.3.4 Umsatz von 2-Methyl-2-phenylpropannitril

Der Umsatz von 2-Methyl-2-phenylpropannitril durch *E. coli* JM109(pIK9) wurde anschließend mittels HPLC unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Standards des mutmaßlichen Reaktionsproduktes (2-Methyl-2-phenylpropansäure) untersucht. Ein Standard für das korrespondierende

rende Amid war jedoch nicht erhältlich. Zur Verifizierung der zuvor erhaltenen Ergebnisse wurden zusätzlich Umsätze mit 2-PPN durchgeführt. Die Ruhezellumsätze wurden bei pH 7 durchgeführt, da beide Substrate bei diesem pH-Wert stabil waren und die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 unter neutralen Reaktionsbedingungen eine höhere Enzymaktivität aufweist. Hierbei wurde gezeigt, dass 2-Methyl-2-phenylpropannitril von der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 in annähernd stöchiometrischen Mengen zur korrespondierenden Säure hydrolysiert wurde (Abb. 3.11). Es gab keinen Hinweis auf die Bildung von 2-Methyl-2-phenylpropanamid als Nebenprodukt, da im HPLC-Chromatogramm keine weiteren Peaks vorhanden waren. Die so bestimmte Nitrilase-Aktivität mit 2-Methyl-2-phenylpropannitril betrug $7,5 \pm 0,08$ % (bezogen auf die Aktivität mit 2-PPN). Der Wert war damit etwas höher als bei den vorangegangenen Untersuchungen zur Ammoniumfreisetzung (3 % bei einem pH-Wert von 5, vgl. Tab. 3.4). Die beiden Versuche zeigten jedoch zweifelsfrei, dass die Nitrilase quartäre Nitrile hydrolysierte.

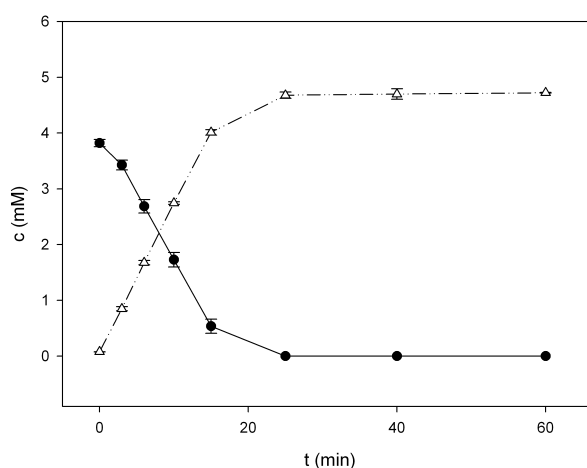


Abbildung 3.11: Umsatz von 2-Methyl-2-phenylpropannitril durch *E. coli* JM109(pIK9). Der Reaktionsansatz (1000 μ L) enthielt Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7), 5 mM 2-Methyl-2-phenylpropannitril (aus einer 50 mM Stammlösung in Methanol) sowie Ruhezellen mit einer optischen Dichte von 15. Der Ansatz wurde bei 30°C und 1100 rpm im Thermoschüttler inkubiert, in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die Reaktion mit 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Konzentrationen an 2-Methyl-2-phenylpropannitril (●) und 2-Methyl-2-phenylpropansäure (Δ) in den Überständen mittels HPLC bestimmt.

3.4 Versuche zur Entwicklung eines Selektionssystems zur Veränderung der Substratspezifität der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191

Die zuvor beschriebenen Versuche zeigten, dass sterisch anspruchsvolle Nitrile mit drei voluminösen Resten am α -ständigen Kohlenstoffatom von der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 mit geringer spez. Aktivität umgesetzt wurden. Es sollte im Folgenden untersucht werden, ob es möglich war, die Umsatzrate für sterisch anspruchsvolle Substrate zu steigern. Zwei verschiedene Ansätze/Methoden kamen hierfür in Frage: die Veränderung der Nitrilase durch rationales Proteindesign oder durch gerichtete Evolution. Ein rationales Proteindesign, d.h. die gezielte Veränderung von

Aminosäuren in der AS-Sequenz eines Proteins, erfordert im Allgemeinen die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Enzyms. Idealerweise sollte hierbei die räumliche Proteinstruktur durch eine vorangegangene Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt worden sein. Es können aber auch Enzyme durch rationales Proteindesign verändert werden, deren Proteinstruktur anhand computergestützter Methoden abgeleitet wurde. Aufbauend auf Sequenzvergleichen mit verwandten, kristallisierten Proteinen wird hierbei ein 3-dimensionales Strukturmodell (Homologie-Modell) des Enzyms erzeugt. Mit dieser Methode kann die Proteinstruktur jedoch nur näherungsweise bestimmt werden und sie ist demzufolge mit größeren Unsicherheiten behaftet.

Beim Ansatz der gerichteten Evolution werden mit Methoden der Molekularbiologie einige der Vorgänge der natürlichen Evolution im Labor simuliert (Jaeger, 2006). Zur Erzeugung von Diversität können zufällige Mutationen generiert und mit rekombinativen Methoden (z.B. DNA-Shuffling) kombiniert werden, um anschließend Proteine mit verbesserten Eigenschaften mittels Screening oder Selektion zu identifizieren (Jaeger, 2006). Diese Methode erfordert keine genauen Kenntnisse über die Struktur-Funktionsbeziehungen des untersuchten Enzyms.

Da für die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 keine aufgeklärte Proteinstruktur zur Verfügung stand, erschien eine Verbesserung der Nitrilase hinsichtlich ihrer Substratspezifität durch Zufallsmutagenese daher zielführender als die Methode des rationalen Proteindesigns. Bei der enzymatischen Hydrolyse von Nitrilen durch Nitrilasen entstehen in stöchiometrischen Mengen die korrespondierenden Carbonsäuren und Ammoniak, welcher unter neutralen Bedingungen protoniert in Form von Ammoniumionen vorliegt. Die bei der Nitril-Hydrolyse frei werdenden Ammoniumionen können von den Organismen als Stickstoffquelle genutzt werden. Diese Reaktion wurde bereits vielfach für die Anreicherung von Stämmen mit Nitril-hydrolysierenden Aktivitäten aus Umweltproben eingesetzt. Es war somit denkbar, dass eine Kultivierung in Flüssigkultur mit einem vom WT-Enzym nur schlecht umgesetzten Nitril als einziger Stickstoffquelle auch für die Selektion von veränderten Nitrilasevarianten in einem rekombinanten *E. coli* Stamm genutzt werden kann. Die Anwendbarkeit dieser Strategie sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

In diesem Zusammenhang wurde zunächst das Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) in Minimalmedium mit einem Nitril als einziger Stickstoffquelle charakterisiert. Als Modellsubstrat für diese Untersuchungen wurde 2-Phenylpropanitril (2-PPN) eingesetzt, da dieses Nitril bei neutralem pH-Wert stabil ist und von der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 effizient zu 2-Phenylpropansäure (2-PPS) hydrolysiert werden kann (Kiziak et al., 2005).

3.4.1 Induktion der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 in *E. coli* JM109(pIK9) beim Wachstum in Minimalmedium

Zunächst wurde das Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) in Ampicillin-haltigem (100 µg/mL) Minimalmedium mit Glycerin als C-Quelle (MM; siehe Kap. 2.5.2) und einer anorganischen Stickstoffquelle (Ammoniumsulfat) bei gleichzeitiger Induktion der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 mit L-Rhamnose (0,2 %, w/v) untersucht. In dem für die Konstruktion des Expressionssystems verwendeten Rhamnose-Abbauweg bilden die Gene *rhaBAD* ein Operon und werden unter der Kontrolle des P_{rhaBAD} Promotors transkribiert. Dieser Promotor wird durch zwei Aktivatoren, RhaS und RhaR, reguliert, wobei die zugehörigen Gene (*rhaS* und *rhaR*) eine Transkriptionseinheit bilden und entgegengesetzt zu *rhaBAD* transkribiert werden (Wegerer et al., 2008). In

Anwesenheit von L-Rhamnose bindet RhaR an den P_{rhaRS} Promotor und aktiviert sowohl seine eigene als auch die Synthese von RhaS (Stumpp et al., 2000). RhaS wiederum bindet mit L-Rhamnose als Effektor an den P_{rhaBAD} Promotor und aktiviert so die Transkription der Strukturgene (Stumpp et al., 2000). Die vollständige Induktion der *rhaBAD*-Transkription erfordert die Bindung des CAP-cAMP-Komplexes, der ein Schlüsselregulator der Katabolitrepression ist (Wegeger et al., 2008). Wenn Glukose vorhanden ist, sind die cAMP-Spiegel niedrig und CAP kann nicht an den Promotor binden. RhaS kann unter diesen Bedingungen die Transkription der *rhaBAD* Gene nicht aktivieren und die Expression der Strukturgene wird daher durch Glukose unterdrückt. Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Minimalmedium (MM) enthielt aus diesem Grund stets Glycerin und keine Glukose als C-Quelle (vgl. Kap. 2.5.2). Bei den Wachstumsversuchen wurden Ammoniumsulfatkonzentrationen von 0,5 - 2 g/L eingesetzt. Nach 19, 23, 26, 40,5 und 48,5 Stunden Inkubation bei 30°C wurden Proben entnommen, die Zellen aufgeschlossen und die Proteinfraction mittels SDS-PAGE analysiert, um die Expression der Nitrilase zu überprüfen.

In der Kultur, die Ammoniumionen in einer Gesamtkonzentration von 7,57 mM (entsprechend 0,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) enthielt, wurde ein deutlich geringerer Zellertrag erzielt als bei den restlichen Kulturen, da die eingesetzte Stickstoffkonzentration das Wachstum limitierte (Abb. 3.12).

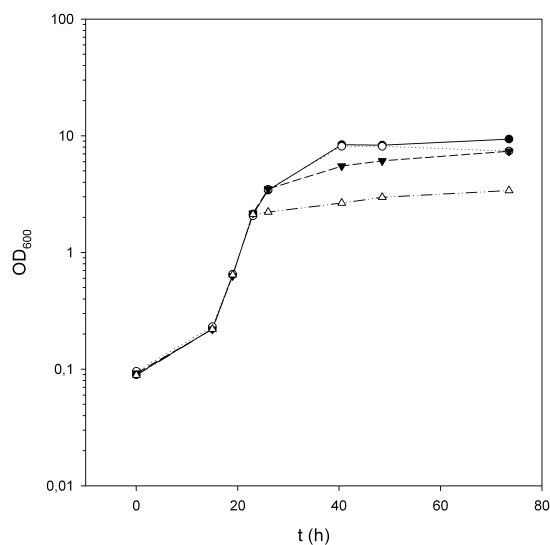


Abbildung 3.12: Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) in Minimalmedium mit Glycerin als C-Quelle (1 %, v/v), Ampicillin (100 µg/mL) und 0,5 g/L (Δ), 1 g/L (▼), 1,5 g/L (○) und 2 g/L (●) Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle. Die Anzucht von *E. coli* JM109(pIK9) erfolgte in 10 mL Minimalmedium (Zusammensetzung entsprechend Kapitel 2.5.2) mit 100 µg/mL Ampicillin in 100 mL-Schikanenkolben bei 37°C für 23 h unter Schütteln. Je 100 µL dieser Vorkultur wurden in 10 mL Ammonium-freies, Ampicillin-haltiges (100 µg/mL) Minimalmedium, dem die oben genannten Ammoniumsulfatkonzentrationen zugesetzt wurden, überimpft und die Hauptkulturen in 100 mL-Schikanenkolben bei 30°C und 100 rpm inkubiert. Die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 wurde durch Zugabe von 0,2 % (w/v) Rhamnose zu den Hauptkulturen induziert. Nach 19, 23, 26, 40,5 und 48,5 h Inkubation wurden neben den Aliquots zur Untersuchung des Bakterienwachstums zusätzlich Proben für die Untersuchung der Expression der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 mittels SDS-PAGE entnommen (siehe Abb. 3.13).

Die Analyse der Proteinfraction mittels SDS-PAGE ergab, dass die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 beim Wachstum in Minimalmedium in der exponentiellen Wachstumsphase am stärksten gebildet und in der stationären Wachstumsphase wieder abgebaut wurde (Abb. 3.13).

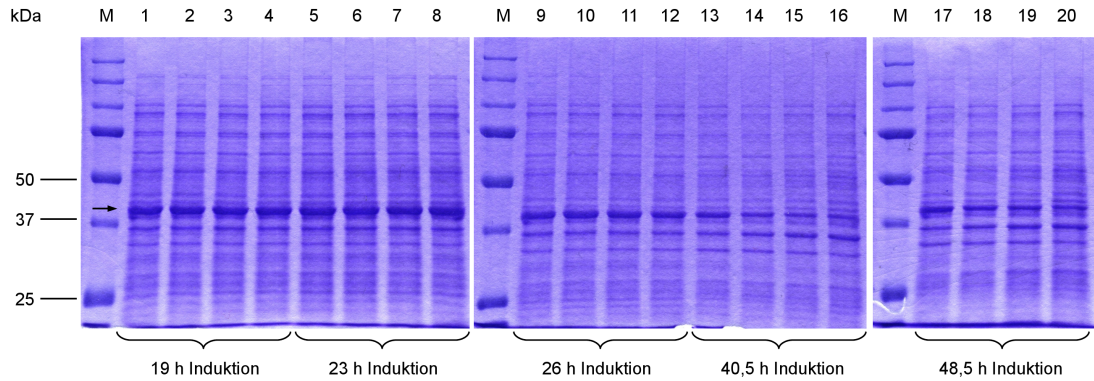


Abbildung 3.13: Expression der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 beim Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) in Minimalmedium, das Ammoniumsulfat in unterschiedlichen Konzentrationen sowie Ampicillin (100 µg/mL) und 0,2 % Rhamnose enthielt (vgl. Abb. 3.12). M: 7,5 µL Proteinmarker („Precision Plus Protein Standards“, Biorad), Spuren 1, 5, 9, 13 und 17: 0,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Spuren 2, 6, 10, 14 und 18: 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Spuren 3, 7, 11, 15 und 19: 1,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Spuren 4, 8, 12, 16 und 20: 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. 10 %ige SDS-Gele nach Laemmli (1970). Pro Spur wurden ca. 5 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Nitrilasebande ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

3.4.2 Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) im wässrigen System in Minimalmedium mit 2-PPN oder Ammoniumsulfat als einziger Stickstoffquelle

Nachfolgend wurde untersucht, ob die anorganische Stickstoffquelle durch 2-PPN ersetzt werden kann. *E. coli* JM109(pIK9) wurde hierfür zunächst in Ampicillin-haltigem (100 µg/mL) Minimalmedium mit einer anorganischen Stickstoffquelle (1 g/L Ammoniumsulfat) bei 37°C angezogen und die Zellen nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase in Ammonium-freies Minimalmedium (mit 1 % Glycerin als C-Quelle und 100 µg/mL Ampicillin) überimpft (1:100), dem 2-PPN in Konzentrationen von 7,5 - 30 mM (aus einer 1,5 M Stammlösung in Methanol) sowie 0,2 % (w/v) Rhamnose zur Induktion der Nitrilase zugesetzt wurden. 2-PPN besitzt nur eine geringe Löslichkeit in Wasser (ca. 2 mM), weshalb es zur Ausbildung einer Nitril-Phase in den Kolben kam. Die Kulturen wurden anschließend bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Um ein Verschleppen von Ammoniumsulfat aus der Vorkultur zu verhindern, wurden die Zellen vor dem Beimpfen der Kolben in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) gewaschen. In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Stamm in Minimalmedium mit korrespondierenden Ammoniumsulfatkonzentrationen (0,5 - 2 g/L) kultiviert, um das Wachstum zu vergleichen. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Kolben mitgeführt, der keine Stickstoffquelle enthielt.

E. coli JM109(pIK9) zeigte nach > 60 Stunden Inkubation kein Wachstum in Gegenwart von 2-PPN als einziger Stickstoffquelle (Abb. 3.14). Dagegen wuchsen die Zellen in den Vergleichskolben mit Ammoniumsulfat (Abb. 3.14). Das einmalige Waschen der Zellen in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) war offenbar ausreichend, um ein Verschleppen von Ammoniumsulfat beim Überimpfen weitgehend zu verhindern, da der Stamm ohne Zugabe einer Stickstoffquelle nicht wachsen konnte.

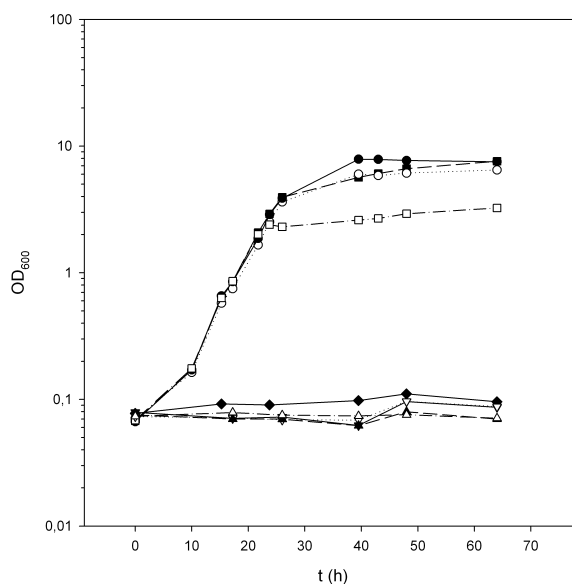


Abbildung 3.14: Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) in Ammonium-freiem Minimalmedium, dem 7,5 mM (▼), 15 mM (▽), 22,5 mM (▲) oder 30 mM (△) 2-PPN als einzige Stickstoffquelle zugesetzt wurden. Die Anzucht von *E. coli* JM109(pIK9) erfolgte in 10 mL Minimalmedium (Zusammensetzung entsprechend Kapitel 2.5.2) mit 100 µg/mL Ampicillin in 100 mL-Schikanenkolben bei 37°C für 26 h unter Schütteln. Die Zellen (8 mL) wurden durch Zentrifugation (6000 rpm, 10 min, 4°C) geerntet, einmal in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) gewaschen und in 8 mL des gleichen Puffers resuspendiert. Je 300 µL der gewaschenen Zellen wurden in 30 mL Ammonium-freies, Ampicillin-haltiges (100 µg/mL) Minimalmedium, dem die oben genannten 2-PPN-Konzentrationen zugesetzt wurden, überimpft und die Hauptkulturen in 300 mL-Schikanenkolben bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 wurde durch Zugabe von 0,2 % (w/v) Rhamnose zu den Hauptkulturen induziert. Zum Vergleich wurden Kulturen in 30 mL Minimalmedium (inklusive 100 µg/mL Ampicillin) mitgeführt, die 0,5 g/L (□), 1 g/L (■), 1,5 g/L (●) oder 2 g/L (○) Ammoniumsulfat als anorganische Stickstoffquelle enthielten. Als Negativkontrolle diente eine Kultur ohne Stickstoffquelle (◆).

In Kolben, die 2-PPN in Konzentrationen ≥ 15 mM enthielten, bildete sich eine organische Phase aus. Die Toxizität organischer Lösemittel korreliert in der Regel mit deren log P-Wert, dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten der chemischen Verbindung zwischen n-Oktanol und Wasser (Sikkema et al., 1995; Aono et al., 1994; Rajagopal, 1996). Der log P-Wert von 2-PPN beträgt ca. 1,6 (SciFinder Datenbank). Verbindungen bzw. organische Lösemittel mit einem vergleichbar niedrigen log P-Wert sind für Bakterienzellen in der Regel toxisch (Laane et al., 1987; Ramos et al., 2002; Rajagopal, 1996). Um die Toxizität von 2-PPN zu prüfen, wurden aus den Kulturen mit 2-PPN nach 26 h Inkubation Proben (je 100 µL) entnommen und direkt auf LB-Agar mit 100 µg/mL Ampicillin ausplattiert. Auf den Agarplatten waren nach der Inkubation über Nacht bei 37°C keine Kolonien vorhanden, was darauf schließen ließ, dass die Zellen in diesen Kulturen nicht mehr zum Wachstum befähigt waren.

In einem weiteren Versuch wurde *E. coli* JM109(pIK9) zunächst in Ampicillin-haltigem (100 µg/mL) Minimalmedium mit einer anorganischen Stickstoffquelle (1 g/L Ammoniumsulfat) bei 37°C angezogen und die Zellen nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase in Minimalmedium mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen an 2-PPN (7,5 oder 15 mM) und je 100 µg/mL Ampicillin überimpft (1:100, v/v), wobei die Kulturen zusätzlich Ammoniumsulfat als anorganische Stickstoffquelle enthielten. Zur Induktion der Nitrilase wurde dem Medium wiederum 0,2 %

Rhamnose zugesetzt. Nach > 60 h Inkubation konnte kein Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) festgestellt werden (Abb. 3.15). Dies zeigte deutlich, dass 2-PPN in den getesteten Konzentrationen toxisch für *E. coli* war.

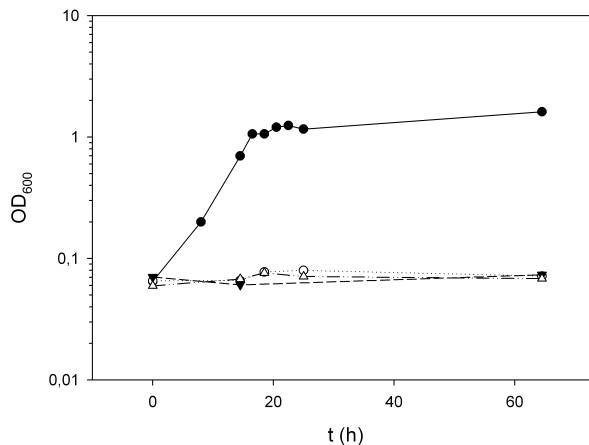


Abbildung 3.15: Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) in Minimalmedium mit 0,25 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ plus 7,5 mM 2-PPN (\circ), 0,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ plus 7,5 mM 2-PPN (\blacktriangledown) oder 0,25 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ plus 15 mM 2-PPN (\triangle) als Stickstoffquellen. Die Anzucht von *E. coli* JM109(pIK9) erfolgte in 10 mL Minimalmedium (Zusammensetzung entsprechend Kapitel 2.5.2) mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin in 100 mL-Schikanenkolben bei 37°C für 24 h unter Schütteln. Die Zellen (8 mL) wurden durch Zentrifugation (6000 rpm, 10 min, 4°C) geerntet, einmal in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) gewaschen und in 8 mL des gleichen Puffers resuspendiert. Je 300 μL der gewaschenen Zellen wurden in 30 mL Ampicillin-haltiges (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Minimalmedium (ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), dem die oben genannten Stickstoff-haltigen Verbindungen zugesetzt wurden, überimpft und die Hauptkulturen in 300 mL-Schikanenkolben bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 wurde durch Zugabe von 0,2 % (w/v) Rhamnose zu den Hauptkulturen induziert. Als Kontrolle wurde eine Kultur in 30 mL Minimalmedium mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin mitgeführt, die 0,25 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enthielt (\bullet).

3.4.3 Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) in 2-Phasensystemen mit 2-PPN als einziger Stickstoffquelle

Eine gängige Methode zur Vermeidung toxischer Effekte von organischen Verbindungen auf Mikroorganismen stellt die Verwendung von 2-Phasensystemen dar. Wichtig in diesem Zusammenhang ist, dass die organischen Lösemittel selbst keine toxische Wirkung auf die Bakterienzellen ausüben. Organische Lösemittel mit einem $\log P < 4,0$ sind in den meisten Fällen extrem toxisch für Mikroorganismen, da sie in der Cytoplasmamembran der Bakterien akkumulieren und so die Struktur der Zellmembran zerstören (Laane et al., 1987; Ramos et al., 2002). Als Substratreservoir für 2-PPN wurden aus diesem Grund die Lösemittel n-Oktan und 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan (HMeN) erprobt, da sie $\log P$ -Werte von 4,5 (Laane et al., 1987) (SciFinder: 4,8) bzw. 7,9 (SciFinder Datenbank) aufweisen.

Zunächst wurden 2-Phasensysteme mit einem geringen Anteil der organischen Phase (6,5 %, v/v) untersucht. Der Phasenanteil bezieht sich hierbei auf das Gesamtvolumen der Flüssigkeiten in den Kolben (organische Phase plus wässrige Phase). *E. coli* JM109(pIK9) wurde hierfür wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben in Ampicillin-haltigem (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Minimalmedium mit anorganischer Stickstoffquelle bei 37°C angezogen. Die Zellen wurden nach dem Waschen in Na/K-Phosphatpuffer in

Ammonium-freies Minimalmedium mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin und 0,2 % Rhamnose (w/v) überimpft, dem 6,5 % (v/v) HMeN oder Oktan zugesetzt wurden. Hierbei enthielten die organischen Phasen jeweils 100 mM 2-PPN. Das Phasenverhältnis (Wasser-Phase zu org. Phase: 14,3 zu 1, v/v) wurde so gewählt, dass nach dem vollständigen Umsatz des Nitrils in etwa 7 mM 2-PPS in der wässrigen Phase vorliegen würden. Als Kontrolle dienten Kulturen, die neben 2-PPN zusätzlich $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enthielten. Zur Charakterisierung der Toxizität der eingesetzten organischen Lösemitel wurden Kulturen in Ammonium-haltigem Minimalmedium mitgeführt, die 6,5 % (v/v) HMeN oder Oktan bzw. keine organische Phase enthielten.

Die Versuche zeigten, dass das Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) auch in den beiden 2-Phasensystemen durch 2-PPN vollständig unterdrückt wurde (Abb. 3.16). Die Anwesenheit von 6,5 % HMeN beeinträchtigte das Wachstum des Stammes jedoch nicht (Abb. 3.16(a)). Bei der Inkubation von *E. coli* JM109(pIK9) mit 6,5 % (v/v) Oktan trat im Vergleich zur entsprechenden Kultur mit HMeN hingegen ein langsames Wachstum auf (Abb. 3.16(b)).

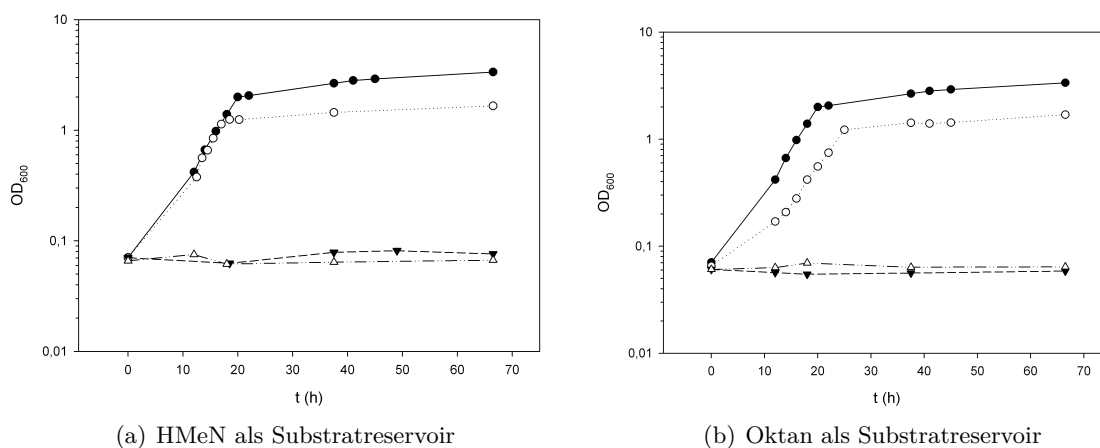


Abbildung 3.16: Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) in 2-Phasensystemen mit (a) 6,5 % (v/v) HMeN oder (b) 6,5 % (v/v) Oktan. Die Anzucht von *E. coli* JM109(pIK9) erfolgte in 10 mL Minimalmedium (Zusammensetzung entsprechend Kapitel 2.5.2) mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin in 100 mL-Schikanenkolben bei 37°C für 24 h unter Schütteln. Die Zellen (8 mL) wurden durch Zentrifugation (6000 rpm, 10 min, 4°C) geerntet, einmal in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) gewaschen und in 8 mL des gleichen Puffers resuspendiert. Anschließend wurden die gewaschenen Zellen in 30 mL Ammonium-freies Minimalmedium mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin und 0,2 % (w/v) Rhamnose überimpft (1:100, v/v). Zu den Kulturen wurden 2,1 mL HMeN oder Oktan gegeben, die 2-PPN in einer Konzentration von 100 mM enthielten (▼). Bei zwei Kulturen wurden der wässrigen Phase zusätzlich 0,25 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als anorganische Stickstoffquelle zugefügt (Δ). Weiterhin wurden Kulturen mitgeführt, in denen die Minimalmedien 0,25 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mit 6,5 % HMeN oder Oktan (○) bzw. 0,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und keine organische Phase enthielten (●).

Bei den zuvor beschriebenen 2-Phasensystemen war der Anteil der organischen Phase gering und enthielt dementsprechend große Mengen an 2-PPN. Nachfolgend wurden 2-Phasensysteme untersucht, bei denen die Nitrilkonzentration in der organischen Phase verringert und der Anteil der organischen Phase von 6,5 auf 25 % (v/v) erhöht wurde. *E. coli* JM109(pIK9) wurde in Minimalmedium mit anorganischer Stickstoffquelle bei 37°C angezogen (gemäß Kapitel 3.4.2) und die Zellen nach dem Waschen in Na/K-Phosphatpuffer in Ammonium-freies, Ampicillin-haltiges (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Minimalmedium überimpft, dem 25 % (v/v) HMeN oder Oktan zugesetzt wurden, wobei die organischen Phasen jeweils 7 mM 2-PPN enthielten. In den 2-Phasensystemen mit HMeN konnte nach

einer ausgeprägten lag-Phase (nach etwa 20 Stunden Inkubation) in den 2-PPN enthaltenden Kulturen Zellwachstum festgestellt werden (Abb. 3.17(a)). Mit Oktan als Substratreservoir für 2-PPN nahm die optische Dichte (600 nm) unter gleichen Bedingungen nicht zu (Abb. 3.17(b)). Bei der Inkubation von *E. coli* JM109(pIK9) mit 25 % (v/v) Oktan trat ein langsames Wachstum im Vergleich zum korrespondierenden System mit HMeN (Abb. 3.17(b)) auf. Eine ähnliche Beobachtung war bereits bei der Verwendung geringerer Konzentrationen an Oktan bzw. HMeN gemacht worden. In Kulturen, die HMeN als organische Phase enthielten, bildete sich mit zunehmender Zelldichte eine stabile Emulsion zwischen HMeN und der wässrigen Phase aus.

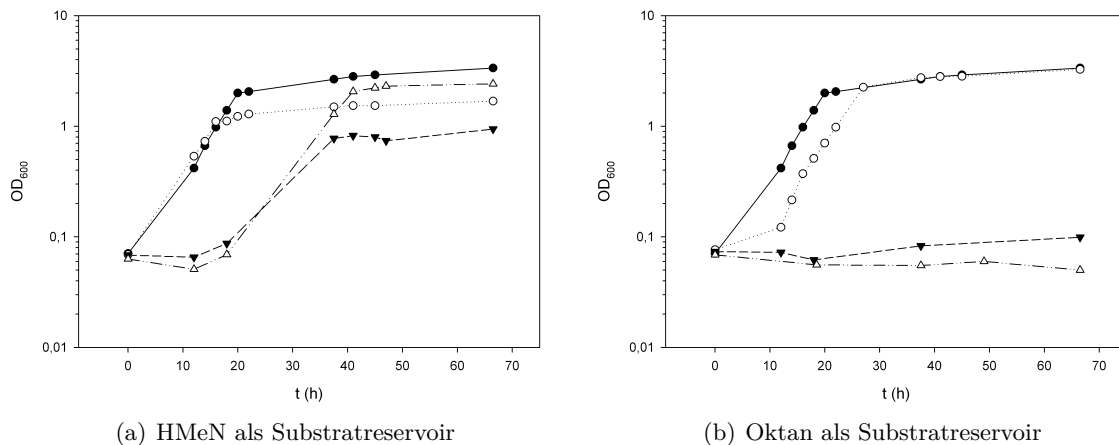


Abbildung 3.17: Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) in 2-Phasensystemen mit (a) 25 % (v/v) HMeN oder (b) 25 % (v/v) Oktan. Die Anzucht von *E. coli* JM109(pIK9) erfolgte in 10 mL Minimalmedium (Zusammensetzung entsprechend Kapitel 2.5.2) mit 100 $\mu\text{g/mL}$ Ampicillin in 100 mL-Schikanenkolben bei 37°C für 24 h unter Schütteln. Die Zellen (8 mL) wurden durch Zentrifugation (6000 rpm, 10 min, 4°C) geerntet, einmal in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) gewaschen und in 8 mL des gleichen Puffers resuspendiert. Anschließend wurden die gewaschenen Zellen in 27 mL Ammonium-freies Minimalmedium mit 100 $\mu\text{g/mL}$ Ampicillin und 0,2 % (w/v) Rhamnose überimpft (1:100, v/v). Zu den Kulturen wurden 9 mL HMeN oder Oktan gegeben, die 2-PPN in einer Konzentration von 7 mM enthielten (▼). Bei einer HMeN-Kultur wurde der wässrigen Phase zusätzlich 0,25 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bzw. bei einer Oktan-Kultur 0,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als anorganische Stickstoffquelle zugefügt (Δ). Weiterhin wurden Kulturen mitgeführt, in denen die Minimalmedien 0,25 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mit 25 % HMeN bzw. 0,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mit 25 % Oktan (\circ) bzw. 0,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und keine organische Phase enthielten (\bullet).

Durch Analyse der wässrigen Kulturüberstände wurde überprüft, ob das Wachstum der Zellen in den 2-Phasensystemen mit HMeN und 2-PPN tatsächlich mit der enzymatischen Hydrolyse des Nitrils zur korrespondierenden Säure (2-PPS) verknüpft war. Hierzu wurden nach 41 und 45 Stunden Inkubation Proben aus der wässrigen Phase entnommen, die Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) entfernt und die Überstände mittels HPLC analysiert. Bei einer 2-PPN-Konzentration von 7 mM in der HMeN-Phase können aufgrund des Phasenverhältnisses von 1:3 in der wässrigen Phase nach Hydrolyse des Nitrils max. 2,3 mM 2-PPS vorliegen. Die entsprechenden Konzentrationen wurden mit 2,2 mM 2-PPS, das in den Überständen nachgewiesen wurde, annähernd erreicht (nicht dargestellt). Beim Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) mit 2-PPN plus Ammoniumsulfat sollte den Zellen mehr Ammonium zum Wachstum zur Verfügung stehen (insgesamt ca. 6 mM bezogen auf die wässrige Phase). Betrachtet man die Wachstumskurven aus Abb. 3.17(a) wird deutlich, dass die Zellen dieser Kultur höchstwahrscheinlich sowohl die organische als

auch die anorganische Stickstoffquelle verwerteten, da eine höhere optische Dichte ($OD_{600} = 2,4$) erreicht wurde als in der Kultur, die lediglich 7 mM 2-PPN enthielt ($OD_{600} = 0,9$).

3.4.4 Inkubation von *E. coli* JM109(pJOE2775) im 2-Phasensystem mit HMeN und 2-PPN als einziger Stickstoffquelle

Die in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Untersuchungen hatten angedeutet, dass das Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) im 2-Phasensystem mit HMeN auf die enzymatische Nitril-Hydrolyse zurückzuführen war. Zur Absicherung dieses Sachverhaltes wurde ein Kontrollexperiment mit dem Stamm *E. coli* JM109(pJOE2775) durchgeführt, der den ursprünglichen Expressionsvektor (ohne das Nitrilase-Gen) enthält (Stumpp et al., 2000). Der Stamm wurde hierzu im zuvor beschriebenen 2-Phasensystem kultiviert, in regelmäßigen Abständen Proben aus der wässrigen Phase (je 900 μ L) entnommen und die Kulturüberstände hinsichtlich ihres 2-PPN und 2-PPS Gehaltes mittels HPLC analysiert. Um das Phasenverhältnis von 1:3 nicht zu verändern, erfolgte zudem jeweils eine Probenahme aus der organischen Phase (je 300 μ L). Als Positivkontrolle wurde eine Kultur mitgeführt, die 1 g/L Ammoniumsulfat als anorganische Stickstoffquelle enthielt.

E. coli JM109(pJOE2775) wuchs im Gegensatz zu *E. coli* JM109(pIK9) nicht in Minimalmedium mit 2-PPN als einziger Stickstoffquelle und setzte auch das Nitril nicht zur korrespondierenden Säure (2-PPS) um (Abb. 3.18). In der Positivkontrolle wurde hingegen nach 22 h Inkubation die gleiche optische Dichte erreicht wie bei der eingesetzten Ammoniumsulfatkonzentration zu erwarten war (nicht dargestellt, vgl. Abb. 3.12). Der Versuch bestätigte, dass das Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) im 2-Phasensystem mit 2-PPN nur durch die enzymatische Nitril-Hydrolyse möglich war.

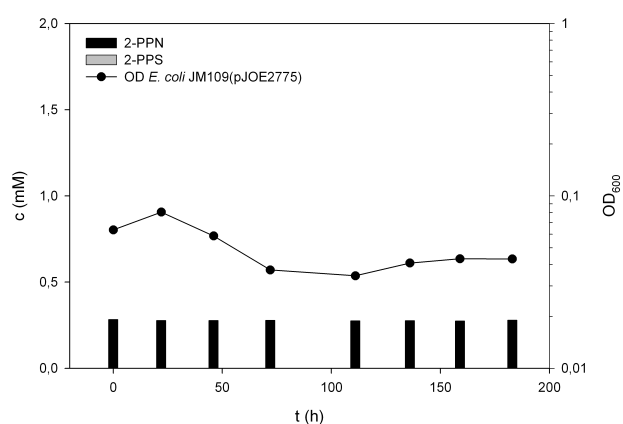


Abbildung 3.18: Veränderung der optischen Dichte und der Konzentration an 2-PPN bei der Inkubation von *E. coli* JM109(pJOE2775) im 2-Phasensystem mit 2-PPN als einziger Stickstoffquelle. Die Anzucht von *E. coli* JM109(pJOE2775) erfolgte in 10 mL Minimalmedium (Zusammensetzung entsprechend Kapitel 2.5.2) mit 100 μ g/mL Ampicillin in 100 mL-Schikanenkolben bei 37°C für 25 h unter Schütteln. Die Zellen (2 mL) wurden durch Zentrifugation (6000 rpm, 10 min, 4°C) geerntet, einmal in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) gewaschen und in 2 mL des gleichen Puffers resuspendiert. 210 μ L der gewaschenen Zellen wurden in 21 mL Ammonium-freies Minimalmedium überimpft, dem 100 μ g/mL Ampicillin und 0,2 % (w/v) Rhamnose zugesetzt waren. Es wurden 7 mL HMeN zugegeben, das 7 mM 2-PPN enthielt und die Kultur in 300 mL-Schikanenkolben bei 30°C unter Schütteln inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben aus beiden Phasen entnommen und nach dem Abtrennen der Zellen (13500 rpm, 4°C, 10 min) die wässrigen Kulturüberstände hinsichtlich ihrer 2-PPN und 2-PPS Konzentrationen mittels HPLC analysiert.

3.4.5 Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) im 2-Phasensystem mit HMeN und unterschiedlichen Konzentrationen an 2-PPN

Nachfolgend wurde das Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) im 2-Phasensystem in Gegenwart unterschiedlicher 2-PPN-Konzentrationen untersucht. Die HMeN-Phase (25 %, v/v) enthielt hierbei 7, 15, 30, 45, 60 und 75 mM des Nitrils. Als Kontrollen wurden Kulturen mit Ammoniumsulfat als anorganischer Stickstoffquelle mitgeführt. In regelmäßigen Abständen wurden Proben aus beiden Phasen entnommen und die (wässrigen) Kulturüberstände hinsichtlich ihres 2-PPN und 2-PPS Gehaltes mittels HPLC analysiert. Bei allen eingesetzten 2-PPN-Konzentrationen konnten Zellen von *E. coli* JM109(pIK9) wachsen, bei hohen Substratkonzentrationen jedoch erst nach einer mehrtägigen lag-Phase (Abb. 3.19). Vergleicht man die optische Dichte (600 nm) der Kontrolle, die 0,13 g/L Ammoniumsulfat enthielt (= knapp 2 mM NH_4^+) mit der korrespondierenden 2-PPN Kultur (7 mM 2-PPN in der HMeN-Phase, entsprechend max. 2,3 mM NH_4^+ in der wässrigen Phase) wurde offenbar derselbe Zellertrag erzielt. Dies deutet darauf hin, dass in dieser Kultur aus 2-PPN quantitativ Ammonium freigesetzt wurde.

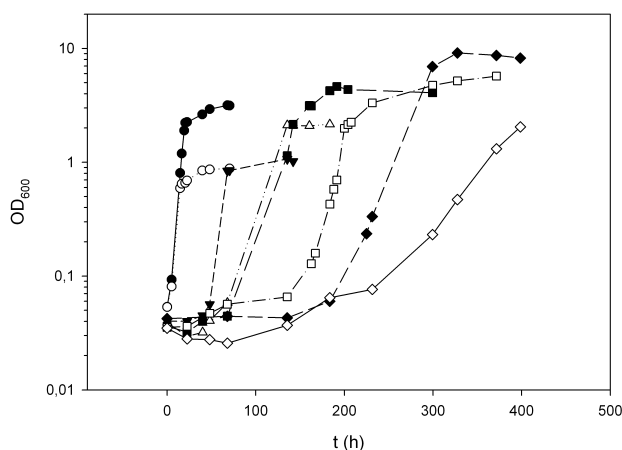


Abbildung 3.19: Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) im 2-Phasensystem mit 25 % (v/v) HMeN als Substratreservoir für 2-PPN unterschiedlicher Konzentrationen. Die Anzucht von *E. coli* JM109(pIK9) erfolgte in 10 mL Minimalmedium (Zusammensetzung entsprechend Kapitel 2.5.2) mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin in 100 mL-Schikanenkolben bei 37°C für 24 h unter Schütteln. Die Zellen (8 mL) wurden durch Zentrifugation (6000 rpm, 10 min, 4°C) geerntet, einmal in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) gewaschen und in 8 mL des gleichen Puffers resuspendiert. Je 210 μL der gewaschenen Zellen wurden in 21 mL Ammonium-freies Minimalmedium überimpft, das 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin und 0,2 % (w/v) Rhamnose enthielt. Es wurden je 7 mL HMeN zugegeben, das 7 mM (\blacktriangledown), 15 mM (\triangle), 30 mM (\blacksquare), 45 mM (\square), 60 mM (\blacklozenge) oder 75 mM (\diamond) 2-PPN als einzige Stickstoffquelle enthielt und die Kulturen in 300 mL-Schikanenkolben bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Als Kontrollen wurden Kulturen mit 0,5 g/L (\bullet) oder 0,13 g/L (\circ) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als anorganische Stickstoffquelle mitgeführt.

Die Ansätze konnten genutzt werden, um anhand der Nitrilkonzentration in der wässrigen Phase und dem eingestellten Volumenverhältnis von wässriger zu organischer Phase den Verteilungskoeffizient von 2-PPN abzuschätzen. In Tabelle 3.5 sind die Konzentrationen an 2-PPN aufgelistet, die zu Beginn der Inkubation in der wässrigen Phase nachgewiesen wurden. Der Verteilungskoeffizient von 2-PPN betrug im hier beschriebenen 2-Phasensystem durchschnittlich 22,4 (korrespondierender $\log D = 1,3$). Die Werte in Tab. 3.5 zeigen, dass durch HMeN die 2-PPN-Konzentration in der

wässrigen Phase signifikant reduziert werden konnte und folglich die Toxizität des Nitrils deutlich vermindert war.

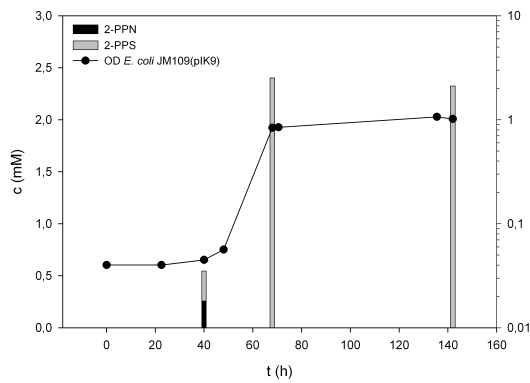
Tabelle 3.5: Verteilungskoeffizient von 2-PPN im 2-Phasensystem mit 25 % (v/v) HMeN.

2-PPN Gehalt ¹ (mM)	2-PPN Gehalt in wässriger Phase (mM)	2-PPN Gehalt in HMeN Phase ² (mM)	$K_{\text{HMeN/Wasser}}$	log D
7	0,26	6,22	23,9	1,4
15	0,65	13,04	20,0	1,3
30	1,25	26,25	21,0	1,3
45	1,79	39,62	22,0	1,3
60	2,26	53,33	23,5	1,4
75	2,66	67,03	25,2	1,4

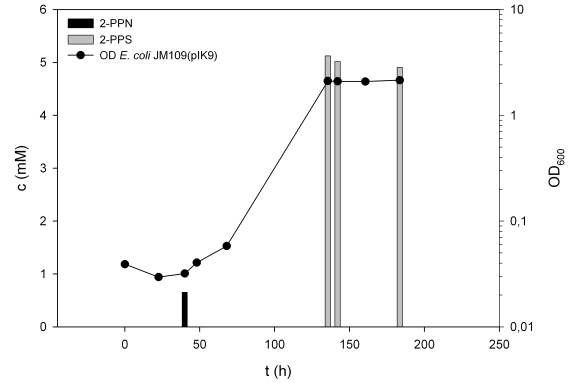
¹ in der HMeN-Phase vorgelegte Konzentration

² berechnet

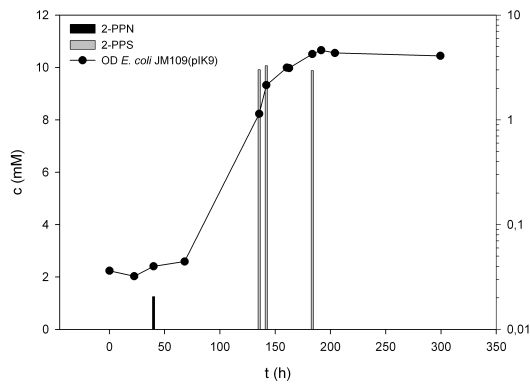
In der Abb. 3.20 sind alle Wachstumskurven von *E. coli* JM109(pIK9) aus Abb. 3.19 einzeln mit den gemessenen Konzentrationen an 2-PPN und 2-PPS in den Überständen der wässrigen Phasen dargestellt. Bei den hier eingesetzten 2-PPN-Konzentrationen von 7 - 75 mM in der HMeN-Phase können aufgrund des Phasenverhältnisses von 1:3 in der wässrigen Phase nach Hydrolyse des Nitrils maximal 2,3 - 25 mM 2-PPS vorliegen. In Ansätzen, die anfänglich 7 - 30 mM 2-PPN in der HMeN-Phase enthielten, wurden die entsprechenden 2-PPS Gehalte in der wässrigen Phase annähernd erreicht (Abb. 3.20(a) - 3.20(c)). In den Überständen der wässrigen Phasen aus Kulturen mit ursprünglich 45 - 75 mM 2-PPN betrug die 2-PPS Wiederfindung jedoch zwischen 115 - 123 % (Abb. 3.20(d) - 3.20(f)). Dies war vermutlich darauf zurückzuführen, dass eine Probenahme aus der organischen Phase mit zunehmender OD aufgrund der bereits in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Emulsionsbildung nicht mehr möglich war, was zu einer Veränderung des Phasenverhältnisses führte und damit zu erhöhten Konzentrationen an 2-PPS in der wässrigen Phase. Weiterhin zeigen die Abb. 3.20(d) - 3.20(f), dass auch bei hohen anfänglichen 2-PPN-Konzentrationen bereits bei niedrigen Zelldichten (OD_{600} ca. 0,2) ein Großteil des in der HMeN-Phase vorgelegten 2-Phenylpropantitrils durch die Nitrilase umgesetzt war. Zur Überprüfung des Expressionsniveaus der Nitrilase wurden die *E. coli* Zellen der Kultur, die 45 mM 2-PPN in der HMeN-Phase enthielt, aufgeschlossen und die Proteinfraction mittels SDS-PAGE untersucht (Abb. 3.21). Die Analyse ergab, dass die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase am stärksten exprimiert war. Dies erklärt, weshalb bei niedrigen Zelldichten bereits hohe Konzentrationen an 2-PPS nachweisbar waren.



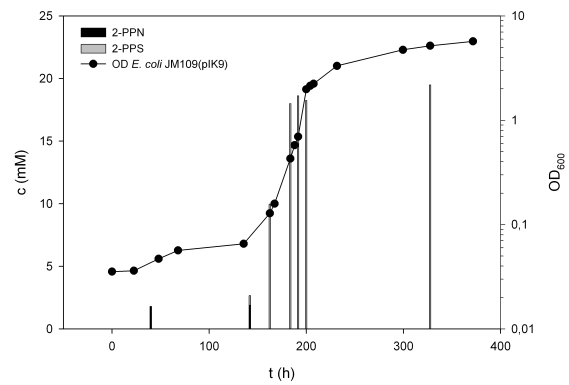
(a) 7 mM 2-PPN in der HMeN-Phase



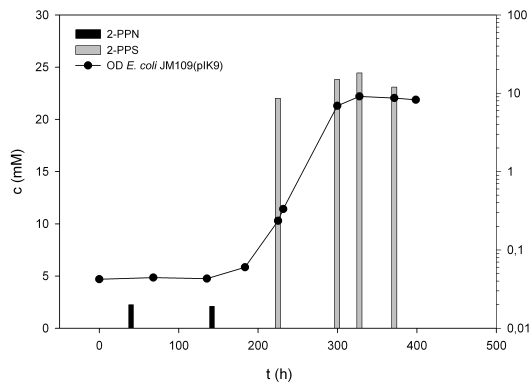
(b) 15 mM 2-PPN in der HMeN-Phase



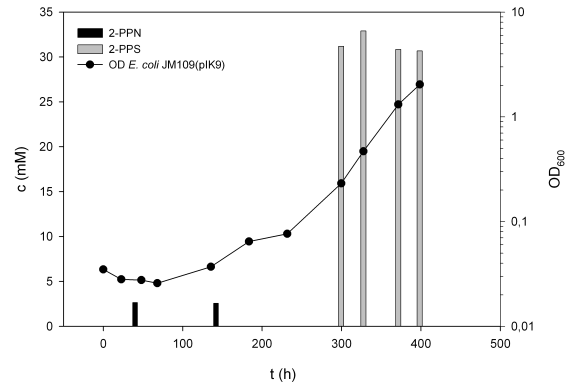
(c) 30 mM 2-PPN in der HMeN-Phase



(d) 45 mM 2-PPN in der HMeN-Phase



(e) 60 mM 2-PPN in der HMeN-Phase



(f) 75 mM 2-PPN in der HMeN-Phase

Abbildung 3.20: 2-PPN und 2-PPS Gehalte in den Kulturüberständen der wässrigen Phasen beim Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) im 2-Phasensystem mit 25 % (v/v) HMeN als Substratreservoir für 2-PPN in Konzentrationen von 7 - 75 mM. Es wurden die 2-PPN und 2-PPS Gehalte in den Kulturüberständen der in Abb. 3.19 gezeigten Experimente analysiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben aus beiden Phasen entnommen und die Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) entfernt. Anschließend erfolgte die Analyse der wässrigen Kulturüberstände hinsichtlich ihrer Konzentrationen an 2-PPN und 2-PPS mittels HPLC.

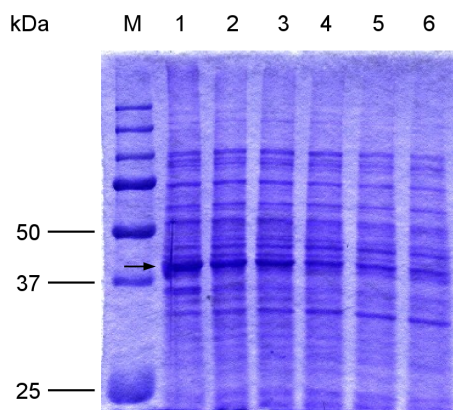


Abbildung 3.21: Expression der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 beim Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) in Ammonium-freiem Minimalmedium in einem 2-Phasensystem, das 45 mM 2-PPN in der HMeN-Phase enthielt. Es wurden die Zellen untersucht, die in Abb. 3.20(d) analysiert wurden. M: 7,5 μ L Proteinmarker („Precision Plus Protein Standards“, Biorad), Spur 1: nach 164 h Wachstum, Spur 2: nach 183,5 h Wachstum, Spur 3: nach 191,5 h Wachstum, Spur 4: nach 200 h Wachstum, Spur 5: nach 207,5 h Wachstum, Spur 6: nach 225 h Wachstum. Es wurde ein 10 %iges SDS-Gel nach Laemmli (1970) verwendet. Pro Spur wurden ca. 5 μ g Gesamtprotein aufgetragen, die Nitrilasebande ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Um die schnelle Hydrolyse des Nitrils unter den gewählten Bedingungen zu bestätigen, wurden zwei voneinander unabhängige Kulturen von *E. coli* JM109(pIK9) erneut im 2-Phasensystem mit 7 mM 2-PPN in der HMeN-Phase angezogen und die 2-PPN/2-PPS Gehalte in den wässrigen Kulturüberständen mittels HPLC bestimmt. Nach ca. 24 h Inkubation waren in den Kulturüberständen bereits knapp die Hälfte des eingesetzten Nitrils zu 2-PPS hydrolysiert, obwohl zu diesem Zeitpunkt noch kein Zellwachstum stattgefunden hatte (Tab. 3.6). Offenbar wurde bei dem hier beschriebenen 2-Phasensystem von den Zellen zunächst das Nitril hydrolysiert und erst im Anschluss wurden hohe Zelldichten erreicht.

Grundlage des Selektionssystems ist der (bei der Nitril-Hydrolyse frei werdende) Ammoniak, welcher unter neutralen Bedingungen protoniert in Form von Ammoniumionen vorliegt und von den Organismen als einziger Stickstoffquelle genutzt werden kann. Die erfolgreiche Selektion von Nitrilasevarianten mit erhöhter Enzymaktivität gegenüber sterisch anspruchsvollen Nitrilen setzt voraus, dass die entsprechenden Zellen einen Wachstumsvorteil aufgrund ihrer schnellen Nitril-Hydrolyse haben. Das frühe Vorliegen von frei verfügbarem NH_4^+ im Medium in Kombination mit dem geringen Zellwachstum würde deshalb voraussichtlich zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Tabelle 3.6: Freisetzung von 2-PPS aus 2-PPN im 2-Phasensystem durch nicht-wachsende Zellen von *E. coli* JM109(pIK9).

Inkubationszeit (h)	OD ₆₀₀	2-PPN ¹ (mM)	2-PPS ¹ (mM)
0	0,055 \pm 0,014	0,32 \pm 0,002	0 \pm 0
24	0,048 \pm 0,008	0,16 \pm 0,009	1,15 \pm 0,131
40	0,403 \pm 0,031	0,03 \pm 0,003	2,34 \pm 0,024
45	0,703 \pm 0,003	0,03 \pm 0,010	2,32 \pm 0,045

¹ Konzentration in der wässrigen Phase

3.4.6 Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) auf verschiedenen Festmedien mit 2-PPN als einziger Stickstoffquelle

Eine Alternative zur Flüssigkultur stellt die Selektion auf Festmedien mit einem Nitril als einziger Stickstoffquelle dar, wodurch möglicherweise verhindert werden kann, dass die bei der Nitril-Hydrolyse entstehenden Ammoniumionen allen vorhandenen Zellen zur Verfügung stehen. Es wurde daher nachfolgend untersucht, ob eine Kultivierung von *E. coli* JM109(pIK9) auf Festmedien mit 2-PPN als einziger Stickstoffquelle möglich ist. Außerdem stellte sich dabei die Frage, ob mikrobiologische Geliermittel zur Verfügung stehen, die keine für die Zellen verfügbaren Stickstoffquellen enthielten. Hierfür wurde der Stamm zunächst in Flüssigkultur (Minimalmedium mit Ammoniumsulfat und 100 µg/mL Ampicillin) bei 37°C angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und anschließend dreimal in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) gewaschen und schließlich eine optische Dichte (600 nm) von 1 eingestellt. Nach dem Erstellen dekadischer Verdünnungen in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) wurde auf Festmedien ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Die Festmedien bestanden aus Minimalmedium mit 1 % Glycerin als C-Quelle sowie 100 µg/mL Ampicillin, 0,2 % (w/v) Rhamnose und 2-PPN (2 mM) als einziger Stickstoffquelle. Folgende Agaresen/Agar wurden verwendet: LE (low electro-endosmosis) Agarose (Biozym), Low-melt Agarose (Biozym), Ultra pure Agarose (Invitrogen) sowie Bacto-Agar (Difco). Zur Kontrolle wurde jeweils zusätzlich auf die entsprechenden Festmedien ohne Stickstoffquelle ausplattiert, um festzustellen, ob die verwendeten Geliermittel Reste an, für die Bakterien verwertbaren, Stickstoff enthielten.

E. coli JM109(pIK9) zeigte auf allen verwendeten Festmedien, denen 2-PPN als einziger Stickstoffquelle zugesetzt wurde, Koloniebildung. Im Allgemeinen waren Kolonien nach ca. 5 Tagen Inkubation deutlich sichtbar. Die Zellen wuchsen allerdings auch auf den entsprechenden Platten ohne 2-PPN und die Kolonien waren hierbei bereits nach 2-3 Tagen Inkubation sichtbar. Im Vergleich zum Wachstum auf LB-Agarplatten zeigte *E. coli* JM109(pIK9) auf allen Minimalplatten (mit 2-PPN bzw. ohne zugesetzte Stickstoffquelle) sehr schleimige Kolonien. Das Wachstum auf den Minimalagarplatten ohne Stickstoffzugabe konnte nicht auf das Vorhandensein von Ammoniumionen im zur Herstellung der Medien verwendeten Wasser zurückgeführt werden, da die Ammoniumkonzentration in dem verwendeten Millipore Wasser lediglich 1,35 µM betrug (bestimmt mittels Aquaquant-Test). Zur Kontrolle der Geliermittel wurden diese mit Wasser extrahiert und die wässrigen Überstände hinsichtlich ihres Ammoniumgehaltes untersucht. Diese lagen ebenfalls im niedrigen µ-molaren Bereich. Da zur Herstellung der Minimalagarplatten dieselben Lösungen wie für die Herstellung von Flüssigmedien verwendet wurden, konnten Stickstoffverunreinigungen in den Lösungen ebenfalls ausgeschlossen werden, da in den zuvor beschriebenen Stickstoff-freien Medien (z.B. Kapitel 3.4.2) kein Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) zu beobachten war. Es erscheint daher plausibel, dass die Geliermittel andere Stickstoffverbindungen enthielten (z.B. Nitrat). Da es nicht gelang Stickstoff-freies Festmedium herzustellen, wurde die Vorgehensweise nicht weiter verfolgt.

3.4.7 Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) in 2-Phasensystemen mit HMeN und 2-PPN als einziger Stickstoffquelle in Gegenwart unterschiedlicher Rhamnosekonzentrationen

Die bisherigen Untersuchungen hatten ergeben, dass bei der Induktion der Nitrilase mit 0,2 % (w/v) Rhamnose die Zellen bereits in einem sehr frühen Stadium des Wachstums 2-PPN unter Freisetzung von Ammonium hydrolysierten und erst nach der vollständigen Umsetzung des Nitrils hohe Zelldichten erreicht wurden. Im Hinblick auf eine geplante Zufallsmutagenese war unter diesen Bedingungen die Anreicherung von Klonen mit erhöhter Aktivität gegenüber sterisch anspruchsvollen Nitrilen durch mehrfaches Überimpfen voraussichtlich nicht möglich. Es wurde daher versucht, die 2-PPN Hydrolyse zu verlangsamen und damit das Wachstum der Zellen stärker an die Umsetzung des Nitrils zu koppeln. Hierzu wurde die Rhamnosekonzentration in den Flüssigkulturen verringert und das Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) sowie der Umsatz von 2-PPN zu 2-PPS mittels HPLC analysiert. Die organische Phase enthielt hierbei 7 mM 2-PPN, außerdem wurde zum Vergleich eine Kultur mitgeführt, welcher 15 mM 2-PPN zugesetzt wurde.

Bei Verwendung von 0,002 bzw. 0,0002 % (w/v) Rhamnose zeigte *E. coli* JM109(pIK9) im Ammonium-freien Minimalmedium ähnliche Wachstumsverläufe, wobei die Generationszeit etwa 4 Stunden betrug (Abb. 3.22). Ein weiteres Absenken der Rhamnosekonzentration auf 0,00002 bzw. 0 % führte zu einer verringerten Wachstumsrate (Generationszeit ca. 19 h) (Abb. 3.22). Darüber hinaus verlängerte eine höhere 2-PPN-Konzentration (15 mM) in der HMeN-Phase die lag-Phase stark.

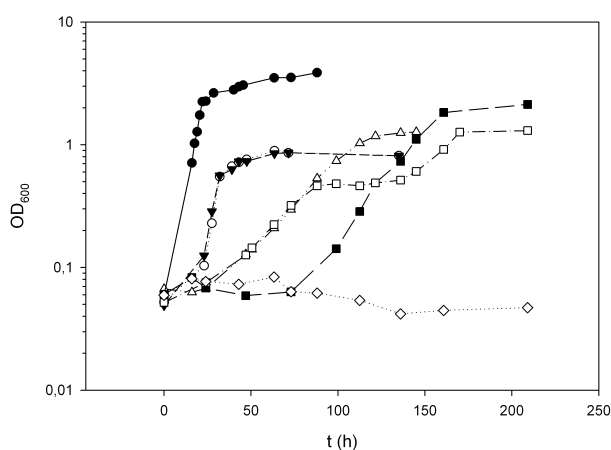


Abbildung 3.22: Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) im 2-Phasensystem mit HMeN (25 %, v/v) als Substratreservoir für 2-PPN in Gegenwart abnehmender Rhamnosekonzentrationen. Die Anzucht von *E. coli* JM109(pIK9) erfolgte in 10 mL Ammonium-freiem Minimalmedium (Zusammensetzung entsprechend Kap. 2.5.2) mit 100 µg/mL Ampicillin in 100 mL-Schikanenkolben bei 37°C für 24 h unter Schütteln. Die Zellen (2 mL) wurden durch Zentrifugation (6000 rpm, 10 min, 4°C) geerntet, einmal in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) gewaschen und in 2 mL des gleichen Puffers resuspendiert. Je 210 µL der gewaschenen Zellen wurden in 21 mL Ammonium-freies Minimalmedium überimpft, dem 100 µg/mL Ampicillin und 0,002 % (○), 0,0002 % (▼), 0,00002 % (△) bzw. 0 % (□) Rhamnose (w/v) zugesetzt waren. Als organische Phase wurden je 7 mL HMeN zugegeben, das 2-PPN in einer Konzentration von 7 mM als einzige Stickstoffquelle enthielt und die Kulturen in 300 mL-Schikanenkolben bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Zum Vergleich wurde eine Kultur mitgeführt, die 0,00002 % (w/v) Rhamnose sowie 15 mM 2-PPN in der HMeN-Phase enthielt (■). Als Kontrollen dienten Kulturen mit 0,5 g/L (NH₄)₂SO₄ als anorganischer Stickstoffquelle (●) bzw. ohne Stickstoffquelle (◇).

In der Abb. 3.23 sind die Wachstumskurven von *E. coli* JM109(pIK9) mit 7 mM 2-PPN in der HMeN-Phase aus Abb. 3.22 einzeln mit den, mittels HPLC bestimmten, 2-PPN und 2-PPS Konzentrationen in den Überständen der wässrigen Phasen dargestellt. Die Ergebnisse zeigten, dass durch Verringerung der Rhamnosekonzentration das Wachstum der Zellen stärker an die Umsetzung des Nitrils gekoppelt werden konnte. Die beste Korrelation zwischen der Hydrolyse des Nitrils und dem Wachstum der Zellen ergab sich, wenn der wässrigen Phase keine Rhamnose zugesetzt wurde (Abb. 3.23(d)).

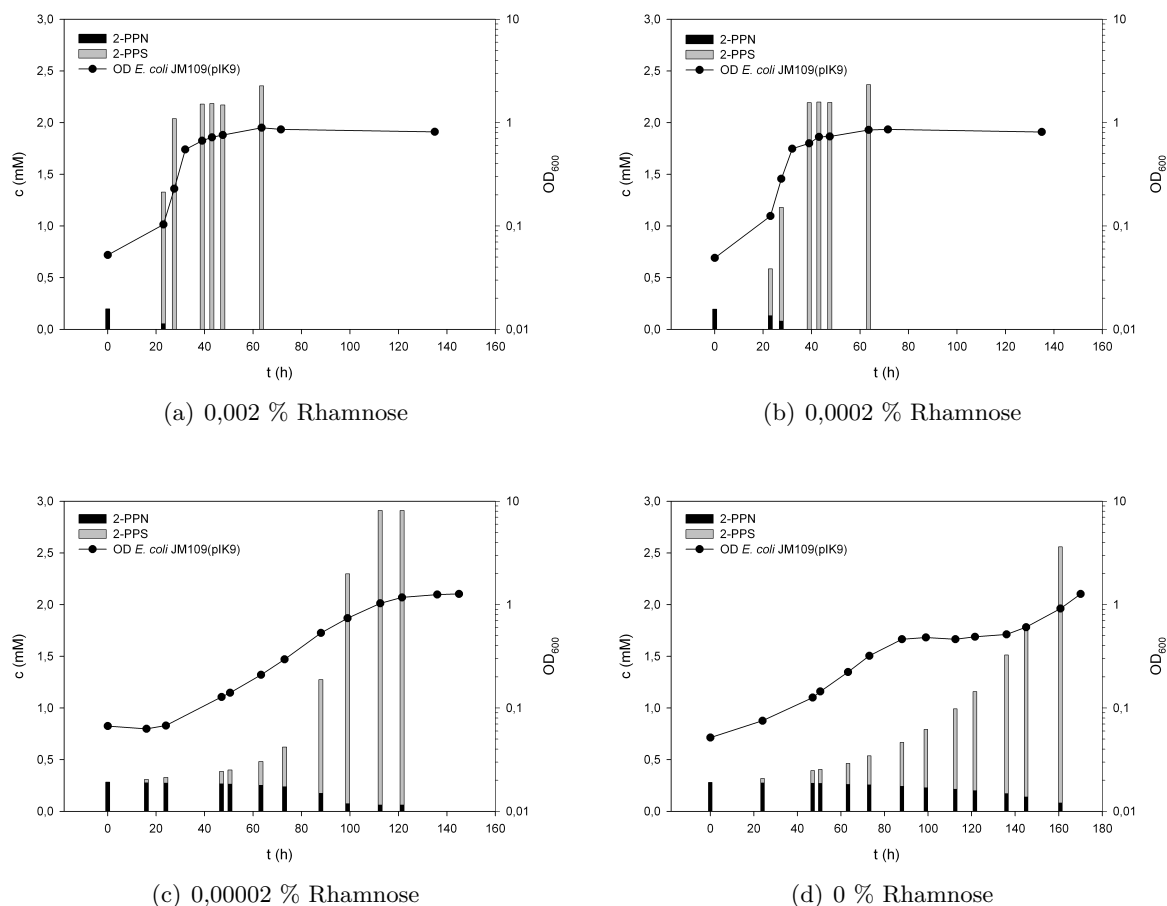


Abbildung 3.23: 2-PPN und 2-PPS Gehalte in den Kulturüberständen der wässrigen Phasen beim Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) im 2-Phasensystem mit 25 % (v/v) HMeN als Substratreservoir für 2-PPN. Es wurden die 2-PPN und 2-PPS Gehalte in den Kulturüberständen der in Abb. 3.22 gezeigten Experimente analysiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben aus beiden Phasen entnommen und die Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) entfernt. Anschließend erfolgte die Analyse der wässrigen Kulturüberstände hinsichtlich ihrer Konzentrationen an 2-PPN und 2-PPS mittels HPLC.

3.4.8 Co-Kultur aus *E. coli* JM109(pIK9) und *E. coli* JM109(pIK7) im 2-Phasensystem

Um festzustellen, ob mit dem oben beschriebenen 2-Phasensystem die Selektion eines optimierten Nitril-hydrolysierenden Stammes aus einer Mutantenschar prinzipiell erreicht werden kann, wurde ein Co-Kultur Experiment mit den Stämmen *E. coli* JM109(pIK9) und *E. coli* JM109(pIK7)

durchgeführt. Es wurde hierbei ausgenutzt, dass rekombinante Zellen, welche die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 synthetisierten, mit dem Modells substrat 2-PPN bei pH 7 eine ca. 5-fach höhere spezifische Aktivität aufwiesen als rekombinante Zellen, welche die Nitrilase aus *Alcaligenes faecalis* ATCC8750 synthetisierten (Kap. 3.1). Die beiden Stämme wurden bei 37°C in Minimalmedium mit Ammoniumsulfat als anorganischer Stickstoffquelle und Ampicillin (100 µg/mL) angezogen, die Zellen in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) gewaschen und eine Co-Kultur in einem Verhältnis von *E. coli* JM109(pIK9) zu *E. coli* JM109(pIK7) von 1:2 mit den gewaschenen Zellen angeimpft. Hierzu wurde der wässrigen Phase keine Rhamnose zugesetzt und die 2-PPN-Konzentration in der HMeN-Phase (25 %, v/v) betrug 7 mM. Die verbleibenden Volumina der Vorkulturen wurden gemischt, in 5 Aliquots aufgeteilt und eingefroren (Kontrollproben). Anschließend wurde die Kultur bei 30°C inkubiert und regelmäßig Proben entnommen. Die (erste) Wachstumskurve der Co-Kultur mit den zugehörigen 2-PPN und 2-PPS Gehalten in den Überständen der wässrigen Phase ist in Abb. 3.24 dargestellt. Das Wachstum der Zellen war hierbei an die kontinuierliche enzymatische Hydrolyse des Nitrils gekoppelt.

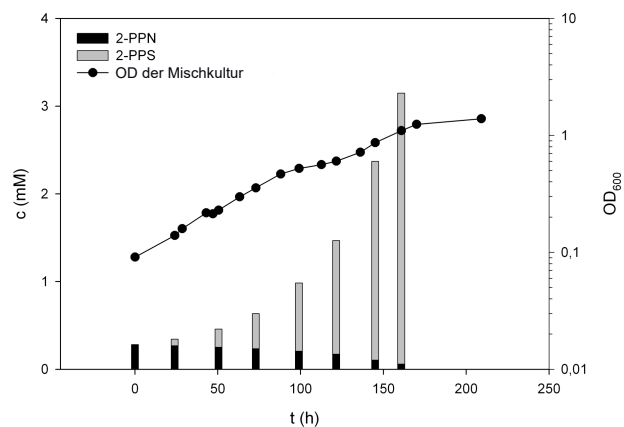


Abbildung 3.24: Wachstum einer Co-Kultur aus *E. coli* JM109(pIK9) und *E. coli* JM109(pIK7) im 2-Phasensystem mit HMeN (25 %, v/v) als Substratreservoir für 2-PPN. Die Anzucht von *E. coli* JM109(pIK9) und *E. coli* JM109(pIK7) erfolgte jeweils in 10 mL Minimalmedium (Zusammensetzung entsprechend Kap. 2.5.2) mit 100 µg/mL Ampicillin in 100 mL-Schikanenkolben bei 37°C für 24 h unter Schütteln. Die Zellen (2 mL) der beiden Stämme wurden durch Zentrifugation (6000 rpm, 10 min, 4°C) geerntet, einmal in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) gewaschen und in 2 mL des gleichen Puffers resuspendiert. Die gewaschenen Zellen der beiden Stämme wurden in einem Verhältnis von *E. coli* JM109(pIK9) zu *E. coli* JM109(pIK7) von 1:2 in 21 mL Ammonium-freies Minimalmedium mit 100 µg/mL Ampicillin überimpft. Es wurden 7 mL HMeN zugegeben, das 2-PPN in einer Konzentration von 7 mM als einzige Stickstoffquelle enthielt und die Kultur in einem 300 mL-Schikanenkolben bei 30°C unter Schütteln inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben aus beiden Phasen entnommen und die wässrigen Kulturüberstände hinsichtlich ihres 2-PPN und 2-PPS Gehaltes mittels HPLC analysiert.

Die Zellen der Co-Kultur wurden nach dem Erreichen von optischen Dichten (600 nm) zwischen 0,3 bis 0,8 insgesamt dreimal im Verhältnis 1:5000 (v/v) in frisches Medium mit der gleichen Zusammensetzung überimpft. Nach dem dritten Überimpfen wurde eine Verdünnungsreihe des Ansatzes auf M9-Agar mit 100 µg/mL Ampicillin ausplattiert (Keimzahl: $6,7 \cdot 10^8$ KBE/mL). Von der Platte wurden 30 Kolonien zufällig gepickt, die Plasmide isoliert (siehe Kap. 2.8.1) und mit den Restriktionsendonukleasen *PvuI* und *EcoRV* verdaut. Ebenso wurde mit den Kontrollproben verfahren (Plasmidisolierung und Restriktionsverdau). Beim Restriktionsverdau wurde ausgenutzt, dass eine

EcoRV Schnittstelle nur im Nitrilasegen von *P. fluorescens* EBC191 vorhanden ist (aber nicht in dem homologen Gen aus *Alcaligenes faecalis* ATCC8750). Dagegen liegt die *PvuI* Schnittstelle im Ausgangsplasmid. Daher sollte Plasmid-DNA von *E. coli* JM109(pIK9) nach dem Verdau mit den beiden Restriktionsenzymen zwei Fragmente mit Größen von 1192 bp und 4166 bp ergeben. Wohingegen das Plasmid pIK7 lediglich 1 Fragment (linearisiertes Plasmid) mit einer Größe von 5376 bp ergeben sollte. Die Restriktionsmuster der, aus 30 zufällig gepickten Kolonien, isolierten Plasmide (inklusive der Kontrollproben) sind in Abb. 3.25 gezeigt.

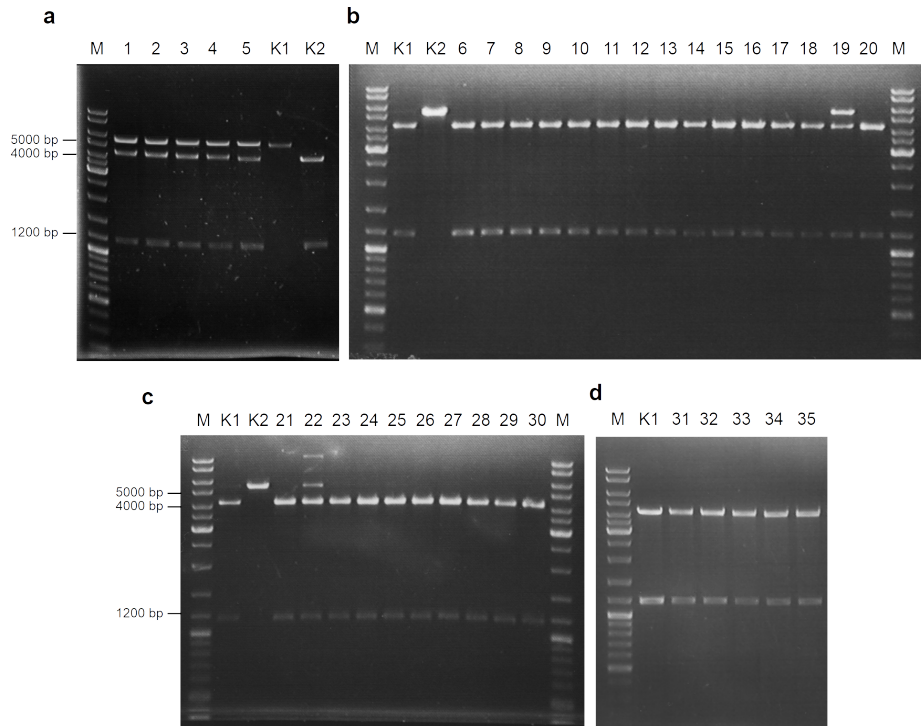


Abbildung 3.25: Agarosegele verschiedener mit den Restriktionsendonukleasen *PvuI* und *EcoRV* geschnittener Plasmide aus dem Co-Kultur Experiment (die Durchführung des Co-Kultur Experiments kann der Legende zu Abb. 3.24 entnommen werden). Von den auf der M9-Agarplatte vorhandenen Kolonien wurden 30 Kolonien zufällig gepickt, die Plasmid-DNA isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen *PvuI* und *EcoRV* geschnitten. Je 10 μL dieser Plasmid-Präparationen wurden mit je 2 μL 6-fach Ladepuffer gemischt und auf die 1 %-igen Agarosegele aufgetragen. Mit den 5 Kontrollproben wurde entsprechend verfahren (siehe Text). Als Kontrollplasmide wurden eingesetzt: pIK9 (Spur K1) und pIK7 (Spur K2). Spuren M: 5 μL DNA-Größenstandard (Fermentas), Spuren 1 - 5: geschnittene Plasmide der Kontrollproben, Spuren 6 - 35: geschnittene Plasmide der 30 Kolonien nach dem dritten Überimpfen der Co-Kultur.

In den Kontrollproben (Nr. 1 - 5) wurden die Stämme als Mischung aus *E. coli* JM109(pIK9) und *E. coli* JM109(pIK7) aufgetragen. Die untersuchten Kolonien nach dem dritten Überimpfen der Co-Kultur (3.25, Nr. 6 - 35) konnten *E. coli* JM109(pIK9) zugeordnet werden. Zur Absicherung wurde das Plasmid von Kolonie Nr. 32 mit dem Primer pJ-F (setzt im Expressionsvektor „vor dem Nitrilasegen“ an) sequenziert. Es ergab sich eine Übereinstimmung mit dem Nitrilasegen aus *P. fluorescens* EBC191 von 100 %. Bei den Kolonien Nr. 19 und 22 waren nach dem Restriktionsverdau mit *PvuI* und *EcoRV* zusätzlich DNA-Banden auf Höhe des geschnittenen Plasmids pIK7 vorhanden. Dies kann entweder darauf zurückgeführt werden, dass die Plasmide nicht vollständig geschnitten waren oder dass in diesen Fällen keine Einzelkolonien gepickt wurden. Mit dem Experiment konnte gezeigt werden, dass sich beim hier beschriebenen Selektionssystem der *E. coli*

Stamm in einer Co-Kultur durchsetzen kann, der 2-PPN mit höherer spezifischer Aktivität umsetzt (*E. coli* JM109(pIK9)).

3.4.9 Verteilungskoeffizient von 2-Methyl-2-phenylpropannitril (MMN) im 2-Phasensystem mit HMeN

Die zuvor beschriebenen Vorversuche hatten gezeigt, dass es prinzipiell möglich erschien mit einem 2-Phasensystem auf „verbesserte“ Nitrilasevarianten hin zu selektieren. Im Hinblick auf die Selektion von Nitrilasevarianten mit einer erhöhten Aktivität gegenüber sterisch anspruchsvollen Nitrilen, wurde als Modellsubstrat 2-Methyl-2-phenylpropannitril (MMN) ausgewählt, da es bei neutralem pH-Wert stabil ist und die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 bereits eine geringe Aktivität für dieses Nitril zeigte (Kap. 3.3.3 und 3.3.4). MMN ist aufgrund der zusätzlichen Methyl-Gruppe am α -Kohlenstoffatom deutlich apolarer als das in den vorangegangenen Versuchen verwendete 2-PPN und weist infolgedessen einen höheren log P-Wert sowie eine geringere Wasserlöslichkeit auf (Tab. 3.7).

Tabelle 3.7: Vergleich der Wasserlöslichkeit und log P-Werte von 2-Phenylpropannitril (2-PPN) und 2-Methyl-2-phenylpropannitril (MMN).

Substanz	Wasserlöslichkeit ¹ (g/L)	Wasserlöslichkeit ¹ (mmol/L)	log P ¹
2-PPN	0,29	2,2	1,6 ± 0,2
MMN	0,07	0,48	2,0 ± 0,2

¹ bei 25°C, Werte entnommen aus der SciFinder Datenbank

Es war daher zu erwarten, dass dies im zuvor entwickelten 2-Phasensystem dazu führt, dass bei einer bestimmten MMN-Konzentration in der HMeN-Phase im Vergleich zu 2-PPN deutlich geringere Mengen des Nitrils in der wässrigen Phase vorliegen würden. Aus diesem Grund wurde zunächst der Verteilungskoeffizient von MMN im 2-Phasensystem mit 25 % (v/v) HMeN bestimmt (Tab. 3.8). Hierfür wurde Ammonium-freies Minimalmedium (9 mL) mit HMeN (3 mL) versetzt, das MMN in verschiedenen Konzentrationen enthielt. Die Versuchsansätze wurden 1 h bei 30°C unter Schütteln (600 rpm) inkubiert und die MMN-Konzentrationen in den wässrigen Phasen anschließend mittels HPLC bestimmt. Der Versuch zeigte, dass um eine ähnlich hohe Konzentration an MMN in der wässrigen Phase zu erzielen wie in den vorangegangenen Versuchen mit 2-PPN (etwa 0,3 mM, vgl. Tab. 3.5 und 3.6), muss MMN in der HMeN-Phase in einer Konzentration von 35 mM vorgelegt werden.

Tabelle 3.8: Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von MMN im 2-Phasensystem mit 25 % (v/v) HMeN.

MMN Gehalt ¹ (mM)	MMN Gehalt in wässriger Phase (mM)	MMN Gehalt in HMeN Phase ² (mM)	$K_{\text{HMeN/Wasser}}$	log D
7	0,07	6,80	101,51	2,01
35	0,32	34,05	107,39	2,03
50	0,42	48,73	115,35	2,06

¹ in der HMeN-Phase vorgelegte Konzentration

² berechnet

3.4.10 *In-vivo*-Mutagenese mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)

Als erster Test, ob sich das zuvor beschriebene Selektionssystem zur Anreicherung von nach Zufallsmutagenese veränderten Nitrilasevarianten eignet, wurde zunächst eine ungerichtete Mutantenbibliothek mit Hilfe des Mutagens N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) erzeugt. Hierbei liegt ein Vorteil der MNNG-Mutagenese in der einfachen Durchführbarkeit sowie der hohen Ausbeute an Mutanten.

Zur Verbesserung eines Enzyms werden in vielen Fällen nur wenige Aminosäure-Austausche benötigt. Dagegen führt eine hohe Anzahl an AS-Austauschen vielfach eher zur Inaktivierung des Enzyms, da die meisten Austausche, statistisch betrachtet, schädlich für die Struktur oder Funktion eines Proteins sind. Um einen hohen Anteil enzymatisch aktiver Klone zu erzeugen, wurde daher eine Mutationsrate von ein bis zwei AS-Austauschen in der Nitrilase angestrebt (Steipe, 1999). Bei der *in-vivo*-Mutagenese mit MNNG kann die Mutationsrate u.a. durch die Mutagenkonzentration gesteuert werden, wobei die optimale MNNG-Konzentration vom verwendeten Bakterienstamm abhängt. Die Angaben in der Literatur sind dementsprechend für verschiedene Organismen vielfältig und erstrecken sich in etwa von 10 bis 1000 µg/mL (Lucchesi et al., 1986; Adelberg et al., 1965; Holtz und Topal, 1994; Ohnishi et al., 2008; Arshad et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Mutagenese mit MNNG der *recA*⁺ Stamm *E. coli* BW3110(pIK9) eingesetzt, der über ein DNA-Reparatursystem verfügt und folglich widerstandsfähiger gegenüber dem stark toxischen Mutagen ist. MNNG wurde einer Kultur von *E. coli* BW3110(pIK9) zunächst in Konzentrationen von 100 - 1000 µg/mL zugesetzt, wobei die Mutagenese entsprechend Kapitel 2.9.3 durchgeführt wurde. Bei Zugabe von 250 - 1000 µg/mL MNNG wurde kein Zellwachstum mehr beobachtet. Die Mutagenkonzentration wurde aus diesem Grund auf 20 - 200 µg/mL reduziert. Bei Zusatz von 20 und 50 µg/mL MNNG zeigten die Zellen gegenüber der Kontrolle ohne MNNG fast unverändertes Wachstum. Es wurde deshalb davon ausgegangen, dass die Mutationsrate bei diesen Konzentrationen zu niedrig war. Die Isolation der Plasmide aus den Zellen zeigte, dass bei Konzentrationen < 100 µg/mL MNNG noch diskrete Plasmidbanden gefunden wurden, während dies bei Mutagenkonzentrationen ab 150 µg/mL nicht der Fall war (Abb. 3.26a).

Dementsprechend wurden anschließend Konzentrationen zwischen 60 - 90 µg/mL MNNG getestet. Hierbei nahm die optische Dichte (600 nm) der Kulturen, denen 70 - 90 µg/mL des Mutagens zugesetzt worden waren, während der 16-stündigen Einwirkzeit von MNNG nicht weiter zu. Die Zellen der mit 60 µg/mL MNNG behandelten Kultur waren während der Einwirkzeit des Mutagens in der Lage geringfügig weiter zu wachsen (von OD₆₀₀ = 0,48 zum Zeitpunkt der MNNG-Zugabe auf OD₆₀₀ = 0,71). Auf dem zugehörigen Agarosegel waren bei allen eingesetzten MNNG Konzentrationen diskrete Plasmidbanden nachweisbar (Abb. 3.26b).

Zur Bestimmung der Mutationsrate wurden die mit 60 bzw. 100 µg/mL MNNG mutagenisierten Plasmide aus *E. coli* BW3110 isoliert, für die Transformation von *E. coli* JM109 eingesetzt und die beiden Transformationsansätze auf LB-Agar mit 100 µg/mL Ampicillin ausplattiert. Anschließend wurden 12 Klone zufällig gepickt, die Plasmid-DNA isoliert und die Nitrilase-Gene mit den Primern pJ-F und pJ-R sequenziert. Die Mutageneserate der Bank, die mit 60 µg/mL MNNG erzeugt worden war, lag bei etwa 2,4 Mutationen pro kb, wobei durchschnittlich ca. 1,9 AS in der Nitrilase

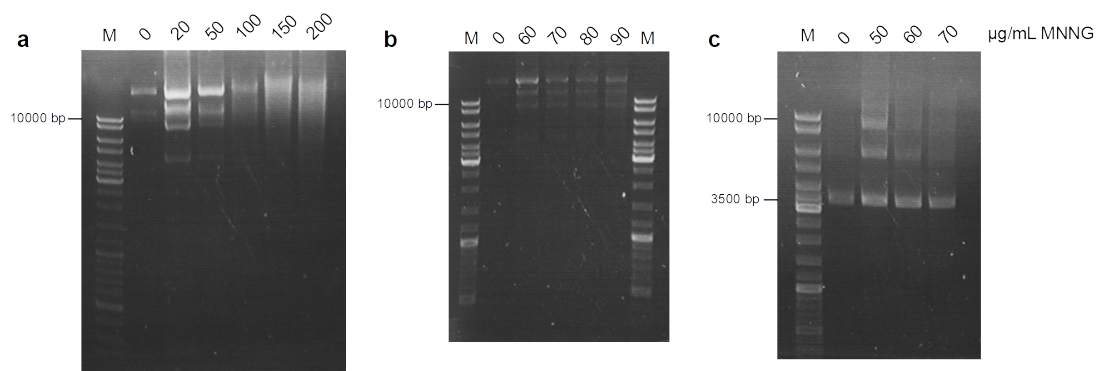


Abbildung 3.26: Agarosegele des Plasmids pIK9 nach chemischer *in-vivo*-Mutagenese mit unterschiedlichen MNNG-Konzentrationen. *E. coli* BW3110(pIK9) wurde in dYT-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin bei 37°C angezogen. Nach dem Überimpfen (1:200, v/v) in LB-Amp-Medium wurde die Kultur bis zum Erreichen einer optischen Dichte (600 nm) von etwa 0,4 bei 37°C und 140 rpm inkubiert, die Zellen anschließend in Portionen zu 10 bzw. 20 mL aliquotiert, mit MNNG (1 mg/mL in DMSO) in Endkonzentrationen von 20 - 200 µg/mL versetzt und für 16 Stunden bei 37°C unter Schütteln weiter inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA isoliert und mittels Agarose-Gelelektrophorese (a und b: 1 % (w/v) Agarose, c: 0,75 % (w/v) Agarose) untersucht. Als Kontrollen (0) wurden aus der LB-Kultur vor der MNNG Zugabe 10 bzw. 20 mL entnommen und ebenfalls die Plasmid-DNA isoliert. Pro Spur wurden 5 µL der Plasmid-Präparationen aufgetragen. M: 5 µL DNA-Größenstandard (Fermentas).

ausgetauscht waren. Die zweite Bank (mit 100 µg/mL MNNG erzeugt) war sehr inhomogen, da entweder enorm viele oder überhaupt keine Mutationen im Zielgen vorhanden waren. Das häufige Auftreten von A/G-Doppelpeaks bei den Sequenzierungen (insbesondere bei den mit 100 µg/mL MNNG mutagenisierten Plasmiden; nicht dargestellt) deutete an, dass das Plasmid pIK9 in den Zellen dimerisiert vorlag (J. Altenbuchner, persönliche Mitteilung). Zur Überführung der Plasmid-Dimere in die Monomere wurde der Stamm *E. coli* JM109 mit der Plasmid-DNA des Stammes *E. coli* BW3110(pIK9) entsprechend Kapitel 2.8.8 transformiert und ein Aliquot des Ansatzes (50 µL) auf LB-Agarplatten mit 100 µg/mL Ampicillin ausplattiert. Von 10 Einzelkolonien, die auf der Agarplatte gewachsen waren, wurde anschließend die Plasmid-DNA isoliert und auf ein 0,75 %-iges Agarosegel aufgetragen. Bei einer Plasmidpräparation der untersuchten Kolonien lag das Plasmid pIK9 offenbar als Monomer vor, während in den anderen Präparationen offenbar dimere oder multimere Formen des Plasmids vorlagen. Die Plasmid-DNA dieser Kolonie wurde verwendet, um den Stamm *E. coli* BW3110 neu zu transformieren. Die *in-vivo*-Mutagenese wurde anschließend mit dem neu transformierten *E. coli* BW3110(pIK9) Stamm mit MNNG-Konzentrationen von 50 - 70 µg/mL wiederholt und anschließend die Plasmide isoliert (Abb. 3.26c). Bei dieser Mutagenese-Runde nahm die optische Dichte (600 nm) der mit 60 µg/mL MNNG behandelten Kultur während der 16-stündigen Einwirkzeit des Mutagens geringfügiger zu als bei der zuvor durchgeführten Mutagenese (von $OD_{600} = 0,42$ zum Zeitpunkt der MNNG-Zugabe auf $OD_{600} = 0,5$). Die mutagenisierten Plasmide aus diesem Experiment wurden anschließend zur Bestimmung der Mutationsrate eingesetzt. Hierfür wurden Zellen von *E. coli* JM109 mit den mutagenisierten Plasmiden transformiert und der Transformationsansatz auf LB-Agarplatten mit 100 µg/mL Ampicillin ausplattiert. Anschließend wurden 10 Klone zufällig gepickt, die Plasmid-DNA isoliert und wiederum mit den Primern pJ-F und pJ-R sequenziert.

Die im Nitrilasegen aus *P. fluorescens* EBC191 nachgewiesenen Mutationen sind in Tab. 3.9

aufgeführt, wobei das durch MNNG mutagenisierte Plasmid pIK9 nachfolgend in pRMS umbenannt wurde. Die Mutationen waren über das gesamte Nitrilasegen verteilt, bei drei (pRMS60.1, pRMS60.5 und pRMS60.8) von zehn Klonen war jedoch überhaupt keine Mutation im Zielgen vorhanden. Die durchschnittliche Mutageneserate bei den Klonen der Bank lag bei 1,6 Mutationen pro kb, wobei durchschnittlich 1,2 Aminosäuren in der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 ausgetauscht waren. Übereinstimmend mit früheren Berichten verursachte MNNG primär GC → AT Transitionen (Lucchesi et al., 1986). Bei der Durchmusterung der Bibliothek mit Hilfe eines Screening-Verfahrens würde die hohe Anzahl an Klonen mit unverändertem Nitrilasegen einen erhöhten Screening-Aufwand bedeuten. Da bei dem in Kapitel 3.4.8 beschriebenen Selektionssystem ein Klon mit einer verbesserten Substratspezifität gegenüber sterisch anspruchsvollen Nitrilen nur dann selektiert werden kann, wenn er sich gegen alle im Medium enthaltenen Zellen durchsetzt, sollte sich das Vorhandensein von Klonen mit unverändertem Nitrilasegen auf die Selektion nicht negativ auswirken.

Tabelle 3.9: Mit Hilfe der MNNG Mutagenese im Nitrilasegen aus *P. fluorescens* EBC191 erzeugte Mutationen. Die Versuchsdurchführung wurde im Text beschrieben.

Plasmid	Position der Mutation im Nitrilasegen	Codon WT	Codon Mutante	AS-Austausch oder stille Mutation
pRMS60.2	112	gct	act	Ala38Thr
	197	ggc	gac	Gly66Asp
	770	ggc	gac	Gly257Asp
pRMS60.3	590	gct	gtt	Ala197Val
	716	tct	ttt	Ser239Phe
pRMS60.4	444	gac	gat	Asp148Asp
	823	ctc	ttc	Leu275Phe
	898	cct	tct	Pro300Ser
pRMS60.6	260	cgg	cag	Arg87Gln
	1043	ggc	gac	Gly348Asp
pRMS60.7	832	gat	aat	Asp278Asn
	1026	gag	gaa	Glu342Glu
pRMS60.9	390	aag	aaa	Lys130Lys
	829	gcg	acg	Ala277Thr
pRMS60.10	516	tcc	ttc	Ser172Phe
	1019	agt	ggt	Ser340Gly

3.4.11 Etablierung eines Selektionssystems mit einem Nitril als einziger Stickstoffquelle nach *in-vivo*-Mutagenese mit MNNG

Die nach Behandlung mit 60 µg/mL MNNG erhaltenen Plasmide (= pRMSX.X) wurden durch Elektroporation in *E. coli* JM109 eingebracht. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C in Minimalmedium (Zusammensetzung entsprechend 2.5.2) wurden die Zellen in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) gewaschen, um das im Medium enthaltene Ammoniumsulfat zu entfernen. Ein Teil des Ansatzes (50 µL) wurde zur Bestimmung der Transformationsrate auf LB-Agar mit 100

$\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin ausplattiert. Die verbleibenden 950 μL des Transformationsansatzes wurden zum Beimpfen der nachfolgenden Versuchsansätze (2-Phasensysteme) verwendet:

1. Negativkontrolle in 100 mL Erlenmeyerkolben: 90 μL Transformationsansatz in 9 mL Ammonium-freiem Minimalmedium mit 3 mL HMeN;
2. Positivkontrolle in 100 mL-Erlenmeyerkolben: 90 μL Transformationsansatz in 9 mL Ammonium-freiem Minimalmedium mit 3 mL HMeN, das 2-PPN in einer Konzentration von 7 mM enthielt;
3. Versuchsansatz in 1 L-Erlenmeyerkolben: 770 μL Transformationsansatz in 69 mL Ammonium-freiem Minimalmedium mit 23 mL HMeN, das MMN in einer Konzentration von 35 mM enthielt.

Als weitere Kontrolle wurden elektrokompetente Zellen von *E. coli* JM109 mit pIK9 Plasmid-DNA (die zuvor nicht mit MNNG mutagenisiert worden war) transformiert und ein Teil der in Na/K-Phosphatpuffer gewaschenen Zellen (50 μL) zur Bestimmung der Transformationsrate eingesetzt. 100 μL der gewaschenen Zellen wurden in 9 mL Stickstoff-freies Minimalmedium mit 3 mL HMeN, das MMN in einer Konzentration von 35 mM enthielt, transferiert (Kontrollkolben).

Die Kulturmedien enthielten außerdem 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin zur Selektion auf Transformanden. Die Erlenmeyerkolben wurden anschließend bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Sobald Zellwachstum im Versuchsansatz festgestellt werden konnte, wurde im Verhältnis 1:5000 (v/v) in frisches Medium (mit MMN als einziger Stickstoffquelle) überimpft. Bei jedem Überimpfungsschritt wurde eine Verdünnungsreihe in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) erstellt und die Verdünnungsstufen 10^{-6} und 10^{-7} auf LB-Agar mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin ausplattiert sowie ein Aliquot tiefgefroren. Um zu kontrollieren, ob das Wachstum der Zellen auf die Hydrolyse der Nitrile (MMN bzw. 2-PPN) zurückzuführen war, wurden Proben aus den Kulturen entnommen und die wässrigen Überstände hinsichtlich ihrer MMN und MMS bzw. 2-PPN und 2-PPS Gehalte mittels HPLC analysiert. Das erste Überimpfen aus dem Versuchsansatz fand nach 294 Stunden Inkubation bei einer OD_{600} von 0,253 in Kolben Nr. 1a statt. Zu diesem Zeitpunkt waren ca. 5 % des eingesetzten Nitrils zu MMS hydrolysiert. Nach 305 Stunden Inkubation ($\text{OD}_{600} = 0,452$) wurde ein weiteres Mal aus der Ausgangskultur in frisches Medium überimpft (in Kolben Nr. 1b). Die MMS-Konzentration in der wässrigen Phase betrug zu diesem Zeitpunkt 1,24 mM und entsprach damit einem Nitril-Umsatz von ca. 11 %. Insgesamt wurde jeweils viermal in frisches Medium überimpft (resultierende Kolben Nr. 4a und 4b, siehe Tab. 3.10).

Die Auszählung der Agarplatten ergab, dass im Versuchsansatz rund 160 Transformanden pro mL und im Kontrollkolben [*E. coli* JM109(pIK9) mit MMN als einziger Stickstoffquelle] ca. 180 Transformanden pro mL vorlagen. Insgesamt befanden sich im Versuchsansatz damit ca. 11000 Transformanden. Auffällig war, dass bereits 20 min nach dem Beimpfen der Kolben die Zellen Klumpen bildeten und sich an die Glaswände am Rand der Schüttelzone hefteten, wobei dieses Phänomen in allen Kulturen beobachtet wurde. Ein Ablösen der Zellen von den Glaswänden war nur schwer möglich, außerdem klebten die Zellen auch nach einer mechanischen Ablösung innerhalb kurzer Zeit erneut an den Wänden. Durch die Inkubation der Kolben bei 30°C verdunstete stets ein Teil des Mediums. Der Flüssigkeitsstand nahm folglich im Laufe der Zeit ab, weshalb die

am Glasgefäß am Rand der Schüttelzone angehefteten Zellen mit zunehmender Inkubationsdauer teilweise nicht mehr vom Medium überspült wurden. Die Wahrscheinlichkeit für die Selektion von Mutanten wurde dadurch reduziert. In der Positivkontrolle (2-Phasensystem mit 2-PPN als einziger Stickstoffquelle) wurde nach 112 h Inkubation ein deutliches Zellwachstum festgestellt ($OD_{600} = 0,28$). Die Analyse des wässrigen Kulturüberstandes mittels HPLC ergab zu diesem Zeitpunkt einen 2-PPN Gehalt von 0,14 mM und einen 2-PPS Gehalt von 0,66 mM. Damit waren etwa 25 % des eingesetzten Nitrils umgesetzt. Bereits 4 h später (nach 116 h Inkubation) war das gesamte 2-PPN von *E. coli* JM109(pRMS) zur korrespondierenden Säure hydrolysiert. Dagegen wurde weder in der Negativkontrolle noch im Kontrollkolben im gesamten Verlauf des Experiments (insgesamt ca. 6 Wochen Inkubation) ein Zellwachstum beobachtet. In Bezug auf den Kontrollkolben war dieses Ergebnis überraschend, da die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 MMN (wenn auch nur mit geringer Aktivität) zur korrespondierenden Säure hydrolysieren kann (Kap. 3.3.4). Das Wachstum der Zellen im Versuchsansatz, die Überimpfungszeitpunkte sowie die MMN und MMS Gehalte in der wässrigen Phase sind in Tab. 3.10 angegeben.

Tabelle 3.10: Wachstum einer aus *E. coli* JM109(pRMS) erzeugten Mutantenbibliothek nach mehrmaligem Überimpfen im 2-Phasensystem mit MMN als einziger Stickstoffquelle. Die zugehörigen MMN und MMS Gehalte sowie die jeweiligen Überimpfungszeitpunkte sind ebenfalls dargestellt.

Kolben	Inkubationszeit (h)	OD_{600}	MMN ¹ (mM)	MMS ¹ (mM)	überimpft in Kolben
Ausgangskultur	112	0,05	0,28	0	
	166	0,04	0,28	0	
	292	0,215	0,24	0,52	
	294	0,253	0,23	0,6	Nr. 1a
	305	0,452	0,2	1,24	Nr. 1b
	334	2,4	0	4,91	
Nr. 1a	88	n.b.	0,3	0	
	188	0,814	0,21	1,39	Nr. 2a
	204	1,384	0,08	3,32	
	212	2,455	0	4,49	
Nr. 1b	76	n.b.	0,3	0	
	178	0,649	0,24	0,7	Nr. 2b
	192	0,874	0,15	1,65	
	201	1,144	0,14	2,5	
Nr. 2a	110	0,911	0,1	2,53	Nr. 3a
	119	1,301	0,12	3,46	
	210	2,542	0	6,17	
Nr. 2b	114	0,404	0,24	0,81	Nr. 3b
	138	0,973	0,15	2,41	
	209	2,416	0	6,69	
Nr. 3a	99	0,31	0,24	0,7	Nr. 4a
Nr. 3b	93	0,471	0,24	0,6	Nr. 4b

Kolben	Inkubationszeit (h)	OD ₆₀₀	MMN ¹ (mM)	MMS ¹ (mM)	überimpft in Kolben
Nr. 4a	97	0,679	n.b.	n.b.	
Nr. 4b	99	0,776	n.b.	n.b.	

¹ Konzentration in der wässrigen Phase

n.b. nicht bestimmt

Auffällig war, dass in den Kulturüberständen nach der vollständigen Umsetzung des Nitrils maximal 6,6 mM der korrespondierenden Säure vorlagen, obwohl in der organischen Phase 35 mM MMN eingesetzt worden waren. Infolge des Phasenverhältnisses von 1:3 sollte die maximale MMS-Konzentration in der wässrigen Phase dementsprechend 11 mM betragen. Die geringen MMS Gehalte deuteten darauf hin, dass nur wenig Ammonium freigesetzt wurde und die Kulturen vermutlich deshalb lediglich eine optische Dichte von maximal 2,5 erreichten (siehe Tab. 3.10), die deutlich unter der mit 30 mM 2-PPN in der HMeN-Phase erreichten optischen Dichte lag (OD₆₀₀ = 4,6, siehe Abb. 3.19). Da bei den hier beschriebenen Versuchen eine neue MMN-Charge verwendet worden war, lag die Vermutung nahe, dass der eingesetzte Standard verunreinigt war. Eine GC-MS sowie eine H¹-NMR-Analyse ergaben, dass der kommerziell erworbene MMN-Standard nicht der vom Hersteller angegebenen Spezifikation (97 % Reinheit) entsprach, sondern zu knapp 50 % mit der Verbindung p-Methoxy-2-methyl-2-phenylpropannitril verunreinigt war (H¹-NMR- und GC-MS-Analysen, siehe Anhang Kapitel A). Durch eine Veränderung der Fließmittelzusammensetzung bei der Analyse der wässrigen Kulturüberstände und der damit einhergehenden Trennung der beiden Nitrile sowie einer Aufstockung mit MMS wurde festgestellt, dass die Zellen nicht in der Lage waren p-Methoxy-2-methyl-2-phenylpropannitril zur korrespondierenden Säure zu hydrolysieren. Dementsprechend wurde davon ausgegangen, dass die Selektion der Stämme durch die Verunreinigung nicht beeinflusst worden war.

Wie bereits erwähnt, wurde bei jedem Überimpfungsschritt eine Verdünnungsreihe in Na/K-Phosphatpuffer erstellt und die Verdünnungsstufen 10⁻⁶ und 10⁻⁷ ausplattiert. Es wurden drei zufällig ausgewählte Kolonien [*E. coli* JM109(pRMS1.1) - *E. coli* JM109(pRMS1.3)], die aus der Ausgangskultur nach 305 h Inkubation erhalten wurden (siehe Tab. 3.10), in Flüssigkultur angezogen, die Plasmid-DNA isoliert und die Nitrilasegene mit den Primern pJ-F und pJ-R sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass Plasmid pRMS1.1 für eine Nitrilase-Variante kodierte, bei der der Prolin-Rest an Position 17 durch einen Serin-Rest ersetzt war (zusätzlich wurde eine „stille“ Mutation im Gly257 Codon gefunden). Bei den Plasmiden pRMS1.2 und pRMS1.3 war jedoch keine Mutation im Zielgen vorhanden.

Des Weiteren wurden die Plasmide pRMS1.1 - 1.3 sowie das Plasmid pRMS60.7 (vgl. Tab. 3.9) nach der üblicherweise angewandten Plasmidisolierungsmethode präpariert und mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Die Bandenintensität des Plasmids pRMS60.7 entsprach hierbei der gängigen Bandenintensität von pIK9 (zugehörige Plasmidkonzentration ca. 20 ng/μL). Die Plasmide pRMS1.1 - 1.3 lagen offenbar in den Zellen in einer deutlich höheren Kopienzahl als das pIK9 Ausgangsplasmid vor (Abb. 3.27a). Da bei der Mutagenese mit MNNG die Plasmid-DNA *in-vivo* mutagenisiert wird, können Mutationen auch außerhalb des Zielgens auftreten. Die erhöhte

Kopienzahl des Plasmids könnte demzufolge evtl. auf eine Mutation außerhalb des Zielgens zurückzuführen sein. Andererseits ist bekannt, dass sich die Kopienzahl von Plasmiden in Abhängigkeit von der Generationszeit der Plasmid-tragenden Zellen verändern kann (Atlung et al., 1999). Dieser Effekt musste im Hinblick auf das langsame Wachstum der rekombinanten *E. coli* Zellen im 2-Phasensystem berücksichtigt werden.

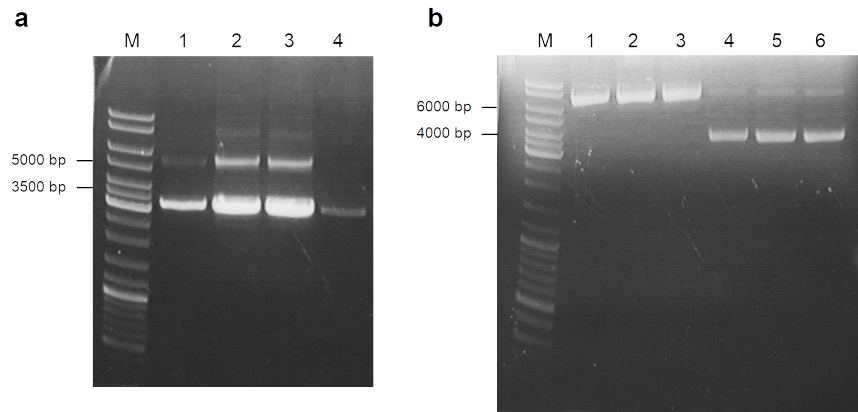


Abbildung 3.27: Unterschiedliche Intensitäten der Plasmidbanden aus verschiedenen mittels MNNG-Mutagenese erzeugten Varianten im Agarosegel. Einige mit Hilfe des Selektionssystems angereicherte *E. coli* Stämme (siehe Text) wurden über Nacht in Flüssigkultur angezogen, die Plasmid-DNA nach dem Standardverfahren isoliert (siehe Kap. 2.8.1) und mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht. (a) Spur 1: pRMS1.1, Spur 2: pRMS1.2, Spur 3: pRMS1.3, Spur 4: pRMS60.7 (Kontrolle). (b) Spur 1: pRMS1305.1, Spur 2: pRMS1305.2, Spur 3: pRMS1305.3, Spur 4: pRMS1205.1, Spur 5: pRMS1205.2, Spur 6: pRMS1205.3. Auf die 1 %igen Agarosegele wurde pro Spur 1 μL der Plasmid-Präparationen aufgetragen. M: 5 μL DNA-Größenstandard (Fermentas).

Nachfolgend wurde überprüft, welche Stämme sich am Versuchsende durchgesetzt hatten. Hierzu wurden je drei zufällig ausgewählte Kolonien [*E. coli* JM109(pRMS1205.1) - *E. coli* JM109 (pRMS1205.3)], die aus der Kultur Nr. 3a nach 99 h Inkubation erhalten wurden (siehe Tab. 3.10), in Flüssigkultur angezogen, die Plasmid-DNA isoliert und die Nitrilasegene mit den Primern pJ-F und pJ-R sequenziert. Ebenso wurde mit je drei zufällig ausgewählten Kolonien, die aus der Kultur Nr. 3b nach 93 h Inkubation erhalten wurden (siehe Tab. 3.10), verfahren [*E. coli* JM109(pRMS1305.1) - *E. coli* JM109(pRMS1305.3)]. Die Plasmid-DNA wurde vor der Sequenzierung mittels Agarose-Gelelektrophorese im Hinblick auf die vorhandene DNA-Konzentration hin untersucht. Die Plasmide lagen in den Zellen (entsprechend den obigen Ergebnissen) wiederum in einer hohen Kopienzahl vor (Abb. 3.27b). Die Sequenzierung ergab, dass bei den Plasmiden pRMS1205.1 - 1205.3 in der Nitrilase der Prolin-Rest an Position 17 durch Serin ersetzt war (zusätzlich: stille Mutation Gly257Gly). Bei den Plasmiden pRMS1305.1 - 1305.3 waren wiederum keine Mutationen im Zielgen vorhanden. Die Laufhöhe der Plasmide pRMS1305.1 - 1305.3 unterschied sich von den in Abb. 3.27a festgestellten Laufhöhen der Plasmide pRMS1.2 und pRMS1.3, die ebenfalls keine Mutationen im Zielgen enthalten hatten. Es wurde davon ausgegangen, dass sich bei den zugehörigen Stämmen *E. coli* JM109(pRMS1305.1) - *E. coli* JM109(pRMS1305.3) im Verlauf der Selektion Plasmid-Dimere durchgesetzt hatten, die sich während der *in-vivo*-Mutagenese mit *E. coli* BW3110(pIK9) möglicherweise erneut gebildet hatten (vgl. Kap. 3.4.10). Bei den Sequenzierungen wurde das in Kap. 3.4.10 erwähnte Auftreten von Doppelpeaks allerdings nicht beobachtet.

3.4.12 Nachweis des beschleunigten Wachstums der mit Hilfe des 2-Phasensystems mit MMN selektierten Stämme

Zur Untersuchung, ob die selektierten Stämme *E. coli* JM109(pRMS1205.1) und *E. coli* JM109(pRMS1305.1) im hier beschriebenen 2-Phasensystem tatsächlich schneller wachsen konnten als *E. coli* JM109(pIK9), wurden die 3 Stämme zunächst in Minimalmedium angezogen. Nach dem Waschen der Zellen in Na/K-Phosphatpuffer wurden die Stämme in 9 mL Ammonium-freies Minimalmedium mit 100 µg/mL Ampicillin plus 3 mL HMeN, das MMN in einer Konzentration von 35 mM enthielt, überimpft. In allen Kolben wurde dabei eine anfängliche optische Dichte von jeweils 0,05 angestrebt. Die Stämme *E. coli* JM109(pRMS1205.1) und *E. coli* JM109(pRMS1305.1) erreichten bereits nach 51 h Inkubation eine Zelldichte von etwa 1,5 (Tab. 3.11). Der WT-Stamm benötigte unter identischen Bedingungen > 9-mal so lange (479 h), um eine optische Dichte von 1,3 zu erreichen (Tab. 3.11). Hierbei wurde in allen 3 Ansätzen gezeigt, dass das Wachstum der Zellen mit der Bildung von MMS verbunden war (Tab. 3.11).

Tabelle 3.11: Wachstum verschiedener *E. coli* JM109(pRMS) Varianten im 2-Phasensystem mit MMN als einziger Stickstoffquelle.

Stamm	Inkubationszeit (h)	OD ₆₀₀	MMN ¹ (mM)	MMS ¹ (mM)
<i>E. coli</i> JM109(pIK9)	0	0,044	0,30	0
	51	0,034	0,30	0
	65	0,025	0,29	0
	479	1,302	0,10	4,47
	504	2,383	0,04	6,99
<i>E. coli</i> JM109(pRMS1205.1)	0	0,054	0,30	0
	51	1,517	0,14	4,38
	65	2,136	0,05	5,79
<i>E. coli</i> JM109(pRMS1305.1)	0	0,051	0,30	0
	51	1,445	0,13	4,69
	65	2,11	0,04	5,81

¹ Konzentration in der wässrigen Phase

Im Folgenden wurde untersucht, ob das schnellere Wachstum der im 2-Phasensystem selektierten Stämme auf deren Plasmide zurückzuführen war. Hierzu wurde *E. coli* JM109 mit den zuvor beschriebenen Plasmiden pRMS1205.1 und pRMS1305.1 (siehe Kap. 3.4.11) transformiert und die so erzeugten Stämme anschließend erneut im 2-Phasensystem mit 35 mM MMN als einziger Stickstoffquelle inkubiert. Diese neu erzeugten Stämme von *E. coli* JM109(pRMS1205.1) bzw. *E. coli* JM109(pRMS1305.1) erreichten nach 44,5 h Inkubation bei 30°C eine optische Dichte (600 nm) von 1,5 bzw. 1,2. Zu diesem Zeitpunkt waren 4,8 mM bzw. 4,38 mM MMS in den wässrigen Kulturüberständen nachweisbar (nicht dargestellt). Der Ausgangsstamm *E. coli* JM109(pIK9) benötigte unter identischen Bedingungen 13-mal länger (598 h), um eine optische Dichte (600 nm) von 1,4 zu erreichen. Die MMS-Konzentration in der wässrigen Phase betrug zu diesem Zeitpunkt 4,87 mM (nicht dargestellt). Es konnte folglich gezeigt werden, dass mit Hilfe des 2-Phasensystems Stämme angereichert werden konnten, die ein deutlich schnelleres Wachstum mit MMN als einziger Stickstoffquelle zeigten als der Ausgangsstamm *E. coli* JM109(pIK9) und dass diese Eigenschaft plasmidkodiert war. Die Agarose-Gelelektrophorese ergab, dass die Plasmid-Kopienzahl auch in

den neu transformierten Stämmen deutlich höher war als die Kopienzahl des Ausgangsplasmids pIK9 in *E. coli* JM109(pIK9) (Abb. 3.28). Dies bestärkte die Vermutung, dass dieser Effekt evtl. durch Mutationen im Replikationsursprung verursacht wurde. Die Plasmide wurden deshalb mit Primern, die den Replikationsursprung flankieren (pORI-F und pORI-R) sequenziert und es konnten hierbei tatsächlich Mutationen im Replikationsursprung nachgewiesen werden (Tab. 3.12). Ob diese Basen-Austausche tatsächlich für die Erhöhung der Plasmid-Kopienzahl verantwortlich waren oder ob weitere Mutationen außerhalb des Zielgens eine Rolle spielen, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

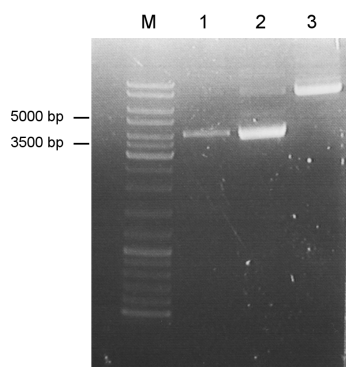


Abbildung 3.28: Intensität der DNA-Banden nach Isolation der Plasmide aus *E. coli* JM109(pIK9) sowie aus den neu transformierten Stämmen *E. coli* JM109(pRMS1205.1) und *E. coli* JM109(pRMS1305.1). Die verschiedenen rekombinanten *E. coli* Stämme wurden in Flüssigkultur über Nacht angezogen, die Plasmid-DNA isoliert (entsprechend Kapitel 2.8.1) und mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Spur 1: *E. coli* JM109(pIK9), Spur 2: *E. coli* JM109(pRMS1205.1), Spur 3: *E. coli* JM109(pRMS1305.1). Auf das 1 %ige Agarosegel wurde pro Spur 1 μL der Plasmid-Präparationen aufgetragen. M: 5 μL DNA-Größenstandard (Fermentas).

Tabelle 3.12: Veränderte Basen im Replikationsursprung (*ori*) der Plasmide pRMS1205.1 und pRMS1305.1. Die Mutationen wurden identifiziert anhand von Sequenz-Alignments mit dem Ursprungsplasmid pBR322 (NCBI Nummer: J01749).

Plasmid	Basenfolge (5' \rightarrow 3') ¹	Position der Basenfolge	Basenaustausch nach <i>in-vivo</i> -Mutagenese
	GCAGAGCGAGG T ATGTAGGCG ²	2905 - 2925	G \rightarrow A
pBR322	AGAGTTGGTAG G CTCTTGATCC ²	3024 - 3044	G \rightarrow A
	AAAAGAGTTG G TAGCTCTTGA ³	3021 - 3041	G \rightarrow A

Die Basenzählung folgt der unter der Registriernummer J01749 bei der NCBI hinterlegten Sequenz des Plasmids pBR322. Die Lage des Replikationsursprungs (*ori*) zwischen den Basenpaaren 2534 - 3122 wurde der bei www.snapgene.com (SnapGene Software von Insightful Science) hinterlegten Plasmidkarte entnommen.

¹ Die Positionen der veränderten Basen sind rot markiert.

² Mutation im *ori* des Plasmids pRMS1205.1

³ Mutation im *ori* des Plasmids pRMS1305.1

3.4.13 Umsatz von MMN durch die im 2-Phasensystem selektierten Stämme im rein wässrigen System

Es wurden anschließend Ruhezellumsätze durchgeführt, um zu prüfen, ob die im 2-Phasensystem selektierten Stämme auch im rein wässrigen System (siehe Kapitel 2.6.6) im Vergleich zum Ausgangsstamm eine höhere Enzymaktivität mit MMN aufwiesen. *E. coli* JM109(pRMS1205.1), *E. coli* JM109(pRMS1305.1) und *E. coli* JM109(pIK9) wurden hierfür über Nacht in LB-Amp-Medium angezogen, wobei ein Teil der Kulturvolumina für die Isolierung der Plasmide eingesetzt wurde. Nach dem Überimpfen in frisches Medium (1:100) wurden die Nitrilasegene nach dem Standardverfahren mit 0,2 % (w/v) Rhamnose induziert (Kap. 2.6.5), die Zellen in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5) gewaschen und anschließend direkt für die Umsätze eingesetzt. Ein Teil der Ruhezellen wurde für die SDS-PAGE verwendet, um die Nitrilasebildung in den Stämmen zu vergleichen. Für die Umsätze wurden die Ruhezellen (*E. coli* JM109(pIK9): OD₆₀₀ = 16,6; *E. coli* JM109(pRMS1205.1): OD₆₀₀ = 17,1; *E. coli* JM109(pRMS1305.1): OD₆₀₀ = 17,4) in 50 mM Na/K-Phosphatpuffer (pH 7) bei 30°C und 1100 rpm inkubiert und mit 5 mM MMN (aus einer 50 mM Stammlösung in Methanol) versetzt. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und die Überstände mittels HPLC analysiert.

Überraschenderweise waren die Aktivitäten bei der Hydrolyse von MMN bei den im Selektionssystem angereicherten Stämmen nur geringfügig höher als bei *E. coli* JM109(pIK9) [relative Aktivität von *E. coli* JM109(pRMS1205.1) \approx 110 % und relative Aktivität von *E. coli* JM109(pRMS1305.1) \approx 150 % bezogen auf die Aktivität von *E. coli* JM109(pIK9)].

Es wurde auch im rein wässrigen System beobachtet, dass die Plasmide in den Stämmen *E. coli* JM109(pRMS1205.1) und *E. coli* JM109(pRMS1305.1) entsprechend der vorherigen Ergebnisse im 2-Phasensystem offenbar in einer höheren Kopienzahl vorlagen (nicht dargestellt). Trotzdem wurden die Nitrilasen bei der Induktion mit 0,2 % (w/v) Rhamnose schwächer exprimiert als die Nitrilase im Ausgangsplasmid pIK9 (Abb. 3.29).

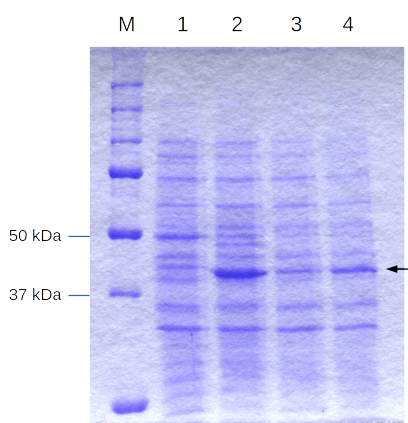


Abbildung 3.29: Expression der Nitrilasevarianten in den rekombinanten Stämmen *E. coli* JM109(pIK9) (Spur 2), *E. coli* JM109(pRMS1205.1) (Spur 3), *E. coli* JM109(pRMS1305.1) (Spur 4). Zum Vergleich wurde der Stamm *E. coli* JM109(pJOE2775) mit Leerplasmid/ohne Nitrilasegen aufgetragen (Spur 1). Es wurde ein 10 %iges SDS-Gel nach Laemmli (1970) verwendet. Pro Spur wurde etwa 5 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Die Nitrilasebande ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. M: 7,5 μ L Proteinmarker („Precision Plus Protein Standards“, Biorad).

Dieser scheinbare Widerspruch war möglicherweise auf Mutationen in der Promotor Sequenz zurückzuführen. Die Sequenzierung der Promotor Region ergab, dass nach *in-vivo*-Mutagenese mit MNNG tatsächlich Mutationen im Rhamnose-induzierbaren Promotor vorhanden waren, die evtl. Ursache für das beobachtete Phänomen waren (Tab. 3.13).

Tabelle 3.13: Veränderte Basen im Rhamnose-induzierbaren Promotor (P_{rhaBAD}) der Plasmide pRMS1205.1 und pRMS1305.1. Die Mutationen wurden identifiziert anhand von Sequenz-Alignments mit dem Plasmid pIK9.

Plasmid	Basenfolge (5' → 3') ¹	Position der Basenfolge	Basenaustausch nach <i>in-vivo</i> -Mutagenese
pRM1205.1	CTGTCAGTAA C GAGAAGGTCG	5302 - 5322	C → T
pRM1305.1	CTGTCAGTAA C GAGAAGGTCG	5302 - 5322	C → T

¹ Die Positionen der veränderten Basen sind rot markiert.

3.4.14 Aggregation der rekombinanten *E. coli* Stämme im 2-Phasensystem mit MMN als einziger Stickstoffquelle

In Kapitel 3.4.11 wurde beschrieben, dass direkt nach dem Beimpfen der Kolben mit den transformierten *E. coli* Stämmen die Zellen im 2-Phasensystem Klumpen bildeten und sich an die Gefäßwände am Rand der Schüttelzone hefteten. Ein mechanisches Ablösen der Zellen von den Gefäßwänden war erfolglos, da die Zellen innerhalb kurzer Zeit erneut an den Wänden klebten.

Um die Zellsuspension nach der Elektroporation zu stabilisieren, wurde untersucht, ob nach einmaliger Verdopplung der Zellen in LB-Medium (mit 100 µg/mL Ampicillin) beim anschließenden Überimpfen in das 2-Phasensystem eine verminderte Zellaggregation auftrat. Elektrokompente Zellen von *E. coli* JM109 wurden mit pIK9 Plasmid-DNA versetzt und die DNA mittels Elektroporation in die Zellen eingebracht. Unmittelbar nach dem Strom-Puls wurden 950 µL LB-Medium zugesetzt und die Zellen zur Ausprägung der Ampicillinresistenz bei 37°C für 60 min schüttelnd inkubiert. Von diesem Ansatz wurden anschließend 50 µL auf LB-Agar mit 100 µg/mL Ampicillin ausplattiert und das restliche Volumen (950 µL) in einen 100 mL Klett-Kolben mit 9 mL LB-Amp-Medium überführt und bei 100 rpm geschüttelt. In regelmäßigen Abständen wurde die Trübung gemessen. Die anfängliche Abnahme der Trübung von 90 auf 55 Klett-Einheiten wurde darauf zurückgeführt, dass Zellen, die bei der Elektroporation kein Plasmid aufgenommen hatten, im Ampicillin-haltigen Medium nicht wachsen konnten. Nachdem sich die Trübung von $t = 7,5$ h bis $t = 10,3$ h Inkubation in etwa verdoppelt hatte, wurden die Zellen 3-mal in 1 mL Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) gewaschen und 142 µL der gewaschenen Zellen zum Beimpfen von 9 mL Ammonium-freiem Minimalmedium, das 3 mL HMeN (ohne Nitril) enthielt, verwendet. Die optische Dichte (600 nm) im 2-Phasensystem wurde anschließend in regelmäßigen Abständen gemessen.

Die Aggregation der Zellen konnte nicht vollständig verhindert werden (mit bloßem Auge gut sichtbar), die Ergebnisse zeigten jedoch, dass durch das vorherige Wachstum der Zellen in LB-Flüssigmedium die Zellaggregation im 2-Phasensystem auf ein Minimum reduziert werden konnte,

da die optische Dichte (600 nm) auch nach langer Inkubationszeit (knapp 60 h) nur sehr geringfügig abnahm. Daher wurde diese Vorgehensweise bei den in Kapitel 3.4.16 beschriebenen Versuchen angewendet.

3.4.15 Zufallsmutagenese mittels fehlerbehafteter PCR (Error-prone PCR)

Die *in-vivo*-Mutagenese mit MNNG hatte erwartungsgemäß zur Folge, dass auch außerhalb des Zielgens Mutationen auftraten. Ein weiterer Nachteil liegt darin, dass mit Hilfe von MNNG hauptsächlich GC → AT Transitionen erzielt werden können (Lucchesi et al., 1986). Zur Erzeugung einer zweiten ungerichteten Mutantenbibliothek wurde deshalb die Methode der fehlerbehafteten Polymerasekettenreaktion eingesetzt. Die bei der PCR verwendete DNA-Polymerase Aktivität Mutazym II (Gemisch aus 2 verschiedenen DNA-Polymerasen) erzeugt AT → GC und GC → AT Mutationen mit etwa gleich hohen Raten (Manual GeneMorph II Random Mutagenesis Kit, Stratagene). Die Mutageneserate wird durch Variation der in der PCR eingesetzten DNA Menge eingestellt, wobei zwischen der Menge an Zielgen-DNA (Target) und der Menge an Plasmid-DNA (Template) unterschieden werden muss. Während mit Template-DNA das gesamte Plasmid gemeint ist, bezieht sich der Begriff Zielgen-DNA nur auf das Gen, welches mittels fehlerbehafteter PCR verändert werden soll (hier: Nitrilasegen aus *P. fluorescens* EBC191). Um eine niedrige Mutageneserate von 1 - 4,5 Mutationen/kb zu erzielen, müssen gemäß den Herstellerangaben des Kits hohe Mengen an Zielgen-DNA von 500 - 1000 ng im PCR-Ansatz (gesamt 50 µL) verwendet werden (Manual GeneMorph II Random Mutagenesis Kit, Stratagene). Für das *talB* Gen aus *E. coli* wurde allerdings gezeigt, dass eine Mutageneserate von 2,4 Mutationen/kb die Verwendung deutlich geringerer Mengen an Zielgen-DNA erforderte (25 ng) (Schneider, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden daher für die fehlerbehaftete PCR 30 ng Zielgen-DNA eingesetzt. Da das Verhältnis von Zielgen-DNA (Insert) zum Vektor etwa 1:4 betrug, entsprach dies 150 ng Template-DNA. Die Durchführung der „Error-prone“ PCR ist in Kapitel 2.9.4 beschrieben. Bei der Transformation der *E. coli* JM109 Zellen wurde eine sogenannte Vektorkontrolle mitgeführt. Die Vektorkontrolle dient dazu, die Anzahl der Transformationsereignisse abzuschätzen, die durch den Vektor (ohne Insert) verursacht werden. Dies kann dazu führen, dass ein geringer Anteil des Vektors auch ohne Insert nach der Ligationsreaktion zirkulär geschlossen vorliegt, wenn beispielsweise die verwendeten Restriktionsenzyme unvollständig geschnitten haben. Eine Verunreinigung mit religiertem oder ungeschnittenem Vektor konnte im vorliegenden Fall ausgeschlossen werden, da nach der Transformation keine Kolonien auf den Agarplatten mit Ampicillin vorhanden waren. Zur Bestimmung der Mutageneserate wurde von 20 zufällig gepickten Klonen die Plasmid-DNA isoliert und die Nitrilasegene sequenziert (Tab. 3.14). Ähnlich wie bei der *in-vivo*-Mutagenese mit MNNG waren die Mutationen über das gesamte Nitrilasegen verteilt, bei 6 von 20 Klonen war jedoch keine Mutation im Zielgen vorhanden. Wie oben beschrieben, wuchsen auf der mitgeführten Vektorkontrolle keine Kolonien auf den zugehörigen Agarplatten. Dementsprechend mussten Transformanden ohne Mutation im Nitrilasegen bei der Berechnung der Mutageneserate für die Klone der Bank berücksichtigt werden. Folglich lag die Mutageneserate bei 1,2 Mutationen pro kb, wobei durchschnittlich 0,8 Aminosäuren im Zielgen ausgetauscht waren.

Tabelle 3.14: Mutationen im Nitrilasegen aus *P. fluorescens* EBC191 nach der Zufallsmutagenese mittels fehlerbehafteter PCR.

Plasmid	Position der Mutation im Nitrilasegen	Codon WT	Codon Mutante	AS-Austausch oder stille Mutation
pRMS1	146	gcg	gtg	Ala49Val
	158	ggg	gag	Gly53Glu
	1003	gcg	acg	Ala335Thr
pRMS2	394	aag	gag	Lys132Glu
pRMS3	417	tca	tcg	Ser139Ser
pRMS4	427	gaa	taa	Glu143Stop
pRMS5	80	gcc	gtc	Ala27Val
	702	gac	gat	Asp234Asp
	743	gaa	gta	Glu248Val
	855	ggg	ggc	Gly285Gly
pRMS6	921	gtc	gtt	Val307Val
	432	ggc	ggt	Gly144Gly
pRMS7	682	gtg	ttg	Val228Leu
pRMS8	311	act	att	Thr104Ile
	799	ttg	atg	Leu267Met
pRMS9	966	tcg	tca	Ser322Ser
	1026	gag	gaa	Glu342Glu
pRMS10	657	tgt	tgg	Cys219Trp
pRMS11	84	aaa	aag	Lys28Asn
	1003	gcg	ccg	Ala335Pro
pRMS12	340	gct	act	Ala114Thr
	907	ctg	atg	Leu303Met
pRMS13	243	ggc	ggt	Gly81Gly
	606	agc	agt	Ser202Ser
pRMS14	349	atc	ttc	Ile117Phe

Für die Versuchsdurchführung siehe Text.

3.4.16 Selektionssystem mit einem Nitril als einziger Stickstoffquelle nach Zufallsmutagenese mittels fehlerbehafteter PCR

Bei der Selektion der Stämme *E. coli* JM109(pRMS1205.1) und *E. coli* JM109(pRMS1305.1) im 2-Phasensystem mit MMN als einziger Stickstoffquelle wurde festgestellt, dass ein verunreinigter MMN-Standard eingesetzt worden war (siehe Kap. 3.4.11). Zudem aggregierten die Zellen bei der Inkubation im 2-Phasensystem sehr stark. Daher wurde im Folgenden die Selektion im 2-Phasensystem mit einer neuen MMN-Charge und mittels fehlerbehafteter PCR generierten Mutanten wiederholt. Das durch fehlerbehaftete PCR mutagenisierte Plasmid wurde durch Elektroporation in *E. coli* JM109 eingebracht. Nach einer Stunde Inkubation in LB-Medium bei 37°C

wurde ein Teil des Ansatzes (30 μL) zur Bestimmung der Transformationsrate auf LB-Agar mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin ausplattiert. Die verbleibenden 970 μL des Transformationsansatzes wurden zu 9 mL LB-Amp-Medium in einen Klett-Kolben gegeben und bei 37°C unter Schütteln ca. 9 Stunden inkubiert bis sich die Trübung etwa einmal verdoppelt hatte. Anschließend wurde das Medium durch Zentrifugation (5000 rpm, 4°C, 6 min) entfernt, die Zellen dreimal in je 10 mL Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) gewaschen und schlussendlich in 970 μL Na/K-Phosphatpuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zum Beimpfen der nachfolgenden Kolben (2-Phasensysteme) verwendet:

1. Positivkontrolle in 100 mL-Erlenmeyerkolben: 100 μL Zellsuspension in 9 mL Ammonium-freiem Minimalmedium mit 3 mL HMeN, das 2-PPN in einer Konzentration von 7 mM enthielt
2. Versuchsansatz in 1 L-Erlenmeyerkolben: 870 μL Zellsuspension in 69 mL Ammonium-freiem Minimalmedium mit 23 mL HMeN, das MMN in einer Konzentration von 25 mM enthielt.

Für eine weitere Kontrolle wurden elektrokompetente Zellen von *E. coli* JM109 mit WT-Plasmid-DNA (pIK9) transformiert. Das weitere Vorgehen entsprach der oben beschriebenen Durchführung, wobei die Inkubation im Klett-Kolben in diesem Fall etwas weniger als 6 Stunden erforderte bis es zu einer Verdopplung der Trübung gekommen war. 100 μL der gewaschenen Zellen wurden in 9 mL Ammonium-freies Minimalmedium mit 3 mL HMeN, das MMN in einer Konzentration von 25 mM enthielt, transferiert (Kontrollkolben). Alle Erlenmeyerkolben enthielten 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin zur Selektion von Transformanden und wurden anschließend bei 30°C unter Schütteln (100 rpm) inkubiert.

Die Auszählung der Kolonien auf den Agarplatten ergab, dass im Versuchsansatz rund 88 Transformanden pro mL und im Kontrollkolben (*E. coli* JM109(pIK9) mit MMN als einziger Stickstoffquelle) ca. 370 Transformanden pro mL vorlagen. Insgesamt befanden sich im Versuchsansatz damit etwa 6000 Transformanden. Die Positivkontrolle erreichte nach ca. 14 Tagen eine optische Dichte (600 nm) von 0,95 und das gesamte 2-PPN war zu 2-PPS umgesetzt. Demgegenüber kam es weder im Kontrollkolben noch im Versuchsansatz auch nach sehr langer Inkubationszeit (> 3 Monate) zu einer deutlichen Trübung der Kulturen.

3.4.17 Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) im 2-Phasensystem mit MMN als einziger Stickstoffquelle

In den Kapiteln 3.4.11 und 3.4.16 wurde beschrieben, dass *E. coli* JM109(pIK9) in den Kontrollkolben mit MMN als einziger Stickstoffquelle auch nach langer Inkubationszeit kein Wachstum zeigte. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob die Zellen in der Lage waren im 2-Phasensystem mit MMN zu wachsen, wenn der Transformationsansatz zunächst auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ausgestrichen wurde. Elektrokompetente Zellen von *E. coli* JM109 wurden hierfür mit pIK9 Plasmid DNA transformiert, ein Teil des Ansatzes (25 μL) nach der 1-stündigen Inkubation in LB-Medium zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz ausplattiert und die Agarplatten über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zellen der bewachsenen Agarplatte (> 2000 Kolonien) wurden mit

1 mL Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) abgeschwemmt, dreimal gewaschen und ein Teil der so erhaltenen Zellsuspension zum Beimpfen von 9 mL Ammonium-freiem Minimalmedium eingesetzt. Zusätzlich wurde die MMN-Konzentration in der HMeN-Phase (25 %, v/v) deutlich reduziert (auf 10 mM) und die Kultur bei 30°C unter Schütteln (100 rpm) inkubiert. Unter diesen Bedingungen war der Stamm im Vergleich zu den vorherigen Untersuchungen in der Lage, im 2-Phasensystem mit MMN als einziger Stickstoffquelle zu wachsen (Tab. 3.15). Die lag-Phase war jedoch extrem lang (> 20 Tage) und die Generationszeit betrug in der Wachstumsphase trotz geringer MMN Mengen unter diesen Bedingungen mehr als 30 Stunden.

Tabelle 3.15: Wachstum von *E. coli* JM109(pIK9) im 2-Phasensystem mit 10 mM MMN als einziger Stickstoffquelle.

Inkubationszeit (h)	OD ₆₀₀	MMN ¹ (mM)	MMS ¹ (mM)
0	0,1	0,09	0
268	0,2	0,07	0
559	0,4	0,03	1,14
571	0,6	0,01	1,66
596	1,0	0	3,21
619	1,3	0	3,90

¹ Konzentration in der wässrigen Phase

Mit dem hier beschriebenen Selektionssystem konnte folglich keine Enzymvariante der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 mit einer erhöhten Aktivität gegenüber MMN selektiert werden. Die Versuche, die im 2-Phasensystem gemacht wurden, deuten an, dass es mit einer optimalen Mutantenbibliothek (z.B. in Bezug auf die Mutagenserate und Ausbeute an Transformanden) bei ggf. gleichzeitigem Absenken der MMN-Konzentration in der organischen Phase eventuell möglich sein könnte, Nitrilasevarianten anzureichern, die in der Lage sind α,α -disubstituierte Nitrile mit einer im Vergleich zur WT-Nitrilase gesteigerten Aktivität umzusetzen (siehe Diskussion).

3.5 Veränderung der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 durch rationales Proteindesign

Parallel zu den Versuchen zur Zufallsmutagenese und anschließender Selektion der Enzymvarianten mit dem sterisch anspruchsvollen Modellsubstrat MMN als einziger Stickstoffquelle wurden verschiedene Varianten der Nitrilase aus *P. fluorescens*, welche bereits aus vorangegangenen Arbeiten zur Verfügung standen, hinsichtlich der Biotransformation von Acetophenoncyanhydrin untersucht. Ferner wurde die Nitrilase über rationales Proteindesign verändert. Ein Sequenzvergleich mit anderen bisher charakterisierten Nitrilasen schien nur bedingt sinnvoll, da die Umsetzung von quartären Nitrilen oder tertiären Cyanhydrinen zuvor in keinem Fall beschrieben worden war.

3.5.1 Biotransformationen mit C-terminal verkürzten Varianten der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 und der Enzymvariante Y141G

Es wurden zunächst die rekombinanten Stämme *E. coli* JM109(pCK103), *E. coli* JM109(pCK104), *E. coli* JM109(pCK105) und *E. coli* JM109(pCK106) untersucht, die für Nitrilasevarianten kodie-

ren, welche C-terminal um 47, 55, 60 und 67 Aminosäuren verkürzt sind (Kiziak et al., 2007). Diese Enzymvarianten wurden ausgewählt, da vorstellbar war, dass durch die Deletionen der Zugang zum aktiven Zentrum erleichtert sein könnte. Die Stämme wurden in LB-Amp-Medium angezogen, die Nitrilasebildung durch Rhamnosezugabe induziert und Ruhezellumsätze vergleichend mit Acetophenoncyanhydrin und dem korrespondierenden Arylacetonitril (Mandelonitril, MN) durchgeführt. Hierbei wurden die Ruhezellumsätze mit Acetophenoncyanhydrin bei einem pH-Wert von 4,5 durchgeführt, um den spontanen Zerfall des Nitrils weitgehend zu unterdrücken (Kapitel 3.3.1). Um den Einfluss dieses niedrigen pH-Wertes auf die Enzymaktivität abzuschätzen, wurde die Mandelonitril-Hydrolyse vergleichend bei pH 4,5 und 5 untersucht. Um Unterschiede in der Induktionseffizienz der verschiedenen *E. coli* Stämme auszugleichen, wurden die Umsätze mit Acetophenoncyanhydrin auf die Umsätze mit Mandelonitril (bei pH 4,5 bzw. pH 5) bezogen und im folgenden lediglich die relativen Aktivitäten miteinander verglichen.

Die C-terminal verkürzten Nitrilasevarianten bildeten, wie bereits von Kiziak et al. (2007) mit dem Substrat MN bei neutralem pH-Wert festgestellt, auch unter sauren Reaktionsbedingungen mehr α -Hydroxycarboxamide als das Ausgangsenzym, wobei der relative Amidanteil bei beiden Substraten ähnlich hoch war (Tab. 3.16). Überraschend war jedoch, dass die relativen Aktivitäten mit MN bei pH 4,5 (bezogen auf die Aktivitäten mit MN bei pH 5) bei den C-terminal verkürzten Enzymvarianten deutlich höher waren (61 - 77 %) als beim WT-Enzym (20 %). Die C-terminal deletierten Varianten zeigten also offenbar eine größere Toleranz gegenüber einem pH-Wert von 4,5. Mit Acetophenoncyanhydrin als Substrat ergaben sich bei den verkürzten Varianten relative Aktivitäten von 9,4 - 19 % (bezogen auf deren Aktivitäten mit MN bei pH 4,5). Beim WT-Enzym betrug dieser Wert lediglich 3,8 %.

Es wurde für die Nitrilase aus *R. rhodochrous* ATCC33278 vorgeschlagen, dass die Aminosäure an Position 142 die Substratspezifität für aliphatische und aromatische Nitrile bestimmt (Yeom et al., 2008). Der Tyrosin-Rest an Position 141 in der *Pseudomonas* Nitrilase entspricht dem Tyrosin-Rest an Position 142 in der Nitrilase aus *R. rhodochrous* ATCC33278. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher der rekombinante Stamm *E. coli* JM109(pIK9/Y141G) erzeugt (siehe Kap. 2.9.1) und im Hinblick auf die Umsetzung von Acetophenoncyanhydrin untersucht. Die Variante Y141G bildete mit Mandelonitril bzw. Acetophenoncyanhydrin deutlich weniger Mandelamid bzw. Atrolactamid als das WT-Enzym, zeigte jedoch keine verbesserte Umsetzung von Acetophenoncyanhydrin (Tab. 3.16).

Tabelle 3.16: Umsatz von Acetophenoncyanhydrin und Mandelonitril bei verschiedenen pH-Werten durch verschiedene Varianten der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191.

Substrat	pH-Wert	Parameter	Variante					
			WT	Del-C47	Del-C55	Del-C60	Del-C67	Y141G
MN	5	spez. Aktivität (U/mg Protein)	17,3 ± 1,9	2,8	2,1	1,3	2,1	8,3
		MA ¹ (%)	19 ± 0,7	45	42	50	45	4
MN	4,5	spez. Aktivität (U/mg Protein)	3,4 ± 0,4	1,7	1,3 ± 0,3	1,0	1,3	n.b.
		MA ¹ (%)	19 ± 0,5	45	43 ± 0,1	50	45	n.b.
		rel. Aktivität ² (%)	20 ± 0,3	61	71	77	62	n.b.
APCN	4,5	spez. Aktivität (U/mg Protein)	0,13 ± 0,01	0,16	0,18 ± 0,01	0,17	0,25	0,08
		ALA ³ (%)	23 ± 1,8	43	41 ± 1,1	50	45	7
		rel. Aktivität ² (%)	0,8 ± 0,00	5,7	8,9	13	12	1
		rel. Aktivität ⁴ (%)	3,8 ± 0,06	9,4	14 ± 2,6	17	19	-

Die Anzucht und Induktion der rekombinanten *E. coli* Stämme erfolgte gemäß Kap. 2.6.5 und die Ruhezellumsätze wurden entsprechend Kap. 2.6.6 durchgeführt.

¹ [MA]/[MA]+[MS]

² bezogen auf die Aktivität mit MN bei einem pH-Wert von 5 (= 100 %)

³ [ALA]/[ALA]+[AL]

⁴ bezogen auf die Aktivität mit MN bei einem pH-Wert von 4,5 (= 100 %)

n.b. nicht bestimmt

MN: Mandelonitril, MA: Mandelamid, MS: Mandelsäure, APCN: Acetophenoncyanhydrin, ALA: Atrolactamid, AL: Atrolactat

3.5.2 Homologie-Modell der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde von der Arbeitsgruppe um Trevor Sewell (Electron Microscope Unit, University of Cape Town, Rondebosch, South Africa) durch Sequenzvergleiche zwischen der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 und verschiedenen Enzymen der Nitrilase-Superfamilie mit bekannter Struktur ein Homologie-Modell erstellt. Hierzu wurden zunächst 12 homologe Enzyme aus der Nitrilase-Superfamilie in der PDB Datenbank identifiziert, für die Strukturdaten vorhanden waren. Es wurden anschließend 2 Enzyme für die Modellierung der Struktur der Nitrilase aus *P. fluorescens* herangezogen: die D-Untereinheit der β -Alanin-Synthase aus *Drosophila melanogaster* und die aliphatischen Amidase aus *Nesterenkonia* sp. AN1. Die D-Untereinheit der β -Alanin-Synthase aus *D. melanogaster* [2vhi, Lundgren et al. (2008)] stellte insgesamt die beste Grundlage für die Modellerstellung dar, da die Sequenz - mit Ausnahme der 67 N-terminalen Aminosäuren, die aus der Modellvorlage entfernt wurden - ähnliche Merkmale aufweist wie die Sequenz der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191. Ferner ist die Struktur dieses Enzyms einzigartig unter den Nitrilase-Homologen, da es eine Vorlage für die Struktur der AS-Reste 238 - 247

in der *Pseudomonas*-Nitrilase liefert. Die Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 besitzt jedoch im Vergleich zu 2vhi eine 7 AS umfassende Insertion (beginnend bei Position 140). Dieser wichtige Teil eines β -Faltblattes, das zum katalytisch aktiven Cystein führt, wurde anhand der Koordinaten der aliphatischen Amidase aus *Nesterenkonia* sp. AN1 [3hxx, Nel et al. (2011)] modelliert. Das Homologie-Modell wurde im weiteren Verlauf von Dael Williamson (University of Cape Town, Rondebosch, South Africa) überarbeitet und nachfolgend weitere kristallisierte Enzyme der Nitrilase-Superfamilie zur Verfeinerung des Modells herangezogen. Für die Erstellung des finalen Strukturmodells wurden verwendet: das PH0642-Protein aus *Pyrococcus horikoshii* [1j31, Sakai et al. (2004)], die ω -Amidase Nit2 aus *Mus musculus* [2w1v, Barglow et al. (2008)], die N-Carbamoyl-D-Aminosäure Amidohydrolase aus *Agrobacterium* sp. Stamm KNK712 [1uf5, Hashimoto et al. (2004)], die AmiF-Formamidase aus *Helicobacter pylori* [2dyu, Hung et al. (2007)] und die β -Alanin Synthase aus *Drosophila melanogaster* [2vhh, Lundgren et al. (2008)]. Die für die Modellerstellung verwendeten Proteine zeigten jeweils 25 %, 20 %, 18 %, 17 % und 15 % Sequenz-Ähnlichkeiten zur Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191. Das so erstellte Strukturmodell der Nitrilase ist in Abb. 3.30(a) und 3.30(b) gezeigt.

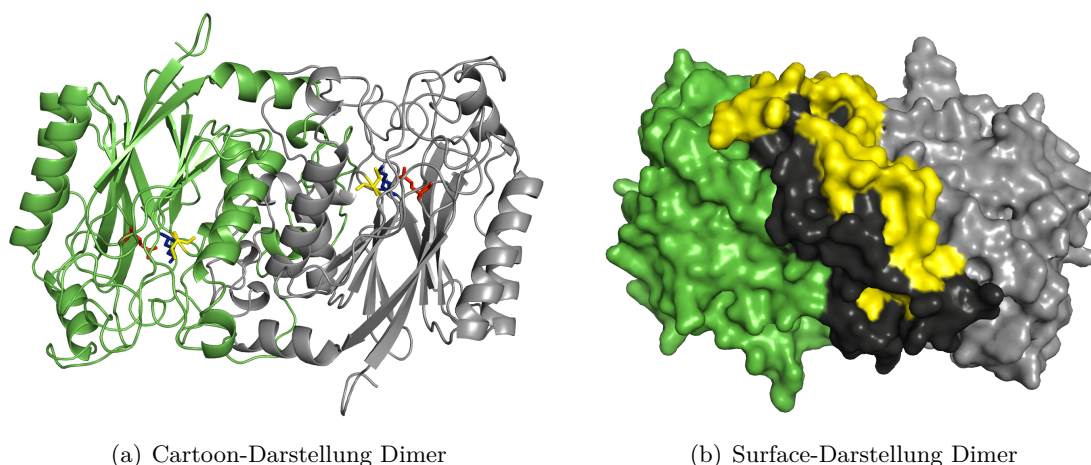


Abbildung 3.30: Strukturmodell der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191. (a) „Cartoon-Darstellung“ des Dimers. Die für Enzyme der Nitrilase-Superfamilie typische $\alpha\beta\beta\alpha$ - $\alpha\beta\beta\alpha$ Sandwich-Struktur des Dimers ist gut zu erkennen. Grün: Monomer 1, grau: Monomer 2. Die Aminosäuren der katalytischen Triade (Glu48: rot, Lys130: blau, Cys164: gelb) sind hervorgehoben. (b) „Surface-Darstellung“ des Dimers. Im Vergleich zur Darstellung in (a) wurde das Dimer um 180° gedreht. Grün: Monomer 1, gelb: C-Terminus (60 AS) von Monomer 1, grau: Monomer 2, dunkelgrau: C-Terminus (60 AS) von Monomer 2. Abbildung erstellt mit PyMol (DeLano, 2002). Das Modell wurde von Dael Williamson (Electron Microscope Unit, University of Cape Town, Rondebosch, South Africa) generiert.

3.5.3 Biotransformationen mit den Enzymvarianten A165W, P189A, S190T, S190Y, F191G und D238A der Nitrilase aus *P. fluorescens*

Anhand des Homologie-Modells wurden unterschiedliche AS-Reste identifiziert, die für die Substratspezifität der Nitrilase von Bedeutung sein könnten. Die entsprechenden AS wurden durch ortsgerichtete Mutagenese verändert und die Konstrukte ebenso wie das WT-Enzym heterolog in *E. coli* JM109 produziert. Bei der Kontrolle der Expression der Nitrilasevarianten mittels SDS-PAGE war im Allgemeinen kein signifikanter Unterschied zur Expression der Ausgangsnitrilase zu sehen.

Die neuen Enzymvarianten wurden hinsichtlich der Mandelonitril- und Acetophenoncyanhydrin-Hydrolyse, der Amidbildung, sowie im Hinblick auf die Enantioselektivität der Reaktionen anhand von Ruhezellumsätzen analysiert. Die rekombinanten *E. coli* Stämme wurden hierfür, wie in Kapitel 2.6.5 beschrieben, angezogen und induziert. Die Ruhezellumsätze erfolgten analog Kapitel 2.6.6.

3.5.3.1 Die Nitrilasevariante A165W

In Kapitel 3.3.2 wurde der Umsatz von Acetophenoncyanhydrin durch verschiedene rekombinante *E. coli* Stämme beschrieben. Von insgesamt 6 untersuchten Nitrilasen war lediglich die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 in der Lage, Acetophenoncyanhydrin vollständig zu hydrolysieren. Ein Alignment der AS-Sequenzen der Nitrilasen ergab, dass bei fast allen untersuchten Enzymen direkt nach dem katalytisch aktiven Cystein (in Richtung C-Terminus) ein Tryptophan-Rest vorhanden ist (zugehöriges Motiv: CWEH) (Abb. 3.31).

P. fl EBC191	134	TH	VER	SVY	GEG	DS	DLA	-V	H	D	T	T	L	G	-----	RL	G	A	L	C	C	A	E	H	I	Q	P	L	S	K	Y	A	M	Y	A	Q	H	E	Q	V	H	I	A	A	W	P	S	F	S	V	Y	R	G														
A. faec JM3	133	TH	VER	T	V	F	G	E	G	Y	A	R	D	L	I	-V	S	D	T	E	L	G	-----	RV	G	A	L	C	C	W	E	H	L	S	P	L	S	K	Y	A	L	Y	S	Q	H	E	A	I	H	I	A	A	W	P	S	F	S	L	Y	S	E						
R. rho J1	135	TH	VER	SVY	GEG	NG	S	D	I	S	-V	Y	D	M	P	F	A	-----	RL	G	A	L	N	C	W	E	H	F	Q	T	L	T	K	Y	A	M	S	M	H	E	Q	V	H	V	A	S	W	P	G	M	S	L	Y	Q	P												
Syn PCC6803	139	TY	H	E	R	M	V	W	G	Q	G	D	G	A	G	L	R	-T	V	D	T	T	V	G	-----	RL	G	A	L	A	C	W	E	H	Y	N	P	L	A	R	Y	A	L	M	A	Q	H	E	I	H	C	G	Q	F	P	G	S	M	V	G	--						
A. niger	131	TH	M	E	R	T	V	F	G	E	S	S	R	S	L	L	N	V	V	D	L	P	I	G	-----	K	V	G	A	L	A	C	W	E	H	I	Q	P	L	L	K	Y	H	T	M	I	Q	G	E	I	H	V	S	A	W	P	V	L	H	P	H	M	G				
N. crassa	130	TH	M	E	R	T	I	F	G	D	G	S	P	D	L	N	C	V	A	E	L	D	F	G	S	E	L	G	S	I	K	V	G	T	L	N	C	W	E	H	A	Q	P	L	L	K	F	H	E	I	Q	Q	V	V	I	H	I	A	M	P	P	I	D	P	Y	P	G

Abbildung 3.31: Alignment der Aminosäure-Sequenzen im Umfeld des katalytisch aktiven Cystein-Restes in den Nitrilasen aus *P. fluorescens* EBC191, *A. faecalis* JM3, *R. rhodochrous* J1, *Synechocystis* sp. PCC6803, *A. niger* CBS 513.88 und *N. crassa* OR74A. Die Sequenz der Nitrilase aus *A. faecalis* JM3 entspricht der Sequenz der Nitrilase aus *A. faecalis* ATCC8750 (Kiziak et al., 2007). Der katalytisch aktive Cystein-Rest ist mit einem Stern gekennzeichnet.

Der angesprochene Tryptophan-Rest ist in beinahe allen bakteriellen, pflanzlichen und pilzlichen Nitrilasen vorhanden (Petříčková et al., 2012). Zu den wenigen Ausnahmen gehören die Nitrilasen aus *P. fluorescens* EBC191, *Bradyrhizobium japonicus* USDA110 und *Klebsiella pneumonia* subsp. *ozaenae*, die das Sequenzmotiv CAEH bzw. CAEN besitzen und bei denen der Tryptophan-Rest durch einen Alanin-Rest ersetzt ist. Da Tryptophan im Vergleich zu Alanin eine sehr sperrige Aminosäure darstellt, war es denkbar, dass die Bindung von α,α -disubstituierten Phenylacetonitrilen in den Nitrilasen aus *Synechocystis* sp. PCC6803, *A. faecalis*, *R. rhodochrous*, *A. niger* und *N. crassa* durch den entsprechenden Tryptophan-Rest erschwert ist. Im Folgenden wurde daher der Einfluss einer Veränderung des Alanin-Restes an Position 165 in der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 durch einen Tryptophan-Rest untersucht, um zu prüfen, ob die Umsatzrate mit Acetophenoncyanhydrin durch diesen AS-Austausch herabgesetzt wird.

Die Enzymvariante A165W wurde bereits von Christoph Kiziak mit Mandelonitril und 2-PPN bei einem pH-Wert von 7 charakterisiert (Kiziak und Stolz, 2009). Der entsprechende Stamm war in der Stammsammlung des Institutes jedoch nicht mehr auffindbar und wurde deshalb neu erzeugt. Bei den vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass die Enzymvariante A165W bei der Hydrolyse von Mandelonitril (bei pH 7) eine deutlich verminderte Aktivität im Vergleich zum WT aufweist. Diese Beobachtung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter sauren Reaktionsbedingungen bestätigt. Die Aktivität der rekombinanten *E. coli*-Zellen, welche die Enzymvariante A165W exprimierten, betrug bei einem pH-Wert von 5 lediglich ein Zehntel der Aktivität der Ruhezellen

von *E. coli* JM109(pIK9) (Tab. 3.17).

Der AS-Austausch A165W beeinträchtigte die Fähigkeit zur Hydrolyse von Acetophenoncyanhydrin ebenfalls stark. Ruhezellen des Stammes *E. coli* JM109(pIK9/A165W) wiesen nur eine Aktivität von ca. 8 % bezogen auf die Aktivität der Ruhezellen mit der wildtypischen Nitrilase auf (Tab. 3.17). Aus diesem Grund konnte die Variante A165W, ähnlich wie bereits bei den Nitrilasen aus *A. niger* und *N. crassa* beobachtet (Abb. 3.10), nicht mehr mit dem chemischen Zerfall des Modellsubstrates in Acetophenon konkurrieren (Abb. 3.32). Die Aktivität der Ruhezellen mit der Enzymvariante A165W von 0,01 U/mg Protein war vergleichbar bzw. geringfügig höher als die Aktivitäten der Ruhezellen mit den Nitrilasen aus *A. niger* (0,01 U/mg Protein) bzw. *N. crassa* (0,003 U/mg Protein).

Die Selektivität der Variante A165W gegenüber (*R*)-Mandelonitril war im Vergleich zum WT-Enzym gesteigert (74 % (*R*)-Mandelsäure vs. 26 % (*R*)-Mandelsäure). Racemisches Acetophenoncyanhydrin wurde aufgrund des AS-Austausches anstelle zu (*R*)-Atrolactat (ee = 51 %) mit sehr geringer Präferenz zu (*S*)-Atrolactat hydrolysiert (Tab. 3.17).

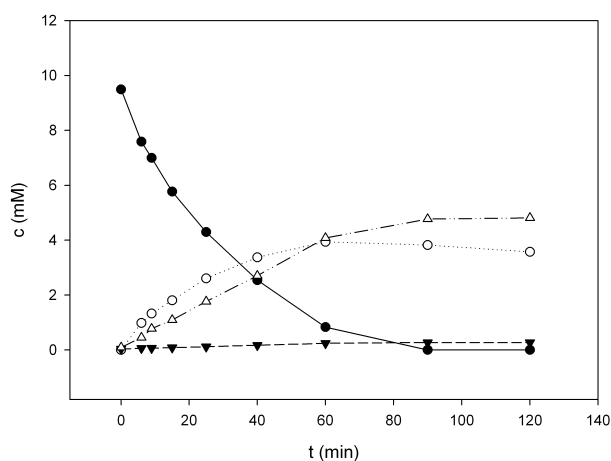


Abbildung 3.32: Umsatz von Acetophenoncyanhydrin durch *E. coli* JM109(pIK9/A165W). Ruhezellen ($OD_{600} = 100$) wurden in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 4,5) mit 10 mM Acetophenoncyanhydrin (aus einer 200 mM Stammlösung in Methanol) bei 30°C und 1100 rpm inkubiert. Aus dem Reaktionsansatz (1000 μ L) wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die Reaktion mit 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Konzentrationen an Atrolactat (Δ), Atrolactamid (\blacktriangledown), Acetophenoncyanhydrin (\bullet) und Acetophenon (\circ) in den Überständen mittels HPLC bestimmt.

3.5.3.2 Die Nitrilasevariante P189A

Gemäß dem Homologie-Modell war die Aminosäure Pro189 sehr nah am katalytisch aktiven Cystein-Rest lokalisiert (Abb. 3.33). Um den Einfluss dieser Aminosäure auf die Hydrolyse von Acetophenoncyanhydrin und Mandelonitril abzuschätzen, wurde der Prolin-Rest gegen Alanin ausgetauscht und der Umsatz der Nitrile analysiert. Der AS-Austausch führte zu einer Verdopplung des relativen Mandelamidanteils (WT: 19 %; P189A: 38 %, vgl. Tab. 3.17). Auch bei dem sterisch anspruchsvollen Acetophenoncyanhydrin wurde von Ruhezellen mit der Enzymvariante P189A etwa doppelt so viel Atrolactamid (41 %) gebildet als von Ruhezellen, welche die wildtypische Nitrilase expri-

mierten (23 %). Ebenso war beim Stamm *E. coli* JM109(pIK9/P189A) die Selektivität gegenüber (*R*)-Mandelonitril und (*R*)-Acetophenoncyanhydrin leicht erhöht im Vergleich zum Stamm *E. coli* JM109(pIK9) (Tab. 3.17). Die relative Aktivität mit Acetophenoncyanhydrin (bezogen auf die Aktivität mit MN bei pH 4,5) war mit 4,9 % im Vergleich zum WT-Enzym etwas erhöht. Eine deutliche Steigerung der Acetophenoncyanhydrin Umsatzrate konnte mit dem beschriebenen AS-Austausch aber nicht erzielt werden.

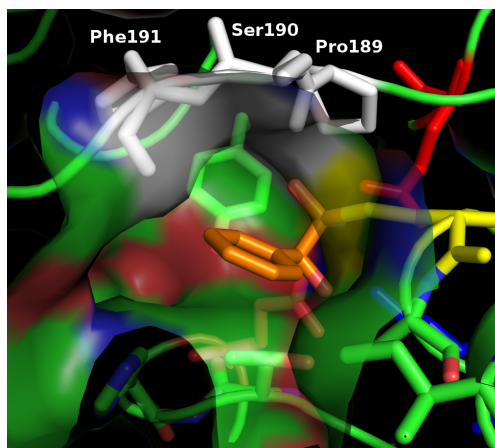


Abbildung 3.33: Substratbindetasche der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 gemäß dem Homologie-Modell. An das katalytisch aktive Cys164 (gelb) ist (*S*)-Mandelonitril (orange) gebunden (tetraedrisches Intermediat). Die Aminosäuren Phe191, Ser190 und Pro189 (weiß) begrenzen die Substratbindetasche. Abbildung erstellt mit PyMol (DeLano, 2002).

3.5.3.3 Die Nitrilasevarianten S190T, S190Y und F191G

Die AS-Reste Ser190 und Phe191 waren nach dem Homologie-Modell zusammen mit Pro189 Teil eines Strukturabschnittes (Loop), der die Substratbindetasche begrenzt (Abb. 3.33). Zudem ist der korrespondierende Bereich in der D-Carbamoylase aus *Agrobacterium* sp. KNK712 ebenfalls Teil der Substratbindetasche (Kiziak et al., 2007). Um den Einfluss der Größe dieser Aminosäuren auf die Hydrolyse von Acetophenoncyanhydrin und Mandelonitril abzuschätzen, wurde Phe191 gegen Glycin und Ser190 gegen die strukturell ähnliche AS Threonin sowie gegen eine sterisch anspruchsvolle Aminosäure mit Hydroxy-Funktion (Tyrosin) ausgetauscht. Die Hydrolyse von Mandelonitril durch die Variante S190T entsprach hinsichtlich der Umsatzrate, des relativen Amidanteils und der Enantioselektivität weitgehend dem WT-Enzym (Tab. 3.17). Die Aktivität der Ruhezellen, welche diese Variante bildeten, war beim Umsatz von Acetophenoncyanhydrin leicht herabgesetzt. Der AS-Austausch S190Y führte erwartungsgemäß zu einer stärkeren Veränderung der Enzymeigenschaften. Die Aktivität bei der Hydrolyse von Mandelonitril und Acetophenoncyanhydrin war deutlich vermindert, ebenso wie die relativen Amidanteile (Tab. 3.17). Überraschend war jedoch, dass die Enzymvariante S190Y eine geringe Toleranz gegenüber sauren pH-Werten aufwies. So waren die Ruhezellen dieser Variante bei einem pH-Wert von 5 etwa 15 min aktiv, bei einem pH-Wert von 4,5 etwa 5 - 10 min. Dagegen wurde beim WT keine Abnahme der Aktivität beobachtet (siehe Abb. 3.9 und Tab. 3.16).

Wie bereits bei den Deletionsmutanten beobachtet (Kap. 3.5.1), war beim rekombinanten *E. coli*-Stamm (pIK9/F191G) die relative Aktivität mit MN bei pH 4,5 (bezogen auf die Aktivität mit MN

bei pH 5) mit 69 % deutlich höher als beim rekombinanten *E. coli*-Stamm, welcher die wildtypische Nitrilase exprimiert (20 %). Abgesehen von der höheren Restaktivität bei pH 4,5, zeigten Ruhezellen mit der Variante F191G bei der Hydrolyse von Mandelonitril und Acetophenoncyanhydrin ähnliche Eigenschaften wie Ruhezellen mit WT-Enzym (Tab. 3.17).

3.5.3.4 Die Nitrilasevariante D238A

Im Homologie-Modell der Nitrilase aus *P. fluorescens* waren zwei mögliche Zugänge zum aktiven Zentrum zu erkennen. Einer dieser Zugänge ist in Abb. 3.34(a) dargestellt. Im Hintergrund ist der katalytisch aktive Cystein-Rest an Position 164 (gelb) zu erkennen. Die Enzymvariante D238A wurde im Hinblick auf die Vergrößerung des Zugangs zum aktiven Zentrum erzeugt (Abb. 3.34(b)). Die Hydrolyse von Mandelonitril durch Ruhezellen der Variante D238A entsprach hinsichtlich der Umsatzrate, des relativen Amidanteils und der Enantioselektivität weitgehend dem WT-Enzym (Tab. 3.17). Ruhezellen von *E. coli* JM109(pIK9/D238A) zeigten bei der Acetophenoncyanhydrin-Hydrolyse eine leicht verminderte Aktivität im Vergleich zur Aktivität der Ruhezellen des Stammes *E. coli* JM109(pIK9). Der AS-Austausch hatte dementsprechend nur wenig Einfluss auf die Enzymeigenschaften.

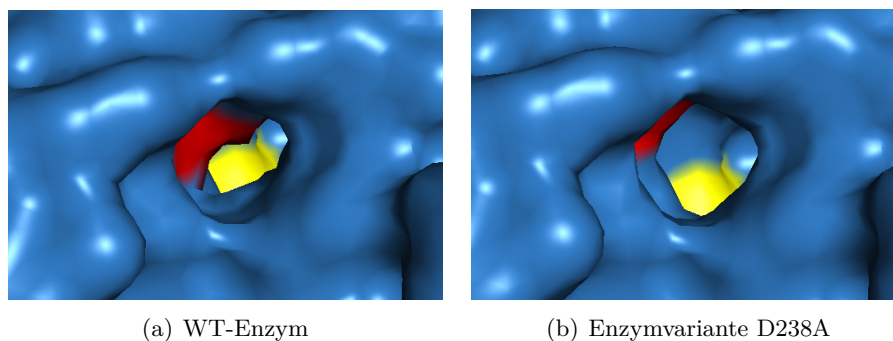


Abbildung 3.34: Aufsicht auf das aktive Zentrum bei der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 (a) sowie der vorhergesagte Effekt der Punktmutation D238A (b). Die Aminosäure an Position 238 ist im Wildtyp und der Ala-Mutante rot markiert. Im Hintergrund ist der katalytisch aktive Cystein-Rest an Position 164 (gelb) zu erkennen. Abbildung erstellt mit PyMol (DeLano, 2002).

Tabelle 3.17: Umsatz von Acetophenoncyanhydrin und Mandelonitril bei verschiedenen pH-Werten durch verschiedene Varianten der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191.

Substrat	pH-Wert	Parameter	Variante						
			WT	A165W	P189A	S190T	S190Y	F191G	D238A
MN	5	spez. Aktivität (U/mg Protein)	17,3 ± 1,9	1,7	1,9	17,5	2,5	7,5	15,3
		MA ¹ (%)	19 ± 0,7	1	38	19	9	12	18
		ee MS ² (%)	26 ± 0,5 (R)	n.b.	45 (R)	25 (R)	13 (R)	n.b.	23 (R)
MN	4,5	spez. Aktivität (U/mg Protein)	3,4 ± 0,4	1,0	0,9	4,8	0,3	5,2	4,3
		MA ¹ (%)	19 ± 0,5	1	38	19	11	12	18
		ee MS ² (%)	25 ± 1,7 (R)	74 (R)	48 (R)	26 (R)	n.b.	n.b.	23 (R)
		rel. Aktivität ³ (%)	20 ± 0,1	59	47	27	-	69	28
APCN	4,5	spez. Aktivität (U/mg Protein)	0,13 ± 0,01	0,01	0,04	0,07	0,04	0,08	0,07
		ALA ⁴ (%)	23 ± 1,8	5	41	14	8	20	20
		ee AL ² (%)	51 ± 2,4 (R)	9 (S)	68 (R)	54 (R)	76 (R)	n.b.	54 (R)
		rel. Aktivität ³ (%)	0,8 ± 0,01	0,6	2,3	0,4	1,6	1,0	0,5
		rel. Aktivität ⁵ (%)	3,8 ± 0,06	1,0	4,9	1,5	-	1,5	1,6

Die Anzucht und Induktion der rekombinanten *E. coli* Stämme erfolgte gemäß Kap. 2.6.5 und die Ruhezellumsätze wurden entsprechend Kap. 2.6.6 durchgeführt.

¹ [MA]/[MA]+[MS]

² bei ca. 30 % Substratumsatz

³ bezogen auf die Aktivität mit MN bei einem pH-Wert von 5 (= 100 %)

⁴ [ALA]/[ALA]+[AL]

⁵ bezogen auf die Aktivität mit MN bei einem pH-Wert von 4,5 (= 100 %)

- vollständiger Aktivitätsverlust nach wenigen Minuten Inkubation

n.b. nicht bestimmt

MN: Mandelonitril, MA: Mandelamid, MS: Mandelsäure, APCN: Acetophenoncyanhydrin, ALA: Atrolactamid, AL: Atrolactat

3.5.4 Biotransformationen mit der Enzymvariante Y54A der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass sterisch anspruchsvolle Nitrile wie Acetophenoncyanhydrin oder 2-Methyl-2-phenylpropannitril von der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 mit geringerer Aktivität umgesetzt wurden als die korrespondierenden Arylacetonitrile Mandelonitril oder 2-PPN. Es war daher wahrscheinlich, dass die geringeren Reaktionsraten mit APCN oder MMN auf sterische Effekte aufgrund der zusätzlichen Substituenten am α -Kohlenstoffatom zurückzuführen waren. Von entscheidender Bedeutung für den Umsatz sterisch anspruchsvoller Nitrile ist

die Orientierung des Substrates im aktiven Zentrum. Bei Nitrilase katalysierten Reaktionen sind die stärksten Einschränkungen im Hinblick auf die Positionierung des Substrates für das tetraedrische Intermediat zu erwarten. Gemäß des vorgeschlagenen katalytischen Mechanismus (s. Abb. 1.5) sollte bei dieser Intermediatstruktur das C-Atom der Nitril-Gruppe kovalent an den Cystein-Rest C164 gebunden sein und das Oxyanion durch Wasserstoffbrückenbindungen zum Lysin-Rest (K130) und zur Amino-Gruppe von Alanin165 stabilisiert werden (Andrade et al., 2007; Chin et al., 2007). Die Amino-Gruppe des tetraedrischen Intermediates sollte in diesem Fall zwischen den beiden Carboxyl-Gruppen der Glutamat-Reste E48 und E137 lokalisiert sein. Ein Modell der Nitrilase mit dem kovalent gebundenen tetraedrischen Intermediat von (*S*)-Acetophenoncyanhydrin (T. Sewell, Universität Kapstadt) deutete an, dass die AS an Position 54 möglicherweise räumlich mit einer der α -ständigen Gruppen in sterisch anspruchsvollen Nitrilen konkurrieren könnte (Abb. 3.35). Um den Einfluss dieses Aminosäure-Restes auf den Umsatz sterisch anspruchsvoller Nitrile abzuschätzen, wurde zunächst die Enzymvariante Y54A erzeugt.

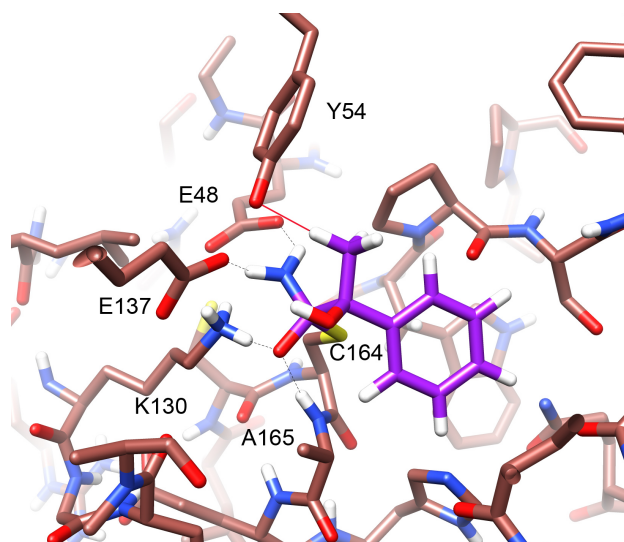


Abbildung 3.35: Homologie-Modell der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 mit dem kovalent gebundenen tetraedrischen Intermediat von (*S*)-Acetophenoncyanhydrin (violett). Das Modell der Nitrilase wurde von den Kristallstrukturen der aliphatischen Amidase aus *Nesterenkonia* sp. (3hkx) und der D-Untereinheit der β -Alanin-Synthase aus *D. melanogaster* (2vhi) abgeleitet. Die relativen Positionen von E48, Y54, K130, E137, C164 sowie das Rückgrat an Position 165 waren bei den beiden Referenzproteinen stark konserviert. Im Modell wurden ihre Positionen von 3hkx abgeleitet. Die mögliche Position der Methylgruppe von (*S*)-Acetophenoncyanhydrin wird durch die Ausrichtung des tetraedrischen Intermediates eingeschränkt. In dieser Ausrichtung könnte es zu einem Zusammenstoß mit der Seitenkette von Y54 kommen, welcher durch die rote Linie angezeigt wird. Abbildung erstellt von T. Sewell (Universität Kapstadt, Südafrika) mittels USCF Chimera (Pettersen et al., 2004).

Die Variante Y54A war in der Lage, die Modellsubstrate Mandelonitril und Acetophenoncyanhydrin umzusetzen, wenn auch mit geringerer Enzymaktivität.

Mit MN war die spezifische Aktivität bei einem pH-Wert von 5 hierbei deutlich stärker vermindert als bei einem pH-Wert von 4,5 (Tab. 3.19). Die Variante Y54A zeigte somit eine höhere „Restaktivität“ bei einem pH-Wert von 4,5. Interessant war, dass die Amidbildung der Enzymvariante beim Umsatz der beiden Substrate sehr stark vermindert war. Aus Mandelonitril wurde kein nachweisbares Mandelamid gebildet; aus Acetophenoncyanhydrin lediglich 2 % Atrolactamid (Tab. 3.19). Im Gegensatz dazu bildete das WT-Enzym 19 % Mandelamid und 23 % Atrolactamid

aus den entsprechenden Nitrilen. Bei der Analyse der Umsätze fiel auf, dass die Variante Y54A mit Acetophenoncyanhydrin eine ungewöhnliche Enzymkinetik aufwies, da nach dem Unterschreiten einer Substratkonzentration von etwa 4 mM die Hydrolyse des Nitrils schlagartig schneller wurde (Abb. 3.36(a)). Dieses Phänomen wurde bei der WT-Nitrilase nicht beobachtet (Abb. 3.9(a)). Beim Umsatz von Mandelonitril zeigte die Enzymvariante Y54A kein auffälliges Verhalten (Abb. 3.36(b)). Um auszuschließen, dass die Variante Y54A durch Acetophenoncyanhydrin Konzentrationen > 4 mM gehemmt wird, wurden Ruhezellumsätze mit einer geringeren Substratkonzentration ($\leq 2,5$ mM) durchgeführt. Diese Umsätze lieferten keinen Beweis einer Hemmung des Enzyms bei Substratkonzentrationen > 4 mM.

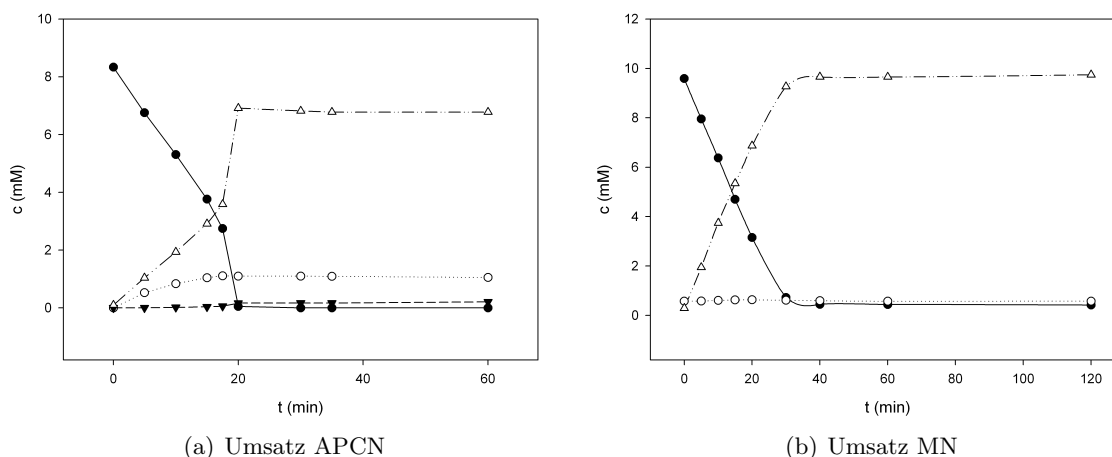


Abbildung 3.36: Umsatz von Acetophenoncyanhydrin (a) bzw. Mandelonitril (b) durch *E. coli* JM109(pIK9/Y54A). Ruhezellen (a: $OD_{600} = 63$, b: $OD_{600} = 1,9$) wurden in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 4,5) bei (a) mit 10 mM Acetophenoncyanhydrin (aus einer 200 mM Stammlösung in Methanol) bzw. bei (b) mit 10 mM Mandelonitril (aus einer 200 mM Stammlösung in Methanol) bei 30°C und 1150 rpm inkubiert. Aus den Reaktionsansätzen (je 1000 μ L) wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die Reaktionen durch Zugabe von 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden bei (a) die Konzentrationen an Atrolactat (Δ), Atrolactamid (\blacktriangledown), Acetophenoncyanhydrin (\bullet) und Acetophenon (\circ) bzw. bei (b) die Konzentrationen an Mandelsäure (Δ), Mandelonitril (\bullet) und Benzaldehyd (\circ) in den Überständen mittels HPLC bestimmt.

Im Folgenden wurde ein (weiterer) Umsatz mit Acetophenoncyanhydrin zusätzlich mittels chiraler HPLC untersucht, wobei ähnliche Kurvenverläufe festgestellt werden konnten (Abb. 3.37(a) und Abb. 3.37(b)). Die chirale Analyse ergab, dass die ungewöhnliche Enzymkinetik darauf zurückzuführen war, dass die Variante Y54A zunächst bevorzugt (*R*)-Atrolactat synthetisierte und die Beschleunigung der Reaktion mit der verstärkten Hydrolyse von (*S*)-Acetophenoncyanhydrin zu (*S*)-Atrolactat (und (*S*)-Atrolactamid) einherging (Abb. 3.37(b)). Erstaunlicherweise wurde das *S*-Enantiomer, das eine geringe Affinität zur Enzymvariante Y54A aufwies, folglich schneller umgesetzt als das *R*-Enantiomer, das eine höhere Affinität zur entsprechenden Enzymvariante aufwies.

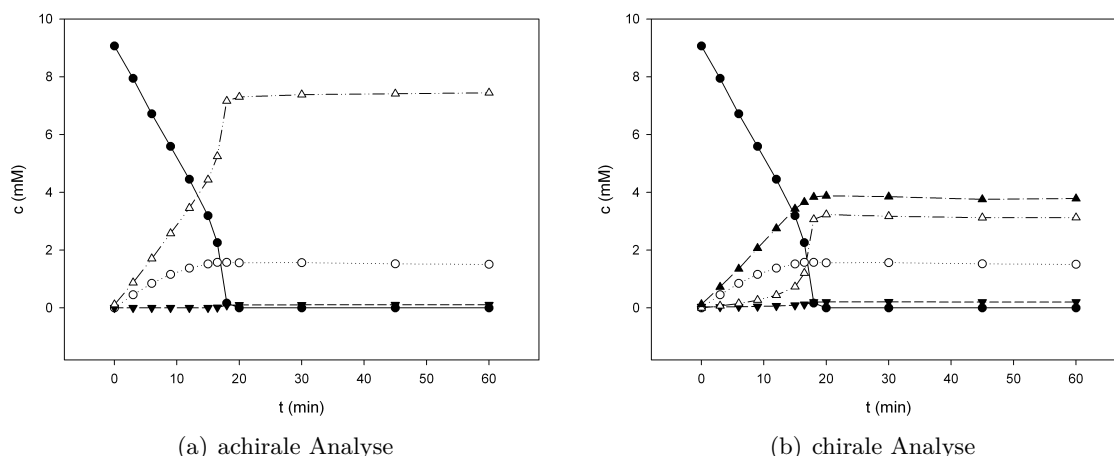


Abbildung 3.37: Umsatz von Acetophenoncyanhydrin durch *E. coli* JM109(pIK9/Y54A). Ruhezellen ($OD_{600} = 56$) wurden in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 4,5) mit 10 mM Acetophenoncyanhydrin (aus einer 200 mM Stammlösung in Methanol) bei 30°C und 1100 rpm inkubiert. Aus dem Reaktionsansatz (1000 μ L) wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden bei (a) die Konzentrationen an Atrolactat (Δ), Atrolactamid (\blacktriangledown), Acetophenoncyanhydrin (\bullet) und Acetophenon (\circ) bzw. bei (b) die Konzentrationen an (S)-Atrolactat (Δ), (R)-Atrolactat (\blacktriangle), (S)-Atrolactamid (\blacktriangledown), Acetophenoncyanhydrin (\bullet) und Acetophenon (\circ) in den Überständen mittels HPLC bestimmt.

3.5.5 Sättigungsmutagenese an Position Y54 in der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191

Der AS-Austausch Y54A in der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 hatte zu einer starken Veränderung der Enzymeigenschaften geführt. Um die Bedeutung dieses AS-Restes näher zu charakterisieren, wurde eine Sättigungsmutagenese an der entsprechenden Position mit Hilfe eines degenerierten Oligonukleotid-Primerpaars (Motiv: NNS) durchgeführt (siehe Kap. 2.9.2). Das Basenmotiv „NNS“ (N: A/C/G/T, S: C/G) sollte den Einbau aller 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren ermöglichen. *E. coli* XL1-Blue oder *E. coli* XL10-Gold Zellen wurden mit den mutagenisierten Plasmiden transformiert und positive Klone auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 μ g/mL) selektiert. Die Anzahl der Klone, die hinsichtlich der Umsetzung von Acetophenoncyanhydrin getestet werden musste, richtete sich nach den Angaben des Programms Caster (Reetz et al., 2006), wonach bei einem einzelnen AS-Austausch (32 mögliche Basentriplets) 94 Klone gescreent werden müssen, um mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit alle möglichen AS-Austausche zu generieren. 94 Klone der Bank, die insgesamt 115 Transformanten umfasste, wurden in LB-Medium mit Ampicillin (100 μ g/mL) angezogen und die Kulturen nach dem Überimpfen in 10 mL LB-Amp-Medium (1:100, v/v) mit 0,2 % (w/v) Rhamnose versetzt. Nach etwa 17 h Kultivierung bei 30°C auf dem Schüttler (100 rpm) wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 rpm, 4 °C, 10 min) geerntet, einmal in 5 mL Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5) gewaschen und anschließend direkt für Ruhezellumsätze eingesetzt. Die Ruhezellen ($OD_{600} = 30$) wurden hierfür in 100 mM Na-Citratpuffer (pH 4,5) resuspendiert, mit 10 mM Acetophenoncyanhydrin versetzt und bei 30°C und 1100 rpm inkubiert. Aus den Reaktionsansätzen (1000 μ L) wurden nach 15 min und 120 min Inkubation Proben entnommen, die Zellen durch Zentrifugation entfernt (13500 rpm, 4°C, 10 min) und die Überstän-

de anschließend mittels HPLC analysiert. Die Ergebnisse der Ruhezellumsätze im Vergleich zum Wildtyp (WT) sind in Abb. 3.38 dargestellt.

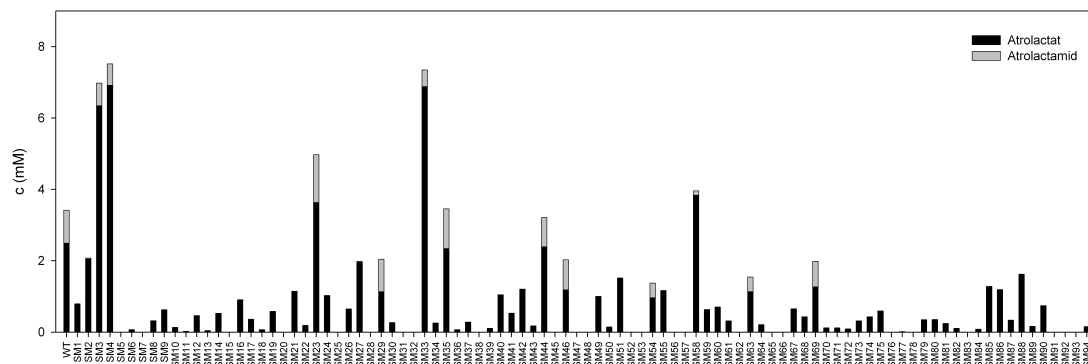


Abbildung 3.38: Umsatz von Acetophenoncyanhydrin durch verschiedene, durch Sättigungsmutagenese an der Position 54 der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 erzeugte, Enzymvarianten. Die Herstellung der Ruhezellen der rekombinanten *E. coli* Stämme erfolgte wie im Text beschrieben. Die Ruhezellen ($OD_{600} = 30$) wurden anschließend mit 10 mM Acetophenoncyanhydrin (aus einer 200 mM Stammlösung in Methanol) in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 4,5) bei 30°C und 1100 rpm inkubiert. Aus den Reaktionsansätzen (1000 μ L) wurden nach 15 min Inkubation Proben entnommen und die Reaktionen mit 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Konzentrationen an Atrolactat, Atrolactamid, Acetophenoncyanhydrin und Acetophenon in den Überständen mittels HPLC bestimmt. In der Abb. sind die Konzentrationen der Produkte (Atrolactat und Atrolactamid) dargestellt.

Drei Klone setzten Acetophenoncyanhydrin schneller um als der rekombinante *E. coli* Stamm mit WT-Nitrilase. Von 4 Klonen wurden nach 15 min Inkubation etwa vergleichbare Produktmengen (Atrolactat bzw. Atrolactamid) gebildet wie vom *E. coli* Stamm, der die wildtypische Nitrilase exprimiert. Alle anderen Klone zeigten einen langsameren Umsatz von Acetophenoncyanhydrin. Bei etwas mehr als der Hälfte der Klone konnten auch nach 120 min Inkubation entweder keine oder nur sehr geringe Produktmengen detektiert werden (nicht dargestellt).

Tabelle 3.18: Im Rahmen der Sättigungsmutagenese an Position Tyr54 erzeugte Enzymvarianten. Zum Vergleich ist in der ersten Zeile das Basentriplett sowie die zugehörige Aminosäure des WT-Enzyms aufgeführt. Die Klone SM55* und SM72* enthielten jeweils einen weiteren AS-Austausch (SM55: Gly285Val bzw. SM72: Trp57Cys).

Klon	Triplett	Aminosäure
WT	TAT	Tyr
SM2	GTC	Val
SM3, SM4, SM33	ATG	Met
SM5	AAG	Lys
SM11	GGG	Gly
SM14	CAC	His
SM16, SM75	CCG	Pro
SM27, SM55*, SM58	TTC	Phe
SM29, SM35, SM72*	TAC	Tyr
SM49	TGC	Cys
SM64	TGG	Trp
SM86, SM88	CTC	Leu
SM92	AGG	Arg

Um herauszufinden, wie viele unterschiedliche Codons an der mutagenisierten Position eingebaut worden waren, wurden anhand der HPLC-Analysen 20 möglichst unterschiedliche Klone für eine DNA-Sequenzierung ausgewählt. Die so identifizierten Mutationen und die kodierten Aminosäure-Austausche sind in Tab. 3.18 aufgeführt. Von den 32 möglichen Basentriplets kamen 12 verschiedene Triplets vor, wobei das im Ausgangsgen vorhandene Basentriplett TAT in keinem Klon wiedergefunden wurde, da dies mit dem degenerierten Primermotiv NNS nicht möglich ist (Tab. 3.18). Bei 2 der 20 Klone waren zusätzliche Mutationen vorhanden, die teilweise zu weiteren AS-Austauschen führten (Klon SM55: Gly285Val, Klon SM72: Trp57Cys). Entsprechend der Vorhersage des Programms Caster war bei 30 % der untersuchten Klone Tyr54 durch unpolare, aliphatische Aminosäuren wie Met, Val und Leu bzw. bei 15 % der Klone der Tyrosin-Rest gegen basische AS wie Arg, Lys und His ersetzt. Entgegen der Vorhersage des Programms waren die Basentriplets TAC und TTC, die für aromatische Aminosäuren (Phe und Tyr) codieren, mit jeweils 15 % überrepräsentiert (Tab. 3.18). Überraschend war ferner, dass lediglich bei einem der sequenzierten Klone Tyr gegen eine polare AS ausgetauscht war (hier: Cys). Polare AS wie Asn, Cys, Gln, Ser und Thr sollten gemäß Caster unter den Enzymvarianten mit einer Wahrscheinlichkeit von 25 % vorkommen. Da die AS-Verteilung nur teilweise der Vorhersage entsprach und die Wahrscheinlichkeit für den Austausch des Tyrosin-Restes durch z.B. saure AS sehr gering war (lediglich 6,3 %), wurde anschließend Tyr54 einzeln durch zielgerichtete Mutagenese gegen Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr oder Ile ausgetauscht (Kap. 2.9.1). Die Ergebnisse der Ruhezellsätze mit diesen Enzymvarianten sind in Abb. 3.39 dargestellt. Alle Klone zeigten einen langsameren Umsatz von Acetophenoncyanhydrin im Vergleich zum *E. coli* Stamm, der die wildtypische Nitrilase exprimierte.

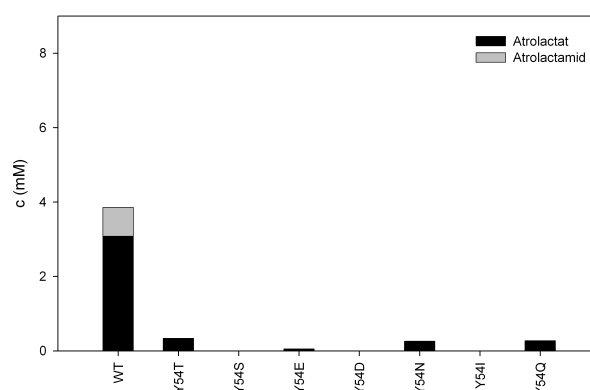


Abbildung 3.39: Umsatz von Acetophenoncyanhydrin durch verschiedene, durch Punktmutationen an der Position 54 der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 erzeugte, Enzymvarianten. Die Herstellung der Ruhezellen der rekombinanten *E. coli* Stämme erfolgte wie im Text beschrieben. Die Ruhezellen ($OD_{600} = 30$) wurden mit 10 mM Acetophenoncyanhydrin (aus einer 200 mM Stammlösung in Methanol) in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 4,5) bei 30°C und 1100 rpm inkubiert. Aus den Reaktionsansätzen (1000 μ L) wurden nach 15 min Inkubation Proben entnommen und die Reaktion mit 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Konzentrationen an Atrolactat, Atrolactamid, Acetophenoncyanhydrin und Acetophenon in den Überständen mittels HPLC bestimmt. In der Abb. sind die Konzentrationen der Produkte (Atrolactat und Atrolactamid) dargestellt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass annähernd alle untersuchten Enzymvarianten weniger Atrolactamid bildeten als das WT-Enzym (Abb. 3.38 und 3.39). Auffällig war ferner, dass die Klone

SM3, SM4 und SM33 (für die Variante Y54M kodierend) Acetophenoncyanhydrin etwa doppelt so schnell zu Atrolactat und Atrolactamid umsetzten als *E. coli* JM109(pIK9) (Abb. 3.38). War der Tyrosin-Rest an Position 54 durch saure (Glu, Asp), basische (Arg, His, Lys) oder nicht ionische polare (Asn, Cys, Ser, Thr) Aminosäuren ersetzt, wurden von diesen Enzymvarianten nach 15 min Inkubation deutlich weniger Produkte (Atrolactat und Atrolactamid) gebildet als vom WT-Enzym. Die Variante, die den AS-Austausch Y54S aufwies, enthielt einen zusätzlichen AS-Austausch (R304L). Da sich Threonin lediglich durch eine zusätzliche Methyl-Gruppe von Serin unterscheidet und die Enzymvariante Y54T ebenfalls nur eine schwache Acetophenoncyanhydrin-Hydrolyse zeigte, wurden keine Anstrengungen unternommen, die Variante Y54S neu zu erstellen.

3.5.6 Biotransformationen mit den Enzymvarianten Y54R, Y54I, Y54K, Y54V, Y54M, Y54F und Y54P

Bei den im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Umsätzen mit Acetophenoncyanhydrin wurde bei den Enzymvarianten Y54R, Y54I und Y54K bei einer optischen Dichte (600 nm) von 30 und 120-minütiger Inkubation keine Nitril-hydrolysierenden Aktivitäten detektiert. Um festzustellen, ob diese Enzymvarianten auch mit einem sterisch weniger anspruchsvollen Substrat keine Aktivität mehr zeigten, wurden Umsätze mit Mandelonitril bei hoher Zelldichte durchgeführt. Es konnten hierbei keinerlei Nitril-hydrolysierende Aktivitäten festgestellt werden.

Die Enzymvarianten Y54V, Y54P, Y54F und Y54M aus der Sättigungsmutagenese wurden anschließend genauer untersucht. Die Varianten Y54V und Y54P wurden ausgewählt, da sie bei den in Kapitel 3.5.5 beschriebenen Testumsätzen wenig Atrolactamid gebildet hatten. Die Variante Y54F wurde aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Phenylalanin im Vergleich zur Aminosäure Tyrosin im Wildtyp eingehender untersucht. Die Enzymvariante Y54M wurde analysiert, da die rekombinanten *E. coli* Stämme, welche diese Variante synthetisierten, Acetophenoncyanhydrin etwa doppelt so schnell hydrolysiert hatten als *E. coli* JM109(pIK9) (Kapitel 3.5.5). Für die Charakterisierung der Enzymvarianten wurden *E. coli* JM109 Zellen zunächst mit den für die jeweiligen Varianten kodierenden Plasmiden transformiert. Anschließend wurde die Nitrilasebildung durch Rhamnosezugabe (0,2 %, w/v) induziert und die Intensität der Nitrilasebanden im SDS-Gel verglichen. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede in den Nitrilasebanden beobachtet werden (nicht dargestellt). Nachfolgend wurden Ruhezellumsätze mit Acetophenoncyanhydrin und Mandelonitril bei pH 5 und 4,5 entsprechend Abb. 3.36 bzw. Kapitel 3.5.1 durchgeführt und mit den Ergebnissen der Variante Y54A verglichen (Tabelle 3.19).

Die relative Aktivität mit Acetophenoncyanhydrin (bezogen auf die Aktivität mit MN bei pH 4,5) betrug bei der Variante Y54M 8,5 %. Beim Wildtyp lag dieser Wert lediglich bei 3,8 %. Dies bestätigte die bereits in Kapitel 3.5.5 erhaltenen Ergebnisse, dass die rekombinanten Zellen, welche die Variante Y54M synthetisierten, Acetophenoncyanhydrin etwa doppelt so schnell hydrolysierten wie *E. coli* JM109(pIK9).

Auch die relative Aktivität der Variante Y54V war mit dem sterisch anspruchsvollen Modells substrat im Vergleich zur Aktivität mit Mandelonitril erhöht (8 % vs. 3,8 % beim WT). Es zeigte sich außerdem, dass bei fast allen Mutanten eine Abnahme der Amidbildung aus MN mit einer Abnahme der Amidbildung aus Acetophenoncyanhydrin einherging. Eine Ausnahme von dieser Regel stellte die Variante Y54F dar. Während von der Enzymvariante Y54F aus Mandelonitril

lediglich rund 2 % MA gebildet wurde, war beim Umsatz von Acetophenoncyanhydrin der Atrolactamidanteil im Vergleich zum WT-Enzym nur geringfügig herabgesetzt (16 % gegenüber 23 %). Interessant war ferner, dass die Varianten Y54M und Y54F bei 30 % Substratumsatz sehr viel mehr (*R*)-Atrolactat bildeten (ee = 86 % bzw. 93 %) als das WT-Enzym (ee = 51 %). Im Gegensatz dazu war die Selektivität gegenüber (*R*)-Mandelonitril jedoch nicht gesteigert (Tab. 3.19). Die chirale Analyse der Umsätze von Acetophenoncyanhydrin durch die Enzymvarianten Y54V und Y54P ergab, dass die Hydrolyse des *S*-Enantiomers durch die Anwesenheit des *R*-Enantiomers in ähnlicher Weise inhibiert wurde wie bei der Enzymvariante Y54A (Abb. 3.40).

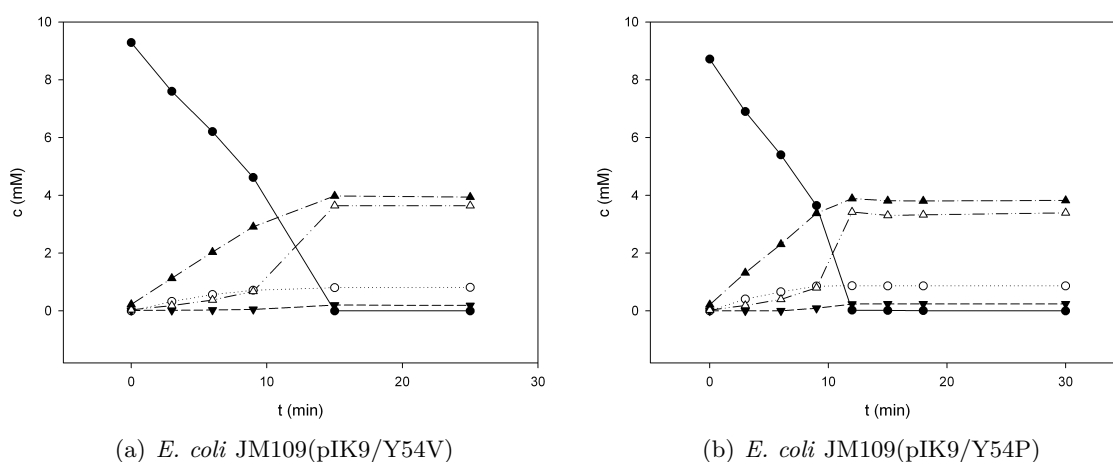


Abbildung 3.40: Umsatz von Acetophenoncyanhydrin durch (a) *E. coli* JM109(pIK9/Y54V) und (b) *E. coli* JM109(pIK9/Y54P). Ruhezellen (a: OD₆₀₀ = 53, b: OD₆₀₀ = 74) wurden in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 4,5) mit 10 mM Acetophenoncyanhydrin (aus einer 200 mM Stammlösung in Methanol) bei 30°C und 1100 rpm inkubiert. Aus den Reaktionsansätzen (je 1000 μL) wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die Reaktionen durch Zugabe von 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Konzentrationen an (*S*)-Atrolactat (Δ), (*R*)-Atrolactat (▲), (*S*)-Atrolactamid (▼), Acetophenoncyanhydrin (●) und Acetophenon (○) in den Überständen mittels HPLC bestimmt.

Im Folgenden wurden zusätzlich Ruhezellumsätze mit einem zweiten Substratpaar (2-PPN und 2-Methyl-2-phenylpropannitril, MMN) durchgeführt. Die beiden Substrate unterscheiden sich durch dieselbe Struktureigenschaft voneinander wie Mandelonitril und Acetophenoncyanhydrin. Bei den sterisch anspruchsvollen Nitrilen (MMN bzw. APCN) ist im Vergleich zum korrespondierenden Arylacetonitril (2-PPN bzw. MN) am α -Kohlenstoffatom zusätzlich eine Methyl-Gruppe vorhanden. Die zuvor dargestellten Ergebnisse wurden mit dem zweiten Substratpaar im Wesentlichen bestätigt. So zeigten die Enzymvarianten Y54M und Y54V mit 24 bzw. 18 % auch beim Umsatz von MMN eine höhere rel. Aktivität (bezogen auf die Aktivität mit 2-PPN) als der Wildtyp mit 7,5 % (Tab. 3.19).

Bei der Variante Y54F ergab die Analyse der Umsätze mittels chiraler HPLC, dass deren Selektivität gegenüber (*R*)-MN mit einem ee-Wert von 27 % vergleichbar war zum WT-Enzym (ee = 25 %). Die Selektivität gegenüber (*S*)-2-PPN war bei der Enzymvariante Y54F mit einem ee-Wert von 81 % im Vergleich zum Wildtyp (ee = 61 %) hingegen gesteigert.

Tabelle 3.19: Umsatz von Acetophenoncyanhydrin, Mandelonitril, 2-Methyl-2-phenylpropannitril und 2-Phenylpropannitril durch verschiedene Varianten der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191.

Substrat	pH-Wert	Parameter	Variante					
			WT	Y54A	Y54V	Y54M	Y54F	Y54P
MN	5	spez. Aktivität (U/mg Protein)	17,3 ± 1,9	2,9	2,5	5,9 ± 0,2	6,1	3,3
		MA ¹ (%)	19 ± 0,7	0	1	10 ± 0,7	2	1
		ee MS ² (%)	26 ± 0,5 (R)	11 (R)	10 (R)	28 ± 2,6 (R)	26 (R)	13 (R)
MN	4,5	spez. Aktivität (U/mg Protein)	3,4 ± 0,4	2,1 ± 0,5	1,5	2,3 ± 0,1	4,2	2,2 ± 0,1
		MA ¹ (%)	19 ± 0,5	0	1	8 ± 0,7	1,8	0,6 ± 0,02
		ee MS ² (%)	25 ± 1,7 (R)	11 ± 3 (R)	10 (R)	27 ± 3 (R)	27 (R)	13 ± 2 (R)
		rel. Aktivität ³ (%)	20 ± 0,1	59	60	39 ± 4	69	67
APCN	4,5	spez. Aktivität (U/mg Protein)	0,13 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,12	0,2 ± 0,02	0,15	0,1 ± 0,00
		ALA ⁴ (%)	23 ± 1,8	2 ± 0,5	0,8	7 ± 1,2	16	1,5 ± 0,4
		ee AL ² (%)	51 ± 2,4 (R)	71 ± 3 (R)	69 (R)	86 ± 0,5 (R)	93 (R)	71 ± 0,4 (R)
		rel. Aktivität ³ (%)	0,8 ± 0,01	2,4	4,8	3,3 ± 0,2	2,5	3,0
		rel. Aktivität ⁵ (%)	3,8 ± 0,06	3,8 ± 0,3	8	8,5 ± 1,4	3,6	4,5 ± 0,1
2-PPN	7	spez. Aktivität (U/mg Protein)	2,3 ± 0,04	n.b.	0,33	0,31	0,32	n.b.
		2-PPA ⁶ (%)	0,2 ± 0,01	n.b.	0	0	0	n.b.
		ee 2-PPS ² (%)	62 ± 1,4 (S)	n.d.	47 (S)	60 (S)	81 (S)	n.b.
MMN	7	spez. Aktivität (U/mg Protein)	0,17 ± 0,00	n.b.	0,06	0,08	0,02	n.b.
		rel. Aktivität ⁷ (%)	7,5 ± 0,08	n.b.	18	24	6	n.b.

Die Anzucht und Induktion der rekombinanten *E. coli* Stämme erfolgte gemäß Kap. 2.6.5 und die Ruhezellumsätze wurden entsprechend Kap. 2.6.6 durchgeführt. Die Standardabweichungen resultieren aus mind. zwei Versuchsreihen.

¹ [MA]/[MA]+[MS]

² bei ca. 30 % Substratumsatz

³ bezogen auf die Aktivität mit MN bei einem pH-Wert von 5 (= 100 %)

⁴ [ALA]/[ALA]+[AL]

⁵ bezogen auf die Aktivität mit MN bei einem pH-Wert von 4,5 (= 100 %)

⁶ [2-PPA]/[2-PPA]+[2-PPS]

⁷ bezogen auf die Aktivität mit 2-PPN bei einem pH-Wert von 7 (= 100 %)

n.b. nicht bestimmt

MN: Mandelonitril, MA: Mandelamid, MS: Mandelsäure, APCN: Acetophenoncyanhydrin, ALA: Atrolactamid, AL: Atrolactat, 2-PPN: 2-Phenylpropannitril, 2-PPA: 2-Phenylpropanamid, 2-PPS: 2-Phenylpropansäure, MMN: 2-Methyl-2-phenylpropannitril

3.6 Die bienzymatische Synthese von Atrolactat und Atrolactamid

3.6.1 Umsatz von Acetophenon durch eine enzymatische Kaskadenreaktion unter „Standardbedingungen“

Es wurde bereits in Kapitel 1.4 beschrieben, dass die enzymatische Hydrocyanierung von Ketonen mittels Oxynitrilasen deutlich schwieriger ist als die Umsetzung von Aldehyden. Insbesondere bei dem Substrat Acetophenon gelang bisher auch unter optimierten Reaktionsbedingungen kein quantitativer Umsatz (Bühler et al., 2003; Chmura et al., 2006; Roberge et al., 2007; von Langermann et al., 2007; Griengl et al., 1998; Kiljunen und Kanerva, 1997; Han et al., 1998; Lin et al., 1999; Rotcenkovs und Kanerva, 2000; Andexer et al., 2007). Die Ursache für die geringen Acetophenoncyanhydrin-Ausbeuten ist hierbei auf die ungünstige Lage des Gleichgewichts zwischen Keton und Cyanhydrin zurückzuführen (Griengl et al., 1998). Dagegen sollte mit Hilfe einer bienzymatischen Kaskade im Prinzip ein vollständiger Umsatz von Acetophenon gelingen, da das Produkt der Oxynitrilase-Reaktion (Acetophenoncyanhydrin) durch die Nitrilase aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt wird. Daher wurde ein Umsatz von Acetophenon und Cyanid mit *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) durchgeführt, der die Oxynitrilase aus *M. esculenta* und die Nitrilase aus *P. fluorescens* synthetisiert (vgl. Kap. 3.2). Es konnte mit diesem Stamm zunächst jedoch kein vollständiger Umsatz von Acetophenon und Cyanid erreicht werden (Abb. 3.41).

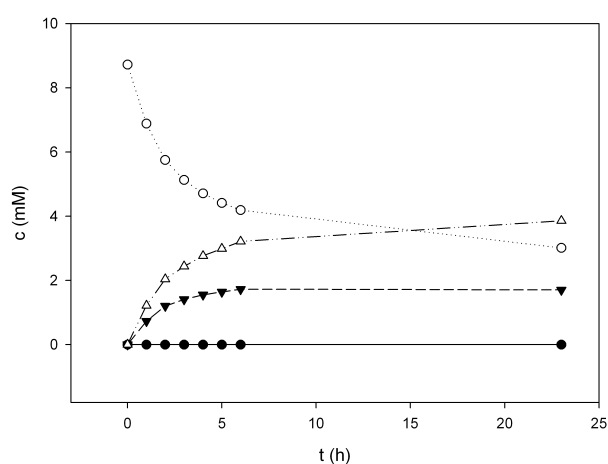


Abbildung 3.41: Umsatz von Acetophenon und Cyanid durch *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1). Ruhezellen ($OD_{600} = 97$, zuvor bei -70°C eingefroren) wurden in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 4,5) mit 10 mM Acetophenon (aus einer 200 mM Stammlösung in Methanol) und 10 mM KCN (aus einer 2 M Stammlösung in Wasser) bei 30°C und 1200 rpm inkubiert. Aus dem Reaktionsansatz (1000 μL) wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 10 % (v/v) 1 M HCL abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C , 10 min) wurden die Konzentrationen an Acetophenon (○), Atrolactamid (▼), Atrolactat (Δ) und Acetophenoncyanhydrin (●) in den Überständen mittels HPLC bestimmt.

Atrolactat wurde vom „bienzymatischen Ganzzellkatalysator“ mit einem relativen Anteil von 69 % und Atrolactamid mit einem rel. Anteil von 31 % gebildet. Der unvollständige Umsatz von Acetophenon war trotz der langen Inkubationszeit von 23 h nicht auf eine Inaktivierung des Biokatalysators zurückzuführen, da in einem weiteren Versuch durch eine erneute Zellzugabe nach 4 und 26 h Inkubation keine Steigerung des Substratumsatzes erzielt werden konnte.

3.6.2 Steigerung der Produktausbeute durch Variationen der Induktions- und Reaktionsbedingungen

Um einen quantitativen Umsatz von Acetophenon zu erreichen, wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Zum einen wurde geprüft, ob durch eine Steigerung der Expression des Oxynitrilase-Gens ein vollständiger Umsatz erzielt werden konnte. Zum anderen wurden die Reaktionsbedingungen bei den Experimenten hinsichtlich pH-Wert, KCN-Konzentration und Inkubationstemperatur variiert. Nach Semba et al. (2008) kann in *E. coli* die Bildung der Oxynitrilase aus *M. esculenta* durch niedrige Temperaturen bei der Induktion gesteigert werden. Daher wurden die Oxynitrilase- und Nitrilaseaktivitäten in den „bienzymatischen Ganzzellkatalysatoren“ bei 19°C in dYT-Medium sowie zum Vergleich bei 30°C in dYT- oder LB-Medium mit jeweils 0,2 % Rhamnose induziert. Aufgrund des langsameren Wachstums bei 19°C wurde *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) in diesem Fall für 48 - 63 h angezogen, während nach einer Anzucht bei 30°C die Zellen bereits nach 14 - 16 h geerntet wurden. Nach dem Waschen der Zellen in Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) wurden die Ruhezellen in 100 mM Na-Citratpuffer (pH 5) resuspendiert und mit 10 mM Benzaldehyd und 20 mM KCN (aus einer 2 M Stammlösung in Wasser) versetzt. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte im Thermoschüttler (30°C, 1100 rpm). In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und die Reaktion mit 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation wurden die Konzentrationen an Benzaldehyd, Mandelonitril, Mandelsäure und Mandelamid in den Überständen mittels HPLC bestimmt und die Aktivität der Ruhezellen anhand der Produktbildung berechnet.

Die Zellen waren nach Anzucht bei 19°C um ca. 30 % aktiver im Vergleich zur Anzucht bei 30°C (nicht dargestellt). Dementsprechend wurde die Oxynitrilase- und Nitrilase-Synthese des „bienzymatischen Ganzzellkatalysators“ bei tieferen Temperaturen analysiert. Hierfür wurde *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) in dYT-Medium bei 17°C und 15°C mit jeweils 0,2 % Rhamnose für 72 h kultiviert und die Zellen in Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 7,5) gewaschen. Anhand eines SDS-Gels wurde zunächst die Bildung der Oxynitrilase und Nitrilase bei den verschiedenen Temperaturen verglichen. Während die Nitrilase nach Anzucht bei 30°C am stärksten exprimiert wurde, waren die Oxynitrilasebanden nach Kultivierung bei 19°C und 17°C etwas intensiver als nach Anzucht der Zellen bei 30°C (Abb. 3.42).

Im Folgenden wurde mit den, bei tieferen Temperaturen, angezogenen Zellen der zuvor beschriebene Versuch (siehe Abb. 3.41) zum Acetophenon Umsatz wiederholt. Die Erniedrigung der Anzuchttemperatur von 30°C auf 19°C, 17°C oder 15°C führte zu keiner Steigerung des Umsatzes von Acetophenon (Tab. 3.20).

Da durch Veränderung der Anzuchttemperatur keine Verbesserung erzielt werden konnte, wurden nachfolgend die Reaktionsbedingungen im Hinblick auf pH-Wert, KCN-Konzentration und Inkubationstemperatur beim Umsatz variiert. Das pH-Optimum der Oxynitrilase aus *M. esculenta* liegt bei pH 5,4 (Effenberger et al., 2000). Es wurde daher zunächst versucht, durch eine Erhöhung des pH-Wertes auf 5 einen vollständigen Umsatz von Acetophenon zu erzielen. Allerdings führte diese Maßnahme zu keiner messbaren Veränderung der Produktausbeute. Auch das Absenken der Temperatur beim Umsatz auf 6°C führte nicht zum Erfolg. Allerdings wurde festgestellt, dass bei verminderter Umsatztemperatur (hier: 6°C) der Amidanteil an den gebildeten Produkten deutlich

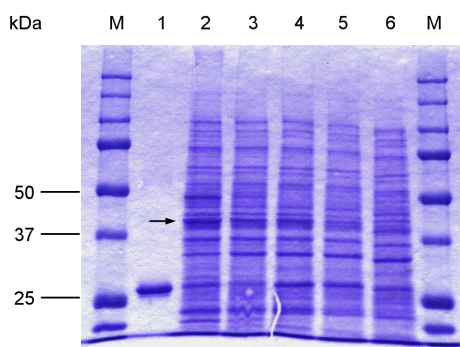


Abbildung 3.42: Expression der Oxynitrilase aus *M. esculenta* und der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 in *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) bei Anzucht der Zellen bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Bedingungen bei der Anzucht der Zellen können dem Text entnommen werden. M: 7,5 μ L Proteinmarker (Biorad), Spur 1: Oxynitrilase aus *M. esculenta* (Sigma-Aldrich), Spur 2: Induktion bei 30°C, Spur 3: Induktion bei 30°C (andere Ruhezellcharge), Spur 4: Induktion bei 19°C, Spur 5: Induktion bei 17°C, Spur 6: Induktion bei 15°C. Es wurde ein 10 %iges SDS-Gel nach Laemmli (1970) verwendet. Pro Spur wurden ca. 5 μ g Gesamtprotein aufgetragen, die Nitrilasebande ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

höher war (47 % im Vergleich zu 26 - 30 % bei 30°C). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch von Fernandes et al. (2006) mit dem Substrat Mandelonitril festgestellt.

Im Folgenden wurden die KCN-Äquivalente erhöht, um die Lage des Gleichgewichts auf die Produktseite zu verschieben. Durch eine Verdreifachung der KCN-Konzentration konnte bei gleichzeitig deutlich reduzierter Zellzahl ein quantitativer Umsatz erzielt werden (Tab. 3.20).

Tabelle 3.20: Umsatz von Acetophenon plus KCN durch Ruhezellen von *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.

OD ₆₀₀	Induktions-temp. (°C)	Acetophenon (mM)	KCN-Äquivalente	pH-Wert	Umsatz-temp. (°C)	rel. Amidanteil (%)	Umsatz ¹ (%)
97	30	10	1	4,5	30	30	65
76	19	10	1	4,5	30	28	70
80	19	10	1	5	30	27	76
80	19	10	1	5	6	47	79
80	17	10	1	4,5	30	29	64
75	15	10	1	4,5	30	29	46
77	17	10	2	4,5	30	30	98
39	19	10	2	4,5	30	30	90
39	19	10	3	4,5	30	28	100
40	30	10	3	4,5	30	26	99
43	30	10	3	5	30	28	98

Die unterschiedlichen Anzucht- und Induktionsbedingungen wurden im Text beschrieben.

¹ bezogen auf die Substratabnahme

Ein typischer Reaktionsverlauf beim quantitativen Umsatz von Acetophenon plus KCN durch den „bienzymatischen Ganzzellkatalysator“ ist in Abb. 3.43(a) dargestellt. Im Vergleich zu den Biotransformationen mit dem aliphatischen Substrat Acrolein, bei welchen es zu einer Akkumulation von 2-Hydroxy-3-butennitril in den Reaktionsansätzen kam (Kapitel 3.2), war bei den Acetophenon-Umsätzen das korrespondierende Nitril (Acetophenoncyanhydrin) in den Reaktionsansätzen nur zu Beginn der Reaktion in äußerst geringen Mengen nachweisbar. Das Intermediat

der Reaktion wurde also offenbar von der Nitrilase-Aktivität des „bienzymatischen Ganzzellkatalysators“ direkt weiter zu Atrolactat und Atrolactamid umgesetzt. In einer mitgeführten Kontrolle wurde keine spontane chemische Bildung von Acetophenoncyanhydrin beobachtet, da das Gleichgewicht der Reaktion sehr stark auf der Seite der Edukte liegt (Abb. 3.43(b)).

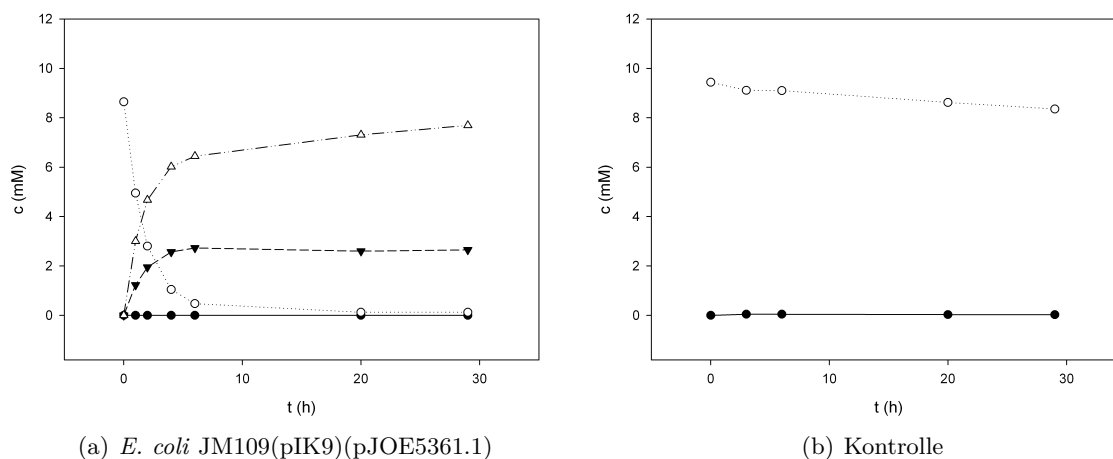


Abbildung 3.43: Umsatz von Acetophenon und Cyanid in Anwesenheit von *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) Ruhezellen (a) bzw. in Abwesenheit von Zellen (b). Die Reaktionsansätze (800 μ L) enthielten 100 mM Na-Citratpuffer (pH 4,5), 10 mM Acetophenon (aus einer 200 mM Stammlösung in Methanol) und 30 mM KCN (aus einer 2 M Stammlösung in Wasser). Bei (a) wurden Ruhezellen von *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) mit einer optischen Dichte (600 nm) von 40 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte im Thermoschüttler bei 30°C und 1100 rpm. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Konzentrationen an Acetophenon (○), Atrolactamid (▼), Atrolactat (△) und Acetophenoncyanhydrin (●) in den Überständen mittels HPLC bestimmt.

Die rekombinanten Zellen bildeten aus Acetophenon und KCN hauptsächlich (*S*)-Atrolactat ($ee = 87\%$) und (*S*)-Atrolactamid (Abb. 3.44). Der exakte ee -Wert für Atrolactamid konnte nicht bestimmt werden, da das Signal von (*R*)-Atrolactamid mit Citrat aus dem Umsatzpuffer sowie mit undefinierten Verbindungen, die von den Ruhezellen exkretiert wurden, coeluierte (Kapitel 3.3.2). Der Überschuss an (*S*)-Atrolactamid kann jedoch durch Vergleich mit der Gesamtmenge an Atrolactamid aus der achiralen Analyse abgeschätzt werden. Hierbei entsprach die Konzentration an (*S*)-Atrolactamid der Gesamtmenge des Amids, so dass davon ausgegangen werden kann, dass kein messbares (*R*)-Atrolactamid gebildet worden war und folglich der ee -Wert für (*S*)-Atrolactamid annähernd 100 % betrug.

Der Versuch bestätigte die Funktionalität der Oxynitrilase in der Enzymkaskade, da beim Umsatz von rac. Acetophenoncyanhydrin durch den Stamm *E. coli* JM109(pIK9) - welcher nur die Nitrilase-Aktivität exprimiert - vorzugsweise (*R*)-Atrolactat gebildet worden war (Kapitel 3.3.2). Der Enantiomerenüberschuss an (*S*)-Atrolactat war bei der Reaktionsführung in Na-Citratpuffer mit einem pH-Wert von 5 etwas höher ($ee = 92\%$) als bei pH 4,5 (Tab. 3.21).

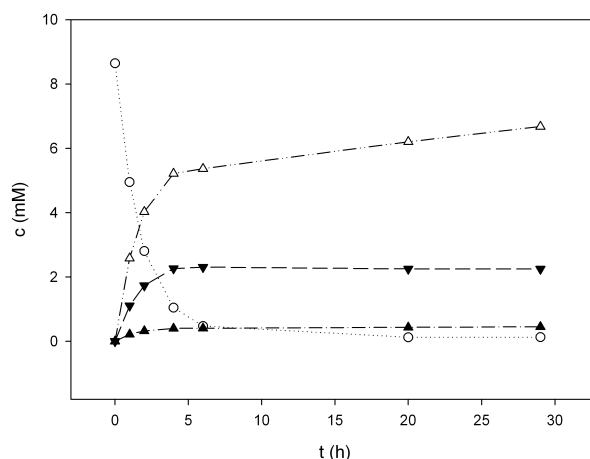


Abbildung 3.44: Chirale Analyse des in Abb. 3.43(a) gezeigten Ruhezellumsatzes von Acetophenon und Cyanid durch *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1). Die Überstände des in Abb. 3.43 gezeigten Ruhezellumsatzes wurden mittels einer chiralen HPLC-Methode (2.7.2) analysiert. Die Konzentrationen an (*S*)-Atrolactat (Δ), (*R*)-Atrolactat (\blacktriangle), (*S*)-Atrolactamid (\blacktriangledown) und Acetophenon (\circ) sind dargestellt.

Tabelle 3.21: Enantiomerenüberschuss an (*S*)-Atrolactat beim Umsatz von Acetophenon und KCN durch Ruhezellen von *E. coli* JM109 (pIK9)(pJOE5361.1).

OD ₆₀₀	Induktions-temp. (°C)	Acetophenon (mM)	KCN-Äquivalente	pH-Wert	Umsatz-temp. (°C)	ee (<i>S</i>)-Atrolactat (%)
77	17	10	2	4,5	30	90
40	30	10	3	4,5	30	87
43	30	10	3	5	30	92

3.6.3 Umsatz von Acetophenon und KCN durch „bienzymatische Ganzzellkatalysatoren“ mit verschiedenen Nitrilasevarianten

Beim Umsatz von Acetophenon und KCN durch *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) wurde Atrolactamid (bei einer Inkubationstemperatur von 30°C) mit einem Anteil am Gesamtprodukt von durchschnittlich 29 % gebildet (Tab. 3.20). Es sollte im Folgenden versucht werden, die Bildung des Nebenproduktes Atrolactamid möglichst weit zu unterdrücken. Hierzu bot sich die Verwendung der Nitrilase-Varianten Y54V und Y54P an, da diese Enzymvarianten aus rac. Acetophenoncyanhydrin die geringsten Atrolactamidanteile gebildet hatten (0,8 % bzw. 1,5 %, vgl. Tabelle 3.19). Kompetente Zellen des Stammes *E. coli* JM109(pJOE5361.1), der die Oxynitrilase aus *M. esculenta* synthetisiert, wurden daher mit den Plasmiden pIK9/Y54V und pIK9/Y54P transformiert und die Transformanten auf LB-Agar mit Ampicillin (100 µg/mL) und Chloramphenicol (20 µg/mL) selektiert (Kapitel 2.8.7). Mit Hilfe der so erzeugten rekombinanten Stämme konnte beim Umsatz von Acetophenon und Cyanid der Atrolactamid-Anteil auf jeweils ca. 4 % gesenkt werden (Abb. 3.45, Tab. 3.22). Der Enantiomerenüberschuss an (*S*)-Atrolactat war bei der Verwendung von *E. coli* JM109(pIK9/Y54P)(pJOE5361.1) bei einem pH-Wert von 5 etwas höher (83 %) als bei pH 4,5 (79 %). Dies korrelierte mit den Ergebnissen, die mit dem Stamm *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) erzielt worden waren (Kapitel 3.6.2). Dieser Effekt wurde bei dem Stamm *E. coli* JM109(pIK9/Y54V)(pJOE5361.1) nicht beobachtet. Bei Verwendung einer höheren Zelldichte konnte mit *E. coli* JM109(pIK9/Y54P)(pJOE5361.1) der Enantiomerenüberschuss an

(*S*)-Atrolactat auf 88 % gesteigert werden. Hierdurch konnte ein Katalysator gewonnen/gefunden werden, der aus Acetophenon plus KCN (*S*)-Atrolactat mit guter Enantiomerenreinheit bei gleichzeitig geringem Atrolactamidanteil synthetisierte (Abb. 3.45, Tab. 3.22).

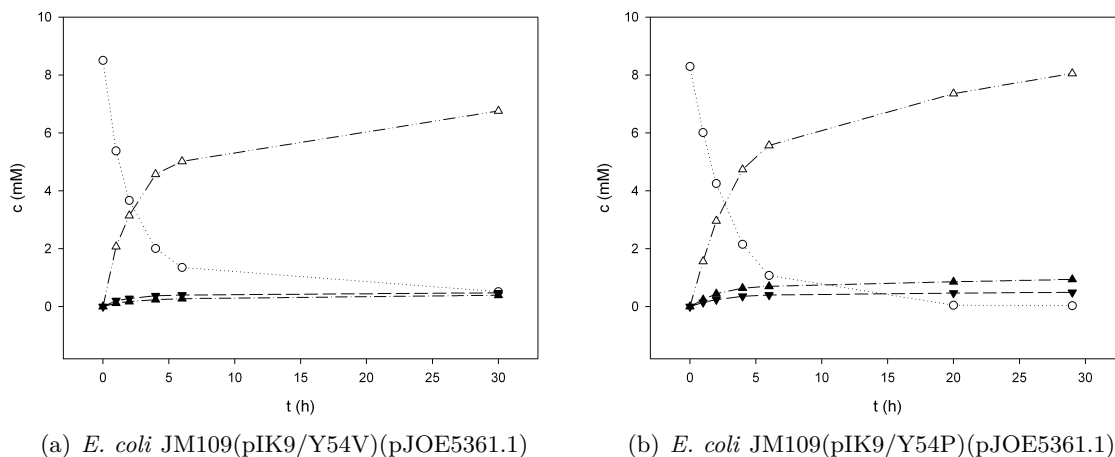


Abbildung 3.45: Umsatz von Acetophenon und KCN durch (a) *E. coli* JM109(pIK9/Y54V)(pJOE5361.1) und (b) *E. coli* JM109(pIK9/Y54P)(pJOE5361.1). Ruhezellen (a: OD₆₀₀ = 98, b: OD₆₀₀ = 92) wurden in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 4,5) mit 10 mM Acetophenon (aus einer 200 mM Stammlösung in Methanol) und 30 mM KCN (aus einer 2 M Stammlösung in Wasser) bei 30°C und 1100 rpm inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Konzentrationen an (*S*)-Atrolactat (Δ), (*R*)-Atrolactat (▲), (*S*)-Atrolactamid (▼) und Acetophenon (○) in den Überständen mittels HPLC bestimmt.

Tabelle 3.22: Umsatz von Acetophenon und KCN durch „bienzymatische Ganzzellkatalysatoren“ mit unterschiedlichen Nitrilasevarianten.

Stamm	OD ₆₀₀	pH-Wert	rel. Amid-anteil (%)	ee (<i>S</i>)-Atrolactat (%)
<i>E. coli</i> JM109(pIK9)(pJOE5361.1)	40	4,5	26	87
	43	5	28	92
<i>E. coli</i> JM109(pIK9/Y54V)(pJOE5361.1)	98	4,5	4	89
	84	5	5	87
<i>E. coli</i> JM109(pIK9/Y54P)(pJOE5361.1)	92	4,5	3,3	79
	68	5	4	83
	80	5	5	88

3.6.4 Umsatz von Acetophenon und KCN durch die Oxynitrilase aus *Arabidopsis thaliana*

Durch Kombination der (*S*)-selektiven Oxynitrilase aus *M. esculenta* mit der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 in einem Ganzzellkatalysator konnten (*S*)-Atrolactat und (*S*)-Atrolactamid aus Acetophenon synthetisiert werden (Kapitel 3.6.2). Um zu prüfen, ob auch die entsprechenden *R*-Enantiomere mittels bienzymatischer Synthese aus Acetophenon zugänglich sind, wurde der Stamm *E. coli* JM109(pIK9)(pSOM4) eingesetzt (Sosedov, 2013). In diesem Konstrukt wurde die

(*S*)-selektive Oxynitrilase durch eine (*R*)-selektive Oxynitrilase aus *Arabidopsis thaliana* ersetzt. Durch Zugabe von Rhamnose zum Kulturmedium können die Oxynitrilase und Nitrilase in *E. coli* JM109(pIK9)(pSOM4) simultan exprimiert werden. Auch dieser „bienzymatische Ganzzellkatalysator“ war in der Lage Acetophenon umzusetzen; ein quantitativer Umsatz gelang jedoch nicht (Abb. 3.46(a)). Atrolactamid wurde bei den Umsätzen mit einem Anteil am Gesamtprodukt von 4 % gebildet. Die Oxynitrilase aus *A. thaliana* wurde anschließend mit der Enzymvariante Y54P der Nitrilase aus *P. fluorescens* kombiniert. Überraschenderweise wurde mit dem entsprechenden Biokatalysator [*E. coli* JM109(pIK9/Y54P)(pSOM4)] mehr Acetophenon umgesetzt, wobei der rel. Amidanteil in diesem Fall 0,8 % betrug (Abb. 3.46(b)). Der neu konstruierte Stamm *E. coli* JM109(pIK9/Y54P)(pSOM4) synthetisierte tatsächlich bevorzugt die *R*-Enantiomere von Atrolactat und Atrolactamid. Die Enantiomerenüberschüsse an (*R*)-Atrolactat waren mit 85 % (*E. coli* JM109(pIK9)(pSOM4)) und 83 % (*E. coli* JM109(pIK9/Y54P)(pSOM4)) etwas niedriger als die mit den korrespondierenden Stämmen mit der Oxynitrilase aus *M. esculenta* bestimmten ee-Werte für (*S*)-Atrolactat (ee = 92 % mit *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) und ee = 88 % mit *E. coli* JM109(pIK9/Y54P)(pJOE5361.1)).

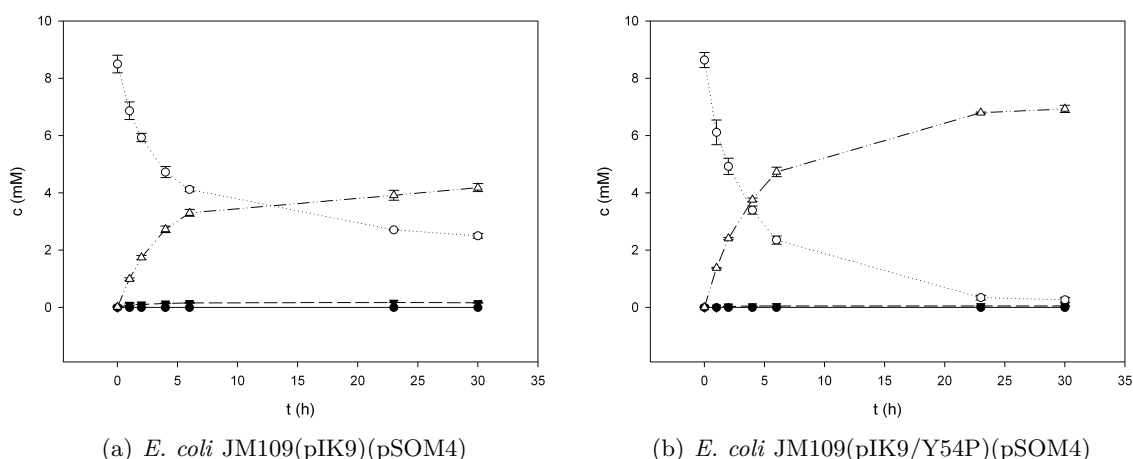


Abbildung 3.46: Umsatz von Acetophenon und KCN durch (a) *E. coli* JM109(pIK9)(pSOM4) bzw. (b) *E. coli* JM109(pIK9/Y54P)(pSOM4). Ruhezellen (a: $OD_{600} = 83$, b: $OD_{600} = 82$) wurden in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 5) mit 10 mM Acetophenon (aus einer 200 mM Stammlösung in Methanol) und 30 mM KCN (aus einer 2 M Stammlösung in Wasser) bei 30°C und 1100 rpm inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und die Reaktionen durch Zugabe von 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Konzentrationen an Acetophenon (○), Atrolactamid (▼), Atrolactat (Δ) und Acetophenoncyanhydrin (●) in den Überständen mittels HPLC bestimmt.

3.7 Einfluss hoher Substratkonzentrationen auf die Oxynitrilase- und Nitrilase-Aktivitäten von Ganzzellkatalysatoren

Bei der Synthese von α -Hydroxycarbonsäuren und α -Hydroxycarboxamiden aus Aldehyden und Cyanid durch *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) konnten in wässrigen Medien beim Umsatz hoher Substratkonzentrationen in Reaktionsansätzen, die 100 und 200 mM Benzaldehyd enthielten,

keine vollständigen Umsätze erzielt werden (Chmura, 2010). Die Reaktionsführung in wässrigen Medien ist für die Enzyme (insbesondere die Nitrilase) vorteilhaft, da sie den natürlichen Bedingungen in den Herkunftszellen entspricht. Ein Nachteil dieser Vorgehensweise besteht jedoch in der Zugabe von Cyanid in Form von KCN. Cyanid-Anionen sind rel. starke Basen ($pK_s = 9,31$), weshalb die Zugabe von großen Mengen an KCN zu einer Alkalisierung des Reaktionsmediums führt. So wurden beim Umsatz von 50 - 200 mM Benzaldehyd mit jeweils 3-fachem KCN Überschuss durch *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) in den Reaktionsansätzen pH-Werte von 9 -13 bestimmt (Chmura, 2010). Dies führte einerseits zur Inaktivierung der *E. coli* Zellen, andererseits zu einer starken Beschleunigung der unerwünschten Hintergrundreaktion (chemische Addition von Cyanid an Benzaldehyd). Der Enantiomerenüberschuss an (*S*)-Mandelsäure betrug folglich weniger als 50 % in Versuchen mit anfänglichen Benzaldehydkonzentrationen von > 20 mM (Chmura, 2010). Hierbei führte auch die Verwendung eines höher konzentrierten Na-Citratpuffers (0,5 M anstelle 0,25 M) nicht zu einer Verbesserung der Ergebnisse (Chmura, 2010). Es sollten daher im Folgenden die Reaktionslimitierungen, die bei der Synthese von α -Hydroxycarbonsäuren und α -Hydroxycarboxamiden aus Aldehyden und Cyanid durch den rekombinanten Ganzzellkatalysator in wässrigen Medien auftraten, analysiert werden.

3.7.1 Einfluss hoher Substratkonzentrationen auf die Aktivität der Oxynitrilase und Nitrilase im „bienzymatischen Ganzzellkatalysator“ unter pH-Wert Kontrolle

Für eine Anwendung in der Biokatalyse sind möglichst hohe Substratkonzentrationen erstrebenswert. Bisher lagen keine Untersuchungen zur Umsetzung hoher Substratkonzentrationen durch den „bienzymatischen Ganzzellkatalysator“ in wässrigen Medien mit adäquater pH Kontrolle vor. Ferner sollten diese Untersuchungen einen Rückschluss erlauben, ob überwiegend die Oxynitrilase- oder die Nitrilase-Aktivität des Ganzzellkatalysators durch hohe Substratkonzentrationen (negativ) beeinflusst wird. Es wurde hierbei eine wässrige HCN-Lösung (3,6 M) mit einem pH-Wert von 5 eingesetzt, um eine Alkalisierung des Mediums zu vermeiden. Zur Herstellung dieser Lösung wurden 130 mg KCN mit 220 mg Citronensäure \times H₂O in 0,36 mL demineralisiertem Wasser gelöst. Das Gesamtvolumen der Lösung nahm dabei auf ca. 0,4 mL zu. Um die exakte HCN-Konzentration in der Stammlösung zu ermitteln, wurde anschließend die HCN-Konzentration mit Hilfe eines Cyanid-Testkits (Spectroquant, Merck) bestimmt (Kapitel 2.7.5). Die Menge an Citronensäure, die benötigt wird, um mit 130 mg KCN in 0,36 mL Wasser einen pH-Wert von ca. pH 5 zu erzielen, wurde in separaten Vorversuchen ermittelt.

Für den Versuch wurden Ruhezellen von *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) mit 175 mM Benzaldehyd und 350 mM HCN inkubiert, wobei die Reaktion durch Zugabe des Aldehyds gestartet wurde. Ein entsprechender Reaktionsansatz ohne Ruhezellen wurde als Kontrolle mitgeführt. Der pH-Wert der Reaktionsansätze wurde nach dem Experiment überprüft und betrug ca. pH 5. Die geringe Benzaldehyd Wiederfindung in den Reaktionsansätzen (bei t_0) ist auf die geringe Wasserlöslichkeit der Verbindung zurückzuführen. Direkt nach der Zugabe lag ein Teil des Aldehyds ungelöst am Boden des Reaktionsgefäßes als zweite Phase vor. Der Reaktionsansatz wurde vor der Probenahme zwar geschüttelt, eine homogene Verteilung des Aldehyds konnte dadurch aber offensichtlich nicht erzielt werden. Bereits nach wenigen Sekunden Inkubation (bei t_0) konnten im Reaktionsansatz in Gegenwart der Ruhezellen des Ganzzellkatalysators > 80 mM Mandelonitril

nachgewiesen werden (Abb. 3.47(a)). Allerdings wurden nur geringe Mengen des Mandelonitrils ($< 25\%$) von der Nitrilase weiter zu Mandelsäure und Mandelamid umgesetzt (Abb. 3.47(a)). Die spontane, chemische Hydrocyanierung war wesentlich langsamer, da in der zellfreien Kontrolle nach wenigen Sekunden lediglich 13 mM Mandelonitril vorlagen (Abb. 3.47(b)). Dies sprach dafür, dass die Oxynitrilase in den Zellen aktiv war. Die Untersuchungen deuteten darauf hin, dass primär die Nitrilase-Aktivität des Ganzzellkatalysators durch hohe Substratkonzentrationen inhibiert wurde, denn beim Umsatz geringer Substratkonzentrationen (10 mM BA und 20 mM KCN) durch *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) fand keine vergleichbare Mandelonitril-Akkumulation im Reaktionsansatz statt (vergleiche Abb. 3.54(a)). Der von der Nitrilase gebildete rel. Amidanteil betrug bei Verwendung hoher Substratkonzentrationen 63 % und war damit deutlich höher als beim Umsatz geringer Substratkonzentrationen (durchschnittlich 42 %).

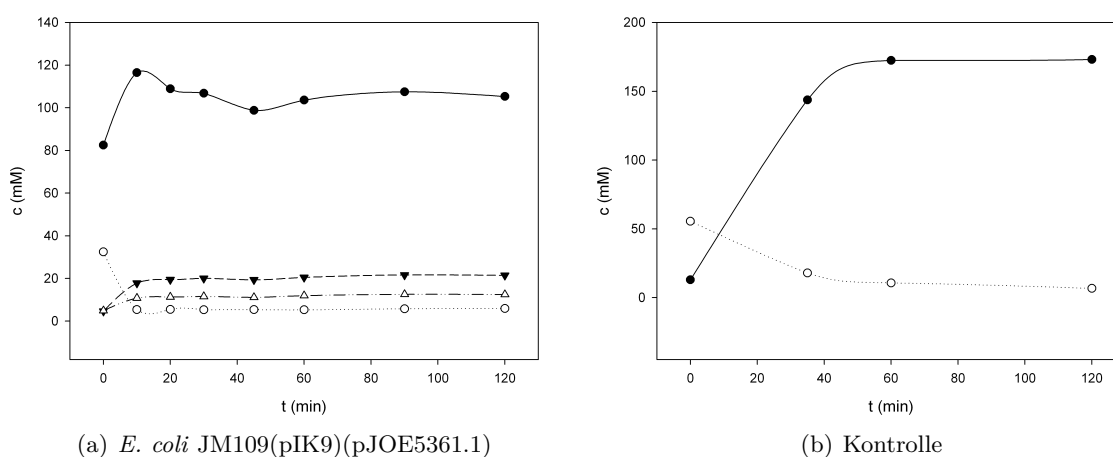
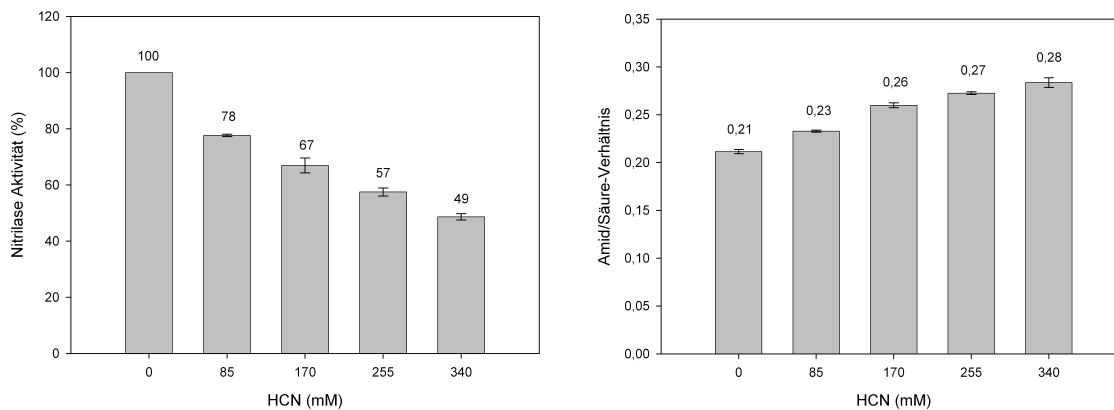


Abbildung 3.47: Umsatz von Benzaldehyd und Cyanid in Anwesenheit von *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) Ruhezellen (a) bzw. in Abwesenheit von Zellen (b). Die Reaktionsansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 1 mL 100 mM Na-Citratpuffer (pH 5), 10 % (v/v) Methanol, 175 mM Benzaldehyd und 350 mM Cyanid (aus einer 3,6 M Stammlösung, die durch Zugabe von Citronensäure auf einen pH-Wert von 5 eingestellt wurde). Bei (a) wurden Ruhezellen von *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) mit einer optischen Dichte (600 nm) von 67 eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden im Thermoschüttler bei 30°C und 1100 rpm inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Konzentrationen an Benzaldehyd (○), Mandelamid (▼), Mandelsäure (Δ) und Mandelonitril (●) in den Überständen mittels HPLC bestimmt.

3.7.2 Einfluss von HCN auf die Nitrilase-Aktivität von *E. coli* JM109(pIK9)

Im Folgenden wurde analysiert, ob die zuvor beobachtete Inhibierung der Nitrilase (Aktivität) durch HCN verursacht wurde. Ruhezellen von *E. coli* JM109(pIK9) wurden deshalb mit HCN in Konzentrationen von 0 - 340 mM für 30 min im Thermoschüttler (1100 rpm) inkubiert und anschließend die verbliebenen Nitrilase-Aktivitäten durch Zugabe von 10 mM Mandelonitril bestimmt. Es wurde wiederum eine wässrige HCN-Lösung (3 M) eingesetzt, die durch Zugabe von Citronensäure auf einen pH-Wert von 5 eingestellt war, um eine Alkalisierung des Reaktionsmediums zu vermeiden. Die HCN-Konzentration der Stammlösung wurde entsprechend dem vorherigen Kapitel mit Hilfe des Cyanid-Testkits (Spectroquant, Merck) bestimmt. Der pH-Wert in den Re-

aktionsansätzen wurde nach den Experimenten überprüft und lag durchweg bei ca. pH 5. Erwartungsgemäß nahm die Nitrilase-Aktivität mit zunehmender HCN-Konzentration ab, die Inhibierung der Nitrilase war jedoch deutlich geringer als zunächst vermutet, da eine 30-minütige Inkubation mit HCN in einer Konzentration von 340 mM beispielsweise lediglich einen Abfall der Nitrilase-Aktivität auf ca. 50 % verursachte (Abb. 3.48(a)). Das Verhältnis Amid/Säure nahm bei den gebildeten Produkten in Gegenwart steigender HCN-Konzentrationen von 0,21 auf 0,28 leicht zu (Abb. 3.48(b)).



(a) Einfluss von HCN auf die Aktivität der NLase (b) Einfluss von HCN auf das Amid/Säure-Verhältnis

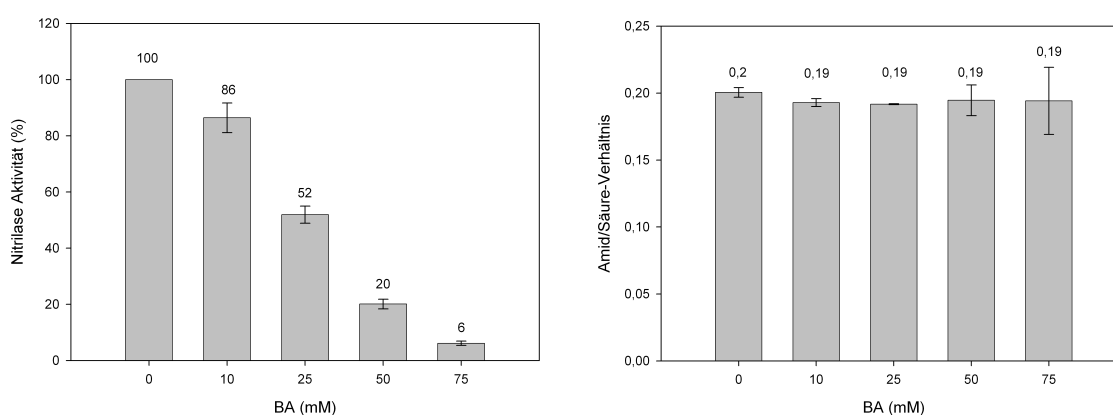
Abbildung 3.48: Einfluss von HCN auf die Nitrilase-Aktivität von *E. coli* JM109(pIK9) (a) und auf das Amid/Säure-Verhältnis (b). *E. coli* JM109(pIK9) wurde in LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und 0,2 % (w/v) Rhamnose für 17 h bei 30°C kultiviert. Nach dem Ernten (5000 rpm, 4°C, 8 min) und Waschen der Zellen in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5) wurden die Ruhezellen anschließend in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 5) resuspendiert. Die Reaktionsansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 1 mL 100 mM Na-Citratpuffer (pH 5), Ruhezellen mit einer OD₆₀₀ von 0,3 sowie die aufgeführten Mengen an HCN (aus einer 3 M Stammlösung, die zuvor mit Citronensäure auf pH 5 eingestellt wurde). Die Reaktionsansätze wurden im Thermoschüttler bei 30°C und 1100 rpm inkubiert. Nach 30 min wurden 50 µL einer Mandelonitril-Lösung (aus einer 210 mM Stammlösung in Methanol) zugegeben. Dies entsprach einer Mandelonitrilkonzentration von 10 mM in den Reaktionsansätzen (Gesamtvolumen = 1050 µL). 10 min nach Zugabe des Substrates wurden Proben entnommen (je 90 µL) und die Reaktionen mit 10 µL 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Überstände mittels HPLC analysiert. Die Nitrilaseaktivität des Reaktionsansatzes ohne HCN wurde als 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei Versuchsreihen mit unabhängig voneinander induzierten *E. coli* JM109(pIK9) Kulturen.

Zur Herstellung wässriger, hochkonzentrierter HCN-Lösungen mit einem pH-Wert von 5, wurden hohe Citronensäurekonzentrationen eingesetzt. Hierdurch stieg dementsprechend die Molarität bzw. Ionenstärke in den Reaktionsansätzen. Um zu prüfen, ob die Inhibierung der Nitrilase tatsächlich auf die steigenden Konzentrationen an HCN zurückzuführen war, wurde ein Kontroll-experiment durchgeführt. Hierzu wurde KCN in der Stammlösung durch KOH ersetzt und die obigen Experimente mit dieser Lösung wiederholt. Die Nitrilase-Aktivität nahm hierbei nur sehr geringfügig ab im Vergleich zu den Versuchen mit HCN (nicht dargestellt). Demzufolge wurde die Nitrilase tatsächlich durch Blausäure gehemmt und nicht durch die hohe Molarität in den Reaktionsansätzen. Auch das Amid/Säure-Verhältnis bei den gebildeten Produkten blieb im Vergleich zu den vorherigen Experimenten konstant und betrug jeweils 0,21.

3.7.3 Einfluss von Benzaldehyd auf die Nitrilase-Aktivität von *E. coli* JM109(pIK9)

Nachfolgend wurde untersucht, ob der in Kapitel 3.7.1 beobachtete Aktivitätsverlust der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 durch Benzaldehyd (BA) verursacht wurde. *E. coli* JM109(pIK9) Ruhezellen wurden mit Benzaldehyd in Konzentrationen von 0 - 75 mM für 30 min im Thermoschüttler (1100 rpm) inkubiert und anschließend die Nitrilase-Aktivitäten durch Zugabe von 10 mM Mandelonitril bestimmt.

Die Anwesenheit von lediglich 25 mM BA in den Reaktionsansätzen führte bereits zu einer Abnahme der Nitrilaseaktivität auf 50 % (Abb. 3.49(a)). Das Amid/Säure-Verhältnis wurde dagegen nicht beeinflusst (Abb. 3.49(b)). Dies deutet darauf hin, dass Benzaldehyd die Nitrilase-Reaktion wesentlich stärker inhibiert als HCN.



(a) Einfluss von BA auf die Aktivität der NLase (b) Einfluss von BA auf das Amid/Säure-Verhältnis

Abbildung 3.49: Einfluss von Benzaldehyd (BA) auf die Nitrilase-Aktivität von *E. coli* JM109(pIK9) (a) und auf das Amid/Säure-Verhältnis (b). *E. coli* JM109(pIK9) wurde in LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und 0,2 % (w/v) Rhamnose für 17 h bei 30°C kultiviert. Nach dem Ernten (5000 rpm, 4°C, 8 min) und Waschen der Zellen in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5) wurden die Ruhezellen anschließend in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 5) resuspendiert. Die Reaktionsansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 1 mL 100 mM Na-Citratpuffer (pH 5), Ruhezellen mit einer OD₆₀₀ von 0,4, insgesamt 10 % (v/v) Methanol sowie die aufgeführten Benzaldehydkonzentrationen (aus einer 2 M Stammlösung in Methanol). Die Reaktionsansätze wurden im Thermoschüttler bei 30°C und 1100 rpm inkubiert. Nach 30 min wurden 50 µL einer Mandelonitril-Lösung (aus einer 210 mM Stammlösung in Methanol) zugegeben. 10 min nach Zugabe des Substrates wurden Proben entnommen (je 90 µL) und die Reaktionen mit 10 µL 1 M HCl abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Überstände mittels HPLC analysiert. Die Enzymaktivität des Reaktionsansatzes ohne BA wurde als 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei Versuchsreihen mit unabhängig voneinander induzierten *E. coli* JM109(pIK9) Kulturen.

3.7.4 Toxischer Effekt von Benzaldehyd auf den Wirtstamm *E. coli* JM109

Es stellte sich nun die Frage, ob Benzaldehyd die Nitrilase direkt inhibierte oder ob der Aldehyd primär einen toxischen Effekt auf die Zellen ausübte. Um dies zu prüfen, wurde der Stamm *E. coli* JM109 eingesetzt, der keine Nitrilase-Aktivität besitzt. Das Abschätzen der Toxizität von Benzaldehyd erfolgte durch Bestimmung der Lebendkeimzahl. Hierfür wurden Zellen von *E. coli* JM109 mit Benzaldehyd in Konzentrationen von 0 - 75 mM inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurden Proben entnommen und die Lebendkeimzahl (Kolonie-bildende Einheiten

(KbE) pro mL) bestimmt. Bereits bei einer Aldehydkonzentration von 25 mM waren nach 5 min Inkubation im Vergleich zur Kontrolle (ohne BA) deutlich weniger KbE nachweisbar (Abb. 3.50). Überraschenderweise nahm die Lebendzellzahl im weiteren Verlauf des Experiments (nach 180 und 360 min Inkubation) langsamer ab. Lag Benzaldehyd in Konzentrationen von 50 oder 75 mM in den Reaktionsansätzen vor, waren bereits nach 5 min Inkubation keine lebenden Zellen mehr nachweisbar (Abb. 3.50).

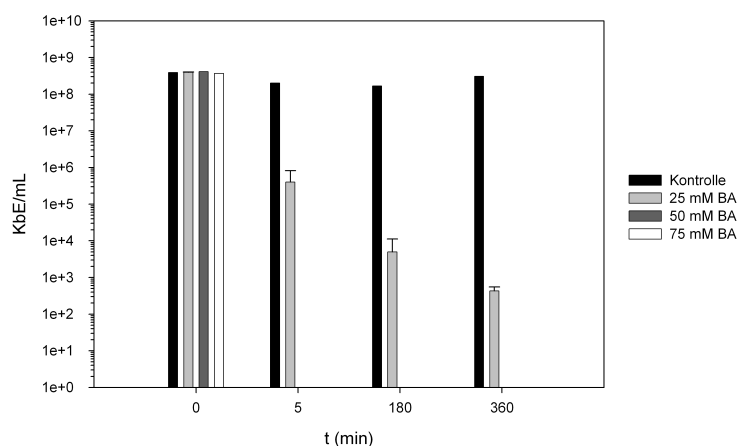


Abbildung 3.50: Toxischer Effekt von Benzaldehyd auf Zellen von *E. coli* JM109. Der Stamm wurde in 5 mL dYT-Medium bei 37°C angezogen. Nach dem Überimpfen in LB-Medium wurde *E. coli* JM109 über Nacht bei 37°C unter Schütteln weiter kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (5000 rpm, 4°C, 15 min), in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5) gewaschen und aliquotiert. Nach dem Entfernen der Überstände wurden die Zellpellets bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren. Direkt vor den Experimenten wurden die Zellpellets auf Eis aufgetaut. Die Reaktionsansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 1 mL 100 mM Na-Citratpuffer (pH 5), Zellen mit einer OD₆₀₀ von 1, 10 % (v/v) Methanol sowie Benzaldehyd in Konzentrationen von 0 - 75 mM. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte in 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei RT unter intensivem Rühren (mittels sterilem Rührfisch). Nach 0, 5, 180 und 360 min Inkubation wurden Proben (je 100 µL) entnommen, dekadische Verdünnungen in phosphatgepufferter Saline (PBS, Kap. 2.5.2) erstellt und die Lebendkeimzahl (Kolonie-bildende Einheiten (KbE) pro mL) durch Plattieren auf LB-Agar bestimmt.

3.7.5 Toxischer Effekt von Mandelsäure auf den Wirtstamm *E. coli* JM109

Organische Säuren, wie beispielsweise Benzoesäure oder Sorbinsäure, werden seit langem aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirkung in der Lebensmittelbranche als Konservierungsmittel eingesetzt. Mandelsäure stellt mit einem pK_s-Wert von 3,37 eine mittelstarke organische Säure dar (Lide, 2009; Mortimer und Müller, 2010). Bei der Darstellung von Mandelsäure in synthetisch relevanten Mengen muss dementsprechend auch eine mögliche toxische Wirkung dieser Verbindung auf den Biokatalysator berücksichtigt werden. Zu beachten ist hierbei, dass prinzipiell die Bildung von Mandelsäure den pH-Wert in den Reaktionsansätzen absenken sollte. Bei der Nitril-Hydrolyse entsteht jedoch auch Ammoniak, welcher der Ansäuerung der Reaktionsansätze entgegenwirkt. Mandelsäure wurde für die Untersuchungen aus diesem Grund in einer mit NaOH gepufferten Lösung gelöst. Zur Bestimmung des toxischen Effekts von Mandelsäure wurden Zellen von *E. coli* JM109 (OD₆₀₀ = 1) in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 5) mit Mandelsäure in Konzentrationen von 0 - 300 mM inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurden Proben entnommen und

die Lebendkeimzahl bestimmt. Als Kontrollen wurden ein Ansatz ohne Mandelsäure sowie ein Ansatz mit 300 mM NaCl mitgeführt, um den Einfluss der Molarität abzuschätzen (vgl. auch Kap. 3.7.2). Der pH-Wert der Reaktionsansätze wurde nach 0 min und 360 min Inkubation überprüft und betrug stets pH 5. Während die Lebendzellzahl in den Kontrollen sowie bei Inkubation mit 100 mM Mandelsäure innerhalb der 5-stündigen Einwirkzeit kaum abnahm, hatte der Zusatz von Mandelsäure in Konzentrationen von 200 und 300 mM ein Absterben der Zellen zur Folge (Abb. 3.51). Mandelsäure war im Vergleich zu Benzaldehyd jedoch deutlich weniger kritisch (vgl. Abb. 3.50).

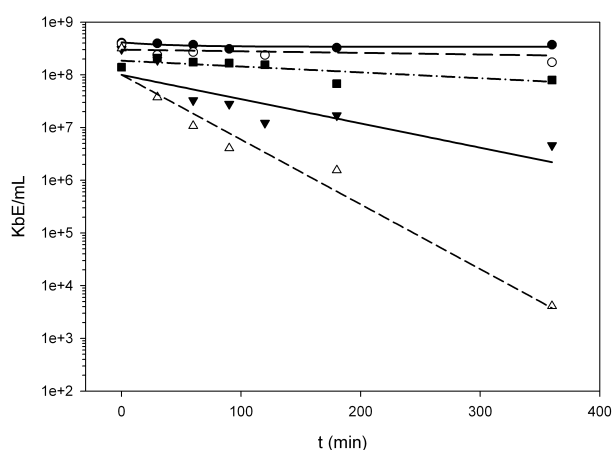


Abbildung 3.51: Toxischer Effekt von Mandelsäure auf Zellen von *E. coli* JM109. Die Kultivierung und das Ernten der Zellen erfolgte wie in Abb. 3.50 beschrieben. Die Reaktionsansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 1 mL 100 mM Na-Citratpuffer (pH 5), Zellen mit einer OD_{600} von 1 sowie 100 mM (○), 200 mM (▼) oder 300 mM (△) Mandelsäure (aus einer 0,8 M Stammlösung, gepuffert mit NaOH). Als Kontrollen wurden ein Ansatz ohne Mandelsäure (●) und ein Ansatz mit 300 mM NaCl (■) mitgeführt. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte in Eppendorf-Reaktionsgefäßen im Thermoschüttler bei 30°C und 1300 rpm. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurden Proben (je 100 µL) entnommen, dekadische Verdünnungen in PBS erstellt und die Lebendkeimzahl durch Plattieren auf LB-Agar bestimmt.

3.8 „Bienzymatische Ganzzellkatalyse“ in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten

3.8.1 Auswahl eines geeigneten Substratreservoirs für Benzaldehyd und HCN

Die vorangegangenen Untersuchungen hatten gezeigt, dass der Umsatz hoher Substratkonzentrationen durch die rekombinanten Zellen in wässrigen Medien nicht möglich ist. Dies lag insbesondere an der Toxizität von Benzaldehyd, der bereits in Konzentrationen von 25 mM Zellen von *E. coli* JM109 nachhaltig schädigte. Eine Möglichkeit zur Verringerung toxischer Substratkonzentrationen ist die Prozessführung in 2-Phasensystemen. Für 2-Phasensysteme in der enzymatischen Katalyse werden vielfach organische Lösemittel eingesetzt, die jedoch häufig selbst eine schädigende Wirkung auf Mikroorganismen haben (Laane et al., 1987; León et al., 1998; Aono et al., 1994; Rajagopal, 1996; Ramos et al., 2002). Eine interessante Alternative zu organischen Lösemitteln stellen ionische Flüssigkeiten dar, da sie trotz ihres polaren Charakters z.T. eine hohe

Biokompatibilität aufweisen. Ionische Flüssigkeiten müssen bestimmte physikalische Eigenschaften besitzen, damit sie als Lösemittelphase in einem biphasischen Prozess für die Ganzzell-Biokatalyse geeignet sind. Einerseits dürfen sie selbstverständlich nicht mit Wasser mischbar sein und müssen andererseits einen Schmelzpunkt $< 30^{\circ}\text{C}$ aufweisen. Optimale physikalische Eigenschaften würden zudem eine geringe Viskosität zur Erleichterung des Mischens und zur Vermeidung etwaiger Limitierungen im Stofftransport sowie einen großen Dichteunterschied im Vergleich zur anderen Prozessflüssigkeit umfassen, um die Phasentrennung zu gewährleisten (Dichte $> 1,2 \text{ g/cm}^3$, Viskosität wassergesättigte IL $< 400 \text{ mm}^2/\text{s}$) (Huddleston et al., 2001). Eine Reihe von kommerziell erhältlichen ILs erfüllen die geforderten Kriterien (Bräutigam et al., 2007b). Studien zur Biokompatibilität ergaben, dass von diesen ILs 1-Butyl-3-methylimidazolium-hexafluorphosphat (BMim PF₆) und 1-Hexyl-3-methylimidazolium-hexafluorphosphat (HMim PF₆) die Zellmembranen von *E. coli* BL21 am wenigsten schädigten und dass ionische Flüssigkeiten mit Pyrrolidinium-Kationen und/oder Bis(trifluormethylsulfonyl)imid-Anionen (NTf₂), wie z.B. BMpl NTf₂, HMpl NTf₂ oder BMim NTf₂, die Zellmembranen zwar etwas stärker schädigten, die Membranintegrität von *E. coli* nach 5-stündiger Inkubation mit 20 % (v/v) dieser ILs jedoch immer noch $> 20 \%$ im Vergleich zum rein wässrigen System betrug (Bräutigam et al., 2007b). In der Studie von Pfruender et al. (2006) mit dem Stamm *E. coli* K12 waren die ionischen Flüssigkeiten BMim PF₆ und BMim NTf₂ sogar vollständig biokompatibel. BMim PF₆ hatte sich auch bei Biotransformationen mit anderen Organismen, wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, bewährt (Lou et al., 2006). Aus diesem Grund wurden die in Abb. 3.52 dargestellten ionischen Flüssigkeiten in dieser Arbeit verwendet. Die physikalischen Eigenschaften dieser ILs sind im Anhang (Tab. A.1) aufgeführt.

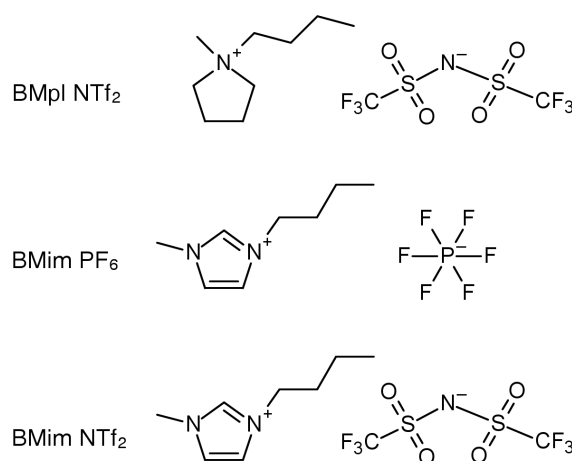


Abbildung 3.52: Strukturen der verwendeten ionischen Flüssigkeiten. BMpl NTf₂ = 1-Butyl-1-methylpyrrolidinium-bis(trifluormethylsulfonyl)imid, BMim PF₆ = 1-Butyl-3-methylimidazolium-hexafluorphosphat, BMim NTf₂ = 1-Butyl-3-methylimidazolium-bis(trifluormethylsulfonyl)imid.

3.8.2 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten der Substrate und Produkte in 2-Phasensystemen mit ionischen Flüssigkeiten

Voraussetzung für den Einsatz von ILs als Substratreservoir bei der angestrebten Biotransformation war, dass sie ein effizientes Lösemittel für Benzaldehyd darstellen. Von Vorteil wäre ferner,

wenn die ionischen Flüssigkeiten in der Lage wären, auch größere Mengen an HCN aufzunehmen. Deshalb wurden zunächst die Verteilungskoeffizienten (log D-Werte) der Substrate (Benzaldehyd bzw. HCN) und Produkte (Mandelsäure bzw. Mandelamid) zwischen den ionischen Flüssigkeiten und Na-Citratpuffer bestimmt. Die Versuchsansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 1000 μL 20 % (v/v) IL sowie 80 % (v/v) Na-Citratpuffer (100 mM, pH 5), wobei die zu untersuchende Substanz in der Puffer-Phase in einer Konzentration von 10 mM vorgelegt wurde. Zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichts wurden die Ansätze in dem jeweiligen 2-Phasensystem bei 30°C unter starkem Rühren in fest verschlossenen Gefäßen für eine Stunde inkubiert (siehe Kap. 2.11.1). Mit den ionischen Flüssigkeiten BMim PF₆ und BMpl NTf₂ ergaben sich hierbei für Benzaldehyd Verteilungskoeffizienten von 2,05 und 1,98 (Tab. 3.23). Somit kamen diese ILs als Substratreservoir in Frage, da dies bedeutet, dass vom Aldehyd im zweiphasigen Ansatz mit 20 % (v/v) Phasenanteil der ionischen Flüssigkeit im Gleichgewichtszustand nur etwa 3,5 - 4 % in der Puffer-Phase verbleiben würden. Auch HCN war teilweise in den ILs löslich (log D bei BMim PF₆ = 0,41 \pm 0,02 bzw. log D bei BMpl NTf₂ = 0,31 \pm 0,03), was eine teilweise Extraktion in BMim PF₆ und BMpl NTf₂ erlauben sollte (Tab. 3.23). Die Produkte der angestrebten Biotransformation (MS bzw. MA) waren aufgrund ihrer negativen bzw. positiven Ladung besser in der wässrigen Phase löslich, wobei Mandelamid stärker in die ILs migrierte als die korrespondierende Säure (Tab. 3.23).

Tabelle 3.23: Verteilungskoeffizienten von Benzaldehyd, HCN, Mandelsäure und Mandelamid für verschiedene 2-Phasensysteme aus ILs oder organischen Lösemitteln und Na-Citratpuffer (100 mM, pH 5).

	MS	MA	BA	HCN
$K_{\text{BMim PF}_6/\text{Puffer}}$	0,088 \pm 0,02	0,96 \pm 0,02	112,24 \pm 2,15	2,57 \pm 0,12
log D	-1,07 \pm 0,12	-0,02 \pm 0,01	2,05 \pm 0,01	0,41 \pm 0,02
$K_{\text{BMpl NTf}_2/\text{Puffer}}$	0,072 \pm 0,03	0,61 \pm 0,01	94,53 \pm 1,93	2,03 \pm 0,12
log D	-1,18 \pm 0,21	-0,21 \pm 0,01	1,98 \pm 0,01	0,31 \pm 0,03
$K_{\text{Heptan}/\text{Puffer}}$	0,059 \pm 0,03	0,011 \pm 0,002	12,09 \pm 0,17	0,21 \pm 0,05
log D	-1,30 \pm 0,27	-1,96 \pm 0,10	1,08 \pm 0,01	-0,68 \pm 0,11
$K_{\text{Oktan}/\text{Puffer}}$	0,03 \pm 0,008	0,003 \pm 0,0027	11,36 \pm 0,40	0,1 \pm 0,04
log D	-1,54 \pm 0,12	-2,34 \pm 0,08	1,06 \pm 0,02	-1,5 \pm 0,86
pKa	3,41 \pm 0,251 ¹	12,46 \pm 0,201 ¹	14,9 ²	9,2 ²

Die Versuche wurden wie in Kap. 2.11.1 beschrieben durchgeführt.

¹ bei 25°C (Werte entnommen aus der SciFinder Datenbank)

² Werte entnommen aus der PubChem Datenbank

Der Verteilungskoeffizient von Mandelsäure wurde ferner nach 2, 3 und 18 h Inkubation bei 30°C analysiert, um zu prüfen, ob das Verteilungsgleichgewicht nach einer Stunde eingestellt war. Die Versuche ergaben, dass die Gleichgewichtseinstellung nach einer Stunde gründlicher Durchmischung beendet war (nicht dargestellt).

Bei der angestrebten Biotransformation hängt die Enantiomerenreinheit der Produkte von der enzymatischen Hydrocyanierung und der (damit) konkurrierenden chemischen Hintergrundreaktion ab. Mandelonitril, das beim Umsatz von Benzaldehyd und HCN als Intermediat entsteht, ist deshalb ein wichtiger Indikator für die Enantioselektivität der Reaktion, da davon ausgegangen werden

kann, dass enantiomerenreine Produkte nur entstehen, wenn lediglich geringe Mengen an Mandelonitril während der Biotransformation akkumulieren und eine Racemisierung dieser Verbindung deshalb weitgehend unterdrückt werden kann (Sosedov et al., 2009). Dementsprechend war es wichtig, auch die Verteilungskoeffizienten von Mandelonitril zwischen den ionischen Flüssigkeiten und Na-Citratpuffer abzuschätzen. Allerdings konnte die Bestimmung aufgrund der Instabilität des Nitrils bei pH 5 nicht entsprechend obigem Vorgehen (1 h Inkubation bei 30°C) durchgeführt werden. Daher wurden 10 mM Mandelonitril in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 5) mit 20 % (v/v) IL einige Sekunden intensiv per Hand geschüttelt und die Verteilungskoeffizienten nach der Phasentrennung dann direkt durch Injektion eines Aliquots aus der Puffer-Phase in die HPLC bestimmt (Kapitel 2.11.1). Die Verteilungskoeffizienten von Mandelonitril zwischen Na-Citratpuffer und BMim PF₆ bzw. BMpl NTf₂ waren annähernd identisch ($K_{\text{BMim PF}_6/\text{W}} = 31,2$, $\log D = 1,5$ bzw. $K_{\text{BMpl NTf}_2/\text{W}} = 31,6$, $\log D = 1,5$). Das Nitril lag dementsprechend hauptsächlich in der BMim PF₆- bzw. BMpl NTf₂-Phase vor.

Zum Vergleich wurden die Verteilungskoeffizienten der Substrate und Produkte in 2-Phasensystemen bestehend aus 20 % (v/v) n-Heptan bzw. n-Oktan sowie 80 % (v/v) Na-Citratpuffer (100 mM, pH 5) ermittelt. Die angesprochenen organischen Lösemittel sollten aufgrund ihres log P-Wertes (Verteilungskoeffizient zwischen n-Oktanol und Wasser) von 4,66 bzw. 5,18 für Biotransformationen mit ganzen Zellen besser geeignet sein als beispielsweise Diisopropylether (DIPE), der einen niedrigen log P-Wert von 1,52 aufweist und das herkömmliche Lösemittel für Oxynitrilase katalysierte Reaktionen darstellt, da es HCN in großen Mengen lösen kann und darüber hinaus auch die störende, chemische Hydrocyanierung stark vermindert (log P-Werte entnommen aus der Datenbank „PubChem“). Die log D-Werte für Benzaldehyd betragen mit 20 % (v/v) Heptan oder Oktan lediglich 1,08 bzw. 1,06 (Tab. 3.23). Im Gleichgewichtszustand verbleiben dementsprechend 25 - 26 % vom Aldehyd in der wässrigen Phase. Zudem waren die organischen Lösemittel nicht in der Lage HCN zu lösen, was eine Extraktion dieses Substrates in diese Lösemittel ausschließt (Tab. 3.23). Weder Heptan noch Oktan waren folglich für den Einsatz als Lösungsmittelphase für die angestrebte Biotransformation geeignet.

3.8.3 Vergleich der toxischen Effekte von ionischen Flüssigkeiten oder Diisopropylether (DIPE) auf *E. coli* JM109

Ein weiteres wichtiges Kriterium für den Einsatz von ionischen Flüssigkeiten bei der Ganzzell-Biokatalyse ist, dass sie möglichst keinen toxischen Effekt auf den eingesetzten Mikroorganismus ausüben. Zur Bestimmung der Biokompatibilität der ionischen Flüssigkeiten im Vergleich zu dem bei Oxynitrilase katalysierten Reaktionen häufig eingesetzten Lösemittel DIPE wurden Zellen von *E. coli* JM109 nach dem Bestimmen der Lebendkeimzahl mit je 20 % (v/v) DIPE, BMim PF₆ oder BMpl NTf₂ versetzt. Die Kontrolle enthielt kein IL bzw. organisches Lösemittel. Nach 1 h und 4 h Inkubation bei 30°C wurde die Lebendkeimzahl erneut bestimmt.

Bereits nach einer Stunde Inkubation waren im Ansatz mit 20 % DIPE keine lebenden Zellen mehr nachweisbar (Abb. 3.53). Ein völlig anderes Bild ergab sich bei Inkubation von *E. coli* JM109 mit den ionischen Flüssigkeiten. Beide ILs waren wesentlich biokompatibler als DIPE, wobei offenbar BMim PF₆ am besten geeignet war, da die Zellzahl mit BMim PF₆ nach 4 h Inkubation deutlich höher war ($6,3 \cdot 10^8$ KBE/mL) als die Zellzahl mit BMpl NTf₂ ($2,05 \cdot 10^6$ KBE/mL) (Abb. 3.53).

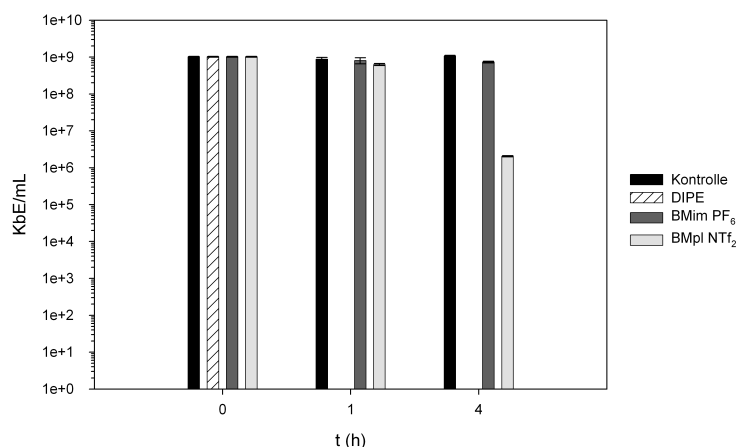


Abbildung 3.53: Toxischer Effekt von DIPE, BMpl NTf₂ und BMim PF₆ auf Zellen von *E. coli* JM109. Der Stamm wurde in 5 mL dYT-Medium bei 37°C angezogen. Nach dem Überimpfen (1:100) in LB-Medium wurde *E. coli* JM109 für 17 h bei 30°C unter Schütteln weiter kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, in Na/K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) gewaschen und anschließend in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 5) resuspendiert, wobei eine optische Dichte (600 nm) von 1 eingestellt wurde. Nach dem Bestimmen der Lebendkeimzahl durch Plattieren auf LB-Agar wurde die Zellsuspension in 4 Aliquots aufgeteilt (je 1 mL) und 3 Reaktionsansätze mit je 250 µL DIPE, BMim PF₆ oder BMpl NTf₂ (entspricht 20 %, v/v) versetzt. Der Kontrolle wurde kein Lösemittel zugegeben. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte in einem Wasserbad bei 30°C unter intensivem Rühren (mittels sterilem Rührfisch). Nach 1 h und 4 h Inkubation wurden Proben (100 µL) aus der wässrigen Phase entnommen, dekadische Verdünnungen in PBS erstellt, die Verdünnungen ausplattiert und am Folgetag die Kolonie-bildenden Einheiten bestimmt.

3.8.4 Vergleich der Biotransformationen von Benzaldehyd und HCN im 1-Phasen- bzw. 2-Phasensystem

Zunächst wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten in einem rein wässrigen Reaktionssystem und in Gegenwart der ionischen Flüssigkeit BMpl NTf₂ verglichen. Hierfür wurden Ruhezellen von *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) mit 10 mM Benzaldehyd und 20 mM KCN in 100 mM Na-Citratpuffer (pH 5) bei 30°C in Gegenwart oder Abwesenheit der IL inkubiert und die Substrat- bzw. Produktkonzentrationen in den Überständen mittels HPLC bestimmt. Benzaldehyd wurde hierbei im rein wässrigen System innerhalb von 5 min vollständig zu Mandelsäure und Mandelamid umgesetzt (Abb. 3.54(a)). Der relative Amidanteil betrug unter diesen Bedingungen 38 %.

Im Folgenden wurde der Umsatz im 2-Phasensystem (mit BMpl NTf₂) durchgeführt. Benzaldehyd wurde hierfür direkt in der ionischen Flüssigkeit gelöst. Die Extraktion von HCN in BMpl NTf₂ erfolgte entsprechend Kapitel 2.11.2. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden bei der Prozessführung im 2-Phasensystem aufgrund des Phasenverhältnisses von 1:4 40 mM Benzaldehyd und 80 mM HCN in BMpl NTf₂ vorgelegt. Diese IL-Phase (0,2 mL) wurde anschließend mit 0,8 mL einer Ruhezellsuspension von *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE536.1) in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 5) versetzt und der Reaktionsansatz bei 30°C unter Schütteln inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben aus der wässrigen Phase entnommen und die Substrat- bzw. Produktkonzentration in den Überständen bestimmt. Die Untersuchung ergab, dass die Zellen auch in Gegenwart der ionischen Flüssigkeit BMpl NTf₂ aktiv waren, die Biotransformation jedoch wesentlich langsamer ablief als im rein wässrigen System (Abb. 3.54(b)). Überraschenderweise wurden von *E. coli*

JM109(pIK9)(pJOE5361.1) im 2-Phasensystem annähernd äquimolare Mengen an Mandelsäure und Mandelamid gebildet (Abb. 3.54(b)). Der relative Amidanteil (53 %) lag damit deutlich höher als bei der Reaktionsführung im rein wässrigen Medium.

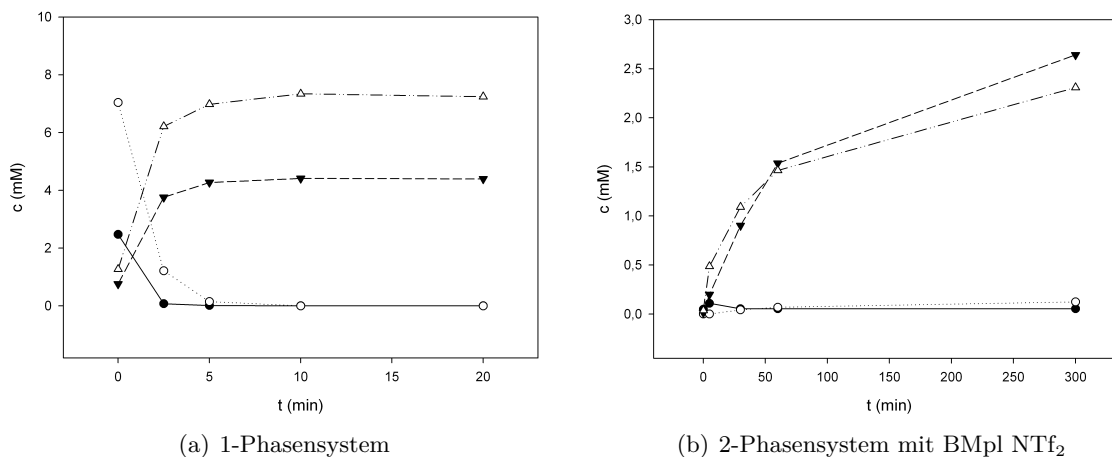


Abbildung 3.54: Umsatz von Benzaldehyd und Cyanid durch *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) im wässrigen Medium (a) oder im 2-Phasensystem mit der ionischen Flüssigkeit BMpl NTf₂ (b). Der Reaktionsansatz bei (a) enthielt in einem Gesamtvolumen von 0,8 mL Ruhezellen ($OD_{600} = 9$), 100 mM Na-Citratpuffer (pH 5), 10 mM Benzaldehyd und 20 mM KCN (aus einer 2 M Stammlösung in Wasser). Der Reaktionsansatz (b) enthielt 0,8 mL Ruhezellen ($OD_{600} = 9,3$), die in 100 mM Na-Citratpuffer (pH 5) resuspendiert waren sowie 0,2 mL BMpl NTf₂, das 40 mM Benzaldehyd und 80 mM HCN enthielt. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte im Wasserbad in vollständig verschlossenen Gefäßen bei 30°C unter intensivem Rühren. In regelmäßigen Abständen wurden Proben (bei (a): je 90 μ L, bei (b): je 180 μ L aus der wässrigen Phase) entnommen und die Reaktionen mit 10 bzw. 20 μ L HCl (1 M) abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Konzentrationen an Benzaldehyd (O), Mandelamid (V), Mandelsäure (Δ) und Mandelonitril (●) in den Überständen mittels HPLC bestimmt.

3.8.5 Spontane chemische Hydrocyanierung in Gegenwart von Bmpl NTf₂

Es wurde bereits mehrfach erwähnt, dass bei der Synthese enantiomerenreiner α -Hydroxycarbonsäuren aus Aldehyden und Cyanid mit Hilfe bienzymatischer Reaktionen der Enantiomerenüberschuss der Produkte von der chemischen Hydrocyanierung der Aldehyde beeinflusst wird. Aus früheren Arbeiten mit den Oxynitrilasen aus *Prunus amygdalus* und *Hevea brasiliensis* war bekannt, dass in Gegenwart der ionischen Flüssigkeiten 1-Ethyl-3-methylimidazolium-tetrafluorborat (EMim BF₄), 1-Propyl-3-methylimidazolium-tetrafluorborat (PMim BF₄) und 1-Butyl-3-methylimidazolium-tetrafluorborat (BMim BF₄) neben der enzymatischen Hydrocyanierung auch die chemische Hintergrundreaktion beschleunigt war (Gaisberger et al., 2004). Dies führte zu einer Abnahme der Enantiomerenreinheit der Cyanhydrine.

Um den Einfluss der unerwünschten Hintergrundreaktion im 2-Phasensystem mit BMpl NTf₂ in Gegenwart hoher Substratkonzentrationen abzuschätzen, wurden 0,2 mL BMpl NTf₂, das 0,74 M Benzaldehyd sowie 1,4 M HCN enthielt, mit 0,8 mL Na-Citratpuffer (100 mM, pH 5) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend unter starkem Rühren bei 30°C inkubiert und die Konzentrationen an Benzaldehyd bzw. Mandelonitril in der IL- und Pufferphase nach 10, 30 und 60 min bestimmt. Auf eine Probenahme bei $t = 0$ min wurde verzichtet, da das Vermischen der Phasen

und damit die adäquate Gleichgewichtseinstellung sowie die sich anschließende Phasentrennung stets einige Minuten Zeit in Anspruch nahm. Bei dem hier beschriebenen 2-Phasensystem waren nach einer Stunde Inkubation etwa 60 % des eingesetzten Benzaldehyds spontan mit HCN zu Mandelonitril reagiert (Abb. 3.55). Dagegen war Benzaldehyd im rein wässrigen System mit etwas niedrigeren Substratkonzentrationen (175 mM BA und 350 mM HCN; vgl. Kapitel 3.7.1) im Rahmen der spontanen Reaktion mit HCN innerhalb einer Stunde Inkubation bereits vollständig in Mandelonitril umgewandelt (Abb. 3.47(b)). Die chemische Hydrocyanierung war in Gegenwart der ionischen Flüssigkeit somit etwas langsamer als im rein wässrigen System.

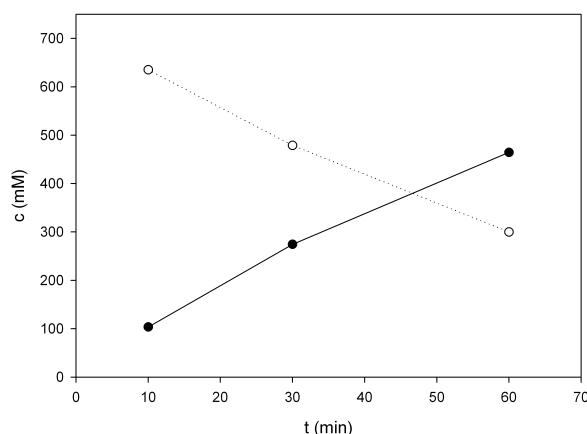


Abbildung 3.55: Spontane chemische Hydrocyanierung von Benzaldehyd in Gegenwart der ionischen Flüssigkeit BMpl NTf₂. Der Reaktionsansatz enthielt 0,8 mL Na-Citratpuffer (100 mM, pH 5) sowie 0,2 mL BMpl NTf₂, das 0,74 M Benzaldehyd und 1,4 M HCN enthielt. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte in einem vollständig verschlossenen Gefäß im Wasserbad bei 30°C unter intensivem Rühren. Nach 10, 30 und 60 min wurden Proben aus beiden Phasen entnommen und die Reaktion in der Puffer-Phase durch Zugabe von 10 % (v/v) HCl (1 M) abgestoppt. Die Konzentrationen an Benzaldehyd (O) und Mandelonitril (●) wurden anschließend in beiden Phasen mittels HPLC bestimmt und deren durchschnittliche Konzentration entsprechend Kapitel 2.11.4 berechnet.

3.8.6 Umsatz synthetisch relevanter Substratkonzentrationen in Gegenwart der ionischen Flüssigkeit BMpl NTf₂

Im Folgenden wurde untersucht, ob synthetisch relevante Substratkonzentrationen von *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) im 2-Phasensystem mit BMpl NTf₂ umgesetzt werden. Ruhezellen von *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) wurden hierfür in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 5) resuspendiert und die Zellsuspension (0,8 mL) anschließend mit 0,2 mL IL-Phase (BMpl NTf₂) versetzt, welche 0,7 M Benzaldehyd sowie 1,4 M HCN enthielt. Um die chemische Hintergrundreaktion weitestgehend zu unterdrücken (vgl. Kap. 3.8.5), wurden Ruhezellen in einer vergleichsweise hohen optischen Dichte (OD₆₀₀ = 67) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C unter intensivem Rühren. Zur Aufrechterhaltung des Phasenverhältnisses wurden analog Kapitel 3.8.5 Proben aus der IL- und Pufferphase entnommen und die Substrat- bzw. Produktkonzentrationen in beiden Phasen anschließend mittels HPLC bestimmt.

Im 2-Phasensystem mit BMpl NTf₂ waren nach 30 min Inkubation bereits 85 % des eingesetzten Benzaldehyds zu Mandelsäure und Mandelamid umgesetzt (Tab. 3.24). Die Biotransformation

wurde mit zunehmender Reaktionszeit zwar langsamer, die Ausbeute betrug nach 150 min Inkubation (bezogen auf das eingesetzte Benzaldehyd) jedoch 100 %. Der relative Amidanteil an den Produkten war mit 72 % noch etwas höher als bei der Prozessführung im rein wässrigen System mit vergleichbaren Substratkonzentrationen (63 %, vgl. Kap. 3.7.1). Die chirale Analyse der Überstände ergab, dass Mandelsäure und Mandelamid durch die Ruhezellen im 2-Phasensystem mit hohen Enantiomerenreinheiten gebildet wurden. Der Enantiomerenüberschuss (ee) an (*S*)-Mandelsäure betrug 95 %, der ee-Wert für (*S*)-Mandelamid war mit 99 % sogar noch etwas höher (Tab. 3.24).

Tabelle 3.24: Umsatz von Benzaldehyd und HCN durch *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) im 2-Phasensystem mit BMpl NTf₂.

t (min)	C _{Puffer-Phase} (mM)		C _{IL-Phase} (mM)				∅ c ¹ (mM)				MA ² (%)	Um- satz ³ (%)	ee (<i>S</i>)-MS ⁴ (%)	ee (<i>S</i>)-MA ⁴ (%)
	MS	MA	MS	MA	BA	MN	MS	MA	BA	MN				
30	40,0	84,3	3,0	67,5	9,2	98,4	32,6	81,0	1,8	19,7	71	85	94	> 99
60	45,2	99,4	2,6	66,1	0,1	5,4	36,7	92,7	0	1,1	72	97	95	> 99
150	46,7	102,0	1,8	72,0	0	0	37,7	96,0	0	0	72	100	95	99

Die Anzucht der Zellen und die Versuchsdurchführung erfolgten wie in Kapitel 2.11.3 beschrieben. Für den Umsatz wurden Ruhezellen mit einer optischen Dichte (600 nm) von 67 eingesetzt.

¹ Durchschnittliche Konzentration. Die Substrat- bzw. Produktkonzentrationen, die in der Puffer- und IL-Phase vorlagen, wurden kombiniert, indem für jede Verbindung eine „durchschnittliche Konzentration“ in Korrelation zum gesamten Reaktionsvolumen berechnet wurde, wobei die IL- und Puffer-Phasen während der gesamten Reaktion in einem Verhältnis von 1:4 vorlagen.

² [MA]/([MS]+[MA])

³ [MS]+[MA]/durchschnittliche Anfangskonzentration von Benzaldehyd. In der IL-Phase wurden 0,7 M BA vorgelegt, dies entspricht einer „durchschnittlichen Konzentration“ von 140 mM (bezogen auf beide Phasen). Da der kommerziell erworbene BA-Standard als Verunreinigung Benzoat enthielt, betrug die tatsächliche durchschnittliche Anfangskonzentration von BA etwa 133 mM.

⁴ in der Puffer-Phase

3.8.7 Umsatz synthetisch relevanter Substratkonzentrationen in Gegenwart der ionischen Flüssigkeit BMim PF₆

Die ionische Flüssigkeit BMim PF₆ sollte aufgrund der Verteilungskoeffizienten (log D-Werte) sowie der Ergebnisse zur Biokompatibilität als Substratreservoir für Benzaldehyd noch besser geeignet sein als BMpl NTf₂ (Kap. 3.8.2 und 3.8.3). Die Biotransformation war in Gegenwart von BMim PF₆ jedoch etwas langsamer als mit BMpl NTf₂ als Lösungsmittelphase. Nach 60 min Inkubation bei 30°C lagen in der BMim PF₆ Phase noch 77,8 mM Mandelonitril vor. Dagegen betrug die Mandelonitrilkonzentration bei Verwendung von BMpl NTf₂ als Lösemittelphase zu diesem Zeitpunkt lediglich 5,4 mM (Tab. 3.24). Zudem nahm die Konzentration des Intermediats im weiteren Verlauf der Reaktion nur geringfügig weiter ab (auf 51,7 mM). Dementsprechend war die Ausbeute mit 87 % nach verlängerter Inkubationszeit etwas geringer als in Gegenwart der ionischen Flüssigkeit BMpl NTf₂, bei der das eingesetzte Benzaldehyds vollständig umgesetzt worden war. Auch der relative Anteil des Amids an den Produkten (63 %) war im 2-Phasensystem mit BMim PF₆ etwas geringer. Die erzielten Enantiomerenüberschüsse (ee) an (*S*)-Mandelsäure (94 %) und (*S*)-Mandelamid (98 %) waren jedoch ähnlich hoch wie bei Verwendung von BMpl NTf₂.

Tabelle 3.25: Umsatz von Benzaldehyd und HCN durch *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) im 2-Phasensystem mit BMim PF₆.

t (min)	C _{Puffer-Phase} (mM)		C _{IL-Phase} (mM)				∅ c ¹ (mM)				MA ² (%)	Um- satz ³ (%)	ee (S)-MS ⁴ (%)	ee (S)-MA ⁴ (%)
	MS	MA	MS	MA	BA	MN	MS	MA	BA	MN				
30	52,4	61,0	3,6	76,2	10,7	125,4	42,6	64,0	2,1	25,1	61	80	95	> 99
60	52,2	65,6	2,6	70,2	5,3	77,8	42,3	66,5	1,1	15,6	61	82	96	> 99
120	53,3	68,0	2,4	80,2	3,7	55,7	43,1	70,4	0,8	11,1	62	85	94	99
270	53,4	69,8	3,9	82,6	3,5	51,7	43,5	72,4	0,7	10,3	63	87	94	98

Die Anzucht der Zellen und die Versuchsdurchführung erfolgten analog zu dem in Tab. 3.24 beschriebenen Experiment; lediglich BMpl NTf₂ wurde durch BMim PF₆ ersetzt.

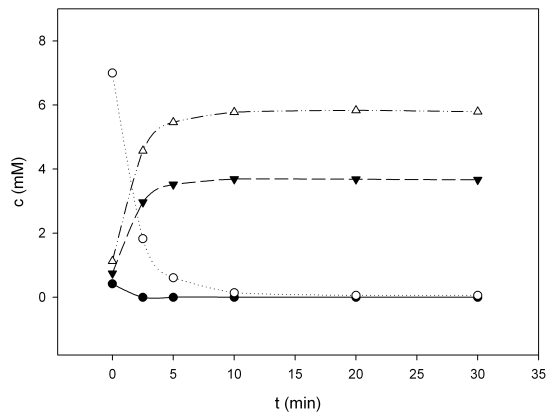
¹⁻⁴ entsprechend Legende Tab. 3.24

3.8.8 Einfluss von BMim PF₆ auf die Oxynitrilase- und Nitrilase-Aktivitäten von *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1)

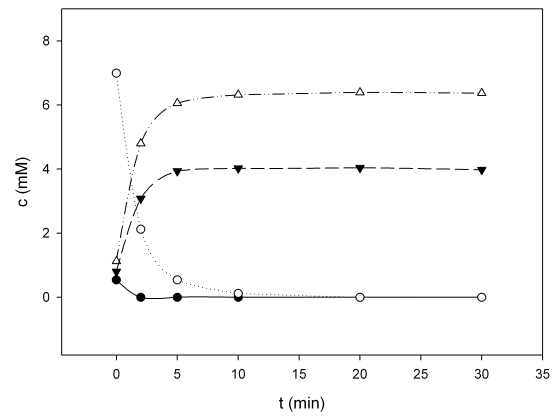
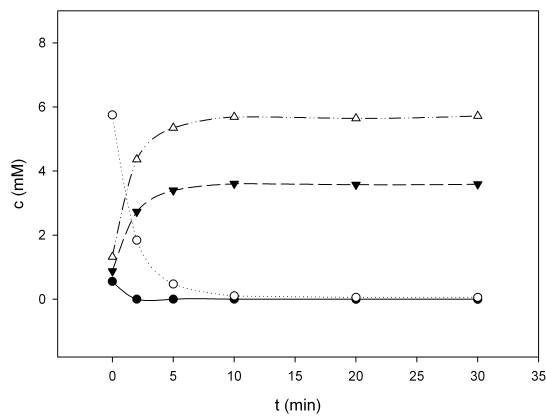
Obwohl sich die ionische Flüssigkeit BMim PF₆ im Vergleich zu BMpl NTf₂ durch eine höhere Biokompatibilität auszeichnete, setzte *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) Benzaldehyd und HCN in Gegenwart von BMpl NTf₂ als Lösungsmittelphase/Substratreservoir schneller um. Dies könnte zum einen auf die unterschiedliche Viskosität der ILs zurückzuführen sein, andererseits wurde im 2-Phasensystem mit BMim PF₆ nach einer Inkubationszeit von 1 h das Intermediat der Reaktion (Mandelonitril) von der Nitrilase-Aktivität des Ganzzellkatalysators nur noch sehr langsam weiter zu Mandelsäure und Mandelamid umgesetzt (Kapitel 3.8.7). Dementsprechend erschien es möglich, dass die Nitrilase-Aktivität des Biokatalysators durch BMim PF₆ gehemmt wurde. Um diesen Sachverhalt zu prüfen, wurden Ruhezellen von *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 5) resuspendiert und mit 20 % (v/v) BMim PF₆ bei 30°C unter starkem Rühren inkubiert. Als Kontrolle diente eine Zellsuspension, der keine ionische Flüssigkeit zugesetzt wurde. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen (0, 1, 2, 3 und 4 h) wurden Aliquots aus der wässrigen Phase entnommen. Aus dem Reaktionsansatz, der 20 % (v/v) BMim PF₆ enthielt, wurden zusätzlich Proben aus der IL-Phase entnommen, um das Phasenverhältnis nicht zu verändern. Mit den entnommenen Zellsuspensionen wurden anschließend Ruhezellumsätze mit Benzaldehyd und KCN durchgeführt. Zu beachten ist, dass Reste von fein verteiltem BMim PF₆ in den Ruhezellumsätzen zu einer Aktivitätsabnahme des Ganzzellkatalysators führen können, da die ionische Flüssigkeit als Substratreservoir fungiert und folglich die Benzaldehydkonzentration in der (die Zellen umgebenden) Puffer-Phase verringert. Ein Verschleppen von BMim PF₆ in die Ruhezellumsätze musste folglich unbedingt verhindert werden. Aus diesem Grund wurde die Zellsuspension, die mit BMim PF₆ inkubiert worden war, vor den Ruhezellumsätzen kurz anzentrifugiert (etwa 3 Sekunden), um fein verteiltes BMim PF₆ abzutrennen. Der Zentrifugationsschritt war so kurz, dass die in der Lösung befindlichen Zellen hierbei nur in sehr geringem Ausmaß pelletiert wurden. Die Inkubation von *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) mit 20 % (v/v) BMim PF₆ führte zu einer Abnahme der Nitrilase-Aktivität, da Mandelonitril in den Ruhezellumsätzen akkumulierte [Abb. 3.56(b), 3.56(d), 3.56(f), 3.56(h) und 3.56(j)]. Dagegen war bei der Inkubation von *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) in 100 mM Na-Citratpuffer bei einem pH-Wert von 5 (Kontrolle)

auch nach 4 Stunden Inkubation keine Abnahme der Oxynitrilase- oder Nitrilase-Aktivität zu erkennen [Abb. 3.56(a), 3.56(c), 3.56(e), 3.56(g) und 3.56(i)]. Die Benzaldehyd Wiederfindung war zum Zeitpunkt t_0 in allen Reaktionsansätzen vergleichbar. Somit kann davon ausgegangen werden, dass ein Verschleppen von BMim PF₆ in die Ruhezellumsätze erfolgreich verhindert wurde. Beim Vorliegen von BMim PF₆ in den Reaktionsansätzen, wäre Benzaldehyd direkt in die ionische Flüssigkeit migriert. Beim Abzentrifugieren der Proben, die in regelmäßigen Abständen aus den Reaktionsansätzen entnommen wurden, wäre die ionische Flüssigkeit pelletiert worden und folglich auch das darin gelöste Benzaldehyd. Dies hätte die Aldehydkonzentration in den Überständen zum Zeitpunkt t_0 verringert.

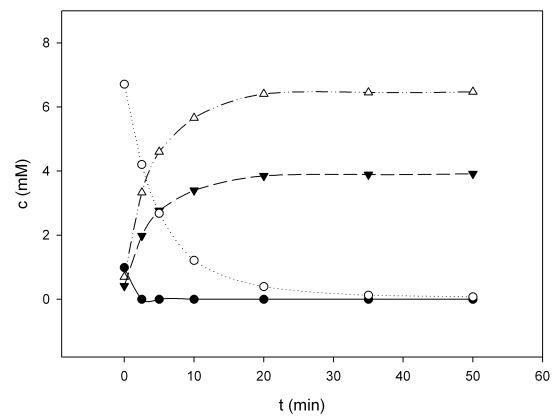
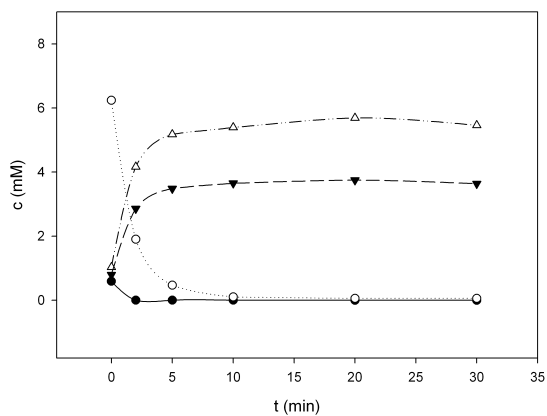
Die Akkumulation von Mandelonitril in den Reaktionsansätzen, die BMim PF₆ enthielten, deutete an, dass die Nitrilase-Aktivität von *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) zumindest teilweise durch die ionische Flüssigkeit inhibiert wurde und die Steigerung dieses Effektes bei einer längeren Inkubation der Zellen in Gegenwart von BMim PF₆.



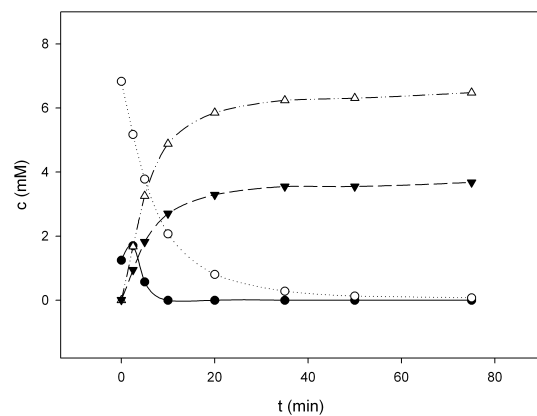
(a) nach 0 h Inkubation in Na-Citratpuffer

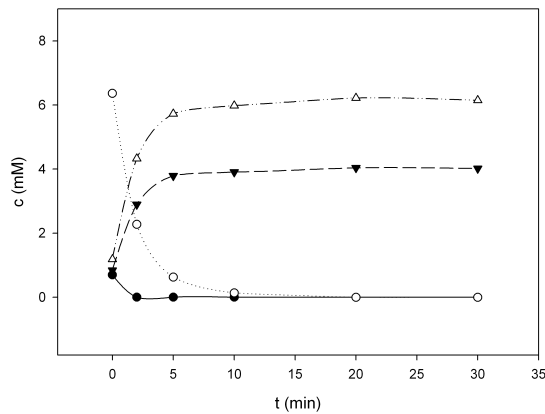
(b) nach 0 h Inkubation mit 20 % BMim PF₆

(c) nach 1 h Inkubation in Na-Citratpuffer

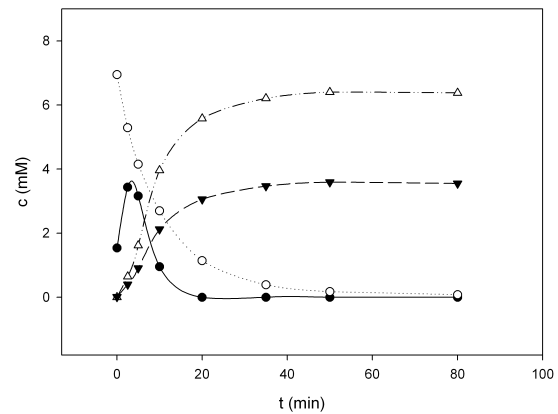
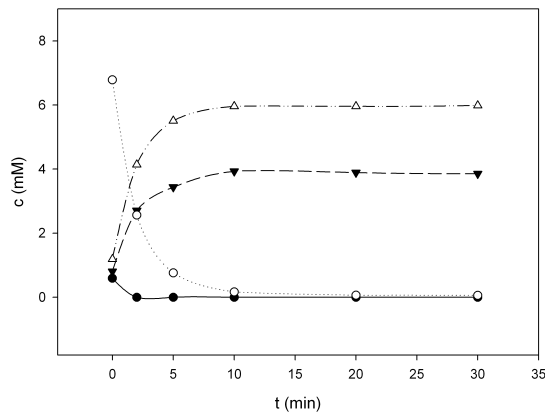
(d) nach 1 h Inkubation mit 20 % BMim PF₆

(e) nach 2 h Inkubation in Na-Citratpuffer

(f) nach 2 h Inkubation mit 20 % BMim PF₆



(g) nach 3 h Inkubation in Na-Citratpuffer

(h) nach 3 h Inkubation mit 20 % BMim PF₆

(i) nach 4 h Inkubation in Na-Citratpuffer

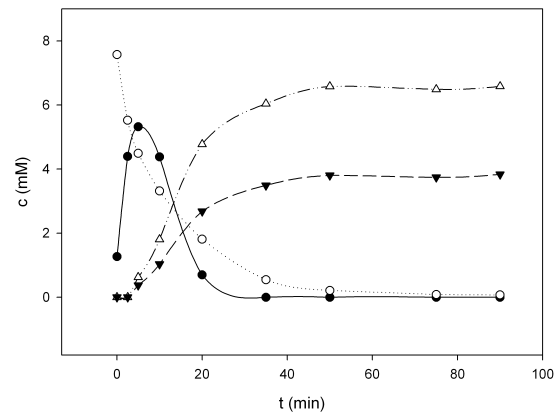
(j) nach 4 h Inkubation mit 20 % BMim PF₆

Abbildung 3.56: Umsatz von Benzaldehyd und Cyanid durch *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) nach 0, 1, 2, 3 und 4 h Inkubation der Zellen in Na-Citratpuffer (a), (c), (e), (g), (i) bzw. nach 0, 1, 2, 3, und 4 h Inkubation der Zellen in Na-Citratpuffer mit 20 % (v/v) BMim PF₆ (b), (d), (f), (h), (j). Bei -70°C eingefrorene Ruhezellen von *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) wurden in Na-Citratpuffer (100 mM, pH 5) resuspendiert und eine optische Dichte (600 nm) von 24 eingestellt. Die Zellsuspension wurde auf 2 Glasgefäße (Headspace-Vials) aufgeteilt, wobei einer Zellsuspension 20 % (v/v) BMim PF₆ zugesetzt wurde. Die Kontrolle enthielt keine ionische Flüssigkeit. Beide Reaktionsansätze wurden im Wasserbad bei 30°C unter starkem Rühren (ca. 500 Umdrehungen/min) inkubiert. Nach 0, 1, 2, 3 und 4 h Inkubation wurden Aliquots entnommen (je 700 µL aus der wässrigen Phase und 175 µL aus der IL-Phase bzw. je 600 µL aus der Kontrolle). Um ein Verschleppen der ionischen Flüssigkeit zu verhindern, wurden die aus der wässrigen Phase entnommen Proben kurz anzentrifugiert, um fein verteiltes BMim PF₆ abzutrennen. Die überstehende wässrige Phase mit den Zellen (ca. 600 µL) wurde entnommen und die optische Dichte der Zellen gemessen. Anschließend wurden Ruhezellumsätze in einem Gesamtvolumen von 1 mL durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 1 mL Ruhezellen ($OD_{600} = 9 \pm 0,6$), 100 mM Na-Citratpuffer (pH 5), 10 mM Benzaldehyd und 20 mM KCN (aus einer 2 M Stammlösung in Wasser). Die Reaktionsansätze wurden im Thermoschüttler bei 30°C und 1100 rpm inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben (90 µL) entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 10 µL 1 M HCL abgestoppt. Nach dem Entfernen der Zellen durch Zentrifugation (13500 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Konzentrationen an Benzaldehyd (○), Mandelamid (▼), Mandelsäure (Δ) und Mandelonitril (●) in den Überständen mittels HPLC bestimmt.

3.8.9 Umsatz synthetisch relevanter Substratkonzentrationen in Gegenwart der ionischen Flüssigkeit BMim NTf₂

Wie bereits in Kapitel 3.8.8 erwähnt, war es möglich, dass die unterschiedlichen Umsatzraten mit BMpl NTf₂ bzw. BMim PF₆ durch die unterschiedlichen Viskositäten der ionischen Flüssigkeiten beeinflusst wurden, da BMim PF₆ eine deutlich höhere Viskosität aufweist als BMpl NTf₂ (Anhang, Tab. A.1). Um den Einfluss der Viskosität auf den Umsatz von Benzaldehyd und HCN durch *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) abzuschätzen, wurde in einem abschließenden Versuch BMim NTf₂ als Substratreservoir eingesetzt, da die Viskosität dieser ionischen Flüssigkeit sehr ähnlich ist zu der von BMpl NTf₂ (Anhang, Tab. A.1). Der Substratumsatz war in Gegenwart von 20 % (v/v) BMim NTf₂ im Hinblick auf die Umsatzrate sowie den relativen Amidanteil annähernd identisch zur Biotransformation mit BMpl NTf₂ als Substratreservoir (Tab. 3.26 und 3.24). Die etwas geringere Umsatzrate mit BMim PF₆ korrelierte daher wahrscheinlich mit der höheren Viskosität dieser ionischen Flüssigkeit. Wie bei den vorangegangenen Untersuchungen wurde (*S*)-Mandelsäure und (*S*)-Mandelamid mit hohen Enantiomerenreinheiten durch *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) synthetisiert.

Tabelle 3.26: Umsatz von Benzaldehyd und HCN durch *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) im 2-Phasensystem mit BMim NTf₂.

t (min)	C _{Puffer-Phase} (mM)		C _{IL-Phase} (mM)				ø c ¹ (mM)				MA ² (%)	Um- satz ³ (%)	ee (<i>S</i>)-MS ⁴ (%)	ee (<i>S</i>)-MA ⁴ (%)
	MS	MA	MS	MA	BA	MN	MS	MA	BA	MN				
30	35,2	73,9	1,9	88,6	16,7	154,6	28,5	76,8	3,3	30,9	73	79	93	> 99
60	42,3	92,8	2,6	91,1	1,3	10,3	34,4	92,5	0,3	2,1	73	95	93	> 99
120	42,7	91,7	1,9	90,7	0	2,8	34,5	92,4	0	0,6	72	95	94	99
240	44,4	92,8	2,2	91,8	0	0	36	92,6	0	0	72	97	94	99

Die Anzucht der Zellen und die Versuchsdurchführung erfolgten analog zu dem in Tab. 3.24 beschriebenen Experiment; lediglich BMpl NTf₂ wurde durch BMim NTf₂ ersetzt.

¹⁻⁴ entsprechend Legende Tab. 3.24

Alle eingesetzten ionischen Flüssigkeiten stellten folglich ein effizientes Substratreservoir für Benzaldehyd dar und waren wesentlich biokompatibler als das traditionelle Lösemittel für Oxynitrilase-katalysierte Reaktionen (DIPE) oder die organischen Lösemittel Heptan und Octan. Die ionischen Flüssigkeiten erlaubten dadurch den Umsatz synthetisch relevanter Substratmengen durch den „bienzymatischen Ganzzellkatalysator“, wobei die Produkte der Biotransformationen mit hohen Enantiomerenreinheiten synthetisiert wurden.

4 Diskussion

Nitrilasen werden traditionell entsprechend ihrer Substratspezifitäten in drei Hauptgruppen unterteilt (Kap. 1.2). Hierbei unterscheidet man zwischen Arylacetonitrilasen, aromatischen und aliphatischen Nitrilasen. Am Institut für Mikrobiologie lagen die Gene der Nitrilasen aus *Pseudomonas fluorescens* EBC191, *Alcaligenes faecalis* ATCC8750, *Synechocystis* sp. PCC6803 und *Rhodococcus rhodochrous* J1 in den gleichen Expressionsvektor (pJOE2775) kloniert in *E. coli* JM109 vor. Die Nitrilasen aus *P. fluorescens* und *A. faecalis* hydrolysieren primär Arylacetonitrile, die Nitrilase aus *R. rhodochrous* bevorzugt aromatische Nitrile und die Nitrilase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 weist die höchsten Aktivitäten mit aliphatischen Nitrilen auf (Kiziak et al., 2005; Yamamoto et al., 1992; Kobayashi et al., 1989; Heinemann et al., 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Potential dieser Nitrilasen im Hinblick auf den Umsatz eines aliphatischen Modellsubstrates (2-Hydroxy-3-butennitril) und eines sterisch anspruchsvollen Substrates (Acetophenoncyanhydrin) untersucht, um die am besten geeignete(n) Nitrilase(n) zur Darstellung der entsprechenden α -Hydroxycarbonsäuren zu identifizieren. Hierbei sollte auch die Möglichkeit einer Kopplung der Nitrilase-Reaktion mit einer Oxynitrilase untersucht werden.

4.1 Vergleich der Stabilität verschiedener α -Hydroxynitrile

Die Synthese enantiomerenreiner α -Hydroxycarbonsäuren aus Aldehyden oder Ketonen und Cyanid mittels „bienzymatischer Ganzzellkatalyse“ erfordert in wässrigen Medien niedrige pH-Werte, um die chemische Hydrocyanierung der Aldehyde oder Ketone sowie den chemischen Zerfall der gebildeten Intermediate (α -Hydroxynitrile) und die damit einhergehende Racemisierung zu unterdrücken. Aus diesem Grund wurde zunächst die Stabilität der Modellsubstrate 2-Hydroxy-3-butennitril und Acetophenoncyanhydrin bei unterschiedlichen pH-Werten (und Temperaturen) untersucht. Während 2-Hydroxy-3-butennitril bei einem pH-Wert von 5 und einer Temperatur von 30°C eine Halbwertszeit von etwa 6 Stunden aufwies, war die Hälfte des eingesetzten Acetophenoncyanhydrins bereits nach 30 min Inkubation bei pH 5 in Acetophenon und Cyanid zerfallen. Durch niedrigere Temperaturen konnte der chemische Zerfall beider Modellsubstrate deutlich vermindert werden.

Ein Vergleich der durchgeführten Stabilitätsuntersuchungen mit den Experimenten von Rustler et al. (2007) zum chemischen Zerfall von Mandelonitril zeigte, dass die Stabilität der untersuchten Cyanhydrine in der Reihe 2-Hydroxy-3-butennitril > Mandelonitril > Acetophenoncyanhydrin abnimmt. Beim Zerfall von α -Hydroxynitrilen handelt es sich um eine reversible chemische Reaktion, weshalb eine hohe Stabilität des Cyanhydrins automatisch mit einer schnellen spontanen Hydrocyanierung einhergeht (und umgekehrt). Die Gleichgewichtslage der Reaktion ist hierbei abhängig von der Reaktivität der Carbonylfunktion in den korrespondierenden Aldehyden bzw.

(im Fall von Acetophenoncyanhydrin) im zugehörigen Keton. Bestimmt wird die Reaktivität der Carbonylfunktion von der Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffatoms und damit von der Elektrodichte am C-Atom, die von den vorhandenen Substituenten beeinflusst wird. Es müssen hierbei sowohl Induktive- als auch Mesomerie-Effekte der Substituenten berücksichtigt werden, wobei -M- und -I-Effekte die Elektrophilie erhöhen, wohingegen sie durch +M- und +I-Effekte gesenkt wird. Je größer die Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffatoms, desto leichter können sich Nucleophile (wie in diesem Fall das Cyanid-Anion) am C-Atom anlagern. Acetophenon weist im Vergleich zu Benzaldehyd eine Methyl-Gruppe am Carbonylkohlenstoffatom auf, die einen +I-Effekt besitzt, weshalb Benzaldehyd etwa 400-fach schneller mit Nucleophilen reagiert als Acetophenon (Schwalbe, 2015). Betrachtet man die beiden Aldehyde, besitzt Benzaldehyd im Vergleich zu Acrolein einen Phenylrest, der einen +M-Effekt aufweist, wobei die Carbonylgruppe in die Konjugation mit dem aromatischen System eingebunden wird. Hinzu kommt, dass Phenylgruppen sterisch anspruchsvoll sind, wodurch die Reaktivität zusätzlich herabgesetzt ist (Schwalbe, 2015). In der Folge reagiert Benzaldehyd langsamer mit dem Cyanid-Anion als Acrolein.

4.2 Säureretoleranz verschiedener Nitrilasen

Das pH-Optimum von Nitrilasen liegt in der Regel im neutralen bis leicht alkalischen Bereich (Banerjee et al., 2002; O'Reilly und Turner, 2003; Thuku et al., 2009). Wie bereits mehrfach erwähnt, erfordert die bienzymatische Synthese von enantiomerenreinen α -Hydroxycarbonsäuren in wässrigen Medien jedoch niedrige pH-Werte. Daher waren neben der Substratspezifität der Nitrilasen auch ihre Säureretoleranz von Bedeutung. Für die Nitrilase aus *P. fluorescens* wurde bereits zuvor gezeigt, dass beim Umsatz von Mandelonitril bei pH-Werten von 4 - 7 der Einsatz von Ruhezellen im Hinblick auf die spezifischen Enzymaktivitäten der Verwendung von Zellextrakten überlegen ist (Rustler et al., 2007). Besonders deutlich war der Unterschied bei einem pH-Wert von 4. So konnten mit zellfreien Extrakten lediglich 15 %, mit Ruhezellen jedoch annähernd 40 % des eingesetzten Mandelonitrils ($c = 10 \text{ mM}$) bei gleichzeitig höherer Enzymaktivität umgesetzt werden (Rustler, 2011). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass Mikroorganismen bestrebt sind, einen ca. neutralen cytoplasmatischen pH-Wert auch unter sauren Bedingungen im umgebenden Medium aufrechtzuerhalten (Baker-Austin und Dopson, 2007). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Säureretoleranz der Nitrilasen aus *P. fluorescens* EBC191, *A. faecalis* ATCC8750, *Synechocystis* sp. PCC6803 und *R. rhodochrous* J1 in *E. coli* JM109 ergaben, dass die Nitrilase aus *P. fluorescens* von den untersuchten Nitrilasen die höchste Aktivität bei einem pH-Wert von 5 aufwies während die Aktivitäten der Nitrilasen aus *A. faecalis* und *R. rhodochrous* unter diesen Bedingungen deutlich niedriger waren als bei neutralem pH-Wert. Die Ergebnisse spiegeln damit im Wesentlichen die Untersuchungen zum pH-Optimum der aufgereinigten Enzyme wider [pH-Optimum NLase *P. fluorescens*: 5,5 - 7,5 (Kiziak et al., 2005), pH-Optimum NLase *A. faecalis*: 6,5 - 8 (Yamamoto et al., 1992), pH-Optimum NLase *Synechocystis*: 6 - 8 (Heinemann et al., 2003), pH-Optimum NLase *R. rhodochrous*: 7,5 - 8 (Kobayashi et al., 1989)].

4.3 Biotransformation aliphatischer Nitrile

Das aliphatische Modellsubstrat 2-Hydroxy-3-butennitril wurde von allen untersuchten Nitrilasen (siehe Kap. 3.1.3) zur korrespondierenden Carbonsäure hydrolysiert. Die Nitrilase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 zeigte hierbei die geringste Umsatzrate. Dieses Enzym ist zwar in der Lage, aliphatische Mono- und Dinitrile mit hoher spezifischer Aktivität umzusetzen, allerdings wurde bereits von Heinemann (2003) beobachtet, dass diese Nitrilase mit α -substituierten Nitrilen nur geringe Umsatzzraten zeigte. Bei den Ganzzellumsätzen wurde 2-Hydroxy-3-butennitril von dem *E. coli* Stamm, der die Nitrilase aus *P. fluorescens* exprimiert, am schnellsten hydrolysiert. Daher wurde das synthetische Potential dieses Enzyms hinsichtlich der Umsetzung weiterer aliphatischer Nitrile untersucht. Die höchsten Aktivitäten wurden hierbei mit Substraten erzielt, die elektronenziehende Substituenten (-OH oder -Cl) am zur Nitril-Gruppe α -ständigen C-Atom tragen (Kap. 3.1.4). In diesem Zusammenhang wurde bereits vor mehr als 50 Jahren für die Nitrilase aus Gerste von Thimann und Mahadevan (1964) vorgeschlagen, dass durch elektronenziehende Substituenten der nukleophile Angriff des katalytisch aktiven Cystein-Restes auf das Kohlenstoffatom der Nitril-Gruppe erleichtert wird. Allerdings konnte für die Nitrilase aus *P. fluorescens* keine Korrelation zwischen der Polarität (oder Größe) der Substituenten und der Enzymaktivität festgestellt werden, da die Umsatzzraten in der Reihe 2-Phenylpentannitril > Phenylacetonitril > Mandelonitril > Phenylglycinonitril > 2-Phenylpropannitril > 2-Acetyloxymandelonitril > 2-Phenylbutannitril abnahmen (Kiziak et al., 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass gesättigte aliphatische Nitrile im Vergleich zu ungesättigten Verbindungen schlechter umgesetzt wurden (Kap. 3.1.4). Ebenso wurde die Enzymaktivität durch „elektronenschiebende“ Gruppen am α -ständigen C-Atom vermindert. Die Substrate 2-Methylbutannitril und Propannitril wurden dementsprechend nur mit sehr geringen spezifischen Aktivitäten umgesetzt.

Zusammenfassend kann für aliphatische Nitrile gesagt werden, dass ungesättigte aliphatische Nitrile mit elektronenziehenden Gruppen in α -Position von der Nitrilase aus *P. fluorescens* am besten hydrolysiert wurden. Berücksichtigt man ferner, dass Valeriansäurenitril bei einem pH-Wert von 7 mit einer vergleichbar hohen spezifischen Aktivität wie 2-Phenylpropannitril umgesetzt wurde (Kiziak et al., 2005), eignet sich die Nitrilase aus *P. fluorescens* voraussichtlich v.a. für die Hydrolyse (ungesättigter) 2-Hydroxypentannitrile. Diese Vermutung wurde in weiterführenden Arbeiten zum Umsatz aliphatischer Nitrile durch die Nitrilase aus *P. fluorescens* bestätigt, da das Enzym bevorzugt ungesättigte Nitrile mit 5 - 6 C-Atomen hydrolysierte (Brunner et al., 2018).

Neben der hier untersuchten Nitrilase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 wurden in der Literatur noch weitere aliphatische Nitrilasen beschrieben. Hierzu gehören die Nitrilasen aus *Acidovorax facilis* 72W, *Acinetobacter* sp. AK226, *Comamonas testosteroni*, *Pseudomonas* sp. S1, *R. rhodochrous* K22, *P. fluorescens* Pf-5, *Arthrobacter aureus* CYC705 und *Isoptericola variabilis* RGT01 (Gavagan et al., 1999; Yamamoto und Komatsu, 1991; Lévy-Schil et al., 1995; Dhillon und Shivaraman, 1999; Dhillon et al., 1999; Kobayashi et al., 1990; Kim et al., 2009; Cai et al., 2014; Kaur et al., 2014). Die Hydrolyse α -substituierter aliphatischer Nitrile wurde hierbei lediglich in geringem Umfang untersucht. So wurde für die Nitrilase aus *A. facilis* 72W der Umsatz von 2-Methylglutaronitril und für die Nitrilase aus *Acinetobacter* sp. AK226 der Umsatz von 2-Methylpropannitril gezeigt (Gavagan et al., 1999; Yamamoto und Komatsu, 1991). Die Nitrilasen aus *R. rhodochrous* K22

und *Synechocystis* sp. PCC6803 sind in der Lage, 2-Methyl-2-butennitril, 2-Methyl-3-butennitril, 2-Methylpropanitril und 2-Chlorpropanitril zu hydrolysieren (Kobayashi et al., 1990; Heinemann, 2003). Die α -substituierten aliphatischen Nitrile wurden von diesen Enzymen jedoch nur mit geringen spezifischen Aktivitäten (zwischen 0,01 - 0,54 U/mg Protein) umgesetzt. Eine Hydrolyse von aliphatischen 2-Hydroxynitrilen wurde zudem für keine der bisher untersuchten Nitrilasen beschrieben. Dementsprechend ist es fraglich, ob die als aliphatische Nitrilasen klassifizierten Enzyme für die Synthese von 2-Hydroxycarbonsäuren in einer Enzymkaskade mit einer pflanzlichen Oxynitrilase überhaupt geeignet sind. Hinzu kommt, dass die Mehrzahl der Nitrilasen saure pH-Werte um 5 nur in geringem Maße toleriert (Banerjee et al., 2002). Eine Alternative im Hinblick auf die Kopplung mit einer Oxynitrilase stellt die Verwendung von Nitril-Hydratase anstelle von Nitrilasen dar. Diese Enzyme hydratisieren Nitrile zu den entsprechenden Carboxamiden und setzen vielfach bevorzugt aliphatische Substrate um (siehe Kap. 1.1). Von Nachteil ist jedoch, dass Nitril-Hydratase äußerst empfindlich auf geringe bis moderate Cyanidkonzentrationen reagieren (van Pelt et al., 2009). Auch ihr pH-Optimum, das in der Regel im neutralen Bereich liegt, bietet keine Vorteile im Vergleich zu Nitrilasen. Zudem erfordert die Synthese von 2-Hydroxycarbonsäuren mit Hilfe einer Nitril-Hydratase einen weiteren Syntheseschritt, bei dem das gebildete Carboxamid durch eine geeignete Amidase in die entsprechende Carbonsäure überführt werden muss.

4.4 Bienzymatische Synthese von 2-Hydroxy-3-butensäure

Der rekombinante Stamm mit der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 hydrolysierte 2-Hydroxy-3-butennitril von allen untersuchten rekombinanten *E. coli* Stämmen mit der höchsten spezifischen Aktivität. Zudem wies die Nitrilase aus diesem Stamm die größte Stabilität gegenüber einem pH-Wert von 5 auf. Für die bienzymatische Synthese von 2-Hydroxy-3-butensäure aus Acrolein und KCN wurde deshalb der Stamm *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) eingesetzt. Mit Hilfe dieses Ganzzellkatalysators gelang die angestrebte Biotransformation, in den Reaktionsansätzen kam es jedoch zu einer starken Akkumulation von 2-Hydroxy-3-butennitril. Die Nitrilase aus *P. fluorescens* war offenbar nicht in der Lage, mit der enzymatischen Cyanhydrin Synthese durch die Oxynitrilase aus *M. esculenta* Schritt zu halten. Daher stellte die Nitrilase-Reaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der bienzymatischen Kaskade dar. In diesem Zusammenhang muss jedoch beachtet werden, dass unter den verwendeten Reaktionsbedingungen (pH 5) ein gewisser Anteil des gebildeten Cyanhydrins nicht auf die Aktivität der Oxynitrilase, sondern auf die chemische Additionsreaktion zurückzuführen war. Dies wirkt sich in Kombination mit der langsamen Umsetzung von Acrolein negativ auf den Enantiomerenüberschuss aus. Ein Absenken des pH-Wertes des Mediums auf pH 4 verminderte zwar die spontane chemische Addition von Cyanid an Acrolein, führte jedoch gleichzeitig zu einem starken Aktivitätsverlust der Nitrilase aus *P. fluorescens*. So wurden bei Mandelonitril, das ein exzellentes Substrat für diese Nitrilase darstellt, bei einem pH-Wert von 4 weniger als 40 % des eingesetzten Substrates (10 mM) innerhalb von 75 min umgesetzt, während bei einem pH-Wert von 5 bei gleicher optischer Dichte ($OD_{600} = 1$) das Substrat nach 10 min vollständig hydrolysiert war (Rustler et al., 2007; Rustler, 2011).

Im Hinblick auf die Synthese enantiomerenreiner aliphatischer α -Hydroxycarbonsäuren durch den „bienzymatischen Ganzzellkatalysator“ kann die geringe Aktivität der Nitrilase aus *P. fluorescens*

gegenüber den untersuchten aliphatischen Nitrilen ein Problem darstellen, da es (wie im Fall von Acrolein) zu einer Akkumulation der Cyanhydrine kommen kann. Dies muss vermieden werden, um die chemische Racemisierung zu verhindern. Diese Problematik wurde bereits in einem System gezeigt, bei der die Oxynitrilase aus *M. esculenta* und die Nitril-Hydratase aus *Nitri-liruptor alkaliphilus* in combi-CLEAs immobilisiert und für die Darstellung von aliphatischen α -Hydroxycarboxamiden bei pH-Werten von 5,5 und 5 eingesetzt wurden. Dort nahm die Enantiomerenreinheit des gebildeten (*S*)-2-Hydroxy-3-butenamids bereits beim Auftreten geringer Nitril Konzentrationen (< 3 mM) in den Reaktionsansätzen aufgrund der Racemisierung des Hydroxynitrils ab (van Pelt et al., 2009).

Aus früheren Untersuchungen war zudem bekannt, dass die Oxynitrilase aus *M. esculenta* beim Umsatz von Acrolein nur eine geringe Enantioselektivität aufweist (ee zwischen 47 - 56 %) (Chmura et al., 2006; Förster et al., 1996). Es war jedoch zu erwarten, dass durch Kombination der Oxynitrilase mit einem zweiten enantioselektiven Enzym der Enantiomerenüberschuss des Produktes verbessert werden kann. Bei der zuvor beschriebenen Kopplung der Oxynitrilase mit einer Nitril-Hydratase in combi-CLEAs wurde jedoch selbst bei einem pH-Wert von 4 lediglich ein geringer Enantiomerenüberschuss von max. 48 % für das *S*-Amid erzielt (van Pelt et al., 2009). Demzufolge besaß die Nitril-Hydratase aus *N. alkaliphilus* offenbar keine ausreichende Enantioselektivität, weshalb (*S*)-2-Hydroxy-3-butenamid in der bienzymatischen Kaskadereaktion nur mit einem sehr geringen Enantiomerenüberschuss gebildet werden konnte. Nitrilasen sind im Vergleich zu Nitril-Hydratasen vielfach deutlich enantioselektiver (Petříčková et al., 2012). Beim Umsatz von rac. 2-Hydroxy-3-butenitril durch die Nitrilase aus *P. fluorescens* gab es jedoch keinen Hinweis auf die selektive Hydrolyse eines der beiden Enantiomere, da das Nitril vollständig zur korrespondierenden Säure hydrolysiert wurde. Dies deutete auf eine geringe oder nicht vorhandene Enantioselektivität der Nitrilase gegenüber 2-Hydroxy-3-butenitril hin. Es war folglich nicht zu erwarten, dass Acrolein durch *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) zu enantiomerenreiner 2-Hydroxy-3-butensäure umgesetzt werden konnte.

Vielversprechend ist der „bienzymatische Ganzzellkatalysator“ im Hinblick auf die Synthese von enantiomerenreinen aliphatischen 2-Hydroxycarbonsäuren mit einer Kettenlänge von 5 C-Atomen, da die Nitrilase aus *P. fluorescens* eine hohe Aktivität bei der Hydrolyse von Pentannitril zeigte und die Oxynitrilase aus *M. esculenta* beim Umsatz des korrespondierenden Aldehyds eine im Vergleich zu Acrolein deutlich höhere Enantioselektivität (ee = 91 %) aufweist (Kiziak et al., 2005; Förster et al., 1996). Durch die bereits beschriebene Kombination der Oxynitrilase aus *M. esculenta* und der Nitril-Hydratase aus *N. alkaliphilus* konnte aus Pentanal (*S*)-2-Hydroxypentanamid mit einem ee-Wert von 90 % synthetisiert werden (van Pelt et al., 2009).

Soll die bienzymatische Reaktionskaskade für aliphatische Aldehyde angewendet werden, deren korrespondierende Nitrile durch die Nitrilase aus *P. fluorescens* schlecht umgesetzt werden, müsste im entsprechenden Ganzzellkatalysator selektiv die Nitrilase-Aktivität gesteigert werden, um eine Akkumulation des Cyanhydrins zu verhindern. Deutlich einfacher wäre in diesem Zusammenhang die getrennte Expression der beiden Enzyme in den Stämmen *E. coli* JM109(pJOE5361.1) und *E. coli* JM109(pIK9) und der Einsatz adäquater Mischungen der entsprechenden Ruhezellen. Dieses Vorgehen könnte allerdings den Einsatz hoher Zelldichten erfordern, was bei aliphatischen Nitrilen zur Folge haben könnte, dass die Nitrile oder die korrespondierenden Amide bzw. Säuren durch Enzy-

me des Wirtsstammes metabolisiert werden. So wurden bei der Ganzzellkatalyse durch den Stamm *Rhodococcus rhodochrous* AJ270 kurzketttige aliphatische Nitrile und Nitrile mit Amino- und Hydroxygruppen durch den Biokatalysator unabhängig vom Nitril-Hydratase/Amidase-System des Bakteriums verstoffwechselt (Meth-Cohn und Wang, 1997). In der Folge führten längere Reaktionszeiten mit den kleineren Nitrilen durchweg zu geringeren Ausbeuten der Zielprodukte. Ähnliche Probleme traten auch bei der Hydrolyse von Dinitrilen auf (Meth-Cohn und Wang, 1997). Das Phänomen der alternativen Metabolisierung wurde auch in der vorliegenden Arbeit beim Umsatz von Acrolein durch Ruhezellen von *Pichia pastoris* pJOE5557.2 beobachtet, bei dem höchstwahrscheinlich aufgrund der hohen Zelldichte ein unbekanntes Reaktionsprodukt in signifikanten Mengen gebildet wurde (siehe Kap. 3.2).

4.5 Biotransformation sterisch anspruchsvoller Nitrile

Der Umsatz des sterisch anspruchsvollen Modellsubstrats Acetophenoncyanhydrin (APCN) wurde zunächst am Beispiel der Nitrilasen aus *P. fluorescens* EBC191, *A. faecalis* ATCC8750, *Synechocystis* sp. PCC6803 und *R. rhodochrous* J1 analysiert. Hierbei konnte lediglich die Nitrilase aus *P. fluorescens* Acetophenoncyanhydrin zur korrespondierenden Carbonsäure hydrolysieren (siehe Kap. 3.1.3). Auch die im Zeitraum der vorliegenden Arbeit klonierten pilzlichen Arylacetonitrilasen aus *Neurospora crassa* OR74A (NitNc) und *Aspergillus niger* CBS 513.88 (NitAn) (Petříčková et al., 2012) zeigten, trotz hoher Restaktivitäten unter sauren Bedingungen, nur sehr geringe Enzymaktivitäten gegenüber Acetophenoncyanhydrin. Die Nitrilase aus *P. fluorescens* stellte infolgedessen den vielversprechendsten Biokatalysator für den Umsatz α -, α -disubstituierter Phenylacetonitrile dar. Acetophenoncyanhydrin ähnelt in seiner Struktur den beiden Arylacetonitrilen Mandelonitril (mit einer Hydroxy-Funktion am α -ständigen C-Atom) und 2-Phenylpropannitril (mit einer Methyl-Gruppe in α -Position). Es stellte sich daher die Frage, ob sich die Nitrilase beim Umsatz von APCN im Hinblick auf die Amidbildung und Enantioselektivität eher wie beim Umsatz von Mandelonitril oder 2-PPN verhalten würde. Der Atrolactamid-Anteil am Gesamtprodukt war ähnlich hoch wie der Amidanteil, der beim Umsatz von Mandelonitril gebildet wurde (23 % vs. 19 %, siehe Tab. 3.17). Auch die Enantiomerenzusammensetzung der Produkte ähnelte den beim Umsatz von Mandelonitril gefundenen Ergebnissen (Präferenz für die Bildung der *R*-Säuren und der *S*-Amide, siehe Tab. 3.17). Im Gegensatz dazu wurden durch die Nitrilase aus 2-PPN deutlich geringere Amidanteile (0,2 % 2-PPA) und (*S*)-2-PPS mit einem ee-Wert von 62 % gebildet (siehe Tab. 3.19).

Der Einfluss der elektronenziehenden OH-Gruppe in APCN war dementsprechend ausschlaggebend für den gebildeten Atrolactamid-Anteil. Eine Erklärung für die beobachtete Enantioselektivität mit Acetophenoncyanhydrin ergibt sich aus den räumlichen Strukturen der drei Substrate (Abb. 4.1). Es wurde bevorzugt das Enantiomer hydrolysiert [(*R*)-APCN], bei dem die Position der α -ständigen Reste (OH- und Methyl-Gruppe) den Positionen der α -ständigen Reste in den Substraten (*R*)-Mandelonitril und (*S*)-2-PPN entsprach, die von dem Enzym bekanntermaßen bevorzugt umgesetzt werden.

Die Nitrilase aus *P. fluorescens* hydrolysierte neben Acetophenoncyanhydrin weitere Nitrile, die ein quaternäres Kohlenstoffatom neben der Nitrilgruppe aufweisen, wie beispielsweise 2-Methyl-

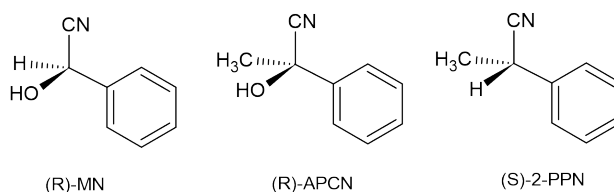


Abbildung 4.1: Konfigurationen der von der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 bevorzugt hydrolysierten Enantiomere von Mandelonitril (MN), Acetophenoncyanhydrin (APCN) und 2-Phenylpropannitril (2-PPN).

2-phenylpropannitril (MMN) und 2-Acetyloxy-2-methylphenylacetonitril. Das Enzym kann somit kleine aliphatische Nitrile bis sterisch sehr anspruchsvolle Nitrile umsetzen und weist dementsprechend ein sehr breites Substratspektrum auf. Nach bestem Wissen gibt es bis heute keine Hinweise in der Literatur, dass andere Nitrilasen befähigt sind, α -, α -disubstituierte Phenylacetone nitrile quantitativ zu den entsprechenden Carbonsäuren zu hydrolysieren. Die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 ist demzufolge bisher einzigartig unter den charakterisierten Nitrilasen. Eine mögliche Ursache hierfür wird in Kapitel 4.8.1 diskutiert.

4.6 Versuche zur Steigerung der Umsatzraten von sterisch anspruchsvollen Nitrilen

4.6.1 Etablierung eines Selektionssystems mit einem Nitril als einziger Stickstoffquelle

Eine Verbesserung der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 im Hinblick auf den Umsatz sterisch anspruchsvoller Nitrile mit drei voluminösen Resten am α -ständigen Kohlenstoffatom war von Interesse, da diese Verbindungen von der Nitrilase nur mit geringen spezifischen Aktivitäten umgesetzt wurden. Die Verbesserung eines Enzyms kann entweder durch rationales Proteindesign oder gerichtete Evolution erfolgen. Da die Struktur der Nitrilase nicht bekannt war, erschien die Methode der gerichteten Evolution zunächst als am erfolgversprechendsten. Die Suche nach neuen/veränderten Enzymvarianten kann hierbei entweder durch ein Screening-Verfahren erfolgen oder mit Hilfe eines Selektionssystems. Im vorliegenden Fall bot sich ein Selektionssystem auf der Grundlage der Verwendung eines Nitrils als einziger Stickstoffquelle an, da bei der enzymatischen Nitril-Hydrolyse durch Nitrilasen Ammoniumionen freigesetzt werden, die als Stickstoffquelle von den Organismen genutzt werden können. Eine Vielzahl von Mikroorganismen mit Nitrilase-Aktivitäten wurde mit Hilfe dieses Vorgehens in der Vergangenheit aus Umweltproben isoliert (O'Reilly und Turner, 2003; Layh et al., 1992). Obwohl dieser Ansatz zunächst als sehr zielgerichtet erschien, wurden doch im Rahmen der Untersuchungen eine Reihe von Problemen identifiziert.

Eine Schwierigkeit ergab sich aus der Toxizität der eingesetzten Nitrile bei der Verwendung von rein wässrigen Medien. Durch die Anwendung eines 2-Phasensystems mit Heptamethylnonan als organischer Phase konnten toxische Nitrilkonzentrationen in der wässrigen Phase signifikant reduziert werden. Allerdings hydrolysierten die Zellen in diesem 2-Phasensystem bei der Induktion der Nitrilase mit Rhamnose (0,2 %, w/v) in einem frühen Stadium des Wachstums 2-PPN unter Freisetzung von Ammonium und erst nach der vollständigen Umsetzung des Nitrils wurden hohe Zelldichten erreicht. Im Hinblick auf eine Zufallsmutagenese und der anschließenden Selektion

der Mutanten im 2-Phasensystem war unter diesen Bedingungen die Anreicherung von Klonen mit verbesserter Substratspezifität gegenüber sterisch anspruchsvollen Nitrilen anhand der Ammoniumfreisetzung bei der Nitril-Hydrolyse durch mehrfaches Überimpfen voraussichtlich nicht möglich. Die bereits bei niedrigen Zelldichten frei verfügbaren Ammoniumionen wären allen im Versuchskolben vorliegenden Zellen zur Verfügung gestanden. Durch Verringerung der Rhamnosekonzentration in den Flüssigkulturen bzw. den kompletten Verzicht auf den Induktor konnte das Wachstum der Zellen stärker an die Umsetzung des Nitrils gekoppelt werden. Dies ging mit einer z.T. starken Verlängerung der Generationszeit einher. So betrug die Generationszeit von *E. coli* JM109(pIK9) in Minimalmedium mit Glycerin als C-Quelle und einer anorganischen Stickstoffquelle im 2-Phasensystem 3,2 Stunden. Mit 2-PPN als einziger N-Quelle betrug bei Verwendung von 0,002 bzw. 0,0002 % Rhamnose die Generationszeiten hingegen 3,7 bzw. 4,2 Stunden. Beim kompletten Verzicht auf den Induktor verlängerte sich die Generationszeit der Zellen auf mehr als 19 Stunden. Das langsame Wachstum der Zellen in Abwesenheit von Rhamnose ließ sich darauf zurückführen, dass nur eine geringe Konzentration der Nitrilase in den Zellen vorlag, da beim Rhamnose-Promotor (P_{rhaBAD}) im Vergleich zu anderen gängigen Promotoren, wie beispielsweise dem Lactose-Promotor (P_{lac}), lediglich eine sehr geringe basale Genexpression in Abwesenheit des Induktors beobachtet wird (Kelly et al., 2016; Wegerer et al., 2008).

Das letztlich angewandte Selektionssystem unterschied sich aufgrund der angesprochenen Probleme deutlich von dem System, das unter Standardbedingungen zur Induktion der Nitrilase verwendet wurde (Zugabe von 0,2 % (w/v) Rhamnose). Anhand einer Co-Kultur aus den Stämmen *E. coli* JM109(pIK9) und *E. coli* JM109(pIK7) konnte jedoch gezeigt werden, dass sich trotz der unterschiedlichen Rahmenbedingungen im verwendeten Selektionssystem (0 % Rhamnose) der Stamm durchsetzen konnte, welcher das eingesetzte Substrat (2-PPN) unter Standard-Induktionsbedingungen (0,2 % Rhamnose) mit 5-fach höherer spezifischer Aktivität umsetzt (*E. coli* JM109(pIK9), siehe Kap. 3.4.8).

Weiterhin wurde auch eine Selektion auf Festmedien mit einem Nitril (2-PPN) als einziger Stickstoffquelle erprobt. Diese Strategie stellte jedoch keine Alternative zur Flüssigkultur dar, da die Zellen bei allen untersuchten Geliermitteln auf den Platten der Negativkontrolle (*E. coli* JM109(pIK9) ohne Zugabe einer Stickstoffquelle) das stärkste Wachstum zeigten. Dies war höchstwahrscheinlich auf Stickstoff-haltige Verunreinigungen in den verwendeten Geliermitteln zurückzuführen. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Mulelu et al. (2019) gelang die Selektion von veränderten Varianten der Nitrilase 4 aus *Arabidopsis thaliana* ($AtNIT4$) nach einer Sättigungsmutagenese an drei Positionen des Enzyms auf Festmedien mit unterschiedlichen Nitrilen als Stickstoffquelle. Bei der Durchführung waren zwei wichtige Details grundsätzlich anders als bei den hier beschriebenen Experimenten. Zum einen wurde „Bacteriological Agar“ der Firma Merck als Geliermittel eingesetzt. Dieser Agar wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Zum anderen wurden in der Studie von Mulelu et al. (2019) Negativkontrollen verwendet, die Nitrile enthielten. Es handelte sich dabei um Nitrile, die von der Wildtyp-Nitrilase 4 aus *A. thaliana* bekanntermaßen nicht umgesetzt werden. Hierbei beobachteten die Autoren offenbar kein Wachstum auf den entsprechenden Medien. Interessant wäre zu prüfen, ob bei Verwendung des „Bacteriological Agar“ der Firma Merck Zellen von *E. coli* JM109(pIK9) in der Lage wären auf den Platten der hier verwendeten Negativkontrolle (Minimalmedium ohne Zugabe einer Stickstoffquelle) zu wachsen und

dies eigentlich zu „falsch-positiven“ Ergebnissen führen sollte. Enthielte der Agar der Firma Merck tatsächlich keine Stickstoff-haltigen Verunreinigungen, wäre die Selektion von nach Zufallsmutagenese veränderten Varianten der Nitrilase aus *P. fluorescens* auf einem entsprechenden Festmedium mit MMN als einziger Stickstoffquelle eventuell möglich.

4.6.2 Erstellen einer Mutantenbibliothek mittels chemischer Mutagenese durch MNNG

Der Erfolg einer gerichteten Evolution hängt neben dem verwendeten Selektions- oder Screeningsystem auch von der Qualität der Mutantenbibliothek ab. In diesem Zusammenhang spielen folgende Faktoren eine Rolle: die Größe der generierten Bank, deren Mutationsfrequenz sowie die Diversität der eingeführten Mutationen. Die Gesamtgröße der Bibliothek korreliert hierbei direkt mit der Erfolgswahrscheinlichkeit des Evolutionsexperiments, da die Untersuchung einer großen Anzahl an Mutanten die Wahrscheinlichkeit erhöht, eine Enzymvariante mit den gewünschten Eigenschaften zu finden. Screeningmethoden mit mittelmäßigem Durchsatz erlauben die Untersuchung von ca. 10^2 - 10^5 Varianten, Methoden mit hohem Durchsatz ca. 10^6 Varianten und mit ultra-hohem Durchsatz ca. 10^7 - 10^9 Varianten, wobei der ultra-hohe Durchsatz in der Regel durch die Ligations- und Transformationseffizienz limitiert wird. Bei selektionsbasierten Verfahren können alle erzeugten Mutanten hingegen auf einmal auf eine gewünschte biochemische Aktivität hin untersucht werden (Nannemann et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit kamen zur Einführung zufälliger Mutationen in das Nitrilasegen zwei unterschiedliche Methoden zum Einsatz: die chemische Mutagenese mit MNNG und eine „error-prone“ PCR (epPCR). Trotz bekannter Nachteile, wie beispielsweise dem möglichen Auftreten von Mutationen außerhalb des Zielgens, wurde die MNNG-Mutagenese aufgrund der schnellen und einfachen Durchführbarkeit sowie der (in der Regel) hohen Ausbeute an Mutanten zur ersten Erprobung des zuvor beschriebenen Selektionssystems eingesetzt. Die mittels MNNG erzeugte Genbank zeigte mit 1 - 3 AS-Austauschen die angestrebte Mutationsfrequenz, allerdings enthielten 30 % der Klone überhaupt keine Mutation im Zielgen. Dadurch wurde die Anzahl an Klonen, die mögliche Positiv-Mutationen aufwiesen, deutlich reduziert. Ein weiterer Nachteil ergab sich aus der Tatsache, dass durch die Mutagenese mit MNNG bei den untersuchten Klonen ausschließlich Transitionen, d.h. der Austausch einer Purinbase gegen eine Purinbase bzw. einer Pyrimidinbase gegen eine Pyrimidinbase, erzeugt worden waren. Im Kontext des genetischen Codes führen Transitionen zu Aminosäuren, die chemisch ähnlich oder identisch zur Ausgangs-Aminosäure sind und verursachen deshalb eine begrenzte chemische Vielfalt in der konstruierten Bibliothek (Martínez und Schwaneberg, 2013). Die Diversität an möglichen Enzymvarianten wurde dadurch stark herabgesetzt. Auch die Größe der erzeugten Bank war mit ca. 11000 Klonen im Versuchsansatz eher gering.

4.6.3 Analyse der mit Hilfe der chemischen Mutagenese selektierten Varianten

Trotz der angesprochenen Nachteile der erzeugten Mutantenbibliothek konnten im 2-Phasensystem mit MMN die beiden Stämme *E. coli* JM109(pRMS1205.1) und *E. coli* JM109(pRMS1305.1) angereichert werden. Die selektierten Stämme zeigten mit MMN als einziger Stickstoffquelle ein 9-mal

schnelleres Wachstum als der Wildtyp *E. coli* JM109(pIK9) (Kap. 3.4.12). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das schnellere Wachstum im 2-Phasensystem auf die Plasmide der angereicherten Stämme zurückzuführen war und nicht auf einer Veränderung der *E. coli* Zellen beruhte, da die Transformation von unbehandelten *E. coli* JM109 Zellen mit den Plasmiden pRMS1205.1 und pRMS1305.1 ebenfalls gegenüber *E. coli* JM109(pIK9) zu einem deutlich schnelleren Wachstum der Transformanten mit MMN als einziger Stickstoffquelle führte. Überraschenderweise war im Plasmid pRMS1305.1 jedoch keine Mutation im Zielgen enthalten; allerdings war die Plasmidkopienzahl in beiden selektierten Stämmen im Vergleich zum Ausgangsplasmid pIK9 stark erhöht. Die Ursache hierfür war möglicherweise die in beiden Plasmiden an verschiedenen Stellen im Replikationsursprung enthaltenen Mutationen. In der Literatur finden sich eine Reihe von Studien, bei denen durch den Austausch einzelner Nukleotide die Kopienzahl bei pBR322-Derivaten gesteigert werden konnte (Boros et al., 1984; Castagnoli et al., 1985; Lin-Chao et al., 1992; Camps, 2010). Die im Selektionssystem angereicherten Stämme zeigten trotz einer erhöhten Plasmidkopienzahl unter den Standard-Induktionsbedingungen mit 0,2 % (w/v) Rhamnose keine deutlich verbesserte Umsetzung von MMN. Eine Analyse der Nitrilasebanden nach Induktion mit Rhamnose mittels SDS-PAGE ergab, dass die Intensität der Nitrilasebanden bei *E. coli* JM109(pRMS1205.1) und *E. coli* JM109(pRMS1305.1) deutlich schwächer waren als bei der Wildtyp-Nitrilase. Daraus wurde geschlossen, dass die Nitrilasegene in den beiden Stämmen offenbar in einem geringeren Maße exprimiert worden waren als das Wildtyp-Nitrilasegen. Dies kann bei beiden Stämmen möglicherweise auf die im Rhamnose-Promotor vorhandene Mutation zurückgeführt werden (siehe Kap. 3.4.13). Eine mögliche Erklärung für diesen scheinbaren Gegensatz könnte darin liegen, dass die im 2-Phasensystem in Abwesenheit von Rhamnose gewachsenen Stämme im entsprechenden Versuchskolben eine gegenüber *E. coli* JM109(pIK9) gesteigerte Nitrilase-Aktivität zeigten. Daher hatten die angereicherten Stämme unter den Bedingungen im 2-Phasensystem einen Vorteil, sonst hätten sie bei den beiden Versuchen zur Verifizierung des beschleunigten Wachstums kein deutlich schnelleres Wachstum im Vergleich zu *E. coli* JM109(pIK9) gezeigt. Unter den Standard-Induktionsbedingungen hob sich dieser Effekt aber offenbar auf. Es wurden daher sehr wahrscheinlich im hier beschriebenen 2-Phasensystem jene Stämme selektiert, welche unter den gegebenen Bedingungen einen Selektionsvorteil besaßen. Dieser Vorteil lag infolge des Verzichts auf den Induktor vermutlich im Ausgleich der geringen basalen Expression des Nitrilasegens durch eine erhöhte Plasmid-Kopienzahl. Der komplette Verzicht auf Rhamnose als Induktor muss folglich kritisch hinterfragt werden.

Die nachgewiesenen Mutationen im Replikationsursprung und im Rhamnose induzierbaren Promotor P_{rhaBAD} deuteten darauf hin, dass nach der Mutagenese mit MNNG voraussichtlich noch weitere Mutationen im Plasmid pIK9 vorlagen. Es war daher denkbar, dass auch diese Mutationen zu dem schnelleren Wachstum der mit Hilfe des Selektionssystems erhaltenen Varianten beitrugen. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Anstrengungen unternommen, mit Hilfe der selektierten Stämme eine verbesserte Umsetzung von sterisch anspruchsvollen Nitrilen zu erzielen.

4.6.4 Erstellen einer Mutantenbibliothek mittels epPCR

Infolge der angesprochenen Mutationen außerhalb des Zielgens bei der Mutagenese mit MNNG, wurde eine weitere Mutantenbibliothek mit Hilfe der epPCR erstellt, wobei diese Methode ebenfalls

einige Nachteile aufweist. Die zur PCR eingesetzten DNA-Polymerasen erzeugen auch bevorzugt Transitionen (siehe oben) im Vergleich zu Transversionen (Austausch einer Purinbase gegen eine Pyrimidinbase und umgekehrt). Darüber hinaus wird die Codondiversität in PCR-basierten Mutageneseverfahren jeweils für ein einzelnes Nukleotid eingeführt, da DNA-Polymerasen nicht in der Lage sind, mehrere Nukleotidfehlpaarungen zu verlängern (Martínez und Schwaneberg, 2013). Viele Aminosäuresubstitutionen sind jedoch nur durch zwei oder sogar drei Basenaustausche pro Codon möglich. Hinzu kommt, dass in Anbetracht der Degeneriertheit des genetischen Codes (mehrere Codons kodieren für dieselbe Aminosäure) einige AS-Austausche bevorzugt auftreten (Liu, 2020). Infolgedessen sind im Durchschnitt weniger als 40 % aller theoretisch möglichen Aminosäuresubstitutionen mit epPCR-Methoden zugänglich (Martínez und Schwaneberg, 2013). Trotzdem stellt diese Methode zur Verbesserung von Enzymaktivitäten, Substratspezifitäten und Enantioselektivitäten eine wichtige Methode der gerichteten Evolution dar. Bei der mittels epPCR erzeugten Genbank waren 1 - 5 Punktmutationen im Zielgen vorhanden, wobei aufgrund der hohen Anteile an stillen Mutationen sowie an Plasmiden, die überhaupt keine Mutation im Zielgen enthielten (30 %), im Durchschnitt lediglich 0,8 Aminosäuren in der Nitrilase ausgetauscht waren. Die Mutationsfrequenz war damit niedriger als angestrebt. Auch bei der epPCR überwogen bei den untersuchten Klonen die Transitionen ($T_s = 16$) im Vergleich zu den Transversionen ($T_v = 9$), wobei die Anzahl an Transversionen damit deutlich höher war als bei der *in-vivo*-Mutagenese mit MNNG. Die Vielfalt an möglichen Enzymvarianten war bei dem beobachteten T_s/T_v -Verhältnis jedoch ebenfalls reduziert. Insbesondere die Größe der erzeugten Bank war mit ca. 6000 Klonen im Versuchsansatz gering. Dies waren vermutlich die Ursachen, dass nach Mutagenese des Nitrilasegens mittels epPCR und anschließender Selektion im hier beschriebenen 2-Phasensystem keine Enzymvariante mit einer erhöhten Aktivität gegenüber MMN angereichert werden konnte.

Eine abschließende Beurteilung, ob mit Hilfe des Selektionssystems eine, im Hinblick auf den Umsatz sterisch anspruchsvoller Nitrile, verbesserte Enzymvariante prinzipiell selektiert werden kann, ist aufgrund der zuvor beschriebenen Punkte schwierig. In Anbetracht der kürzlich von Mulelu et al. (2019) veröffentlichten Ergebnisse erscheint ein weiterer Selektionsversuch mit einer qualitativ besseren Genbank und ggf. einer geringeren MMN-Konzentration in der wässrigen Phase jedoch lohnenswert. Eine Selektion auf Festmedien (jedoch mit dem in Mulelu et al. (2019) beschriebenen Geliermittel oder anderen synthetischen Geliermitteln) wäre eventuell zielführend, denn möglicherweise spielt das beobachtete Wachstum auf der in dieser Arbeit verwendeten Negativkontrolle (Minimalmedium ohne Zugabe einer Stickstoffquelle) aufgrund der Toxizität der eingesetzten Nitrile nur eine untergeordnete Rolle.

Zur Steigerung der Umsatzrate von Acetophenoncyanhydrin wäre auch denkbar, die Säuretoleranz der Nitrilase gegenüber pH-Werten von 4 - 4,5 durch Protein Engineering zu verbessern oder einen säuretoleranteren Ganzzellkatalysator zu verwenden. In der vorliegenden Arbeit führte ein einzelner AS-Austausch (S190Y) zu einer starken Abnahme der Säurestabilität. Demzufolge erscheint es möglich, dass ein einzelner AS-Austausch auch zu einer Steigerung der Säuretoleranz führen könnte. In der Literatur finden sich etliche Beispiele, bei denen die Säureresistenz/-toleranz von Enzymen oder Organismen verbessert werden konnte (Liu et al., 2014, 2019; Shivange et al., 2013; Tran et al., 2011; Lidan et al., 2013). So wurden in den letzten Jahren auch Anstrengungen unternommen, säuretolerantere *E. coli* Stämme zu entwickeln (Gao et al., 2018; Ma et al., 2020; Zhu et al., 2018).

4.7 Umsatz von Acetophenoncyanhydrin durch C-terminal verkürzte Enzymvarianten der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191

Alle mikrobiellen Nitrilasen, für die Sequenzdaten verfügbar sind, weisen im Vergleich zu den anderen homologen Proteinen der „Nitrilase-Superfamilie“ mit bekannter Kristallstruktur eine verlängerte C-terminale Sequenz auf (Thuku et al., 2009). Für die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 ergab ein Proteinsequenz-Alignment mit anderen Mitgliedern der „Nitrilase-Superfamilie“ eine C-terminale Verlängerung um ca. 60 AS (Kiziak et al., 2007). Der Einfluss dieser C-terminalen Region wurde in früheren Arbeiten durch Deletionen um 20, 32, 47, 55, 60 und 67 AS analysiert. Diese Versuche zeigten, dass sich die Enzymvarianten NitDelC-20 und NitDelC-32 (mit Deletionen um 20 und 32 AS) ähnlich verhielten wie das WT-Enzym (Kiziak et al., 2007). Im Gegensatz dazu zeigten die Nitrilasevarianten NitDelC-47, NitDelC-55, NitDelC-60 und NitDelC-67 stark veränderte Enzymeigenschaften, wie z.B. eine Abnahme der Enzymaktivität, Veränderungen in der Enantioselektivität sowie eine verstärkte Amidbildung. Die C-terminal um 47 - 67 AS verkürzten Nitrilasevarianten waren im Hinblick auf den Umsatz von Acetophenoncyanhydrin interessant, da vorstellbar war, dass durch die Deletionen der Zugang zum aktiven Zentrum erleichtert sein könnte. Das von der Arbeitsgruppe um Trevor Sewell (Electron Microscope Unit, University of Cape Town, Rondebosch, South Africa) erstellte Homologie-Modell der Nitrilase aus *P. fluorescens*, das im späteren Verlauf der vorliegenden Arbeit zur Verfügung stand, stützte diese Annahme. Bereits nach dem Abtrennen von 55 Aminosäuren vom C-Terminus wurde in dem Modell im Vergleich zum WT und zur NitDelC-47-Mutante ein möglicher Zugang zum aktiven Zentrum des Enzyms sichtbar [Abb. 4.2(a) und 4.2(b)]. Durch das Abtrennen von 60 bzw. 67 AS vom C-Terminus wurde dieser Bereich des Enzyms noch deutlich vergrößert [Abb. 4.2(c) und 4.2(d)]. Der katalytisch aktive Cystein-Rest (in Abb. 4.2 rot dargestellt) ist bei den am stärksten verkürzten Enzymvarianten (NitDelC-60 und NitDelC-67) zu erkennen (angezeigt durch einen Pfeil). Konformationsänderungen, die bei der Nitrilase durch das Abtrennen der C-Termini möglicherweise auftreten, konnten mit Hilfe des verwendeten Programms (PyMol; DeLano, 2002) allerdings nicht vorhergesagt werden.

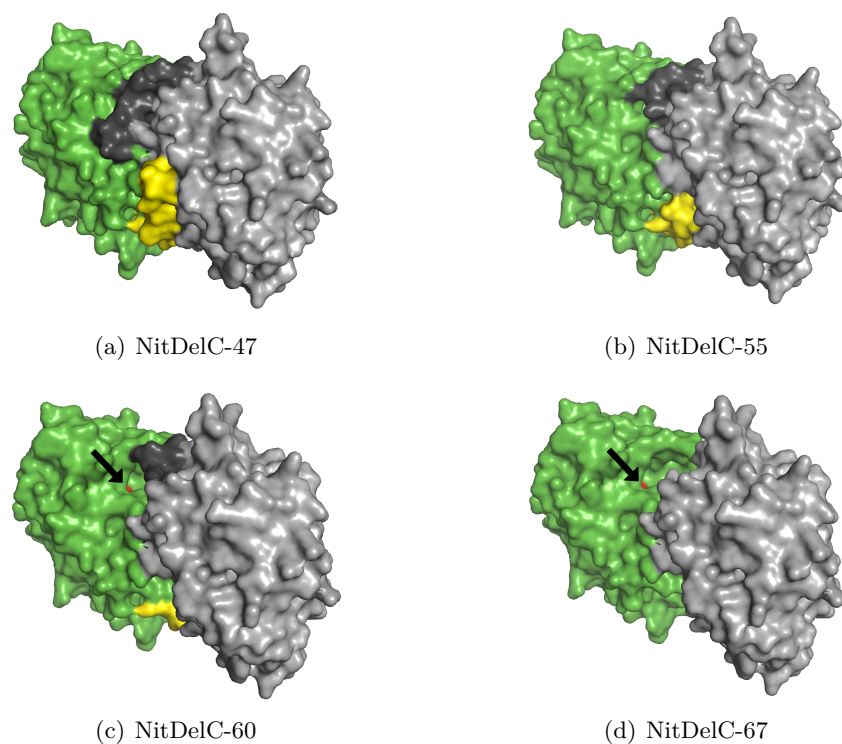


Abbildung 4.2: Strukturmodelle von C-terminal verkürzten Varianten der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191. Der C-Terminus umfasst bei der Nitrilase aus *P. fluorescens* ca. 60 AS. „Surface-Darstellungen“ der dimeren Strukturen, nachdem bei (a) 47 AS; bei (b) 55 AS; bei (c) 60 AS und bei (d) 67 AS von den C-Termini entfernt wurden. Grün: Monomer 1; grau: Monomer 2; gelb: AS des C-Terminus von Monomer 1 nach Deletion um 47, 55, 60 oder 67 AS, dunkelgrau: AS des C-Terminus von Monomer 2 nach Deletion um 47, 55, 60 oder 67 AS. Der katalytisch aktive Cystein-Rest ist in rot dargestellt und durch einen Pfeil gekennzeichnet. Abbildung erstellt mit PyMol (DeLano, 2002).

Im Hinblick auf den Umsatz von Acetophenoncyanhydrin ergab ein Vergleich der C-terminal verkürzten Nitrilasevarianten NitDelC-47, NitDelC-55, NitDelC-60 und NitDelC-67 mit dem WT-Enzym, dass alle verkürzten Enzymvarianten das sterisch anspruchsvolle Modellssubstrat tatsächlich mit einer höheren relativen Aktivität umsetzten (Kap. 3.5.1).

Dies könnte folglich mit der in dem Modell gezeigten verbesserten Zugänglichkeit des aktiven Zentrums zusammenhängen. Daneben trugen möglicherweise auch strukturelle Veränderungen der Nitrilase zu den höheren relativen Aktivitäten bei, da für verschiedene Nitrilasen eine Beteiligung des C-Terminus an den Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Untereinheiten in den mit A und C bezeichneten Regionen vorgeschlagen wurde (Sewell et al., 2005; Dent et al., 2009; Thuku et al., 2009). Während die Interaktionsfläche A verantwortlich ist für die Assoziation der Monomere, kommt der Region C eine Schlüsselrolle bei der Ausbidung der spiralförmigen Quartärstruktur des Holoenzym zu (Kap. 1.2.2.1). Daher sollte der C-terminale Bereich einen wichtigen Faktor für die Oligomerisierung darstellen und die Enzymaktivität beeinflussen (Thuku et al., 2009; Mulelu et al., 2019). Es ist folglich denkbar, dass die C-terminalen Deletionen strukturelle Veränderungen in den Regionen A und C in der Nitrilase aus *P. fluorescens* zur Folge hatten. Diese Veränderungen könnten zu einer Konformationsänderung der Nitrilase geführt haben, welche zu den höheren relativen Aktivitäten der C-terminal deletierten Enzymvarianten mit dem Substrat Acetophenoncyanhydrin beitrug.

4.8 Veränderung der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 durch rationales Proteindesign

4.8.1 Bedeutung des Alanin-Restes an Position 165 für die Enzymaktivität, Amidbildung und Enantioselektivität der Nitrilase

Von insgesamt sechs im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Nitrilasen (Kap. 3.3.2) war lediglich die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 in der Lage, Acetophenoncyanhydrin quantitativ zu hydrolysieren. Die untersuchten Nitrilasen unterscheiden sich in ihren AS-Sequenzen u.a. durch einen Tryptophan-Rest, der dem katalytisch aktiven Cystein-Rest direkt benachbart ist (in Richtung C-Terminus). Während bei 5 der untersuchten Nitrilasen der angesprochene Tryptophan-Rest vorhanden ist, weist die Nitrilase aus *P. fluorescens* an dieser Position einen Alanin-Rest auf. Da Tryptophan im Vergleich zu Alanin eine sehr sperrige Aminosäure darstellt, war es möglich, dass diese Aminosäure die Bindung von α,α -disubstituierten Phenylacetonitrilen in den Nitrilasen aus *Synechocystis* sp. PCC6803, *A. faecalis*, *R. rhodochrous*, *A. niger* und *N. crassa* behinderte. Dieser Sachverhalt wurde durch Untersuchung der Nitrilasevariante A165W geprüft. Diese Variante der Nitrilase aus *P. fluorescens* war bereits früher von Kiziak und Stolz (2009) generiert und im Hinblick auf den Umsatz von Mandelonitril und 2-PPN analysiert worden. Hierbei wurde beobachtet, dass dieser Austausch zu starken Veränderungen der Enzymeigenschaften führte und die Enzymvariante A165W eine deutlich verminderte Aktivität beim Umsatz von Mandelonitril und 2-PPN besaß. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die spezifische Aktivität beim Umsatz von Acetophenoncyanhydrin durch den AS-Austausch A165W erwartungsgemäß ebenfalls stark abnahm. So wies der Stamm *E. coli* JM109(pIK9/A165W) mit Acetophenoncyanhydrin nur noch eine Aktivität von ca. 8 % bezogen auf den Stamm mit der Wildtyp-Nitrilase auf.

Im Hinblick auf die Enantioselektivität der Enzymvariante A165W wurde in Vorarbeiten gezeigt, dass aus den Substraten MN und 2-PPN verstärkt die *R*-Enantiomere der Säuren gebildet wurden (Kiziak und Stolz, 2009). Dies kann damit erklärt werden, dass durch den Austausch des Alanin-Restes (A165) gegen einen Tryptophan-Rest die Bindung der *S*-Enantiomere aufgrund der Methyl-Gruppe in 2-PPN bzw. der OH-Gruppe in MN erschwert wird und dementsprechend die *R*-Enantiomere bevorzugt hydrolysiert werden. Beim Umsatz von Acetophenoncyanhydrin durch die Enzymvariante A165W war die Enantioselektivität gegenüber dem Wildtyp ebenfalls deutlich verändert. Racemisches Acetophenoncyanhydrin wurde aufgrund des AS-Austausches nicht mehr primär zu (*R*)-Atrolactat (ee = 51 %) sondern mit sehr geringer Präferenz zu (*S*)-Atrolactat hydrolysiert. Die Abnahme der Enantioselektivität bei der Nitrilasevariante A165W kann damit erklärt werden, dass sich die funktionellen Gruppen in Acetophenoncyanhydrin (Hydroxy- und Methyl-Funktion) in ihrer Größe weniger stark voneinander unterscheiden als OH- und H- in MN bzw. CH₃- und H- in 2-PPN. Ein Sequenzvergleich mit weiteren Enzymen aus Zweig 1 der „Nitrilase-Superfamilie“ ergab, dass, im Gegensatz zur Nitrilase aus *P. fluorescens*, der angesprochene Tryptophan-Rest in beinahe allen bakteriellen und pflanzlichen Nitrilasen vorhanden ist. Dies könnte die Ursache sein, dass es - nach bestem Wissen - bis heute keine Hinweise in der Literatur gibt, dass neben der Nitrilase aus *P. fluorescens* auch andere Nitrilasen befähigt sind, α,α -disubstituierte Phenylacetonitrile quantitativ zu den entsprechenden Carbonsäuren und/oder

Carboxamiden umzusetzen. Interessant wäre in diesem Zusammenhang eine Analyse des Umsatzes von Acetophenoncyanhydrin durch die Nitrilase aus *Bradyrhizobium japonicus* USDA110 bl16402 (Zhu et al., 2007), da dieses Enzym ebenfalls einen Alanin-Rest direkt „down-stream“ von dem katalytisch aktiven Cystein-Rest besitzt. Da die Variante A165W der Nitrilase aus *P. fluorescens* noch eine gewisse Restaktivität mit Acetophenoncyanhydrin zeigte, kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Unterschiede in den AS-Sequenzen der Nitrilasen einen Einfluss auf die Hydrolyse von α,α -disubstituierten Phenylacetonitrilen haben.

4.8.2 Bedeutung des Tyrosin-Restes an Position 54 für die Aktivität, Amidbildung und Enantioselektivität der Nitrilase

Der Vergleich der spezifischen Aktivitäten beim Umsatz von α,α -disubstituierten Arylacetonitrilen mit den spezifischen Aktivitäten beim Umsatz der korrespondierenden, einfach substituierten Arylacetonitrile zeigte, dass 2-Methyl-2-phenylpropannitril mit signifikant niedrigeren Umsatzraten als 2-Phenylpropannitril hydrolysiert wurde. Gleiches galt für Acetophenoncyanhydrin, das ebenfalls viel langsamer hydrolysiert wurde als das korrespondierende, nicht methylierte Arylacetonitril Mandelonitril. Dies deutete an, dass die verminderten Reaktionsgeschwindigkeiten beim Umsatz von α,α -disubstituierten Nitrilen durch sterische Effekte aufgrund der zusätzlichen Substituenten am α -Kohlenstoffatom hervorgerufen wurden.

Das Homologie-Modell der Nitrilase aus *P. fluorescens* legte nahe, dass der Tyrosin-Rest an Position 54 aufgrund seiner Nähe zum aktiven Zentrum möglicherweise die Substratbindung von sterisch anspruchsvollen Nitrilen beeinflusst (Kap. 3.5.4). Ein Sequenzvergleich mit verschiedenen Mitgliedern der „Nitrilase-Superfamilie“, wie z.B. Cyanid-Hydratasen, Cyanid-Dihydratasen, Nitrilasen und Amidasen ergab, dass der in Rede stehende Tyrosin-Rest stark konserviert ist. Weiterhin fiel bei dem Sequenz-Alignment auf, dass C-terminal neben dem Tyrosin-Rest ein Prolin-Rest ebenfalls stark konserviert ist. Prolin kommt aufgrund seiner zyklischen Struktur eine Sonderstellung innerhalb der 20 biogenen Aminosäuren zu, da die Aminogruppe innerhalb des zyklischen Ringes lokalisiert ist und Prolin deshalb die Rotation um das Peptidrückgrat limitiert und dies in der Folge zu einer Fixierung der Peptidkette führt (Yaron und Naider, 1993). Es wäre deshalb möglich, dass der Tyrosin-Rest 54 durch den direkt benachbarten Prolin-Rest innerhalb der Substratbindetasche in einer bestimmten Position fixiert wird (siehe auch nachfolgendes Kap. 4.8.2.3).

4.8.2.1 Einfluss unterschiedlicher Aminosäure-Reste an Position 54 auf die Aktivität der Nitrilase

Um den Einfluss von Y54 auf den Umsatz sterisch anspruchsvoller Nitrile abzuschätzen, wurde eine Sättigungsmutagenese an dieser Position durchgeführt. War der Tyrosin-Rest durch langkettige basische Aminosäuren (Arginin und Lysin) oder durch die Aminosäure Isoleucin ersetzt, zeigten die Enzymvarianten keine Aktivität beim Umsatz von Acetophenoncyanhydrin, Mandelonitril und 2-PPN.

Während die Enzymvarianten Y54M und Y54V die sterisch anspruchsvollen Substrate Acetophenoncyanhydrin und MMN in etwa doppelt so schnell hydrolysierten als der Wildtyp (bezogen auf die Aktivität mit den korrespondierenden Arylacetonitrilen MN und 2-PPN), führte der Austausch

von Y54 gegen saure (Glu, Asp), basische (His) oder polare (Asn, Cys, Ser, Thr) Aminosäuren zu einer starken Herabsetzung der Enzymaktivitäten gegenüber Acetophenoncyanhydrin im Vergleich zum WT-Enzym. Durch die räumliche Nähe des Tyrosin-Restes an Position 54 zu dem in Nitrilase konservierten, zweiten Glutamat-Rest an Position 137 (siehe auch Abb. 4.4 und nachfolgendes Kap. 4.8.2.3) waren bei den Enzymvarianten Y54R, Y54K, Y54E und Y54D jeweils zwei wahrscheinlich ionisierte Aminosäure-Seitenketten in direkter Nachbarschaft im aktiven Zentrum vorhanden. Dies war möglicherweise der Grund für den kompletten Aktivitätsverlust bzw. die starke Abnahme der Enzymaktivität bei den entsprechenden Varianten. Ähnliche Effekte wurden in früheren Arbeiten beim Austausch des, dem katalytisch aktiven C164, direkt benachbarten Alanin-Restes an Position 165 festgestellt. So führten die Aminosäure-Austausche A165E und A165R bei der Nitrilase aus *P. fluorescens* beim Umsatz von 2-PPN ebenfalls zu einem drastischen Aktivitätsverlust auf jeweils 3 bzw. 0,3 % der Aktivität der Wildtyp-Nitrilase (Kiziak und Stolz, 2009). Auch beim Austausch des Cystein-Restes an Position 163 gegen polare Aminosäuren wurde im Fall der Enzymvarianten C163S und C163N ein deutlicher Aktivitätsverlust von ca. 70 % beobachtet (Sosedov et al., 2010).

Die Bedeutung des homologen Tyrosin-Restes wurde auch für die Arylacetonitrilase aus *Pseudomonas putida* MTCC 5110 durch ortsgerichtete Mutagenese anhand der Enzymvariante Y53A gezeigt. Die Bestimmung des K_m -Wertes und der Enzymaktivität beim Umsatz von Mandelonitril ergab, dass durch die angesprochene Mutation der K_m -Wert kaum beeinflusst wurde, wohingegen eine 32-fache Reduktion der spezifischen Enzymaktivität auftrat (Kaushik et al., 2012). Die Untersuchung weiterer Nitrile ergab je nach eingesetztem Substrat zum Teil drastische Aktivitätsverluste von bis zu 99 % (Valeronitril) oder im Fall von Benzonitril hingegen eine leichte Aktivitätszunahme von 65 %. Daraus wurde geschlossen, dass der betreffende Tyrosin-Rest bedeutend/wichtig für die Hydrolysefähigkeit der Nitrilase aus *P. putida* ist und die Substratspezifität beeinflusst (Kaushik et al., 2012).

Aus den Ergebnissen der Sättigungsmutagenese an Position 54 lässt sich ableiten, dass für den Umsatz von Acetophenoncyanhydrin möglicherweise primär der hydrophobe Phenylring wichtig ist für die Substratbindung oder Aktivität der Nitrilase, da die Enzymvarianten Y54S und Y54T, die ebenfalls eine Hydroxy-Funktion in ihren Seitenketten aufweisen, nur sehr geringe Aktivitäten beim Umsatz dieses Substrates zeigten. Des Weiteren konnten lediglich mit Enzymvarianten, die hydrophobe Aminosäuren an Position 54 besaßen, der Wildtyp-Nitrilase vergleichbare oder leicht erhöhte spezifische Aktivitäten bei der Hydrolyse von Acetophenoncyanhydrin erzielt werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die OH-Gruppe ebenfalls zur Hydrolysefähigkeit der Nitrilase beiträgt, da die Seitenketten der Aminosäuren Serin und Threonin ein deutlich geringeres Van-der-Waals-Volumen (Bondi, 1964) aufweisen als Tyrosin und die Hydroxy-Funktion dadurch möglicherweise nicht in Wechselwirkung (z.B. in Form von Wasserstoffbrücken) mit benachbarten Aminosäure-Resten im aktiven Zentrum treten kann. Eine detailliertere Betrachtung der Relevanz von Wasserstoffbrücken-Netzwerken bei enzymkatalysierten Reaktionen erfolgt im nachfolgenden Kapitel 4.8.2.3.

4.8.2.2 Einfluss unterschiedlicher Aminosäure-Reste an Position 54 auf die Amidbildung durch die Nitrilase

Die (gezielte) Veränderung des Y54-Restes in der Nitrilase aus *P. fluorescens* hatte neben den Veränderungen der Enzymaktivität auch einen starken Einfluss auf die Amidbildungsrate beim Umsatz von Acetophenoncyanhydrin, da alle Enzymvarianten weniger Atrolactamid bildeten als die Wildtyp-Nitrilase. Eine verminderte Nitril-Hydratase Aktivität der Nitrilase aus *P. fluorescens* wurde auch beim Umsatz von Mandelonitril durch den Austausch der beiden Aminosäuren, die dem katalytisch aktiven Cystein-Rest an Position 164 direkt benachbart sind, festgestellt. So wurde durch den Austausch von C163 gegen Serin- oder Alanin-Reste oder durch Einführung einer sperrigen Aminosäure, wie z.B. Phenylalanin, an Position 165 (Ala) die Amidbildung aus Mandelonitril deutlich reduziert (Kiziak und Stolz, 2009; Sosedov et al., 2010). Die Ergebnisse stützten die Annahme, dass der Tyrosin-Rest tatsächlich in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert ist und bestätigten damit das Homologie-Modell der Nitrilase aus *P. fluorescens*.

Für die Nitrilase aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 wurden anhand experimenteller röntgenkristallographischer Daten die AS-Reste E53, K135, H141, E142, C169, Y59, F64, N118, Y140, W146, W170, P194, M197, V198 und F202 identifiziert, welche die mutmaßliche Substratbindetasche der Nitrilase bilden (Zhang et al., 2014; Shen et al., 2020). Der Tyrosin-Rest an Position 59 in der Nitrilase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 entspricht in einem Sequenz-Alignment dem Tyrosin-Rest 54 in der Nitrilase aus *P. fluorescens*. Dies unterstützt folglich ebenfalls die ursprüngliche Annahme, dass dieser Aminosäure-Rest nahe am aktiven Zentrum lokalisiert ist.

Die Wildtyp-Nitrilase hydratisierte Acetophenoncyanhydrin zu Atrolactamid mit einem Anteil von 23 % am Produktgemisch. Ein Vergleich der Nitrilase-Varianten zeigte, dass die Atrolactamidbildung bei der Variante Y54F mit 16 % am höchsten war, gefolgt von der Variante Y54M, die 7 % Amid bildete. Die anderen Y54-Mutanten, bei denen der Tyrosin-Rest durch kleine unpolare Aminosäuren ersetzt worden war (Alanin, Valin und Prolin) zeigten noch deutlich geringere Atrolactamidanteile (0,8 - 2 %). Die Amidbildung bei den Nitrilasevarianten nahm im Vergleich zum Wildtyp in der Reihe NitA > Y54F > Y54M > Y54V, Y54P, Y54A ab. Die Abnahme der Atrolactamidanteile bei den Y54-Varianten korrelierte also mit einer Verkleinerung der Aminosäure-Seitenketten. Hieraus konnte gefolgert werden, dass dieser Effekt nicht auf einer erschwerten Amidfreisetzung beruhte, sondern Folge einer Verringerung der sterischen Behinderung war und dadurch eine verstärkte Säurebildung ermöglichte.

Der Reaktionsmechanismus von Nitrilasen ist, wie bereits erwähnt, nicht vollständig aufgeklärt (siehe Kap. 1.2.3). Es wird aber davon ausgegangen, dass nach dem ersten Hydrolyseschritt ein tetraedrisches Intermediat entsteht, das nach der Abspaltung von Ammoniak zum sog. Acyl-Enzymkomplex weiterreagiert, aus dem nach einer zweiten Wasseranlagerung die Säure freigesetzt wird (siehe auch Kap. 1.2.3). Die Abspaltung von Ammoniak aus dem tetraedrischen Übergangszustand erfordert eine Protonierung der Amin-Gruppe und damit eine positive Ladung am Stickstoff-Atom, die möglicherweise durch den zur katalytischen Triade gehörenden Glutamat-Rest stabilisiert wird. Befindet sich die positive Ladung nicht am Substrat, sondern beispielsweise am katalytisch aktiven Lysin-Rest, führt dies zur Thioleliminierung und in der Folge zur Freisetzung des Amids (Fernandes et al., 2006). Elektronenziehende Reste am α -ständigen C-Atom, welche

die positive Ladung am Stickstoff-Atom des Substrates destabilisieren und sterisch anspruchsvolle Reste, die das Stickstoff-Atom der stabilisierenden Wirkung des Glutamat-Restes entziehen, korrelierten mit einer verstärkten Amidbildung (Fernandes et al., 2006). Eine Verkleinerung der Aminosäure-Seitenkette an Position 54 hatte offenbar zur Folge, dass die Amin-Gruppe im tetraedrischen Intermediat von Acetophenoncyanhydrin leichter protoniert und Ammoniak besser abgespalten werden konnte.

Im Gegensatz zu dem am α -ständigen C-Atom disubstituierten Acetophenoncyanhydrin bildete die Nitrilasevariante Y54M beim Umsatz von Mandelonitril nach der Wildtyp-Nitrilase den höchsten Mandelamidanteil (zwischen 8 und 10 %). Bei allen anderen Varianten war der Mandelamidanteil sehr gering (max. 2 %). Die Amidbildung nahm im Fall von Mandelonitril nicht mit einer Verkleinerung der Aminosäure-Seitenkette an Position 54, sondern in der Reihe NitA > Y54M > Y54F > Y54V, Y54P, Y54A ab. Beim Umsatz von Mandelonitril scheint eine Argumentation zur Amidbildung anhand sterischer Effekte entsprechend dem Substrat Acetophenoncyanhydrin daher nicht zutreffend. Eine Gemeinsamkeit der Aminosäuren Tyrosin und Methionin besteht im Vorhandensein von Heteroatomen in deren Seitenketten, die offenbar die Bildung von Mandelamid begünstigen. Ein Zusammenhang zwischen den untersuchten Aminosäuren-Austauschen an Position 54 und dem gebildeten Mandelamidanteil der zugehörigen Enzymvarianten ergibt sich möglicherweise aus der Hydrophobizität der Aminosäuren. Gemäß der Hydrophobizitätsskala von Kyte und Doolittle (1982) weist Tyrosin die höchste Polarität mit einem „hydropathy index“ von -1,3 auf, gefolgt von Methionin (1,9) und Phenylalanin (2,8). Eine Abnahme der Amidbildung wäre somit Folge einer steigenden Hydrophobizität der Aminosäure-Seitenketten. Dagegen spricht, dass Alanin mit einem „hydropathy index“ von 1,8 eine annähernd identische Polarität wie Methionin (1,9) aufweist. Bezieht man jedoch zusätzlich das van-der-Waals-Volumen der Aminosäure-Seitenketten in die Betrachtung ein, bilden die Enzymvarianten mit sehr kleinen Aminosäuren an Position 54 (Val, Pro, Ala) weniger Mandelamid als die Wildtyp-Nitrilase und die Varianten mit großen Seitenketten (Tyr, Met und Phe). Es ergab sich somit eine Parallelität zwischen den beiden Substraten Mandelonitril und Acetophenoncyanhydrin. Der scheinbare Widerspruch bezüglich Hydrophobizität und gebildetem Mandelamidanteil wird damit erklärt, dass die Aminosäuren an Position 54 eine gewisse räumliche Ausdehnung besitzen müssen, um den Umsatz von Mandelonitril beeinflussen zu können. Diese Annahme wird durch die beobachteten Enantioselektivitäten der untersuchten Enzymvarianten beim Umsatz von Mandelonitril und 2-PPN gestützt (siehe nachfolgendes Kap. 4.8.2.3).

Ein Zusammenhang zwischen Mandelamidbildung und der Größe und Polarität verschiedener Aminosäure-Seitenketten an Position 165 in der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 wurde auch von Kiziak und Stolz (2009) beobachtet. Enzymvarianten, bei denen der Alanin-Rest durch große Aminosäuren (Phe, Tyr, Trp, His) ersetzt worden war, bildeten aus Mandelonitril deutlich weniger Mandelamid (max. 6 %) als die Wildtyp-Nitrilase (19 %). Innerhalb dieser Gruppe setzte die Nitrilasevariante mit neutraler Seitenkette (A165F) annähernd kein Amid frei (< 0,5 %), während bei A165Y und A165H höhere Amidanteile von 3 und 6 % gefunden wurden. Daraus wurde geschlossen, dass die Amidbildung bei Mandelonitril insbesondere durch polare oder geladene Aminosäure-Seitenketten beeinflusst wird (Kiziak und Stolz, 2009). Dies stand in Einklang mit der Beobachtung, dass polare (elektronegative) Substituenten in α -Position (z.B. -OH in MN) die

Amidbildung begünstigen, im Vergleich zu Substraten, die unpolare Substituenten an dieser Position aufweisen (z.B. $-\text{CH}_3$ in 2-PPN). Es war deshalb nicht überraschend, dass innerhalb (der Gruppe) der A165-Mutanten von Enzymvarianten mit polaren Aminosäuren (A165Y und A165H) mehr Mandelamid freigesetzt wurde als von den Varianten A165W und A165F mit unpolaren Aminosäuren an Position 165 (Christoph Kiziak, unveröffentlichte Daten).

4.8.2.3 Einfluss unterschiedlicher Aminosäure-Reste an Position 54 auf die Enantioselektivität und Enzymkinetik der Nitrilase

Die Kinetik beim Umsatz von Acetophenoncyanhydrin unterschied sich bei einigen Mutanten aus der Sättigungsmutagenese an Position 54 stark von der des WT-Enzyms. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt bei der Enzymvariante Y54A. Bei der chiralen Analyse wurde beobachtet, dass diese Variante zunächst bevorzugt (*R*)-Atrolactat synthetisierte. Sobald das *R*-Enantiomer des Nitrils umgesetzt war, trat eine starke Beschleunigung der Reaktion ein, die mit der verstärkten Hydrolyse von (*S*)-Acetophenoncyanhydrin zu (*S*)-Atrolactat einherging. Erstaunlicherweise wurde das *S*-Enantiomer von der Variante Y54A folglich schneller umgesetzt als das anfangs bevorzugt umgesetzte *R*-Enantiomer. Offenbar wurde die Bindung von (*S*)-Acetophenoncyanhydrin an das katalytisch aktive Cystein durch die Anwesenheit des *R*-Enantiomers beinahe vollständig unterdrückt. Eine Bestimmung der v_{max} - und K_m -Werte und damit eine exakte Charakterisierung der Enzymkinetik hätte die Synthese von (*R*)- und (*S*)-Acetophenoncyanhydrin erfordert, da die Enantiomere nicht käuflich erhältlich sind. Von der Synthese der beiden Verbindungen wurde abgesehen, da es aufgrund der hohen Instabilität von Acetophenoncyanhydrin (vgl. Kapitel 3.3.1) unter den Reaktionsbedingungen zu einer deutlichen Racemisierung der Enantiomere gekommen wäre und folglich keine exakten Ergebnisse zu erwarten waren.

Alle untersuchten Nitrilasemutanten bildeten zunächst einen höheren Enantiomerenüberschuss an (*R*)-Atrolactat als das WT-Enzym. Die deutlichste Steigerung ergab sich bei den beiden Varianten Y54F und Y54M, deren Enantiomerenüberschüsse für (*R*)-Atrolactat bei 30 % Substratumsatz 93 % und 86% im Vergleich zu 51 % beim Wildtyp betragen. Bei den Enzymvarianten Y54A, Y54V und Y54P führte der außerordentlich schnelle Umsatz von (*S*)-Acetophenoncyanhydrin, nachdem das *R*-Enantiomer verbraucht war, zu einer starken Abnahme des Enantiomerenüberschusses für (*R*)-Atrolactat (ee nach 100 %-igem Substratumsatz: zwischen 4 - 9 %). Die Aminosäuren an Position 54 müssen offenbar eine gewisse räumliche Ausdehnung besitzen, damit der Enantiomerenüberschuss nach dem vollständigen Umsatz des Substrates nicht herabgesetzt wird. Entsprechend den Beobachtungen bei der Bildung von Atrolactat, beschleunigte sich auch die Bildung von (*S*)-Atrolactamid deutlich sobald das *R*-Enantiomer von Acetophenoncyanhydrin annähernd vollständig umgesetzt worden war. Dies bestätigte frühere Ergebnisse beim Umsatz von Mandelonitril und 2-Acetyloxy-2-phenylacetoneitril, die gezeigt hatten, dass vorwiegend aus den *S*-Enantiomeren der Nitrile die korrespondierenden Amide gebildet werden (Fernandes et al., 2006; Mateo et al., 2006).

Aus den Umsatzkurven lässt sich ableiten, dass das kovalent an das aktive Zentrum gebundene Intermediat des *S*-Enantiomers schneller hydrolysiert wurde als das entsprechende Zwischenprodukt des *R*-Enantiomers. Die Ausbildung eines kovalenten Intermediates bei der Nitrilase-Reaktion wurde experimentell erstmals von Stevenson et al. (1990) mittels Ionenspray-Massenspektroskopie

nachgewiesen. Die Beobachtung, dass auch bei einem Substrat, das von der untersuchten Nitrilase aus *Rhodococcus* ATCC 39484 nur sehr schlecht umgesetzt wird ein kovalentes Addukt gebildet wurde, führte zu der Schlussfolgerung, dass die Rate des Zusammenbruchs des kovalenten Intermediates bestimmt, ob es sich um ein „gutes“ oder „schlechtes“ Substrat handelt und nicht die Bildung des Michaelis-Komplexes oder die Ausbildung der kovalenten Bindung (Stevenson et al., 1990). Der Zusammenbruch des Intermediates stellt folglich den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion dar. Es ist deshalb möglich, dass Nitrilasen zumindest den ersten Schritt der Reaktion mit vielen verschiedenen Nitrilen durchführen können, aber nachfolgende Stufen der Reaktion nur mit „guten“ Substraten schnell sind (Stevenson et al., 1990). Das *S*-Enantiomer von Acetophenoncyanhydrin stellt aufgrund seiner höheren Umsatzgeschwindigkeit demnach das „bessere“ Substrat als das entsprechende *R*-Enantiomer dar.

Die Inhibierung des Umsatzes von (*S*)-Acetophenoncyanhydrin in Anwesenheit des *R*-Enantiomers wurde bei allen eingehender untersuchten Enzymvarianten beobachtet. Die starke Beschleunigung der Hydrolyse des *S*-Enantiomers nach Verbrauch des *R*-Enantiomers war bei den Varianten Y54A, Y54V und Y54P jedoch wesentlich stärker ausgeprägt als bei den Enzymvarianten Y54M und Y54F. Dies deutet an, dass die Abnahme der Affinität gegenüber (*S*)-Acetophenoncyanhydrin bzw. die schnellere Hydrolyse dieses Enantiomers u.U. durch die kleine Größe und/oder den apolaren Charakter der Aminosäuren Alanin, Valin und Prolin verursacht wurde. Der sterische Einfluss schien hierbei jedoch zu überwiegen, da es sich bei Methionin und Phenylalanin ebenfalls um hydrophobe Aminosäuren handelt. Ähnliche Auswirkungen auf die chirale Diskriminierung eines Enzyms wurden auch für eine Mutante (F108Q) der Epoxid-Hydrolase aus *Agrobacterium radiobacter* beschrieben (van Loo et al., 2009). Obwohl das Enzym gegenüber (*S*)-[(*p*-Nitrophenoxy)methyl]oxiran die größere Affinität aufwies, wurde das korrespondierenden *R*-Enantiomer deutlich schneller umgesetzt. Zurückgeführt wurde dies auf die höhere Hydrolysegeschwindigkeit des kovalenten Intermediats des „nicht-bevorzugten“ Enantiomers (van Loo et al., 2009).

Auch für die Acyltransferase-Aktivität der Amidase aus *Rhodococcus* sp. Stamm R312 wurde mit den Substraten Lactamid und Alaninamid eine ähnliche Enzymkinetik wie bei den Y54-Mutanten beobachtet. Die Amidase setzte 5 α -substituierte Amide bevorzugt zu den *S*-Hydroxamsäuren um, weshalb das Enzym eine Erkennungsstelle für Substituenten in α -Position aufweisen sollte (Fournand et al., 1998). Bei den Substraten Lactamid und Alaninamid wurden von der Amidase jedoch die *R*-Enantiomere schneller umgesetzt als die korrespondierenden *S*-Enantiomere, obwohl das Enzym gegenüber (*S*)-Lactamid eine 8-fach höhere und gegenüber (*S*)-Alaninamid eine 32-fach höhere Affinität aufwies. Dies wurde damit erklärt, dass möglicherweise durch eine Veränderung der Position der α -ständigen Reste in der Substratbindetasche der nukleophile Angriff von Hydroxylamin auf den Acyl-Enzymkomplex der *R*-Enantiomere erschwert, aber gleichzeitig die Freisetzung der Hydroxamsäure erleichtert ist.

Im Hinblick auf das Substrat Mandelonitril hydrolysierten die Enzymvarianten Y54F und Y54M Mandelonitril mit einem der Wildtyp-Nitrilase vergleichbaren Enantiomerenüberschuss zu (*R*)-Mandelsäure. Bei den Enzymvarianten, in denen Tyr54 gegen kleine, unpolare Aminosäuren ersetzt worden war (Valin, Prolin und Alanin) nahm die Präferenz zur Bildung von (*R*)-Mandelsäure hingegen deutlich ab. Im Falle des Substrates Mandelonitril musste die Aminosäure an Position 54 offenbar ebenfalls eine gewisse räumliche Ausdehnung besitzen, damit der ee-Wert nicht her-

abgesetzt wurde. Gleiches galt für das Substrat 2-PPN, bei dem, analog zu Mandelonitril, mit Varianten, die größere AS-Reste an Position 54 (Y54M und Y54F) besaßen, höhere Enantantio-merenüberschüsse für (*S*)-2-PPS erzielt werden konnten als mit der Enzymvariante Y54V.

Möglicher Einfluss der Aminosäure-Austausche an Position 54 auf die Quartärstruktur der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191

Bei den Mitgliedern der „Nitrilase-Superfamilie“ assoziieren die Monomere über die Interaktionsfläche A zu Dimeren, wodurch der katalytisch aktive Cystein-Rest innerhalb des aktiven Zentrums positioniert wird (Thuku et al., 2009). Die Mehrzahl der charakterisierten Nitrilasen weisen als Dimere jedoch keine enzymatische Aktivität auf (Kap. 1.2.2.1). Die Oligomerisierung der Dimere zur Ausbildung langer Spiralen scheint eine wichtige Voraussetzung für die Aktivität von Nitrilasen zu sein (Nagasawa et al., 2000; Jandhyala et al., 2005; Woodward et al., 2018). Deshalb hat der Prozess der Oligomerisierung möglicherweise ebenfalls einen Einfluss auf die Positionierung der katalytischen Reste im aktiven Zentrum (Kimani et al., 2007).

Eine Erklärung für die ungewöhnliche Enzymkinetik bei der Hydrolyse von Acetophenoncyanhydrin ergab sich möglicherweise aus der Lage der Aminosäure Y54 in der Nitrilase aus *P. fluorescens*. Nitrilasen weisen in ihren Aminosäure-Sequenzen im Vergleich zu anderen kristallisierten Enzymen der „Nitrilase-Superfamilie“ an zwei Positionen Insertionen von 12 - 16 Aminosäuren auf, welche die Region C bilden (siehe Kap. 1.2.2.1). Ein Sequenzvergleich der Nitrilase aus *P. fluorescens* mit verschiedenen mikrobiellen Nitrilasen und 6 kristallisierten Mitgliedern der Superfamilie zeigte, dass der Aminosäure-Rest an Position 54 innerhalb der ersten Insertion lokalisiert ist (Abb. 4.3). Die räumliche Lage der beiden Insertionen im Homologie-Modell der Nitrilase ist in Abb. 4.4 gezeigt. Die Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten in Region C sind entscheidend für die spiralförmige Quartärstruktur, welche bei den kristallisierbaren Enzymen der Superfamilie nicht auftritt (Kap. 1.2.2.1).

PfEBC191	1:	MTVHKKQYKVAAVQA-APAF-----DLEAGVAKAIGLIAQAAAE--GASLVAFPEAWLPG-*	<-----C----				
RrJ1	1:	MVEYNTTFKVAAVQA-QPVWF-----DAKTVDKTVSIIAEEARN--GCELVAFPEVFIPIG-	YPWHIWLDS PAGG-----				
BpumC1CynD	1:	MTSIYPKFRAAAVQA-APIYL-----NLEASVKSCELI DEEASN--GAKLVAFPEAFPIPG-	YPWFAFI GH-----				
NcraCht	1:	MVLTKYKAAAVTS-EPVWF-----DLEGVRRKTI DFINEAGQA--GCKLVAFPEVWIPG-	YPYVMWKVT-----				
3wuy	1:	MLGKIMLNKTI RAAAAQI-SPVLF-----SQQGTMEKVLDAI ANAAK--GVELIVFPEFTVPY-	YPYFSFVEP-----				
1j31	1:	MVKVGYIQM-EPKIL-----ELDKNYSKAELIKEASKE--GAKLVLPLELFDTC-	YNFE-----				
1f89	2:	SASKILSQIKVALVQL-SGSSP-----DKMANLQRAATPIERAMKEQPDTKLVLPLECFNSP-	YS-----				
2dyu	13:	MGSIGSMGKPIEGFLVAAIQFPVPIVNS-RKIDIDHNIESI IRTLHATKAGYPGVELIIFPEY-	YSTQGLNT-----				
2uxy	1:	MRHGDISSNDTVGVAVVNYKMPRLHT--AAEVLNARKIAEMI VGMKQGLPGMDLVVFPPEY-	SLQGMIMY-----				
2plq	1:	MRHGDISSSHD TVGIAVVNYKMPRLHT--KAEVIENAKKIADMVVMKQGLPGMDLVVFPPEY-	STMGIMY-----				
		<--β1-->	<-----α1----->	<-β2->			
		<----->	<-----D---/E-->	<C>	*		
PfEBC191	67:	-----MRFVQRNF DNALEVGSEPFERLCRAAAQHKIYVVLG-FTERS GG-----TLYLAQAI IDDCGRV VATR	RRKLKPT-----				
RrJ1	63:	PLAGMAKFAVRYHENS LTMDS PHVQRLD AARDHNI AVVVG-I SERDGG-----SLYMTQLVIDADGQLVARRR	KLKPT-----				
BpumC1CynD	63:	PEYTRK FHYHELYKNAVEI PSLAIQKISEAAKRNETYVCIS--CSEKDG G-----SLYLAQLWFNPNGDLIGKHR	KMRAS-----				
NcraCht	61:	-YQQLPMLK KYRENAMAVDSDEFRRIRRAARDNQIYVSLG-FAEIDHA-----TLYLAQALIDPTGEVINHR	RKI KPT-----				
3wuy	68:	PVLMGKSHLKLQYEA V-TVPGKVTQAI AQA AKTHGMVVVLG-VNEREEG-----SLYNTQLIFDADGALVLR	KRITPT-----				
1j31	52:	-----SREEVFDVAQQIP-EGETTTFLMELARELGLYIVAG-TAEKSGN-----YLYNSAVVVGPRG-	YIGKYRKH LFP-----				
1f89	61:	-----TDQFRKYSEVINPKPESTSVQFLSNLANKFKI ILVGGTIP ELDPKTDK--IYNTSIIIFNEDGK	LIDKHRKVHLFDVDI PNGIS-				
2dyu	81:	-----AKWLSEEFLLDVPGETELYAKACKEAKVYGVFS-IMERNPDSNKN-PYNTAIIIDPQGEI IILKYR	KLFPWNP-----				
2uxy	68:	-----DPAEMMETAVAI PGEETEIFSRACRKANVWGVFSLT-ERHEEHPRKAPYNTLVLIDNNGEIVQ	KYRKIIPWCP-----				
2plq	68:	-----DQDEMFAATAASIPGEETAIFA EACKKADTWGVFSLTGEKHEDHPNKAPYNTLVLINNKG	EIVQKYRKIIPWCP-----				
		<--α2-->	<-----α3----->	<-β3-->	<--β4-->	<-β5-->	
		#	<F>	*	<--A-->	<----->	
PfEBC191	135:	--HVERSVYGE G DG-SDLAVHDTTLGR LGALCAEHIQPLSKYAMYAQ-----HEQVHIAAWPSF	SVYRGA AFQL-----SAQANNA				
RrJ1	136:	--HVERS VYGE G NG-SDISVYDMPFARL GALNCEWHFQTLTKYAMYSM-----HEQVHVASW	PGMSLYQEVPAF-----GVDAQLT				
BpumC1CynD	135:	--VAERLIWGDGSG-SMMPVFQTEI GN LGGLMCWEHQVPLDLMAAMNAQ-----NEQVHVASW	PGY-----FDDEI				
NcraCht	133:	--HVEKLVYGDGAGDTFMSVPTPELGR LGQLNCEWENMNPFLKSLNVSM-----GEQIHIAAWPI	YPGKETLKY PDPATNVADPASDL				
3wuy	140:	--YHERMVVGGQDG-AGLRTVDTTVGR LGALACEWHEYNPLARYALMAQ-----HEQIHCGQFP	PGSMVGGIF-----ADQMEV				
1j31	118:	--YREKVFPEPGDLG-FKVF DIG-FAKVGVMI CFDFWFFPESARTLALK-----GAEIIAH PANLV	-----MPYAPR				
1f89	142:	--FHESETLSPG EK-S--TTIDTKYKGFVGI CYDMRFP ELAMLSARK-----GAFAMIYPSAFNT	-----VTGPHLHWH				
2dyu	152:	---IE--PWYPGDLG-MPVCEGPGGSKLAVCI CHDGMIP ELAREAAKY-----GCNVYIRISGYST	-----QVNDQWIL				
2uxy	140:	---IE--GWYPPGGQ--TYVSEGP KGMKISLIICDDGNYPEIWRDCAMK-----GAELIVRCQGY	P-----AKDQQVM				
2plq	141:	---IE--GWYPPGDT--TYVTEGPKGLKISLIVCDDGNYPEIWRDCAMK-----GAELIVRCQGY	MP-----AKEQQIM				
		<α4>	<β6>	<-β7->	<--α5-->	<-β8->	<----->
		-A----->	<-----C----->	<E>	<C>		
PfEBC191	209:	ASQVYALEGQC FVLAPCAPVSKEMLELIDLS PAKAELL---LEGGGFAMIYGPDGAPLCTPLAETE	EEGILYADIDLGVIGVAKAAYDP				
RrJ1	210:	ATRMVALEGQT FVVCTTQVVTP EAHEFFCDNDEQRKLI---GRGGGFARI IGP DGRDLATPLA	EEGILYADIDL SAITLAKQAADP				
BpumC1CynD	197:	SSRYAIAIATQTFVLM TSSMYTEEMKEMICLTQEQRYDFE--TFKSGHTCIYGP DGEPI	SDMVAETEGIAYAEIDVERVI DYKXYIDP				
NcraCht	213:	VTPAYAIETGTWTLAPFQR LSV EGLKKNTP EGVPE TDP--STYNGHARIYRPGSLVVRPDK-	DFDGLLFVDIDLNECHLTKALADF				
3wuy	209:	TMRHHALES GCFVINATGWLTAEQKLQIT TDEKM HQALS---GGCYTAI ISPEGKHLCEPIAE-	GEGLA IADLDFSLIAKRKRMMDS				
1j31	180:	AMPIRALENRVYTTITADR VGEERG-----LKF I GKS LIASPKAEVLSIASETE--EEIGV	VEIDLNLARNKRLNDMN				
1f89	207:	LARSRAVDNQVYVMLCSPARNLQS-----SYHAYGHSIVVDPRGKIVAEAGE--GEEI	IYAE LDPVIESFRQAVPL				
2dyu	215:	TNRSNAWHNLMYTVSVNLAGYDNV-----YFFGEGQICNF DGTTLVQGH R-NPEWIVTGE	IYPKMADNARLSWGL				
2uxy	200:	MAKAMAWANNCYVAVANAAGFDGV-----YSYFGHSAIIGFDGRTLGECEG E-EMGIQY	AQLSLSQIRDARANDQS				
2plq	203:	MAKAMAWANN TYVAVANATGFDGV-----YSYFGHSAIIGFDGRTLGECEGT-EENGIQY	AEVVISQIRDFRKNQAQS				
		-α6----->	<-β9-><β10>	<β11>	<β12->	<β13>	<-β14-><--α7-->
		<--A-->					
PfEBC191	294:	VGHYSRPDVLRLLVNREP MTRVHYVQPSLPETS VLAFGAGADAIRSEENP EEQGDK					
RrJ1	295:	VGHYSRPDVLRLNFRHTTPVNTAISTHATHHTLVPSGALDGVRELNGADEQALPSTHSD	ETDRATASI				
BpumC1CynD	283:	AGHYSNQLSLMNFNQPTPVVKHLNHQKNEVFTYEDIQYQHGLEEKV					
NcraCht	298:	AGHYMRPDLIRLLVDTSRKELVTEVDRNGGI VQYSTRERLGLNTPLENDKEGKK					
3wuy	292:	VGHYARPDLQLTLNQPWSALEANPVTPNAIPAVSDPELTETIEALPNPIFSH					
1j31	250:	DIFKDRREYYFR					
1f89	277:	TKQ-RRF					
2dyu	285:	ENNIYNLGHRYGVAKPG-GEHDAGLTYIKDLAAGKYKLPWEDHMKIKDGS IYGYPTTGG	RFGK				
2uxy	270:	QNHFLKILHRGYSGLQASGDGRGLAECFF EYRTWVTD A EKARENVERL TRSTTGVAQC	PGVGR LPYEGLEKEA				
2plq	273:	QNHFLKLLHRGYTGLINSGE DGRVAECFFDFYRTWVLD A EKARENVEKI TRSTVTGTA	AECP IQGIPNEGKTEIGV				
		<α8>	<-α9-->	<-α10-->	<--α11-->		

Abbildung 4.3: Multiples Sequenz-Alignment der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 mit verschiedenen mikrobiellen Nitrilasen und 6 kristallisierten Mitgliedern der „Nitrilase-Superfamilie“; aus Thuku et al. (2009), verändert. **PfEBC191:** Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191, **RrJ1:** Nitrilase aus *Rhodococcus rhodochrous* J1, **BpumC1CynD:** Cyanid-Dihydratase aus *Bacillus pumilus* C1, **NcraCht:** Cyanid-Hydratase aus *Neurospora crassa*, **3wuy:** Nitrilase aus *Synechocystis* sp. PCC6803, **1j31:** PH0642-Protein aus *Pyrococcus horikoshii*, **1f89:** ω-Amidase NIT3 aus *Saccharomyces cerevisiae*, **2dyu:** Formamidase aus *Helicobacter pylori*, **2uxy:** aliphatische Amidase aus *Pseudomonas aeruginosa*, **2plq:** Amidase aus *Geobacillus pallidus* RAPc8. Die Aminosäuren der katalytischen Triade (C,E,K) sind rot, der zweite konservierte Glutamat-Rest grün und der Tyrosin-Rest an Position 54 in der Nitrilase aus *P. fluorescens* magenta dargestellt. Die postulierten Interaktionsflächen (Regionen A, C, D und E) sind in der obersten Zeile angegeben. Sekundärstrukturen (α-Helices und β-Faltblätter), die in 2plq identifiziert wurden, sind in der untersten Zeile aufgeführt. Die für mikrobielle Nitrilasen charakteristischen Insertionen der Region C sind grau hinterlegt.

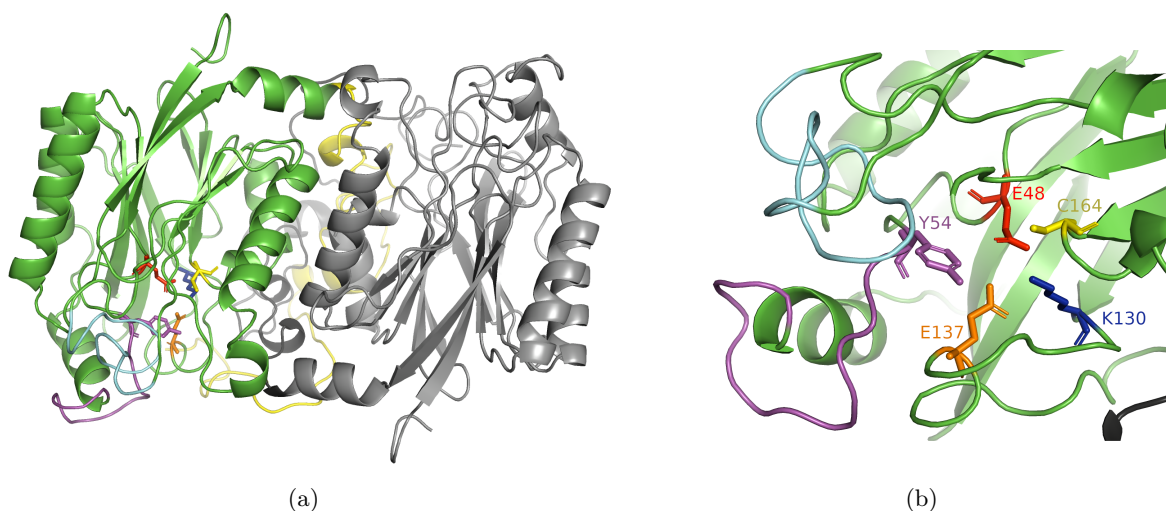


Abbildung 4.4: Lage des Aminosäure-Restes an Position 54 im Dimer-Strukturmodell der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191. (a) Darstellung der katalytisch aktiven Reste C164 (gelb), E48 (rot) und K130 (blau) inklusive des zweiten konservierten Glutamat-Restes E137 (orange) mit Tyrosin an der Position 54 (magenta). Die für Nitrilasen charakteristischen 12 - 16 Aminosäuren umfassenden Insertionen sind in magenta und cyan hervorgehoben. (b) Detailansicht der entsprechenden Enzymregion. Abbildung erstellt mit PyMol (DeLano, 2002).

Ein direkter Zusammenhang zwischen der Quartärstruktur von Nitrilasen und deren Substratspezifität konnte bei den pflanzlichen Nitrilasen aus *Capsella rubella* (*CrNIT1* und *CrNIT2*) nachgewiesen werden. Trotz einer Sequenz-Identität von 88 % zeigten die beiden Nitrilasen unterschiedliche Substratspezifitäten, wobei *CrNIT1* bevorzugt 6-Heptennitril umsetzt, während *CrNIT2* eine recht hohe Spezifität für das kurzkettige 3-Butennitril aufweist (Woodward et al., 2018). Durch Veränderung des jeweiligen Aminosäure-Restes an Position 80 (*CrNIT1* H80F und *CrNIT2* F80H), der in der Region C lokalisiert ist, konnte die Substratpräferenz der Nitrilasen vertauscht werden. Es ergab sich hierbei ein Zusammenhang zwischen der spiralförmigen Drehung („helical twist“) und dem Umsatz der Nitrile mit unterschiedlicher Kettenlänge. Die Helixdrehung wird durch den Drehwinkel zwischen aufeinanderfolgenden Dimeren um die helikale Achse definiert, die konventionsgemäß negativ ist, um Linkshändigkeit anzuzeigen. Eine Abnahme des Drehwinkels führte zu einem größeren Durchmesser der Spirale und hiermit verbunden zum Umsatz größerer Substrate [(Woodward et al., 2018), Abb. 4.5]. Es wurde deshalb postuliert, dass die Helixdrehung die Gesamtgröße der Substratbindetasche beeinflusst. Die Studie zeigt, dass der Austausch eines einzelnen Aminosäure-Restes in der Region C zu einer Veränderung der Quartärstrukturen der Enzyme führte.

Die Untersuchungen von Woodward et al. (2018) bezogen sich zwar nicht auf unterschiedliche Enantiomere eines bestimmten Substrates, sondern auf Nitrile mit unterschiedlicher Kettenlänge, möglicherweise könnten Veränderungen der Substratbindetasche bei sterisch anspruchsvollen Nitrilen auch zu einer unterschiedlichen Hydrolyse der Enantiomere führen. Diese Annahme wird bestärkt durch Untersuchungen der Enzymvariante W59R der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 durch Sosedov (2013). Dieser Aminosäure-Rest ist, wie der Tyrosin-Rest an Position 54, ebenfalls in der ersten für Nitrilasen charakteristischen Insertion (Region C) lokalisiert (Abb. 4.3). Der Aminosäure-Austausch führte zu einer Enzymvariante, die beim Umsatz von Mandelonitril mit

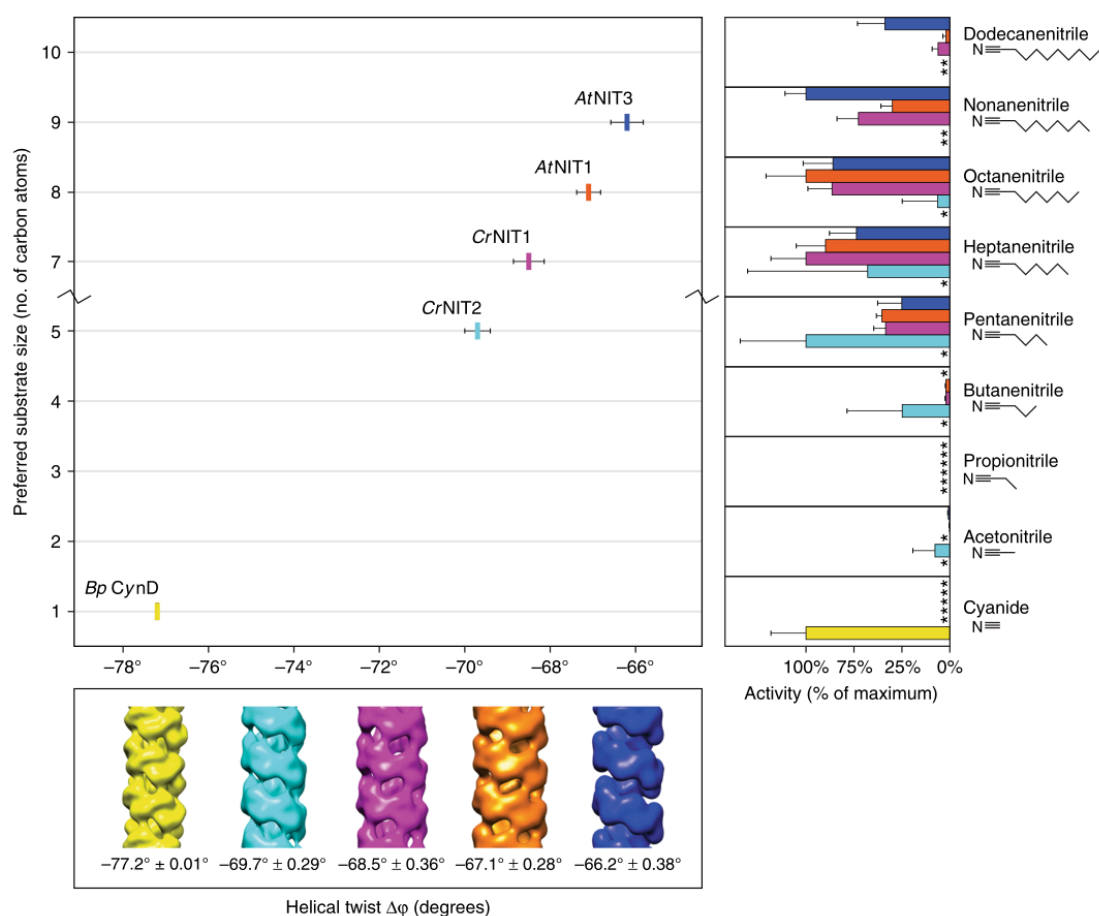


Abbildung 4.5: Beziehung zwischen spiralförmiger Drehung („helical twist“) und der Größe der bevorzugt umgesetzten Substrate bei verschiedenen Nitrilasen. Enzyme, die größere Substrate bevorzugen, haben kleinere absolute helikale Drehungen. Die Helixdrehungen sind mit einem negative Vorzeichen versehen, um anzuzeigen, dass die Helix der Faser linksgängig ist. (*) keine nachweisbare Ammoniakbildung nach 30-minütiger Inkubation. Nitrilasen aus *Capsella rubella*: *CrNIT1*, *CrNIT2*. Nitrilasen aus *Arabidopsis thaliana*: *AtNIT1*, *AtNIT3*, Cyanid-Dihydratase aus *Bacillus pumilus*: *BpCynD* (Woodward et al., 2018).

einem Enantiomerenüberschuss von 92 % für (*R*)-Mandelsäure deutlich enantioselektiver war als die Wildtyp-Nitrilase mit einem ee-Wert von 26 % (Sosedov, 2013). Entsprechend dem Verhalten der Nitrilase-Varianten Y54V, Y54A und Y54P beim Umsatz von Acetophenoncyanhydrin, setzte die Mandelamidbildung bei der Enzymvariante W59R erst ein, nachdem etwa 50 % des Mandelonitrils hydrolysiert war (Sosedov, 2013). Beim Umsatz mit dem strukturell ähnlichen Substrat 2-PPN wurde kein besonderes Verhalten festgestellt. Dies traf im Hinblick auf die Enzymkinetik auch auf die Y54-Varianten bei den Substraten Mandelonitril und 2-PPN zu.

Die Untersuchungen unterstreichen die Vermutung von Woodward et al. (2018), dass die Oligomerisierung möglicherweise die Substratbindetasche beeinflusst. Die unterschiedlichen Affinitäten und Umsatzgeschwindigkeiten der Y54-Varianten gegenüber (*S*)- und (*R*)-Acetophenoncyanhydrin waren möglicherweise Folge einer veränderten Spiralbildung der Nitrilase, so dass die Substratbindetasche im Verlauf der Oligomerisierung dahingehend verändert wurde, dass eine erschwerte Bindung von (*S*)-Acetophenoncyanhydrin, jedoch ein schnellerer Umsatz dieses Enantiomers die Folge war.

Möglicher Einfluss von Veränderungen des Aminosäure-Restes an Position 54 auf den Glutamat-Rest an Position 137 in der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191

Aufgrund der Nähe der Aminosäure Y54 zu den katalytisch aktiven Resten war ein Einfluss der Aminosäure-Reste an Position 54 auf den Reaktionsmechanismus denkbar. Wie bereits in Kapitel 1.2.1 beschrieben, besitzen Nitrilasen jeweils einen konservierten Cystein-, Glutamat- und Lysin-Rest im aktiven Zentrum, die an der Katalyse beteiligt sind. Neben dieser katalytischen Triade ist ein weiterer Glutamat-Rest konserviert, der unter anderem in den Kristallstrukturen der Amidase aus *Geobacillus pallidus* RAPc8 (PDB-Nummer 2plq), der Formamidase aus *Helicobacter pylori* (PDB-Nummer 2dyu) oder der Nitrilase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (PDB-Nummer 3wuy) visualisiert werden konnte (Kimani et al., 2007; Hung et al., 2007; Zhang et al., 2014). Gemäß dem Homologie-Modell der Nitrilase aus *P. fluorescens* war der im ersten Zweig der „Nitrilase-Superfamilie“ (der Cyanid-Hydratasen, Cyanid-Dihydratasen und Nitrilasen umfasst) hoch konservierte Tyrosin-Rest dem bei allen Mitgliedern der Superfamilie konservierten zweiten Glutamat-Rest (Position 137 in NitA) räumlich direkt benachbart (Abb. 4.4 und 3.35). Die Lage dieses Glutamat-Restes auf einer Schleife, die in Richtung der Interaktionsfläche C orientiert ist, führte zu der Vermutung, dass dieser AS-Rest durch den Prozess der Oligomerisierung in Position gebracht wird (Kimani et al., 2007; Thuku et al., 2009). Eine Beteiligung dieses AS-Restes am Reaktionsmechanismus würde demzufolge erklären, weshalb die Dimer-Assoziation erforderlich ist für die katalytische Aktivität. Im Fall der anderen katalytischen Reste ergab sich kein derart offensichtlicher Zusammenhang (Kimani et al., 2007). Neben dem bereits oben diskutierten möglichen direkten Einfluss der Aminosäure an Position 54 auf die Enzymstruktur und der damit einhergehenden Veränderung der Größe und/oder Geometrie der Substratbindetasche, könnten Mutationen an dieser Stelle auch zu einer Positionsänderung des Glutamat-Restes E137 innerhalb der Bindetasche führen.

Weiterhin konnten für die N-Carbamoyl-D-aminosäure-Amidohydrolase aus *A. radiobacter* und die Formamidase aus *H. pylori* anhand deren Kristallstrukturen Interaktionen in Form von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem zweiten konservierten Glutamat-Rest und den katalytisch aktiven Resten (Lysin und Glutamat) und den Substraten nachgewiesen werden (Hung et al., 2007; Chen et al., 2003). Hieraus wurde abgeleitet, dass dieser Glutamat-Rest entscheidend für die Aufrechterhaltung der Geometrie der katalytischen Triade (CEK) ist und eine wichtige Rolle bei der Positionierung des jeweiligen Substrates in der Substratbindetasche spielt (siehe auch Kap. 1.2.3). Untersuchungen mit der Amidase aus *G. pallidus* RAPc8 am entsprechenden Glutamat-Rest (E142) ergaben, dass das aktive Zentrum im Falle der Mutante E142D destabilisiert und das Substrat bei der Mutante E142L im aktiven Zentrum falsch positioniert wurde (Weber et al., 2013). Hierbei war die Wasserstoffbrücke zwischen einem der O-Atome des Glutamat-Restes an Position 142 und der Amino-Gruppe des Substrates essentiell für die Positionierung des Substrates, um den nukleophilen Angriff auf den Carbonylkohlenstoff durch das katalytisch aktive Cystein zu ermöglichen (Weber et al., 2013). Untersuchungen am zweiten konservierten Glutamat-Rest (E137) bei der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 zeigten, dass der AS-Austausch E137A zu einer drastischen Reduktion der Enzymaktivität führte (0,01 % Restaktivität im Vergleich zur WT-Nitrilase), die Enzymvariante aber immer noch in der Lage war Mandelonitril zu hydrolysieren (Sosedov und

Stolz, 2015). Der Glutamat-Rest spielt folglich auch bei der *P. fluorescens* Nitrilase eine sehr wichtige Rolle in der enzymatischen Reaktion, eine direkte/aktive Beteiligung von E137 an der Katalyse wurde jedoch ausgeschlossen (Sosedov und Stolz, 2015). Veränderungen in der Positionierung der Substrate infolge einer möglichen Positionsänderung des entsprechenden Glutamat-Restes (E137), entweder durch eine veränderte Quartärstruktur der Nitrilase oder möglicherweise durch Veränderungen der räumlichen Nachbarschaft bei den Y54-Varianten zu E137, scheinen auch im Falle der Nitrilase aus *P. fluorescens* denkbar. Diese Veränderungen könnten dazu geführt haben, dass das *R*-Enantiomer von Acetophenoncyanhydrin von den Enzymvarianten Y54A, Y54V und Y54P zwar bevorzugt gebunden wurde, die anschließende Hydrolyse des zugehörigen kovalenten Intermediates jedoch langsamer war als die Hydrolyse von (*S*)-Acetophenoncyanhydrin.

Eine interessante Beobachtung ergab sich ferner aus dem Sequenz-Alignment von Thuku et al. (2009) (siehe Abb. 4.3). Bei einigen kristallisierten Mitgliedern der „Nitrilase-Superfamilie“ ist ein Tyrosin-Rest dem katalytisch aktiven Glutamat-Rest C-terminal direkt benachbart (u.a. in der Formamidase aus *H. pylori*, PDB-Nummer 2dyu; der Amidase aus *P. aeruginosa*, PDB-Nummer 2uxy und der Amidase aus *G. pallidus* RAPc8, PDB-Nummer 2plq). Gemäß den hinterlegten Strukturen dieser Enzyme in der PDB Datenbank existieren zwischen dem jeweiligen Tyrosin-Rest und dem räumlich benachbarten zweiten Glutamat-Rest Wasserstoffbrückenbindungen. Auch bei der ω -Amidase Nit2 aus *M. musculus* (PDB-Nummer 2w1v), dem hypothetischen Protein aus *Pyrococcus horikoshii* (PDB-Nummer 1j31) und der Nitrilase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (PDB-Nummer 3wuy) sind zwischen den zu Y54 der Nitrilase aus *P. fluorescens* korrespondierenden Tyrosin-Resten und den entsprechenden Glutamat-Resten Wasserstoffbrückenbindungen dargestellt. Wasserstoffbrücken sind elementar für biologische Systeme und sie werden regelmäßig in Netzwerken gefunden, die an der Faltung, molekularen Erkennung und Katalyse beteiligt sind (Wang et al., 2018). In einem Enzym besteht das Wasserstoffbrücken-Netzwerk häufig aus den aktiven Resten, funktionellen Resten und Wassermolekülen, die durch Wasserstoffbrücken verbunden sind und ein dreidimensionales Netzwerk bilden (Wang et al., 2017). Bei hydrolytischen Enzymen ist dieses Netzwerk vielfach für den Transport von Protonen und Wassermolekülen und den Erhalt der aktiven und dynamischen Strukturen verantwortlich (Wang et al., 2017). Die starke Konservierung des hier diskutierten Tyrosin-Restes in Nitrilasen, Cyanid-Hydratasen und -Dihydratasen in Kombination mit dem C-terminal direkt benachbarten Prolin-Rest, der die Peptidkette fixieren kann, ließ darauf schließen, dass die Anwesenheit des Tyrosin-Restes in räumlicher Nähe zum zweiten konservierten Glutamat-Rest wichtig sein könnte für das Wasserstoffbrücken-Netzwerk im aktiven Zentrum.

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzymvarianten mit AS-Austauschen an Position 54 können die Wasserstoffbrücken zwischen der OH-Gruppe des Tyrosins und einem der O-Atome im Glutamat-Rest 137 nicht ausgebildet werden. Möglicherweise wurde die Ausbildung von Wasserstoffbrücken im aktiven Zentrum durch die Nitrilasevarianten mit kurzen AS-Seitenketten (Valin, Alanin und Prolin) dahingehend beeinflusst, dass der nukleophile Angriff des zweiten Wassermoleküls am Carbonylkohlenstoffatom des Acyl-Enzymkomplexes beim *S*-Enantiomer von Acetophenoncyanhydrin erschwert, aber gleichzeitig die Freisetzung von (*S*)-Atrolactat erleichtert war.

Möglicher Einfluss der Aminosäure-Austausche an Position 54 auf die Drehbarkeit von C-C-Bindungen im gebundenen Substrat

Das Strukturmodell der Nitrilase deutete an, dass durch Austausch der großen Aminosäure Tyrosin an Position 54 gegen die kleineren, hydrophoben Aminosäuren Valin, Alanin und Prolin in direkter Nachbarschaft zum zweiten konservierten Glutamat-Rest möglicherweise eine Art „hydrophobe Tasche“ entsteht (Abb. 4.6).

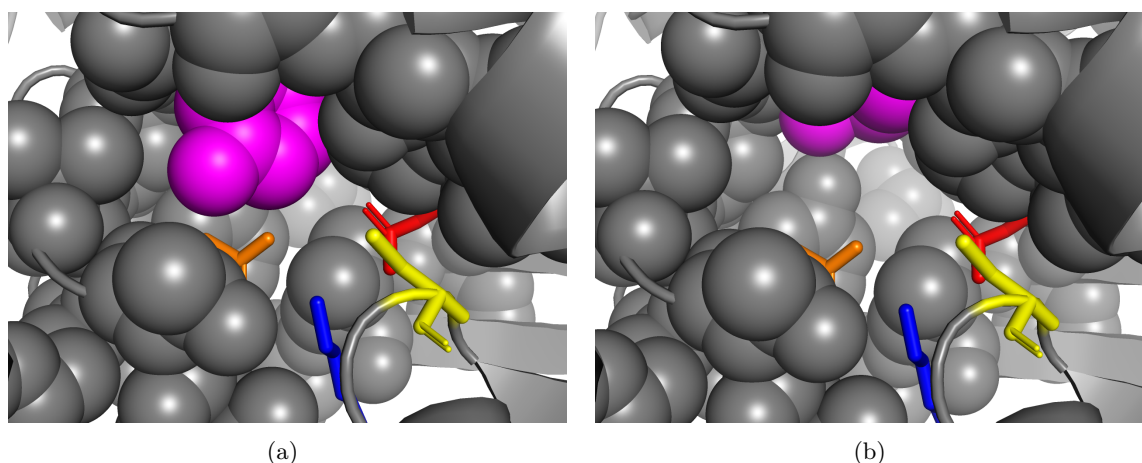


Abbildung 4.6: (a) Substratbindetasche der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191. Darstellung der katalytisch aktiven Reste C164 (gelb), E48 (rot) und K130 (blau) inklusive des zweiten konservierten Glutamat-Restes E137 (orange) mit Tyrosin an der Position 54 (magenta). (b) Substratbindetasche der Nitrilasevariante Y54A. Darstellung der katalytisch aktiven Reste C164 (gelb), E48 (rot) und K130 (blau) inklusive des zweiten konservierten Glutamat-Restes E137 (orange) mit Alanin an der Position 54 (magenta). Abbildung erstellt mit PyMol (DeLano, 2002).

Hierdurch könnte im Gegensatz zur Wildtyp-Nitrilase aufgrund der kleineren AS-Seitenketten eine freie Drehbarkeit um die C-CO-Achse des enzymgebundenen Reaktionsintermediates möglich sein. Der große Phenylring in Acetophenoncyanhydrin könnte sich bei den Enzymvarianten Y54V, Y54P und Y54A infolgedessen in die kleine „hydrophobe Tasche“ orientieren. Dies würde gleichzeitig eine veränderte Ausrichtung der in α -Position vorhandenen Reste (Hydroxy- und Methyl-Gruppe) beinhalten. Durch die unterschiedliche Orientierung der funktionellen Gruppen innerhalb des aktiven Zentrums könnte bei den Varianten der nukleophile Angriff des zweiten Wassermoleküls auf das C-Atom des Thioesters von (*S*)-Acetophenoncyanhydrin erschwert, die Freisetzung der Säure jedoch erleichtert sein. Bei den Enzymvarianten Y54M und Y54F war die ungewöhnliche Enzymkinetik deutlich weniger stark ausgeprägt. Dies impliziert, dass bei diesen beiden Mutanten aufgrund der größeren Aminosäure-Seitenketten möglicherweise keine zu den Varianten Y54A, Y54V und Y54P vergleichbare freie Drehbarkeit des enzymgebundenen Substrates um die C-CO-Achse gegeben war. Bei den Ruhezellsätzen mit den sterisch weniger anspruchsvollen Substraten Mandelonitril und 2-PPN wurde bei den Enzymvarianten mit kleinen Aminosäure-Resten an Position 54 eine deutlich verminderte Enantioselektivität im Vergleich zur wildtypischen Nitrilase festgestellt (siehe Tab. 3.19). Die Abnahme der Enantioselektivität lässt sich möglicherweise ebenfalls mit einer freien Drehbarkeit um die C-CO-Achse erklären.

4.9 Bienzymatische Synthese von Atrolactat

Bei der chemischen und enzymkatalysierten Synthese von Cyanhydrinen aus Ketonen werden vielfach nur geringe Ausbeuten erzielt (von Langermann et al., 2007). Dies trifft insbesondere auf die enzymatische Umsetzung von Methylphenylketon (Acetophenon) durch verschiedene Oxynitrilasen zu, bei der nur geringe Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse erzielt wurden (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1: Literaturangaben für die Synthese von Acetophenoncyanhydrin aus Acetophenon und Cyanid durch verschiedene Oxynitrilasen (HnL).

HnL	Umsatz (%)	ee (%)	Referenz
MeHnL	13	87 (<i>S</i>)	Bühler et al. (2003)
MeHnL	12	91 (<i>S</i>)	Chmura et al. (2006)
MeHnL	11	98 (<i>S</i>) ¹	Chmura et al. (2006)
MeHnL	9	54 (<i>S</i>)	Roberge et al. (2007)
MeHnL	22	96 (<i>S</i>)	von Langermann et al. (2007)
HbHnL	40	99 (<i>S</i>)	Griengl et al. (1998)
LuHnL	6	<10 (<i>S</i>)	Roberge et al. (2007)
AtHnL	7	n.d.	Andexer et al. (2007)
PaHnL	5	95 (<i>R</i>)	Kiljunen und Kanerva (1997)
PaHnL	8	97 (<i>R</i>)	Roberge et al. (2007)
PaHnL	33	78 (<i>R</i>)	Han et al. (1998)
PaHnL	30	75 (<i>R</i>)	Lin et al. (1999)

MeHnL: HnL aus *M. esculenta*, HbHnL: HnL aus *Hevea brasiliensis*

LuHnL: HnL aus *Linum usitatissimum*, AtHnL: HnL aus *Arabidopsis thaliana*

PaHnL: HnL aus *Prunus amygdalus*

¹ bei 0°C

Im Falle von Ketonen, wie z.B. Acetophenon, bei denen die Umsetzung durch thermodynamische Effekte gehemmt ist, sind alle Versuche das Gleichgewicht durch *in situ*-Derivatisierung des Cyanohydrins zu verschieben, fehlgeschlagen (Cabirol, 2010). Dies lässt sich damit erklären, dass es sich bei Cyanhydrinen aus Ketonen um tertiäre Alkohole handelt, die relativ reaktionsfreudige Reagentien für die Derivatisierung benötigen und durch die Derivatisierungsreagentien auch der eingesetzte Biokatalysator inaktiviert wird (Cabirol, 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von *E. coli*JM109(pIK9)(pJOE5361.1) in einem wässrigen Medium mit 5 % Methanol unter Verwendung eines dreifachen KCN Überschusses hingegen ein annähernd quantitativer Umsatz von Acetophenon erzielt werden. Die ursprüngliche Annahme, dass eine bienzymatische Reaktionskaskade bei der Umsetzung von Ketonen besonders vorteilhaft sein sollte, da das Intermediat der Reaktion (Cyanhydrin) durch die Nitrilase aus dem Gleichgewicht entfernt wird, traf demnach zu. Dagegen setzten combi-CLEAs (cross linked enzyme aggregates), bei denen die (*S*)-selektive Oxynitrilase aus *M. esculenta* und die Nitrilase aus *P. fluorescens* gemeinsam immobilisiert vorlagen, in einem biphasischen Medium bestehend aus 50 % Puffer (pH 5,5) und 50 % Diisopropylether lediglich ca. 4 % des eingesetzten Acetophenons (10 mM) zu Atrolactat um (Chmura, 2010). Auch in einer weiteren Studie konnten mit Hilfe der Oxynitrilase aus *M. esculenta* (20 U/mL) in einem biphasischen DIPE/Puffer-Medium (1:1, pH 4) bei einer Substratkonzentration von 10 mM lediglich 2 % des eingesetzten Acetophenons umgesetzt werden (von Langermann et al., 2007). Die Ursache für diese deutlichen Unterschiede zwischen einer Reaktionsführung in einer rein wässrigen Phase oder einem 2-Phasensystem liegt

in den Reaktionsbedingungen begründet. In einem biphasischen DIPE/Puffer-Medium ist die Acetophenonkonzentration in der wässrigen Phase aufgrund des hohen Verteilungskoeffizienten dieser Verbindung sehr gering. Der Oxynitrilase stehen damit nur geringe Substratkonzentrationen in der wässrigen Phase zur Verfügung. Daher zeigte auch eine Verzehnfachung der Substratkonzentration nur einen geringen Einfluss auf den Gesamtumsatz (2,5 % bei 100 mM Acetophenon; von Langermann et al., 2007). Das wässrige System (mit 5 % Methanol) war im Fall von Acetophenon dem biphasischen Medium aufgrund der wahrscheinlich höheren Substratverfügbarkeit demnach deutlich überlegen. Der Reaktionsverlauf beim Umsatz von Acetophenon in der wässrigen Phase durch ganze Zellen von *E. coli*JM109(pIK9)(pJOE5361.1) bestätigte die im biphasischen Medium von von Langermann et al. (2007) gemachten Beobachtungen, da mit abnehmender Eduktkonzentration (gegen Ende des Umsatzes) die Geschwindigkeit der Reaktion sehr stark abnahm. Interessant war in diesem Zusammenhang, dass bei allen untersuchten „bienzymatischen Ganzzellkatalysatoren“ (mit unterschiedlichen Oxynitrilasen und Nitrilasevarianten) die Atrolactatkonzentration nach 6 bis 30 h Inkubation noch einmal deutlich zunahm, während die Atrolactamidkonzentration bereits nach 6 h Inkubation ihren maximalen Wert erreichte. Es scheint, dass beim Vorliegen geringer Substratkonzentrationen (gegen Ende des Umsatzes) nur noch Atrolactat und kein Atrolactamid mehr gebildet wurde. Das Ausmaß der Amidbildung aus Arylacetonitrilen ist bei der Nitrilase aus *P. fluorescens* von der absoluten Konfiguration der in α -Position vorhandenen Substituenten abhängig. Aus (*R*)-Mandelonitril wurden beispielsweise 10 % Mandelamid und 90 % Mandelsäure gebildet, aus (*S*)-Mandelonitril hingegen annähernd äquimolare Mengen an Mandelamid und Mandelsäure (Mateo et al., 2006). Vieles spricht dafür, dass dieses Verhalten auf Acetophenoncyanhydrin übertragbar ist, da beim Umsatz von racemischem Acetophenoncyanhydrin durch die Nitrilase aus *P. fluorescens* primär (*S*)-Atrolactamid mit einem ee-Wert von ca. 90 % gebildet wurde (Kap. 3.3.2). Bei der Nitrilase-Reaktion bleibt die absolute Konfiguration der α -ständigen Reste erhalten. Daher kann angenommen werden, dass die Nitrilase (*R*)-APCN überwiegend zur Säure hydrolysierte und aus dem *S*-Enantiomer deutlich größere Mengen an Atrolactamid gebildet wurden. Wird bei niedrigen Substratkonzentrationen das Gleichgewicht der Oxynitrilase-Reaktion erreicht, gewinnt möglicherweise die enzymatische Rückreaktion der Hydroxynitril-Lyase (Dehydrocyanierung des Hydroxynitrils) an Bedeutung. Es ist davon auszugehen, dass bevorzugt (*S*)-Acetophenoncyanhydrin durch die (*S*)-spezifische Oxynitrilase zu Acetophenon und HCN umgesetzt wird. In der Folge würde der relative Anteil an (*R*)-APCN im Reaktionsansatz steigen und vermehrt die Säure freigesetzt. Träfe diese Annahme zu, so müsste der Enantiomerenüberschuss von (*S*)-Atrolactat gegen Ende der Reaktion abnehmen. Dies war jedoch nicht der Fall. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die steigende Atrolactatkonzentration bei gleichzeitig konstanter Atrolactamidkonzentration gegen Ende der bienzymatischen Reaktionskaskade zu erklären.

Im Hinblick auf die Enantioselektivität der Produkte wurden in den hier beschriebenen Arbeiten Enantiomerenüberschüsse von ca. 90 % erzielt. Dies entspricht den ee-Werten von (*S*)-Acetophenoncyanhydrin, die beim Umsatz von Acetophenon und HCN in biphasischen Reaktionsmedien durch die Oxynitrilase aus *M. esculenta* bestimmt wurden (Bühler et al., 2003; Förster et al., 1996; Chmura et al., 2006).

Durch Kombination der Oxynitrilase aus *Arabidopsis thaliana* mit der Nitrilase aus *P. fluorescens* und deren Enzymvariante Y54P waren auch die *R*-Enantiomere von Atrolactat und Atrolactamid

zugänglich. Allerdings konnte mit dem Stamm *E. coli* JM109(pIK9)(pSOM4), der die WT-Nitrilase exprimiert, unter den Standard-Reaktionsbedingungen kein vollständiger Umsatz erzielt werden. Im Vergleich zur Wildtyp-Nitrilase zeichnete sich die Enzymvariante Y54P durch eine gesteigerte Enantioselektivität gegenüber (*R*)-Acetophenoncyanhydrin aus. Dies sollte erwartungsgemäß mit einem niedrigeren K_m -Wert für das *R*-Enantiomer einhergehen, weshalb mit dem rekombinanten Stamm *E. coli* JM109(pIK9/Y54P)(pSOM4) möglicherweise ein vollständiger Umsatz von Acetophenon im Vergleich zu *E. coli* JM109(pIK9)(pSOM4) erzielt werden konnte.

Die in dieser Arbeit eingesetzten „bienzymatischen Ganzzellkatalysatoren“ sind vielversprechend für die Darstellung von sterisch anspruchsvollen (*S*)- oder (*R*)- α -Alkyl- α -hydroxycarbonsäuren bzw. -amiden aus Ketonen und Cyanid. Als besonders vorteilhaft für die Kopplung mit den beiden Oxynitrilasen haben sich die Enzymvarianten erwiesen, die aus der Sättigungsmutagenese an Position 54 erhalten wurden. Mit Hilfe dieser Ganzzellkatalysatoren konnte die unerwünschte Menge an Atrolactamid als Nebenprodukt der bienzymatischen Reaktionskaskade deutlich gesenkt werden und im Fall des Stammes *E. coli* JM109(pIK9/Y54P)(pSOM4) war darüber hinaus ein vollständiger Umsatz von Acetophenon möglich.

4.10 Einfluss hoher Substratkonzentrationen auf die Oxynitrilase- und Nitrilase-Aktivitäten und die Lebensfähigkeit rekombinanter *E. coli* Stämme

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bestand in der Analyse der Reaktionslimitierungen, die bei der Synthese von α -Hydroxycarbonsäuren und α -Hydroxycarboxamiden aus Aldehyden und Cyanid durch rekombinante Ganzzellkatalysatoren in wässrigen Medien auftreten. So wurde bereits früher gezeigt, dass bei der Biotransformation von Benzaldehyd und Cyanid im wässrigen System bei Substratkonzentrationen > 25 mM der Enantiomerenüberschuss an (*S*)-Mandelsäure auf $ee < 50$ % abnahm (Chmura, 2010; Sosedov et al., 2009). Dies wurde auf die Alkalisierung des Mediums durch Zugabe von KCN und der damit einhergehenden Inaktivierung des Ganzzellkatalysators sowie der Beschleunigung der unerwünschten chemischen Hintergrundreaktion (chemische Addition von Cyanid an Benzaldehyd) zurückgeführt. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Umsatz hoher Benzaldehydkonzentrationen (175 mM) unter adäquater pH-Kontrolle zeigten deutlich, dass lediglich die Nitrilase-Aktivität des Ganzzellkatalysators durch hohe Substratkonzentrationen gehemmt wurde (Kap. 3.7.1). Zudem wurde von der Nitrilase aus *P. fluorescens* unter diesen Reaktionsbedingungen wesentlich mehr Mandelamid gebildet (Amid/Säure-Verhältnis: 1,7) als beim Umsatz von 10 mM Benzaldehyd (Amid/Säure-Verhältnis: 0,6) (Kap. 3.7.1 und 3.8.4). Eine verstärkte Amidbildung in Gegenwart hoher Substratkonzentrationen wurde auch *in-vitro* von Chmura (2010) festgestellt. Hierbei wurden die beiden, in combi-CLEAs immobilisierten, Enzyme im 2-Phasensystem bestehend aus 70 % DIPE und 30 % Na-Citratpuffer (pH 5,5) inkubiert und der Umsatz von 10 - 250 mM Benzaldehyd mit 3- oder 5-fachem HCN-Überschuss untersucht. Dabei wurden Amid/Säure-Verhältnisse von 0,6 - 1,4 erzielt. Auch bei Inkubation des „bienzymatischen Ganzzellkatalysators“ im 2-Phasensystem mit 70 % DIPE nahm das Amid-Säure-Verhältnis in Gegenwart steigender Substratkonzentrationen zu.

Die verstärkte Amidbildung bei den Umsätzen sowohl mit combi-CLEAs als auch ganzen Zellen wurde mit einer Inhibierung der Hydrolyse-Aktivität der Nitrilase aus *P. fluorescens* durch HCN erklärt (Chmura, 2010).

Ob die angesprochene Inhibierung der Nitrilase-Aktivität in den rekombinanten *E. coli* Zellen auf HCN oder Benzaldehyd zurückzuführen war, wurde in der vorliegenden Arbeit in separaten Versuchen ermittelt. Eine Inaktivierung des Enzyms durch Mandelonitril wurde bereits von Rustler et al. (2007) untersucht, wobei die Anwesenheit von ≥ 150 mM MN im Umsatzpuffer die Enzymaktivität in ganzen Zellen deutlich reduzierte.

Die 30-minütige Inkubation von *E. coli* JM109(pIK9) mit HCN ergab, dass eine HCN-Konzentration von 340 mM einen Abfall der Nitrilase-Aktivität auf 50 % gegenüber der Aktivität in Abwesenheit von Cyanwasserstoff verursachte (Kapitel 3.7.2). Das Amid/Säure-Verhältnis wurde durch die verschiedenen Cyanidkonzentrationen bei diesen Untersuchungen nur geringfügig beeinflusst. Ähnliche Versuche von Chmura (2010) zur Inhibierung der Nitrilase aus *P. fluorescens* durch HCN in combi-CLEAs ergaben für die immobilisierte Nitrilase eine Restaktivität von 55 % im 2-Phasensystem mit 70 % DIPE und 30 % Na-Citratpuffer (pH 5,5) nach 1-stündiger Inkubation in Gegenwart von 125 mM HCN. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass DIPE im 2-Phasensystem als Substratreservoir für HCN fungiert und die HCN-Konzentration in der wässrigen Phase folglich geringer war als im hier untersuchten rein wässrigen System. Werden in einem 2-Phasensystem aus DIPE und Puffer (pH 5) beispielsweise ca. 250 mM HCN in der organischen Phase vorgelegt, beträgt die max. Löslichkeit von HCN in der wässrigen Phase lediglich ca. 75 mM (Bauer et al., 2002). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Nitrilase in ganzen Zellen offenbar etwas besser gegenüber HCN geschützt war als in immobilisierter Form in den combi-CLEAs.

Die 30-minütige Inkubation von *E. coli* JM109(pIK9) mit Benzaldehyd ergab, dass die *Pseudomonas* Nitrilase wesentlich stärker durch Benzaldehyd gehemmt wurde als durch Blausäure, da bereits eine Aldehydkonzentration von lediglich 25 mM einen Aktivitätsverlust von etwa 50 % zur Folge hatte (Kapitel 3.7.3). Die ausgesprochen starke Toxizität von Benzaldehyd wurde bereits bei der Biotransformation von Benzoylformiat in Benzaldehyd und CO₂ durch ganze Zellen von *Pseudomonas putida* ATCC 12633 beobachtet. Hier wurde ein kompletter Aktivitätsverlust bei einer Benzaldehydkonzentration von 20 mM festgestellt (Simmonds und Robinson, 1998).

Im Vergleich zu dem in der vorliegenden Arbeit eingesetzten rein wässrigen System war der durch Benzaldehyd verursachte Aktivitätsverlust bei der in Form von combi-CLEAs immobilisierten Nitrilase im 2-Phasensystem mit 70 % DIPE gering (80 % Restaktivität in Gegenwart von 500 mM Benzaldehyd) (Chmura, 2010). Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen rein wässrigem und 2-Phasensystem sind, ähnlich wie im vorangegangenen Kapitel für den Umsatz von Acetophenon beschrieben, den unterschiedlichen Reaktionsbedingungen geschuldet, da DIPE auch als Substratreservoir für Benzaldehyd fungiert und daher toxische Substratkonzentrationen in der Puffer-Phase bei den Untersuchungen von Chmura (2010) offensichtlich nicht erreicht wurden. Benzaldehyd inhibierte jedoch nicht nur die Nitrilase, sondern schädigte darüber hinaus den Wirtstamm bereits in geringen Konzentrationen (25 mM) nachhaltig (Kapitel 3.7.4). Eine verminderte Aktivität bzw. Überlebensfähigkeit von mikrobiellen Zellen in Gegenwart von Benzaldehyd (ca. 30 mM) wurde auch für *Zymomonas mobilis* und *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Li et al., 2006; Long und Ward, 1989). So nahm die metabolische Aktivität bei der Herstellung von Feinchemikalien (Ben-

zylalkohol aus Benzaldehyd) mit Hilfe von Suspensionen von *Zymomonas mobilis* in nur 15 min auf 70 % der anfänglichen Aktivität ab und am Ende der 3-stündigen Inkubationszeit betrug die Restaktivität nicht mehr als 10 % (Li et al., 2006). Bei der Biotransformation von Benzaldehyd und Pyruvat zu Phenylacetylcarbinol durch Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* wurde beobachtet, dass mit zunehmender Benzaldehydkonzentration die Wachstumsrate der Hefe zunächst reduziert (0,5 g/l), dann gehemmt (1-2 g/l) und schließlich auch die Überlebensfähigkeit der Zellen reduziert wurde (3 g/l, entsprechen 28 mM) (Long und Ward, 1989). Im Hinblick auf den Wirkmechanismus von Benzaldehyd auf *S. cerevisiae* konnte durch den Vergleich der intra- und extrazellulären Substratkonzentration gezeigt werden, dass bei hohen Benzaldehydkonzentrationen (> 50 mM) die Permeabilität der Zellmembranen verändert war, da die intrazelluläre Konzentration an Benzaldehyd den extrazellulären Level überstieg (Long und Ward, 1989). Dagegen war bei niedrigen Aldehydkonzentrationen im Medium (< 20 mM) die extrazelluläre Konzentration an Benzaldehyd höher als innerhalb der Zellen. Diese Beobachtung lässt sich nicht durch freie Diffusion erklären und legt nahe, dass sich Benzaldehyd in den Zellen durch Assoziation mit intrazellulären Lipiden oder anderen Zellbestandteilen anreichern kann (Long und Ward, 1989). Für *E. coli* wurde bereits in den 70er Jahren nachgewiesen, dass radioaktiv-markiertes Benzaldehyd an Proteine der äußeren Membran sowie der Cytoplasmamembran bindet, wobei Aldehyde Schiff'sche Basen mit den freien Amino-Gruppen von Proteinen bilden und mit Sulfhydryl-Gruppen reagieren können (Sakaguchi et al., 1979). Möglicherweise führte dies zu der beobachteten Veränderung der Aufnahme verschiedener Aminosäuren in die Zellen, da Membranproteine bekanntermaßen eine wichtige Rolle beim Transport von Substraten spielen (Sakaguchi et al., 1979). Die Toxizität verschiedener substituierter Benzaldehyde gegenüber Bakterien aus den Gattungen *Salmonella*, *Listeria* und *Lactobacillus* beruht möglicherweise auf der Reaktion der Aldehyd-Carbonyl-Funktion mit den Sulfhydryl-Gruppen an der Oberfläche der Zellen, da ein Zusammenhang zwischen der Anzahl freier Thiol-Gruppen an der Zelloberfläche und der Sensitivität der Bakterien gegenüber substituierten Benzaldehyden nachgewiesen werden konnte (Ramos-Nino et al., 1998). Die Reihenfolge der Empfindlichkeit gegenüber den untersuchten Benzaldehyden (*Salmonella* > *Listeria* > *Lactobacillus*) korrelierte mit der Anzahl der verfügbaren Sulfhydryl-Gruppen, welche bei *Salmonella* am höchsten ist (Ramos-Nino et al., 1998).

Neben dem Einfluss hoher Substratkonzentrationen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zudem der Effekt von hohen Produktkonzentrationen (Mandelsäure) auf das Überleben des Wirtstammes untersucht. Während die Zellzahl bei Inkubation mit 100 mM Mandelsäure (bzw. 300 mM NaCl) innerhalb der 6-stündigen Versuchszeit kaum abnahm, hatte der Zusatz von Mandelsäure in Konzentrationen von 200 und 300 mM ein Absterben der Zellen zur Folge (Kapitel 3.7.5). Nach 6 Stunden Inkubation konnten nach Zugabe von 200 mM Mandelsäure noch 1,5 % und nach Zugabe von 300 mM Mandelsäure noch 0,001 % der ursprünglich eingesetzten Zellen nachgewiesen werden. Im Hinblick auf die angestrebte Biotransformation sollte dies jedoch wenig Einfluss haben, da hierbei ein schneller Umsatz erforderlich ist, um Produkte mit hoher optischer Reinheit zu erhalten. Allerdings würde ein schnelles Absterben der Zellen unter Prozessbedingungen eine Wiederverwertung des Biokatalysators ausschließen.

4.11 Ionische Flüssigkeiten

Der Umsatz hoher Substratkonzentrationen durch die rekombinanten *E. coli* Stämme war in wässrigen Medien aufgrund der Toxizität von Benzaldehyd nicht möglich. Eine gängige Methode in der Biokatalyse zur Vermeidung toxischer Substratkonzentrationen ist die Prozessführung in 2-Phasensystemen. Im Hinblick auf die Ganzzellkatalyse in einem biphasischen Prozess sind zwei Attribute von entscheidender Bedeutung: zum einen der Verteilungskoeffizient und zum anderen die Biokompatibilität der organischen Phase. Hierbei gibt der Verteilungskoeffizient ($\log D$) der Substrate und Produkte zwischen den nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten Aufschluss darüber, inwieweit/ob das entsprechende Lösemittel als Eduktreservoir bzw. *in-situ*-Extraktionsmittel geeignet ist.

Im Gegensatz zu den zahlreichen *in-vitro* Studien unter Verwendung von ILs existierten zum Zeitpunkt der experimentellen Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit nur wenige Veröffentlichungen zur Ganzzellbiokatalyse in Gegenwart von ionischen Flüssigkeiten (Bräutigam et al., 2007a; Gangu et al., 2009). Die Mehrzahl dieser Studien beschrieb die (häufig asymmetrische) Reduktion von Ketonen (durch verschiedene Hefen) (Gangu et al., 2009). Bis heute stellt diese Biotransformation den größten Anteil an Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der Ganzzellbiokatalyse mithilfe von ILs (Egorova und Ananikov, 2018).

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene ILs (BMim PF₆, BMpl NTf₂ und BMim NTf₂) ausgewählt, sowie die organischen Lösemittel Heptan und Oktan vergleichend untersucht. Hierbei war das Ziel, Substratkonzentrationen von mehreren 100 mM in der organischen Phase bereitzustellen ohne gleichzeitig eine toxische Substratkonzentration in der wässrigen Phase zu erreichen. Dies erforderte, dass die ILs und organischen Lösemittel $\log D$ -Werte von mindestens 2 aufwiesen (Pfruender et al., 2006; Bräutigam et al., 2007b; Kragl et al., 2003). Für Benzaldehyd wurde dieses Kriterium von den ILs BMim PF₆ und BMpl NTf₂ erfüllt (Kap. 3.8.2). Die organischen Lösemittel Heptan und Oktan waren mit $\log D$ -Werten von 1,08 bzw. 1,06 hingegen nicht in der Lage, unter den gewählten Reaktionsbedingungen toxische Benzaldehydkonzentrationen in der Puffer-Phase zu vermeiden, da im Gleichgewichtszustand noch 25 - 26 % des Aldehyds in der wässrigen Phase verblieben (Kap. 3.8.2). Zudem war eine Extraktion von HCN in diese Lösemittel nicht möglich. Dieses Beispiel illustriert die Problematik beim Auffinden alternativer Reaktionsmedien für die Ganzzellkatalyse. Organische Lösemittel müssen apolar/hydrophob sein, um toxische Effekte auf den Biokatalysator möglichst auszuschließen. Sollen eher polare bis moderat/mäßig polare Substrate bei der Ganzzellbiokatalyse umgesetzt werden, schließt dies eine gute Löslichkeit der Substanzen in den organischen Lösemitteln jedoch aus.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Biokompatibilität der ionischen Flüssigkeiten BMim PF₆ und BMpl NTf₂ ergaben, dass die ILs im Vergleich zu dem bei Oxynitri-lase katalysierten Reaktionen im zellfreien System häufig eingesetzten Lösemittel Diisopropylether wesentlich biokompatibler sind (Kap. 3.8.3). Während sich Wasser-mischbare ILs vielfach durch eine hohe Biokompatibilität auszeichnen, sind die Literatur-Angaben zu den Auswirkungen von nicht mit Wasser mischbaren ionischen Flüssigkeiten auf Zellen von *E. coli* im Hinblick auf deren Toxizität teilweise widersprüchlich (Wood et al., 2011; Egorova und Ananikov, 2018). Einerseits wurde berichtet, dass ionische Flüssigkeiten, wie z.B. BMim PF₆ oder BMim NTf₂, bereits in ge-

ringen Konzentrationen (0,1 - 0,7 %, v/v) das Wachstum von *E. coli* stark beeinträchtigen und folglich eine antimikrobielle Wirkung besitzen (Ganske und Bornscheuer, 2006; Cornmell et al., 2008; Lee et al., 2005; Egorova und Ananikov, 2018; Pernak et al., 2003; Samorì, 2011). Andererseits wurde von Pfruender et al. (2006) mit Ruhezellen von *E. coli* gezeigt, dass bei Inkubation mit 20 % (v/v) BMim PF₆ oder BMim NTf₂ im Vergleich zur Inkubation im rein wässrigen System die Membranintegrität des Stammes nicht negativ beeinflusst wurde und die ILs die Lebensfähigkeit der Zellen nicht beeinträchtigten. In einer anderen Studie beeinflusste BMim PF₆ die Zellmembran von *E. coli* zwar etwas stärker, nach 5 h Inkubation in einem biphasischen System bestehend aus Puffer und 20 % (v/v) IL verfügten aber noch 70 % der Zellen über eine intakte Membran im Vergleich zu 95 % im rein wässrigen System (Bräutigam et al., 2007b).

Die Ergebnisse der Biokompatibilitäts-Studien sind offensichtlich abhängig von der verwendeten Testmethode und müssen demnach an die eigenen Bedürfnisse/Art der Biotransformation angepasst werden. Soll eine Kultivierung von Zellen in Gegenwart von ILs durchgeführt werden, ist die Bestimmung der minimalen Inhibitorkonzentration (MIC) oder mittleren effektiven Konzentration (EC₅₀) erforderlich. Im Falle von Biotransformationen mit ganzen Zellen ist hingegen die Bestimmung der Viabilität/Überlebensfähigkeit der Zellen durch Plattieren oder kommerzielle Testsysteme sinnvoll, wie beispielsweise dem LIVE/DEAD *BacLight* Testkit (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Hierbei werden zwei verschiedene Nukleinsäurefärbungen genutzt, um lebende Bakterien mit intakten Plasmamembranen schnell von toten Bakterien mit beeinträchtigten Membranen zu unterscheiden.

Ein Vergleich des Umsatzes von Benzaldehyd und HCN im rein wässrigen Medium bzw. im 2-Phasensystem mit BMpl NTf₂ zeigte, dass der „bienzymatische Ganzzellkatalysator“ auch in Gegenwart der ionischen Flüssigkeit aktiv war, die Biotransformation jedoch mindestens 20-mal langsamer ablief als im rein wässrigen System (Kap. 3.8.4). Benzaldehyd lag bei dieser Untersuchung in der wässrigen Phase gemäß dem zugehörigen Verteilungskoeffizienten in einer Konzentration von etwa 0,4 mM vor, da BMpl NTf₂ als Substratreservoir fungiert. Die Oxynitrilase aus *M. esculenta* zeigte für Benzaldehyd einen K_m-Wert von 5,9 mM (Guterl et al., 2009). Die deutlich geringere Reaktionsrate in Gegenwart von BMpl NTf₂ könnte demnach darauf zurückzuführen sein, dass die in der wässrigen Phase vorliegende Benzaldehydkonzentration deutlich unter dem K_m-Wert der Oxynitrilase lag. Erstaunlicherweise war der durch den Ganzzellkatalysator gebildete Amidanteil in Gegenwart der ionischen Flüssigkeit deutlich höher als bei der Prozessführung in reinem Na-Citratpuffer. Hohe HCN-Konzentrationen konnten für die verstärkte Amidbildung nicht verantwortlich sein (vgl. Kap. 4.10), da unter Berücksichtigung des Phasenverhältnisses von 1 zu 4 (20 % IL und 80 % Puffer) max. 20 mM Blausäure in der wässrigen Phase vorliegen konnten, was der HCN-Konzentration bei der Prozessführung in reinem Citratpuffer entsprach. Der hohe Amidanteil war daher eindeutig auf die Anwesenheit von BMpl NTf₂ beim Umsatz zurückzuführen.

Voraussetzung für die beobachtete Veränderung der Reaktionsspezifität der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 muss eine Interaktion der ionischen Flüssigkeit mit dem Enzym und damit ein direkter Kontakt sein. Die Kationen von ionischen Flüssigkeiten (wie beispielsweise BMim⁺) können sich innerhalb weniger Nanosekunden in die Phospholipiddoppelschicht der Zellmembran einlagern (Benedetto und Ballone, 2016; Benedetto, 2017). Dieser Vorgang wird durch die Coulomb-Anziehungskraft zwischen der positiven Ladung des Kations und den elektronegativen Sauerstoff-

atomen in der Lipidkopfregion angetrieben und durch Van-der-Waals-Kräfte zwischen den hydrophoben Resten des Kations und den Phospholipidschwänzen stabilisiert (Benedetto, 2017). ILs können hierdurch die Membranpermeabilität verändern und sogar die gesamte Membran zerstören. Im ersten Fall stören ILs indirekt die biochemischen Gradienten zwischen der extrazellulären Umgebung und dem Cytoplasma und induzieren entweder die Diffusion des intrazellulären Inhalts aus der Zelle heraus oder das Eindringen von extrazellulärem Material in das Cytoplasma (Kumari et al., 2020). Aufgrund ihrer Wechselwirkungen mit den Zellmembranen vermögen ILs neben der bereits erwähnten Veränderung der Membranpermeabilität auch auf weiteren Wegen in das Innere der Zelle zu gelangen. Insbesondere können sie, sobald sie in die äußere Membran diffundiert sind, „kippen“ und dann in das Cytoplasma diffundieren (Kumari et al., 2020). Zusätzlich können ILs über Membran-gebundene Transporterproteine (z.B. Flippasen) und Proteinkanäle (z.B. Porine) das Zellinnere erreichen (Yu et al., 2016; Modi et al., 2011). ILs können in der Folge direkt mit cytoplasmatischen Proteinen und Enzymen interagieren und deren Struktur beeinflussen (Kumar et al., 2017; Kumari et al., 2020; Bui-Le et al., 2020). Bezogen auf die oben angesprochenen Ergebnisse wäre denkbar, dass die ionische Flüssigkeit bzw. BMpl⁺ zunächst die Membran der *E. coli* Zellen überwand und anschließend im Cytoplasma mit der Nitrilase interagierte (z.B. über eine Konformationsänderung oder teilweise Inhibierung des Enzyms), was in der Folge zu einer verstärkten Amidbildung führte.

Beim Umsatz hoher Substratkonzentrationen (0,7 M Benzaldehyd, 1,4 M HCN) im 2-Phasensystem mit BMpl NTf₂ war die Biotransformation bereits nach 150 min beendet (100 % Umsatz) und Mandelsäure sowie Mandelamid wurden mit ee-Werten von jeweils 95 % bzw. 99 % durch *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) gebildet (Kap. 3.8.6). Der relative Amidanteil war hierbei mit 72 % noch etwas höher als bei der Prozessführung im rein wässrigen System mit vergleichbaren Substratkonzentrationen (63 %). Die noch höheren Amidanteile beim Umsatz hoher Substratkonzentrationen können möglicherweise auf eine Kombination der Interaktion von BMpl NTf₂ mit der Nitrilase und der teilweisen Inhibierung der Hydrolyse-Aktivität des Enzyms durch HCN zurückgeführt werden, da (wie bereits in Kapitel 4.10 diskutiert) die Zunahme im Amid/Säure-Verhältnis mit einer durch HCN verursachten Abnahme der Nitrilase-Aktivität einherging.

Bei Verwendung von BMim PF₆ als Lösemittelphase wurden ähnlich hohe Enantiomerenüberschüsse für Mandelsäure und Mandelamid erzielt wie bei der Biotransformation mit BMpl NTf₂; der Umsatz war mit 87 % trotz größerer Biokompatibilität von BMim PF₆ jedoch etwas geringer (Kap. 3.8.7). Insbesondere fiel auf, dass nach einer Inkubationszeit von einer Stunde das Intermediat der Reaktion (Mandelonitril) von der Nitrilase-Aktivität des Ganzzellkatalysators nur noch geringfügig weiter zu Mandelsäure und Mandelamid hydrolysiert wurde. Dies lag zumindest teilweise daran, dass die Nitrilase-Aktivität von *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) durch die ionische Flüssigkeit gehemmt wurde. Ob auch die Oxynitrilase-Aktivität durch BMim PF₆ gehemmt wurde, lässt sich mit den durchgeführten Untersuchungen nicht eindeutig klären, da bei einer Akkumulation von Mandelonitril die enzymatische Rückreaktion der Oxynitrilase (Spaltung von Mandelonitril in Benzaldehyd und HCN) berücksichtigt werden muss, während die Rückreaktion im Falle der sofortigen Umsetzung von Mandelonitril in Mandelsäure bzw. Mandelamid durch die Nitrilase keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt.

In Gegenwart von BMim PF₆ verlief der Umsatz zudem langsamer als bei den ILs mit NTf₂ Anion

(vgl. Umsätze nach einer Stunde Inkubation, Kap. 3.8.6, 3.8.7 und 3.8.9). Ursache hierfür ist möglicherweise die deutlich höhere Viskosität von BMim PF₆ im Vergleich zu BMpl NTf₂ und BMim NTf₂ (vgl. Tab. A.1), da eine hohe Viskosität der Lösemittel zu Limitierungen im Stofftransport führt und dadurch eine niedrigere Reaktionsgeschwindigkeit zu erwarten ist (Huddleston et al., 2001; Yang und Pan, 2005).

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die ionischen Flüssigkeiten im Hinblick auf die angestrebte Biotransformation zwei Vorteile aufweisen. Zum einen konnten toxische Benzaldehydkonzentrationen in der wässrigen Phase aufgrund der ILs vermieden werden. Zum anderen waren die ILs deutlich biokompatibler als DIPE, welches das traditionelle Lösemittel für Oxynitrilase-katalysierte Reaktionen darstellt. Die Kombination dieser Vorteile erlaubte die bienzymatische Darstellung von synthetisch relevanten Mengen an Mandelsäure und Mandelamid in kurzer Zeit mit hohen Enantiomerenüberschüssen.

Literaturverzeichnis

- Adelberg, E., Mandel, M., und Chein Ching Chen, G. Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 18(5-6):788–795, 1965.
- Akbari, F., Alavianmehr, M. M., Mohammad-Aghaie, D., und Ardakani, R. B. Thermophysical properties of ionic liquids and their mixtures from a new equation of state. *Ionics*, 24(5):1357–1369, 2018.
- Aki, S. N. V. K., Brennecke, J. F., und Samanta, A. How polar are room-temperature ionic liquids? *Chemical Communications*, 5:413–414, 2001.
- Andexer, J., von Langermann, J., Mell, A., Bocola, M., Kragl, U., Eggert, T., und Pohl, M. An R-selective hydroxynitrile lyase from *Arabidopsis thaliana* with an α/β -hydrolase fold. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(45):8679–8681, 2007.
- Andrade, J., Karmali, A., Carrondo, M. A., und Frazão, C. Structure of amidase from *Pseudomonas aeruginosa* showing a trapped acyl transfer reaction intermediate state. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(27):19598–19605, 2007.
- Anthony, J. L., Maginn, E. J., und Brennecke, J. F. Solution thermodynamics of imidazolium-based ionic liquids and water. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(44):10942–10949, 2001.
- Aono, R., Kobayashi, H., Joblin, K. N., und Horikoshi, K. Effects of organic solvents on growth of *Escherichia coli* K-12. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(11):2009–2014, 1994.
- Arshad, R., Farooq, S., und Ali, S. S. Effect of mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on expression of penicillin G acylase and β -lactamase in wild-type *Escherichia coli* strains. *Annals of Microbiology*, 60(4):645–652, 2010.
- Atlung, T., Christensen, B. B., und Hansen, F. G. Role of the rom protein in copy number control of plasmid pBR322 at different growth rates in *Escherichia coli* K-12. *Plasmid*, 41(2):110–119, 1999.
- Baker-Austin, C. und Dopson, M. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in Microbiology*, 15(4):165–171, 2007.
- Bandyopadhyay, A. K., Nagasawa, T., Asano, Y., Fujishiro, K., Tani, Y., und Yamada, H. Purification and characterization of benzonitrilases from *Arthrobacter sp.* Strain J-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(2):302–306, 1986.

- Banerjee, A., Sharma, R., und Banerjee, U. C. The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(1-2):33–44, 2002.
- Barglow, K. T., Saikatendu, K. S., Bracey, M. H., Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., Stevens, R. C., und Cravatt, B. F. Functional proteomic and structural insights into molecular recognition in the nitrilase family enzymes. *Biochemistry*, 47(51):13514–13523, 2008.
- Bauer, M., Geyer, R., Griengl, H., und Steiner, W. Enzyme kinetics of an (*S*)-hydroxynitrile lyase. *Food Technology and Biotechnology*, 40(1):9–19, 2002.
- Baum, S., Williamson, D. S., Sewell, T., und Stolz, A. Conversion of sterically demanding α,α -disubstituted phenylacetonitriles by the arylacetonitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191. *Applied Environmental Microbiology*, 78(1):48–57, 2012.
- Bell, E. L., Finnigan, W., France, S. P., Green, A. P., Hayes, M. A., Hepworth, L. J., Lovelock, S. L., Niikura, H., Osuna, S., Romero, E., Ryan, K. S., Turner, N. J., und Flitsch, S. L. Biocatalysis. *Nature Reviews Methods Primers*, 1:46, 2021.
- Benedetto, A. Room temperature ionic liquids meet bio-membranes: the state-of-the-art. *Biophysical Reviews*, 9(4):309–320, 2017.
- Benedetto, A. und Ballone, P. Room temperature ionic liquids meet biomolecules: a microscopic view of structure and dynamics. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4(2):392 – 412, 2016.
- Benz, P., Muntwyler, R., und Wohlgemuth, R. Chemoenzymatic synthesis of chiral carboxylic acids via nitriles. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82(12):1087–1098, 2007.
- Bernot, R. J., Kennedy, E. E., und Lamberti, G. A. Effects of ionic liquids on the survival, movement, and feeding behavior of the freshwater snail, *Physa acuta*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(7):1759–1765, 2005.
- Bhalla, T. C., Miura, A., Wakamoto, A., Ohba, Y., und Furuhashi, K. Asymmetric hydrolysis of α -aminonitriles to optically active amino acids by a nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* PA-34. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(2):184–190, 1992.
- Bühler, H., Effenberger, F., Förster, S., Roos, J., und Wajant, H. Substrate specificity of mutants of the hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta*. *ChemBioChem*, 4(2-3):211–216, 2003.
- Bondi, A. Van der Waals volumes and radii. *The Journal of Physical Chemistry*, 68(3):441–451, 1964.
- Boros, I., Posfai, G., und Venetianer, P. High-copy-number derivatives of the plasmid cloning vector pBR322. *Gene*, 30(1-3):257–260, 1984.
- Bracco, P., Busch, H., von Langermann, J., und Hanefeld, U. Enantioselective synthesis of cyanohydrins catalysed by hydroxynitrile lyases – a review. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 14(27):6375–6389, 2016.

- Brenner, C. Catalysis in the nitrilase superfamily. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(6): 775–782, 2002.
- Brunel, J.-M. und Holmes, I. P. Chemically catalyzed asymmetric cyanohydrin syntheses. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(21):2752–2778, 2004.
- Brunner, S., Eppinger, E., Fischer, S., Gröning, J., und Stolz, A. Conversion of aliphatic nitriles by the arylacetonitrilase from *P. fluorescens* EBC191. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(7):91–106, 2018.
- Bräutigam, S., Dennewald, D., Schürmann, M., Lutje-Spelberg, J., Pitner, W.-R., und Weuster-Botz, D. Process intensification of whole-cell biocatalysis with ionic liquids. *The Chemical Record*, 7(6):334–340, 2007a.
- Bräutigam, S., Bringer-Meyer, S., und Weuster-Botz, D. Asymmetric whole cell biotransformations in biphasic ionic liquid/water-systems by use of recombinant *Escherichia coli* with intracellular cofactor regeneration. *Tetrahedron: Asymmetry*, 18(16):1883–1887, 2007b.
- Bui-Le, L., Clarke, C. J., Bröhl, A., Brogan, A. P. S., Arpino, J. A. J., Polizzi, K. M., und Hallett, J. P. Revealing the complexity of ionic liquid–protein interactions through a multi-technique investigation. *Communications Chemistry*, 3:55, 2020.
- Cabirol, L. F. Hydroxynitrile lyase-catalyzed enantioselective conversion of ketones into cyanohydrins. *Dissertation, Technische Universität Delft, Niederlande*, 2010.
- Cai, W., Su, E., Zhu, S., Ren, Y., und Wei, D. Characterization of a nitrilase from *Arthrobacter aurescens* CYC705 for synthesis of iminodiacetic acid. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 60(6):207–214, 2014.
- Camps, M. Modulation of ColE1-like plasmid replication for recombinant gene expression. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 4:58–73, 2010.
- Carmichael, A. J. und Seddon, K. R. Expanding the polarity range of ionic liquids. *Tetrahedron Letters*, 43(26):4657–4659, 2000.
- Caspar, J. und Spitteller, P. A free cyanohydrin as arms and armour of *Marasmius oreades*. *ChemBioChem*, 16(4):570–573, 2015.
- Castagnoli, L., Lacatena, R., und Cesareni, G. Analysis of dominant copy number mutants of the plasmid pMB1. *Nucleic Acids Research*, 13(14):5353–5367, 1985.
- Chen, C.-Y., Chiu, W.-C., Liu, J.-S., Hsu, W.-H., und Wang, W.-C. Structural basis for catalysis and substrate specificity of *Agrobacterium radiobacter* N-carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28):26194–26201, 2003.
- Chen, J., Zheng, R.-C., Zheng, Y.-G., und Shen, Y.-C. Microbial transformation of nitriles to high-value acids or amides. In *Biotechnology in China I*, volume 113 of *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, pages 33–77. Springer Berlin / Heidelberg, 2009.

- Chhiba-Govindjee, V. P., van der Westhuyzen, C. W., Bode, M. L., und Brady, D. Bacterial nitrilases and their regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(11):4679–4692, 2019.
- Chin, K.-H., Tsai, Y.-D., Chan, N.-L., Huang, K.-F., Wang, A. H.-J., und Chou, S.-H. The crystal structure of XC1258 from *Xanthomonas campestris*: A putative procaryotic Nit protein with an arsenic adduct in the active site. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 69(3): 665–671, 2007.
- Chmura, A. A sustainable, two-enzyme, one-pot procedure for the synthesis of enantiomerically pure α -hydroxy acids. *Dissertation, Technische Universität Delft, Niederlande*, 2010.
- Chmura, A., van der Kraan, G. M., Kielar, F., van Langen, L. M., van Rantwijk, F., und Sheldon, R. A. Cross-linked aggregates of the hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta*: highly active and robust biocatalysts. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 348(12-13):1655–1661, 2006.
- Choi, M. C., Chan, S., und Matsumoto, K. Catalytic asymmetric synthesis of (*S*)-acetophenone cyanohydrin under high pressure. *Tetrahedron Letters*, 38(38):6669–6672, 1997.
- Conradt, D. Isolierung des Nitrilasegens aus *Pseudomonas fluorescens* EBC191 und Expression in *E. coli*. *Diplomarbeit, Universität Stuttgart*, 1997.
- Cornmell, R. J., Winder, C. L., Schuler, S., Goodacre, R., und Stephens, G. Using a biphasic ionic liquid/water reaction system to improve oxygenase-catalysed biotransformation with whole cells. *Green Chemistry*, 10(6):685–691, 2008.
- Costes, D., Wehtje, E., und Adlercreutz, P. Hydroxynitrile lyase-catalyzed synthesis of cyanohydrins in organic solvents: Parameters influencing activity and enantiospecificity. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(3-5):384–391, 1999.
- Dai, A.-D., Tang, X.-L., Wu, Z.-M., Tang, J.-T., Zheng, R.-C., und Zheng, Y.-G. Rational regulation of reaction specificity of nitrilase for efficient biosynthesis of 2-chloronicotinic acid through a single site mutation. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(5):e0239721, 2022.
- Davis, F., Ulatowski, T. G., und Haque, M. S. Asymmetric oxidation of chiral enolates in the preparation of acyclic tertiary α -hydroxy amides in high optical purity. *The Journal of Organic Chemistry*, 52(23):5288–5290, 1987.
- DeLano, W. The PyMOL Molecular Graphics System. 2002.
- Dennett, G. V. und Blamey, J. M. A new thermophilic nitrilase from an antarctic hyperthermophilic microorganism. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4:article 5, 2016.
- Dent, K., Weber, B., Benedik, M., und Sewell, B. T. The cyanide hydratase from *Neurospora crassa* forms a helix which has a dimeric repeat. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(2): 271–278, 2009.
- Dhillon, J. K. und Shivaraman, N. Biodegradation of cyanide compounds by a *Pseudomonas* species (S1). *Canadian Journal of Microbiology*, 45(3):201–208, 1999.

- Dhillon, J. K., Chhatre, S., Shanker, R., und Shivaraman, N. Transformation of aliphatic and aromatic nitriles by a nitrilase from *Pseudomonas* sp. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(10):811–815, 1999.
- Docherty, K. M. und Kulpa, C. F. J. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. *Green Chemistry*, 7(4):185–189, 2005.
- Effenberger, F. Synthese und Reaktionen optisch aktiver Cyanhydrine. *Angewandte Chemie*, 106(15-16):1609–1619, 1994.
- Effenberger, F., Ziegler, T., und Förster, S. Enzyme-catalyzed cyanohydrin synthesis in organic solvents. *Angewandte Chemie International Edition*, 26(5):458–460, 1987.
- Effenberger, F., Förster, S., und Wajant, H. Hydroxynitrile lyases in stereoselective catalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(6):532–539, 2000.
- Egorova, K. S. und Ananikov, V. P. Ionic liquids in whole-cell biocatalysis: a compromise between toxicity and efficiency. *Biophysical Reviews*, 10(3):881–900, 2018.
- Feichter, C., Faber, K., und Griengl, H. Chemoenzymatic preparation of atrolactic and mosher's acid using *Aspergillus oryzae* protease. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 3:653–654, 1991.
- Fernandes, B. C., Mateo, C., Kiziak, C., Chmura, A., Wacker, J., van Rantwijk, F., Stolz, A., und Sheldon, R. A. Nitrile hydratase activity of a recombinant nitrilase. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 348(18):2597–2603, 2006.
- Flieger, J. und Flieger, M. Ionic liquids toxicity - benefits and threats. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17):6267, 2020.
- Foster, J. W. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews Microbiology*, 2(11):898–907, 2004.
- Fournand, D., Bigey, F., und Arnoud, A. Acyl transfer activity of an amidase from *Rhodococcus* sp. strain R312: formation of a wide range of hydroxamic acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8):2844–2852, 1998.
- Förster, S., Roos, J., Effenberger, F., Wajant, H., und Sprauer, A. Über die erste rekombinante Hydroxynitril-Lyase und ihre Anwendung in der Synthese von (*S*)-Cyanhydrinen. *Angewandte Chemie*, 108(4):493–494, 1996.
- Gaisberger, R. P., Fechter, M. H., und Griengl, H. The first hydroxynitrile lyase catalysed cyanohydrin formation in ionic liquids. *Tetrahedron: Asymmetry*, 15(18):2959–2963, 2004.
- Gangu, S. A., Weatherley, L. R., und Scurto, A. M. Whole-cell biocatalysis with ionic liquids. *Current Organic Chemistry*, 13(13):1242–1258, 2009.
- Ganske, F. und Bornscheuer, U. Growth of *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* and *Bacillus cereus* in the presence of the ionic liquids [BMIM][BF₄] and [BMIM][PF₆] and organic solvents. *Biotechnology Letters*, 28(7):465–469, 2006.

- Gao, X., Yang, X., Li, J., Zhang, Y., Chen, P., und Lin, Z. Engineered global regulator H-NS improves the acid tolerance of *E. coli*. *Microbial Cell Factories*, 17(1):118–131, 2018.
- García, I., Arenas-Alfonseca, L., Moreno, I., Gotor, C., und Romero, L. C. HCN regulates cellular processes through posttranslational modification of proteins by *S*-cyanylation. *Plant Physiology*, 179(1):107–123, 2019.
- Gassman, P. und Talley, J. Cyanohydrins - a general synthesis. *Tetrahedron Letters*, 19(40):3773–3776, 1978.
- Gavagan, J. E., DiCosimo, R., Eisenberg, A., Fager, S. K., Folsom, P. W., Hann, E. C., Schneider, K. J., und Fallon, R. D. A Gram-negative bacterium producing a heat-stable nitrilase highly active on aliphatic dinitriles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(5):654–659, 1999.
- Gong, J.-S., Lu, Z.-M., Li, H., Shi, J.-S., Zhou, Z.-M., und Xu, Z.-H. Nitrilases in nitrile biocatalysis: recent progress and forthcoming research. *Microbial Cell Factories*, 11(1):142–159, 2012.
- Gong, J.-S., Shi, J.-S., Lu, Z.-M., Li, H., Zhou, Z.-M., und Xu, Z.-H. Nitrile-converting enzymes as a tool to improve biocatalysis in organic synthesis: recent insights and promises. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(1):69–81, 2015.
- Gröger, H. Enzymatic routes to enantiomerically pure aromatic α -hydroxy carboxylic acids: a further example for the diversity of biocatalysis. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 343(6-7):547–558, 2001.
- Griengl, H., Klempier, N., Pöchlauer, P., Schmidt, M., Shi, N., und Zabelinskaja-Mackova, A. A. Enzyme catalysed formation of (*S*)-cyanohydrins derived from aldehydes and ketones in a biphasic solvent system. *Tetrahedron*, 54(48):14477–14486, 1998.
- Guterl, J.-K., Andexer, J. N., Sehl, T., von Langermann, J., Frindi-Wosch, I., Rosenkranz, T., Fitter, J., Gruber, K., Kragl, U., Eggert, T., und Pohl, M. Uneven twins: Comparison of two enantiocomplementary hydroxynitrile lyases with alpha/beta-hydrolase fold. *Journal of Biotechnology*, 141(3-4):166–173, 2009.
- Han, S., Lin, G., und Li, Z. Synthesis of (*R*)-cyanohydrins by crude (*R*)-oxynitrilase-catalyzed reactions in micro-aqueous medium. *Tetrahedron: Asymmetry*, 9(11):1835–1838, 1998.
- Hanefeld, U. Immobilisation of hydroxynitrile lyases. *Chemical Society Reviews*, 42(15):6203–6568, 2013.
- Hashimoto, H., Aoki, M., Shimizu, T., Nakai, T., Morikawa, H., Ikenaka, Y., Takahashi, S., und Sato, M. Crystal Structure of C171A/V236A Mutant of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase. *RCSB Protein Data Bank (1uf5)*, 2004.
- He, Y.-C., Zhang, Z.-J., Xu, J.-H., und Liu, Y.-Y. Biocatalytic synthesis of (*R*)-(-)-mandelic acid from racemic mandelonitrile by cetyltrimethylammonium bromide-permeabilized cells of *Alcaligenes faecalis* ECU0401. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37(7):741–750, 2010.

- Heinemann, U. Charakterisierung einer neuartigen Nitrilase aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Dissertation, Universität Stuttgart*, 2003.
- Heinemann, U., Engels, D., Bürger, S., Kiziak, C., Mattes, R., und Stolz, A. Cloning of a nitrilase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 and heterologous expression and characterization of the encoded protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8): 4359–4366, 2003.
- Holbrey, J. D., Rogers, R. D., Mantz, R. A., Trulove, P. C., Cocalia, V. A., Visser, A. E., Anderson, J. L., Anthony, J. L., Brennecke, J. F., Maginn, E. J., Welton, T., und Mantz, R. A. Chapter 3: Physicochemical properties. In *Ionic liquids in Synthesis, Second Edition*, pages 57–174. Wiley-VCH Verlag, 2008.
- Holt, J. und Hanefeld, U. Enantioselective enzyme-catalysed synthesis of cyanohydrins. *Current Organic Synthesis*, 6(1):15–37, 2009.
- Holtz, J. und Topal, M. Location of putative binding and catalytic sites of *NaeI* by random mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 269(44):27286–27290, 1994.
- Howden, A. J. M. und Preston, G. M. Nitrilase enzymes and their role in plant–microbe interactions. *Microbial Biotechnology*, 2(4):441–451, 2009.
- Howden, A. J. M., Harrison, C. J., und Preston, G. M. A conserved mechanism for nitrile metabolism in bacteria and plants. *The Plant Journal*, 57(2):243–253, 2009.
- Huddleston, J. G., Visser, A. E., Reichert, W. M., Willauer, H. D., Broker, G. A., und Rogers, R. D. Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. *Green Chemistry*, 3:156–164, 2001.
- Hung, C.-L., Liu, J.-H., Chiu, W.-C., Huang, S.-W., Hwang, J.-K., und Wang, W.-C. Crystal structure of *Helicobacter pylori* formamidase AmiF reveals a cysteine–glutamate–lysine catalytic triad. *Journal of Biological Chemistry*, 282(16):12220–12229, 2007.
- Jaeger, K. Gerichtete Evolution zur Optimierung von Enzymen. In *Angewandte Mikrobiologie*, pages 207–216. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006.
- Jallageas, J.-C., Arnaud, A., und Galzy, P. Bioconversions of nitriles and their applications. In *Advances in Biochemical Engineering, Volume 14*, pages 1–32. Springer Berlin / Heidelberg, 1980.
- Jandhyala, D., Berman, M., Meyers, P. R., Sewell, B. T., Willson, R. C., und Benedik, M. J. CynD, the cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus*: gene cloning and structural studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8):4794–4805, 2003.
- Jandhyala, D. M., Willson, R. C., Sewell, B. T., und Benedik, M. J. Comparison of cyanide-degrading nitrilases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(3):327–335, 2005.
- Janowitz, T., Trompetter, I., und Piotrowski, M. Evolution of nitrilases in glucosinolate-containing plants. *Phytochemistry*, 70(15-16):1680–1686, 2009.

- Kaplan, O., Vejvoda, V., Plíhal, O., Pompach, P., Kavan, D., Bojarová, P., Bezouška, K., Macková, M., Cantarella, M., Jirku, V., Křen, V., und Martínková, L. Purification and characterization of a nitrilase from *Aspergillus niger* K10. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(3):567–575, 2006.
- Kaplan, O., Bezouška, K., Malandra, A., Veselá, A. B., Petříčková, A., Felsberg, J., Rinágelová, A., Křen, V., und Martínková, L. Genome mining for the discovery of new nitrilases in filamentous fungi. *Biotechnology Letters*, 33(2):309–312, 2011a.
- Kaplan, O., Bezouška, K., Plíhal, O., Ettrich, R., Kulik, N., Vanek, O., Kavan, D., Benada, O., Malandra, A., Sveda, O., Vesela, A., Rinágelova, A., Slamova, K., Cantarella, M., Felsberg, J., Duskova, J., Dohnalek, J., Kotik, M., Křen, V., und Martínková, L. Heterologous expression, purification and characterization of nitrilase from *Aspergillus niger* K10. *BMC Biotechnology*, 11(1):2, 2011b.
- Kaufmann, I. Amplifikation, Sequenzierung und heterologe Expression des Nitrilase-Gens aus *Alcaligenes faecalis* ATCC8750 in *E. coli*. *Studienarbeit, Universität Stuttgart*, 1997.
- Kaul, P. und Banerjee, U. Predicting enzyme behavior in nonconventional media: correlating nitrilase function with solvent properties. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(7):713–720, 2008.
- Kaur, G., Soni, P., Tewari, R., und Sharma, R. Isolation and characterization of a nitrile-hydrolysing bacterium *Isoptericola variabilis* RGT01. *Indian Journal of Microbiology*, 54(2):232–238, 2014.
- Kaushik, S., Mohan, U., und Banerjee, U. Exploring residues crucial for nitrilase function by site directed mutagenesis to gain better insight into sequence-function relationships. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3(4):384–391, 2012.
- Kelly, C. L., Liu, Z., Yoshihara, A., Jenkinson, S. F., Wormald, M. R., Otero, J., Estévez, A., Kato, A., Marqvorsen, M. H. S., Fleet, G. W. J., Estévez, R. J., Izumor, K., und Heap, J. T. Synthetic chemical inducers and genetic decoupling enable orthogonal control of the *rhaBAD* promoter. *ACS Synthetic Biology*, 5(10):1136–1145, 2016.
- Kiljunen, E. und Kanerva, L. T. Approach to (*R*)- and (*S*)-ketone cyanohydrins using almond and apple meal as the source of (*R*)-oxynitrilase. *Tetrahedron: Asymmetry*, 8(10):1551–1557, 1997.
- Kim, J.-S., Tiwari, M. K., Moon, H.-J., Jeya, M., Ramu, T., Oh, D.-K., Kim, I.-W., und Lee, J.-K. Identification and characterization of a novel nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(2):273–283, 2009.
- Kimani, S. W., Agarkar, V. B., Cowan, D. A., Sayed, M. F.-R., und Sewell, B. T. Structure of an aliphatic amidase from *Geobacillus pallidus* RAPc8. *Acta Crystallographica Section D*, 63(10):1048–1058, 2007.

- Kiziak, C. Heterologe Produktion der Nitrilase aus *Pseudomonas fluorescens* EBC191 und chimärer Enzymvarianten in *E. coli* - Reinigung, Stabilisierung und biochemische Charakterisierung der Enzyme. *Diplomarbeit, Universität Stuttgart*, 1998.
- Kiziak, C. und Stolz, A. Identification of amino acid residues responsible for the enantioselectivity and amide formation capacity of the arylacetonitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17):5592–5599, 2009.
- Kiziak, C., Conradt, D., Stolz, A., Mattes, R., und Klein, J. Nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191: cloning and heterologous expression of the gene and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Microbiology*, 151(11):3639–3648, 2005.
- Kiziak, C., Klein, J., und Stolz, A. Influence of different carboxy-terminal mutations on the substrate-, reaction- and enantiospecificity of the arylacetonitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191. *Protein Engineering Design and Selection*, 20(8):385–396, 2007.
- Kobayashi, M., Yanaka, N., Nagasawa, T., und Yamada, H. Purification and characterization of a novel nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* K22 that acts on aliphatic nitriles. *Journal of Bacteriology*, 172(9):4807–4815, 1990.
- Kobayashi, M., Nagasawa, T., und Yamada, H. Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1. *European Journal of Biochemistry*, 182(2):349–356, 1989.
- Kobler, C. und Effenberger, F. Chemo enzymatic synthesis of rengyol and isorengyol. *Tetrahedron*, 62(20):4823–4828, 2006.
- Kragl, U., Eckstein, M., und Kaftzik, N. Chapter 8: Biocatalytic reactions in ionic liquids. In *Ionic liquids in Synthesis*, pages 336–346. Wiley-VCH Verlag, 2003.
- Kumar, A., Bisht, M., und Venkatesu, P. Biocompatibility of ionic liquids towards protein stability: A comprehensive overview on the current understanding and their implications. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 96:611–651, 2017.
- Kumaran, D., Eswaramoorthy, S., Gerchman, S. E., Kycia, H., Studier, F. W., und Swaminathan, S. Crystal structure of a putative CN hydrolase from yeast. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 52(2):283–291, 2003.
- Kumari, P., Pillai, V. V., und Benedetto, A. Mechanism of action of ionic liquids on living cells: the state of the art. *Biophysical Reviews*, 12(5):1187–1215, 2020.
- Kyte, J. und Doolittle, R. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1):105–132, 1982.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., und Veeger, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, 30(1):81–87, 1987.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, 1970.

- Lanfranchi, E., Steiner, K., Glieder, A., Hajnal, I., Sheldon, R. A., van Pelt, S., und Winkler, M. Mini-review: recent developments in hydroxynitrile lyases for industrial biotechnology. *Recent Patents on Biotechnology*, 7(3):197–206, 2013.
- Layh, N., Stolz, A., Förster, S., Effenberger, F., und Knackmuss, H.-J. Enantioselective hydrolysis of O-acetylmandelonitrile to O-acetylmandelic acid by bacterial nitrilases. *Archives of Microbiology*, 158(6):405–411, 1992.
- Layh, N., Stolz, A., Förster, S., Effenberger, F., und Knackmuss, H.-J. Characterization and partial purification of an enantioselective arylacetone nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* DSM 7155. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 5(5-6):467–474, 1998.
- Lee, S.-M., Chang, W.-J., Choi, A.-R., und Koo, Y.-M. Influence of ionic liquids on the growth of *Escherichia coli*. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 22(5):687–690, 2005.
- Legras, J. L., Chuzel, G., Arnaud, A., und Galzy, P. Natural nitriles and their metabolism. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6(2):83–108, 1990.
- León, R., Fernandes, P., Pinheiro, H., und Cabral, J. Whole-cell biocatalysis in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, 23(7-8):483–500, 1998.
- Li, C., Li, Y., Cheng, X., Feng, L., Xi, C., und Zhang, Y. Immobilization of *Rhodococcus rhodochrous* BX2 (an acetonitrile-degrading bacterium) with biofilm-forming bacteria for wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 131:390–396, 2012.
- Li, X. Z., Webb, J. S., Kjelleberg, S., und Rosche, B. Enhanced benzaldehyde tolerance in *Zygomonas mobilis* biofilms and the potential of biofilm applications in fine-chemical production. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2):1639–1644, 2006.
- Lidan, Y., Hua, Z., Zhi, L., und Jin Chuan, W. Improved acid tolerance of *Lactobacillus pentosus* by error-prone whole genome amplification. *Bioresource technology*, 135(10):459–463, 2013.
- Lide, D. R. Dissociation constants of organic acids and bases. In *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 90. Auflage, pages 8–48. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2009.
- Liese, A., Seelbach, K., und Wandrey, C. Chapter: Processes. In *Industrial Biotransformations, Second Edition*, pages 94–396. Wiley-VCH Verlag, 2006.
- Lin, G., Han, S., und Li, Z. Enzymatic synthesis of (*R*)-cyanohydrins by three (*R*)-oxynitrilase sources in micro-aqueous organic medium. *Tetrahedron*, 55(12):3531–3540, 1999.
- Lin-Chao, S., Chen, W., und Wong, T. High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. *Molecular Microbiology*, 6(22):3385–3393, 1992.
- Liu, Y. A code within the genetic code: codon usage regulates co-translational protein folding. *Cell Communication and Signaling*, 18(1):145, 2020.

- Liu, Z.-Q., Zhang, X.-H., Xue, Y.-P., Xu, M., und Zheng, Y.-G. Improvement of *Alcaligenes faecalis* nitrilase by gene site saturation mutagenesis and its application in stereospecific biosynthesis of (*R*)-(-)-mandelic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(20):4685–4694, 2014.
- Liu, Z., Zhao, H., Han, L., Cui, W., Zhou, L., und Zhou, Z. Improvement of the acid resistance, catalytic efficiency, and thermostability of nattokinase by multisite-directed mutagenesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(8):1833–1843, 2019.
- Long, A. und Ward, O. P. Biotransformation of benzaldehyde by *Saccharomyces cerevisiae*: Characterization of the fermentation and toxicity effects of substrates and products. *Biotechnology and Bioengineering*, 34(7):933–941, 1989.
- Loos, W. T., Geluk, H. W., Ruijken, M. M. A., Kruse, C. G., Brussee, J., und van Der Gen, A. Synthesis of optically active cyanohydrins using *R*-oxynitrilase in a liquid-liquid biphasic system: Part 1: An industrially useful procedure. *Biocatalysis and Biotransformation*, 12(4):255–266, 1995.
- Lou, W., Zong, M., und Smith, T. Use of ionic liquids to improve whole-cell biocatalytic asymmetric reduction of acetyltrimethylsilane for efficient synthesis of enantiopure (*S*)-1-trimethylsilylethanol. *Green Chemistry*, 8:147–155, 2006.
- Lucchesi, P., Carraway, M., und Marinus, M. G. Analysis of forward mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the bacteriophage P22 *mnt* repressor gene. *Journal of Bacteriology*, 166(1):34–37, 1986.
- Lundgren, S., Lohkamp, B., Andersen, B., Piskur, J., und Dobritzsch, D. The crystal structure of β -Alanine synthase from *Drosophila melanogaster* reveals a homooctameric helical turn-like assembly. *Journal of Molecular Biology*, 377(5):1544–1559, 2008.
- Luque-Almagro, V. M., Moreno-Vivián, C., und Roldán, M. D. Biodegradation of cyanide wastes from mining and jewellery industries. *Current Opinion in Biotechnology*, 38:9–13, 2016.
- Lévy-Schil, S., Soubrier, F., Coq, A.-M. C.-L., Faucher, D., Crouzet, J., und Pétré, D. Aliphatic nitrilase from a soil-isolated *Comamonas testosteroni* sp.: gene cloning and overexpression, purification and primary structure. *Gene*, 161(1):15–20, 1995.
- Ma, X., Zhang, S., Xu, Z., Li, H., Xiao, Q., Qiu, F., Zhang, W., Long, Y., Zheng, D., Huang, B., Chen, C., und Lu, Y. SdiA improves the acid tolerance of *E. coli* by regulating GadW and GadY expression. *Frontiers in Microbiology*, 11:1078, 2020.
- Makumire, S., Su, S., Weber, B. W., Woodward, J. D., Kimani, S. W., Hunter, R., und Sewell, T. B. The structures of the C146A variant of the amidase from *Pyrococcus horikoshii* bound to glutaramide and acetamide suggest the basis of amide recognition. *Journal of Structural Biology*, 214(2):107859–107868, 2022.
- Martínez, R. und Schwaneberg, U. A roadmap to directed enzyme evolution and screening systems for biotechnological applications. *Biological Research*, 46(4):395–405, 2013.

- Martínková, L., Uhnáková, B., Pátek, M., Nešvera, J., und Křen, V. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International*, 35(1):162–177, 2009.
- Martínková, L. Nitrile metabolism in fungi: A review of its key enzymes nitrilases with focus on their biotechnological impact. *Fungal Biology Reviews*, 33(2):149–157, 2019.
- Martínková, L. und Křen, V. Biotransformations with nitrilases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(2):130–137, 2010.
- Mateo, C., Chmura, A., Rustler, S., van Rantwijk, F., Stolz, A., und Sheldon, R. A. Synthesis of enantiomerically pure (*S*)-mandelic acid using an oxynitrilase-nitrilase bienzymatic cascade: a nitrilase surprisingly shows nitrile hydratase activity. *Tetrahedron: Asymmetry*, 17(3):320–323, 2006.
- Meindersma, G. W., Maase, M., und De Haan, A. B. Ionic Liquids. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag, 2007.
- Meth-Cohn, O. und Wang, M.-X. An in-depth study of the biotransformation of nitriles into amides and/or acids using *Rhodococcus rhodochrous* AJ270. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 8:1099–1104, 1997.
- Modi, N., Singh, P. R., Mahendran, K. R., Schulz, R., Winterhalter, M., und Kleinekathöfer, U. Probing the transport of ionic liquids in aqueous solution through nanopores. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2(18):2331–2336, 2011.
- Mortimer, C. E. und Müller, U. In *Chemie: Das Basiswissen der Chemie*, page 310. Thieme, Stuttgart, 2010.
- Moser, R. Charakterisierung, Reinigung und N-terminale Sequenzierung der Nitrilase aus *Pseudomonas fluorescens* EBC191. *Diplomarbeit, Universität Stuttgart*, 1996.
- Mueller, P., Egorova, K., Vorgias, C. E., Boutou, E., Trauthwein, H., Verseck, S., und Antranikian, G. Cloning, overexpression, and characterization of a thermoactive nitrilase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Protein Expression and Purification*, 47(2):672–681, 2006.
- Muldoon, M. J., Gordon, C. M., und Dunkin, I. R. Investigations of solvent-solute interactions in room temperature ionic liquids using solvatochromic dyes. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 4:433–435, 2001.
- Mulelu, A. E., Kirykowicz, A. M., und Woodward, J. D. Cryo-EM and directed evolution reveal how *Arabidopsis* nitrilase specificity is influenced by its quaternary structure. *Communications Biology*, 2(260):1–11, 2019.
- Mylerová, V. und Martínková, L. Synthetic applications of nitrile-converting enzymes. *Current Organic Chemistry*, 7(13):1279–1295, 2003.
- Nagasawa, T., Wieser, M., Nakamura, T., Iwahara, H., Yoshida, T., und Gekko, K. Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* J1. Conversion into the active form by subunit association. *European Journal of Biochemistry*, 267(1):138–144, 2000.

- Nagasawa, T. und Yamada, H. Microbial transformations of nitriles. *Trends in Biotechnology*, 7 (6):153–158, 1989.
- Nakai, T., Hasegawa, T., Yamashita, E., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Ueki, T., Nanba, H., Ikenaka, Y., Takahashi, S., Sato, M., und Tsukihara, T. Crystal structure of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase with a novel catalytic framework common to amidohydrolases. *Structure*, 8(7):729–738, 2000.
- Nannemann, D., Birmingham, W., Scism, R., und Bachmann, B. Assessing directed evolution methods for the generation of biosynthetic enzymes with potential in drug biosynthesis. *Future Medicinal Chemistry*, 3(7):809–819, 2011.
- Neidhardt, F. und Umbarger, H. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2. Auflage. American Society for Microbiology, Washington D.C, 1996.
- Nel, A. J. M., Tuffin, I. M., Sewell, B. T., und Cowan, D. A. Unique aliphatic amidase from a psychrotrophic and haloalkaliphilic *Nesterenkonia* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11):3696–3702, 2011.
- Nigam, V. K., Arfi, T., Kumar, V., und Shukla, P. Bioengineering of nitrilases towards its use as green catalyst: applications and perspectives. *Indian Journal of Microbiology*, 57(2):131–138, 2017.
- Noronha-Blob, L., Sturm, B., und Lowe, V. Stereoselective antimuscarinic effects of 3-quinuclidinyl atrolactate and 3-quinuclidinyl xanthene-9-carboxylate. *European Journal of Pharmacology*, 211 (1):97–103, 1992.
- North, M. Synthesis and applications of non-racemic cyanohydrins. *Tetrahedron: Asymmetry*, 14 (2):147–176, 2003.
- Ohnishi, J., Mizoguchi, H., Takeno, S., und Ikeda, M. Characterization of mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in an industrial *Corynebacterium glutamicum* strain. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 649(1-2):239–244, 2008.
- O'Reilly, C. und Turner, P. D. The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes - a comparative study. *Journal of Applied Microbiology*, 95(6):1161–1174, 2003.
- Pace, H., Hodawadekar, S., Draganescu, A., Huang, J., Bieganowski, P., Pekarsky, Y., Croce, C., und Brenner, C. Crystal structure of the worm NitFhit Rosetta Stone protein reveals a Nit tetramer binding two Fhit dimers. *Current Biology*, 10(15):907–917, 2000.
- Pace, H. C. und Brenner, C. The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biology*, 2(1):reviews0001.1–reviews0001.9, 2001.
- Pernak, J., Sobaszekiewicz, K., und Mirska, I. Anti-microbial activities of ionic liquids. *Green Chemistry*, 5(1):52–56, 2003.

- Petterson, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., und Ferrin, T. E. UCSF Chimera — A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13):1605–1612, 2004.
- Petříčková, A., Sosedov, O., Baum, S., Stolz, A., und Martínková, L. Influence of point mutations near the active site on catalytic properties of fungal arylacetonitrilases from *Aspergillus niger* and *Neurospora crassa*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 77:74–80, 2012.
- Pfennig, K. D. Norbert und Lippert. Über das Vitamin B₁₂-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Archiv für Mikrobiologie*, 55:245–256, 1966.
- Pfruender, H., Jones, R., und Weuster-Botz, D. Water immiscible ionic liquids as solvents for whole cell biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, 124(1):182–190, 2006.
- Piotrowski, M. Primary or secondary? Versatile nitrilases in plant metabolism. *Phytochemistry*, 69(15):2655–2667, 2008.
- Piotrowski, M., Schönfelder, S., und Weiler, E. W. The *Arabidopsis thaliana* isogene NIT4 and its orthologs in tobacco encode β -cyano-L-alanine hydratase/nitrilase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(4):2616–2621, 2001.
- Pretti, C., Chiappe, C., Pieraccini, D., Gregori, M., Abramo, F., Monni, G., und Intorre, L. Acute toxicity of ionic liquids to the zebrafish (*Danio rerio*). *Green Chemistry*, 8(3):238–240, 2006.
- Pretti, C., Chiappe, C., Baldetti, I., Brunini, S., Monni, G., und Intorre, L. Acute toxicity of ionic liquids for three freshwater organisms: *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(4):1170–1176, 2009.
- Quijano, G., Couvert, A., und Amrane, A. Ionic liquids: Applications and future trends in bioreactor technology. *Bioresource Technology*, 101(23):8923–8930, 2010.
- Raczynska, J. E., Vorgias, C. E., Antranikian, G., und Rypniewski, W. Crystallographic analysis of a thermoactive nitrilase. *Journal of Structural Biology*, 173(2):294–302, 2011.
- Rajagopal, A. N. Growth of Gram-negative bacteria in the presence of organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(8):606–613, 1996.
- Ramos, J. L., Duque, E., Gallegos, M.-T., Godoy, P., Ramos-González, M. I., Rojas, A., Terán, W., und Segura, A. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 56(1):743–768, 2002.
- Ramos-Nino, M. E., Ramirez-Rodriguez, C. A., Clifford, M. N., und Adams, M. R. QSARs for the effect of benzaldehydes on foodborne bacteria and the role of sulfhydryl groups as targets of their antibacterial activity. *Journal of Applied Microbiology*, 84(2):207–212, 1998.
- Ramteke, P. W., Maurice, N. G., Joseph, B., und Wadher, B. J. Nitrile-converting enzymes: an eco-friendly tool for industrial biocatalysis. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 60(5):459–481, 2013.

- Reetz, M. T., Carballeira, J. D., und Vogel, A. Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(46):7745–7751, 2006. Programm CASTER (Degenerate Codon Optimizer. Version 1.0, 2006).
- Reichardt, C. Polarity of ionic liquids determined empirically by means of solvatochromic pyridinium N-phenolate betaine dyes. *Green Chemistry*, 7(5):339–351, 2005.
- Ress-Löschke, M., Friedrich, T., Hauer, B., und Mattes, R. Verfahren zur Herstellung chiraler Carbonsäuren aus Nitrilen mit Hilfe einer Nitrilase oder Mikroorganismen, die ein Gen für eine Nitrilase enthalten. *German Patent Office*, DE 19848129A1, 1998.
- Richard, H. T. und Foster, J. W. Acid resistance in *Escherichia coli*. *Advances in Applied Microbiology*, 52:167–186, 2003.
- Roberge, C., Fleitz, F., Pollard, D., und Devine, P. Synthesis of optically active cyanohydrins from aromatic ketones: Evidence of an increased substrate range and inverted stereoselectivity for the hydroxynitrile lyase from *Linum usitatissimum*. *ChemInform*, 38(25):208–214, 2007.
- Robertson, D. E., Chaplin, J. A., DeSantis, G., Podar, M., Madden, M., Chi, E., Richardson, T., Milan, A., Miller, M., Weiner, D. P., Wong, K., McQuaid, J., Farwell, B., Preston, L. A., Tan, X., Snead, M. A., Keller, M., Mathur, E., Kretz, P. L., Burk, M. J., und Short, J. M. Exploring nitrilase sequence space for enantioselective catalysis. *Applied Environmental Microbiology*, 70(4):2429–2436, 2004.
- Rocha, M. A. A., Neves, C. M. S. S., Freire, M. G., Russina, O., Triolo, A., Coutinho, J. A. P., und Santos, L. M. N. B. F. Alkylimidazolium based ionic liquids: Impact of cation symmetry on their nanoscale structural organization. *Journal of Physical Chemistry B*, 117(37):10889–10897, 2013.
- Rotchenkova, G. und Kanerva, L. T. Optimized methods for the preparation of (*S*)-2-hydroxy-2-phenylpropanenitrile exploiting (*R*)-oxynitrilase in almond meal. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(1):37–43, 2000.
- Rustler, S. Die enzymatische Hydrolyse von Nitrilen unter sauren Bedingungen durch neu isolierte und rekombinante Mikroorganismen und die Verwendung von säuretoleranten Ganzzellbiokatalysatoren zur enantioselektiven Synthese von α -Hydroxycarbonsäuren. *Dissertation, Universität Stuttgart*, 2011.
- Rustler, S., Müller, A., Windeisen, V., Chmura, A., Fernandes, B., Kiziak, C., und Stolz, A. Conversion of mandelonitrile and phenylglycinonitrile by recombinant *E. coli* cells synthesizing a nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4):598–606, 2007.
- Rustler, S., Chmura, A., Sheldon, R., und Stolz, A. Characterisation of the substrate specificity of the nitrile hydrolyzing system of the acidotolerant black yeast *Exophiala oligosperma* R1. *Studies in Mycology*, 61(1):165–174, 2008a.

- Rustler, S., Motejadded, H., Altenbuchner, J., und Stolz, A. Simultaneous expression of an arylacetonitrilase from *Pseudomonas fluorescens* and a (*S*)-oxynitrilase from *Manihot esculenta* in *Pichia pastoris* for the synthesis of (*S*)-mandelic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(1):87–97, 2008b.
- Sakaguchi, K., Miyakawa, T., Takeuchi, S., Nakagawa, K., und Hayase, E. Interaction of benzaldehyde to the membrane protein of *Escherichia coli*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 43(8):1775–1777, 1979.
- Sakai, N., Tajika, Y., Yao, M., Watanabe, N., und Tanaka, I. Crystal structure of hypothetical protein PH0642 from *Pyrococcus horikoshii* at 1.6Å resolution. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 57(4):869–873, 2004.
- Sambrook, J. und Russel, D. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*, Third Edition, 2001.
- Sambrook, J., Fritsch, E., und Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*, Second Edition, 1989.
- Samorì, C. Ionic liquids and their biological effects towards microorganisms. *Current Organic Chemistry*, 15(12):1888–1904, 2011.
- Sariaslani, F., Stieglitz, B., und Witterholt, V. Enzymatic process for the preparation of chiral α -tertiary carboxylic acid esters, 1996.
- Schmidt, M. und Griengl, H. Oxynitrilases: From cyanogenesis to asymmetric synthesis. In *Biocatalysis - From Discovery to Application*, volume 200 of *Topics in Current Chemistry*, pages 193–226. Springer Berlin / Heidelberg, 1999.
- Schneider, S. Änderung der Substratspezifität von Transaldolasen. *Dissertation, Universität Stuttgart*, 2010.
- Schwalbe, P. D. H. Carbonylchemie. In *Skript zur Vorlesung OCI, 2. Vorlesungsteil*, pages 20–60. 2015.
- Seffernick, J. L., Samanta, S. K., Louie, T. M., Wackett, L. P., und Subramanian, M. Investigative mining of sequence data for novel enzymes: A case study with nitrilases. *Journal of Biotechnology*, 143(1):17–26, 2009.
- Semba, H., Ichige, E., Imanaka, T., Atomi, H., und Aoyagi, H. Efficient production of active form of recombinant cassava hydroxynitrile lyase using *Escherichia coli* in low-temperature culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(4):563–569, 2008.
- Sewell, B. T., Thuku, R. N., Zhang, X., und Benedik, M. J. Oligomeric structure of nitrilases: Effect of mutating interfacial residues on activity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1056(1):153–159, 2005.

- Sewell, B., Berman, M., Meyers, P., Jandhyala, D., und Benedik, M. The cyanide degrading nitrilase from *Pseudomonas stutzeri* AK61 is a two-fold symmetric, 14-subunit spiral. *Structure*, 11(11):1413–1422, 2003.
- Shah, F. U., An, R., und Muhammad, N. Editorial: Properties and applications of ionic liquids in energy and environmental science. *Frontiers in Chemistry*, 8:627213, 2020.
- Sharma, M., Akhter, Y., und Chatterjee, S. A review on remediation of cyanide containing industrial wastes using biological systems with special reference to enzymatic degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(5):70, 2019.
- Sharma, N., Thakur, N., Raj, T., Savitri, , und Bhalla, T. C. Mining of microbial genomes for the novel sources of nitrilases. *BioMed Research International*, 2017:7039245, 2017.
- Shen, J.-D., Cai, X., Liu, Z.-Q., und Zheng, Y.-G. Nitrilase: a promising biocatalyst in industrial applications for green chemistry. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(1):72–93, 2020.
- Shivange, A. V., Dennig, A., und Schwaneberg, U. Multi-site saturation by OmniChange yields a pH- and thermally improved phytase. *Journal of Biotechnology*, 170(1):68–72, 2013.
- Sikkema, J., de Bont, J., und Poolman, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology Reviews*, 59(2):201–222, 1995.
- Simmonds, J. und Robinson, G. K. Formation of benzaldehyde by *Pseudomonas putida* atcc 12633. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(3):353–358, 1998.
- Sivapragasam, M., Moniruzzaman, M., und Goto, M. An overview on the toxicological properties of ionic liquids toward microorganisms. *Biotechnology Journal*, 15(4):e1900073, 2020.
- Sosedov, O. Steigerung der Nitrilhydratase-Aktivität der Nitrilase aus *Pseudomonas fluorescens* EBC191. *Dissertation, Universität Stuttgart*, 2013.
- Sosedov, O. und Stolz, A. Random mutagenesis of the arylacetonitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191 and identification of variants, which form increased amounts of mandeloamide from mandelonitrile. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(4):1595–1607, 2014.
- Sosedov, O. und Stolz, A. Improvement of the amides forming capacity of the arylacetonitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191 by site-directed mutagenesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(6):2623–2635, 2015.
- Sosedov, O., Matzer, K., Bürger, S., Kiziak, C., Baum, S., Altenbuchner, J., Chmura, A., van Rantwijk, F., und Stolz, A. Construction of recombinant *Escherichia coli* catalysts which simultaneously express an (*S*)-oxynitrilase and different nitrilase variants for the synthesis of (*S*)-mandelic acid and (*S*)-mandelic amide from benzaldehyde and cyanide. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 351(10):1531–1538, 2009.
- Sosedov, O., Baum, S., Bürger, S., Matzer, K., Kiziak, C., und Stolz, A. Construction and application of variants of the *Pseudomonas fluorescens* EBC191 arylacetonitrilase for increased

- production of acids or amides. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(11):3668–3674, 2010.
- Stalker, D. M., Malyj, L. D., und McBride, K. E. Purification and properties of a nitrilase specific for the herbicide bromoxynil and corresponding nucleotide sequence analysis of the *bxn* gene. *Journal of Biological Chemistry*, 263(13):6310–6314, 1988.
- Steipe, B. Evolutionary approaches to protein engineering. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 243(60):55–86, 1999.
- Stevenson, D. E., Feng, R., Dumas, F., Groleau, D., Mihoc, A., und Storer, A. C. Mechanistic and structural studies on *Rhodococcus* ATCC 39484 nitrilase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 15(3):283–302, 1992.
- Stevenson, D. E., Feng, R., und Storer, A. C. Detection of covalent enzyme-substrate complexes of nitrilase by ion-spray mass spectroscopy. *FEBS Letters*, 277(1-2):112–114, 1990.
- Stolte, S., Matzke, M., Arning, J., Boschen, A., Pitner, W.-R., Welz-Biermann, U., Jastorff, B., und Ranke, J. Effects of different head groups and functionalised side chains on the aquatic toxicity of ionic liquids. *Green Chemistry*, 9(11):1170–1179, 2007.
- Stumpp, T., Wilms, B., und Altenbuchner, J. Ein neues, L-Rhamnose-induzierbares Expressions-system für *Escherichia coli*. *Biospektrum*, 6:33–36, 2000.
- Sugai, T., Kakeya, H., und Ohta, H. Preparation of enantiomerically enriched compound using enzymes. Part 3. Enzymic preparation of enantiomerically enriched tertiary alpha-benzyloxy acid esters. Application to the synthesis of (*S*)-(-)-frontalin. *The Journal of Organic Chemistry*, 55(15):4643–4647, 1990.
- Thimann, K. und Mahadevan, S. Enzymatic hydrolysis of indoleacetonitrile. *Nature*, 181(4621):1466–1467, 1958.
- Thimann, K. und Mahadevan, S. Nitrilase I, occurrence preparation and general properties of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 105(1):133–141, 1964.
- Thuku, R. N., Brady, D., Benedik, M. J., und Sewell, B. T. Microbial nitrilases: versatile, spiral forming, industrial enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 106(3):703–727, 2009.
- Thuku, R. N., Weber, B. W., Varsani, A., und Sewell, B. T. Post-translational cleavage of recombinantly expressed nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* J1 yields a stable, active helical form. *FEBS Journal*, 274(8):2099–2108, 2007.
- Tran, T. T., Mamo, G., Búxo, L., Le, N. N., Gaber, Y., Mattiasson, B., und Hatti-Kaul, R. Site-directed mutagenesis of an alkaline phytase: influencing specificity, activity and stability in acidic milieu. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(2):177–182, 2011.
- Uhm, K.-N., Lee, S.-J., Kim, H.-K., Kang, H.-Y., und Lee, Y. Enantioselective resolution of methyl 2-chloromandelate by *Candida antarctica* lipase A in a solvent-free transesterification reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45(1-2):34–38, 2007.

- van Langen, L. M., van Rantwijk, F., und Sheldon, R. A. Enzymatic hydrocyanation of a sterically hindered aldehyde. Optimization of a chemoenzymatic procedure for (*R*)-2-Chloromandelic acid. *Organic Process Research & Development*, 7(6):828–831, 2003.
- van Loo, B., Kingma, J., Heyman, G., Wittenaar, A., Spelberg, J. H. L., Sonke, T., und Janssen, D. B. Improved enantioselective conversion of styrene epoxides and meso-epoxides through epoxide hydrolases with a mutated nucleophile-flanking residue. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(3):145–153, 2009.
- van Pelt, S., Zhang, M., Otten, L. G., Holt, J., Sorokin, D. Y., van Rantwijk, F., Black, G. W., Perry, J. J., und Sheldon, R. A. Probing the enantioselectivity of a diverse group of purified cobalt-centred nitrile hydratases. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 9(8):3011–3019, 2011.
- van Pelt, S., van Rantwijk, F., und Sheldon, R. Synthesis of aliphatic (*S*)- α -hydroxycarboxylic amides using a one-pot bienzymatic cascade of immobilised oxynitrilase and nitrile hydratase. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 351(3):397–404, 2009.
- van Rantwijk, F., Lau, R. M., und Sheldon, R. A. Biocatalytic transformations in ionic liquids. *Trends in Biotechnology*, 21(3):131–138, 2003.
- Vetter, J. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon*, 38(1):11–36, 2000.
- von Langermann, J., Mell, A., Paetzold, E., Daußmann, T., und Kragl, U. Hydroxynitrile lyase in organic solvent-free systems to overcome thermodynamic limitations. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(8-9):1418–1424, 2007.
- Wang, M.-X. Enantioselective biotransformations of nitriles in organic synthesis. *Accounts of Chemical Research*, 48(3):602–611, 2015.
- Wang, Q.-Y., Xie, N.-Z., Du, Q.-S., Qin, Y., Li, J.-X., Meng, J., und Huang, R.-B. Active hydrogen bond network (AHBN) and applications for improvement of thermal stability and pH-sensitivity of pullulanase from *Bacillus naganoensis*. *PLoS ONE*, 12(1):e0169080, 2017.
- Wang, Q.-Y., Xie, N.-Z., Du, Q.-S., Qin, Y., Li, J.-X., Meng, J., und Huang, R.-B. Structural coupling throughout the active site hydrogen bond networks of ketosteroid isomerase and photoactive yellow protein. *Journal of the American Chemical Society*, 140(31):9827–9843, 2018.
- Weber, B. W., Kimani, S. W., Varsani, A., Cowan, D. A., Hunter, R., Venter, G. A., Gumbart, J. C., , und Sewell, B. T. The mechanism of the amidases: mutating the glutamate adjacent to the catalytic triad inactivates the enzyme due to substrate mispositioning. *Journal of Biological Chemistry*, 288(40):28514–28523, 2013.
- Wegerer, A., Sun, T., und Altenbuchner, J. Optimization of an *E. coli* L-rhamnose-inducible expression vector: test of various genetic module combinations. *BMC Biotechnology*, 8(1):2, 2008.
- Wells, A. S. und Coombe, V. T. On the freshwater ecotoxicity and biodegradation properties of some common ionic liquids. *Organic Process Research & Development*, 10(4):794–798, 2006.

- Wood, N., Ferguson, J. L., Gunaratne, H. Q. N., Seddon, K. R., Goodacre, R., und Stephens, G. M. Screening ionic liquids for use in biotransformations with whole microbial cells. *Green Chemistry*, 13(7):1843–1851, 2011.
- Woodward, J. D., Trompeter, I., Sewell, B. T., und Piotrowski, M. Substrate specificity of plant nitrilase complexes is affected by their helical twist. *Communications Biology*, 1(186):1–10, 2018.
- Wu, S., Snajdrova, R., Moore, J. C., Baldenius, K., und Bornscheuer, U. T. Biokatalyse: Enzymatische Synthese für industrielle Anwendungen. *Angewandte Chemie International Edition*, 133(1):88–119, 2021.
- Wyatt, J. M. und Knowles, C. J. Microbial degradation of acrylonitrile waste effluents: the degradation of effluents and condensates from the manufacture of acrylonitrile. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 35(1-3):227–248, 1995a.
- Wyatt, J. M. und Knowles, C. J. The development of a novel strategy for the microbial treatment of acrylonitrile effluents. *Biodegradation*, 6(2):93–107, 1995b.
- Yabu, K., Masumoto, S., Yamasaki, S., Hamashima, Y., Kanai, M., Du, W., Curran, D. P., und Shibasaki, M. Switching enantiofacial selectivities using one chiral source: catalytic enantioselective synthesis of the key intermediate for (20 *S*)-camptothecin family by (*S*)-selective cyanosilylation of ketones. *Journal of the American Chemical Society*, 123(40):9908–9909, 2001.
- Yadav, M., Singh, I. K., und Singh, A. Dhurrin: A naturally occurring phytochemical as a weapon against insect herbivores. *Phytochemistry*, 205:113483, 2023.
- Yamada, H., Asano, Y., Hino, T., und Tani, Y. Microbial utilization of acrylonitrile. *Journal of Fermentation Technology*, 57(1):8–14, 1979.
- Yamamoto, K. und Komatsu, K. Purification and characterization of nitrilase responsible for the enantioselective hydrolysis from *Acinetobacter* sp. AK 226. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(6):1459–1466, 1991.
- Yamamoto, K., Fujimatsu, I., und Komatsu, K.-I. Purification and characterization of the nitrilase from *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 responsible for enantioselective hydrolysis of mandelonitrile. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 73(6):425–430, 1992.
- Yanase, H., Sakamoto, A., Okamoto, K., Kita, K., und Sato, Y. Degradation of the metal-cyano complex tetracyanonickelate (II) by *Fusarium oxysporum* N-10. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(3):328–334, 2000.
- Yang, Z. und Pan, W. Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(1):19–28, 2005.
- Yaron, A. und Naider, F. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 28(1):31–81, 1993.

- Yeom, S.-J., Kim, H.-J., Lee, J.-K., Kim, D.-E., und Oh, D.-K. An amino acid at position 142 in nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 33278 determines the substrate specificity for aliphatic and aromatic nitriles. *Biochemical Journal*, 415(3):401–407, 2008.
- Yu, J., Zhang, S., Dai, Y., Lu, X., und Fan, Q. L. W. Antimicrobial activity and cytotoxicity of piperazinium- and guanidinium-based ionic liquids. *Journal of Hazardous Materials*, 307:73–81, 2016.
- Zha, C., Brown, G. B., und Brouillette, W. J. Synthesis and structure-activity relationship studies for hydantoins and analogues as voltage-gated sodium channel ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(26):6519–6528, 2004.
- Zhang, K., Pan, T., Wang, L., Wang, H., Ren, Y., und Wei, D. Screening and characterization of a nitrilase with significant nitrile hydratase activity. *Biotechnology Letters*, 44(10):1163–1173, 2022.
- Zhang, L., Yin, B., Wang, C., Jiang, S., Wang, H., und Yuan, Y. A. Structural insights into enzymatic activity and substrate specificity determination by a single amino acid in nitrilase from *Syechocystis* sp. PCC6803. *Journal of Structural Biology*, 188(2):93–101, 2014.
- Zhang, S., Sun, N., He, X., Lu, X., und Zhang, X. Physical properties of ionic liquids: database and evaluation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 35(4):1475, 2006.
- Zheng, R.-C., Zheng, Y.-G., und Shen, Y.-C. Acrylamide, microbial production by nitrile hydratase. In *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, pages 1–39. John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- Zhou, X., Zhang, Y., Xu, D., Cao, W., Dai, C., Qiang, Z., Yang, Z., und Zhao, J. Treatment of succinonitrile wastewater by immobilized high efficiency microorganism strains. *Water Science and Technology*, 58(4):911–918, 2008.
- Zhu, D., Mukherjee, C., Biehl, E. R., und Hua, L. Discovery of a mandelonitrile hydrolase from *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 by rational genome mining. *Journal of Biotechnology*, 129(4):645–650, 2007.
- Zhu, D., Mukherjee, C., Yang, Y., Rios, B. E., Gallagher, D. T., Smith, N. N., Biehl, E. R., und Hua, L. A new nitrilase from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110: Gene cloning, biochemical characterization and substrate specificity. *Journal of Biotechnology*, 133(3):327–333, 2008.
- Zhu, Z., Ji, X., Wu, Z., Zhang, J., und Du, G. Improved acid-stress tolerance of *Lactococcus lactis* NZ9000 and *Escherichia coli* BL21 by overexpression of the anti-acid component recT. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 45(12):1091–1101, 2018.

A Anhang

H¹-NMR Analysen von MMN

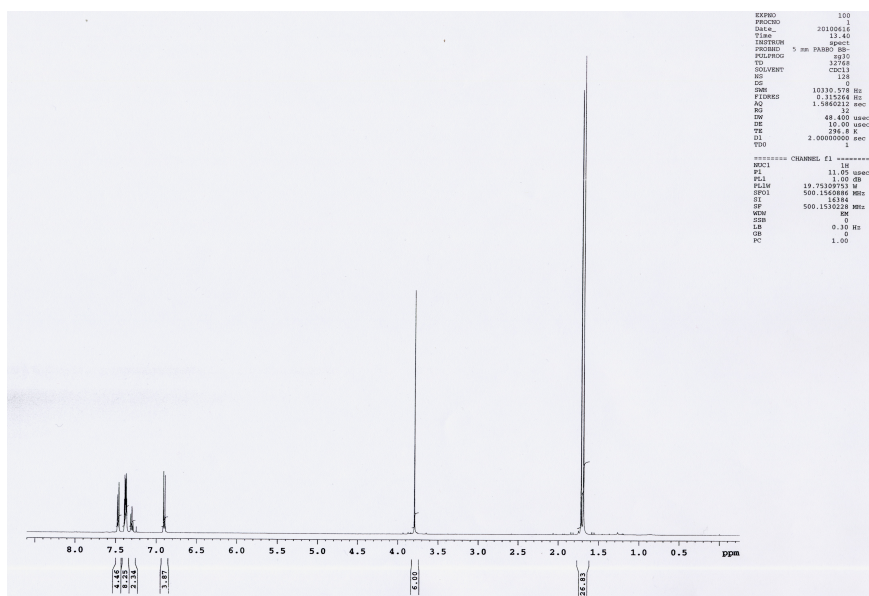


Abbildung A.1: H¹-NMR des verunreinigten 2-Methyl-2-phenylpropanitrils Standards.

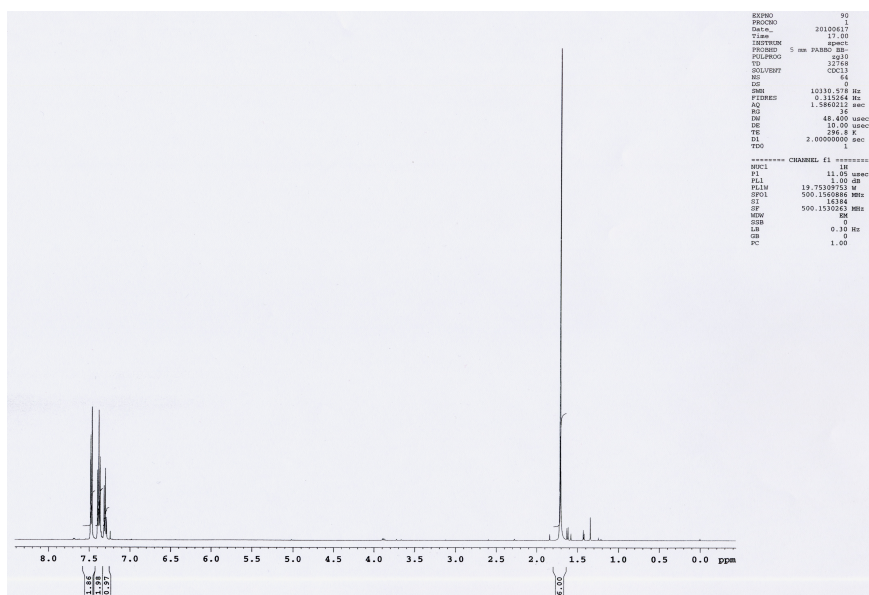


Abbildung A.2: H¹-NMR von 2-Methyl-2-phenylpropanitril.

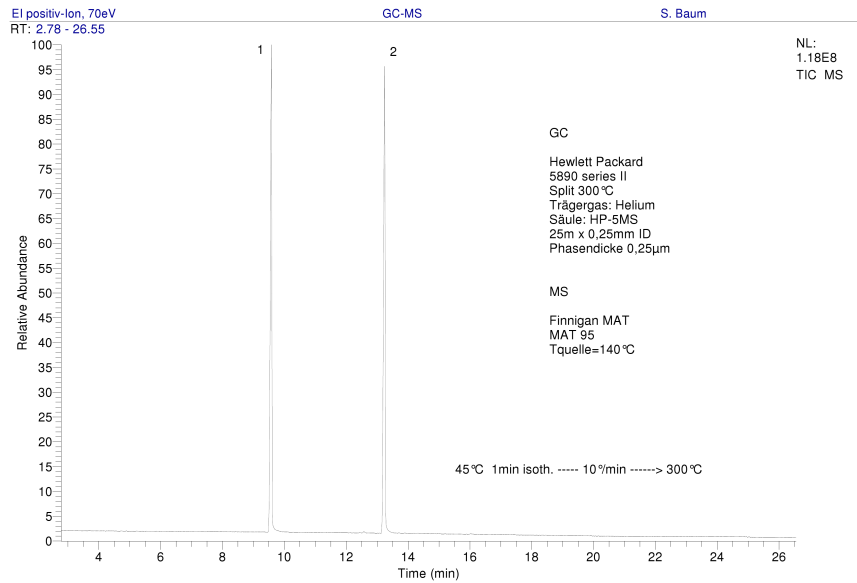


Abbildung A.3: GC-MS Analyse des verunreinigten 2-Methyl-2-phenylpropanitril Standards.

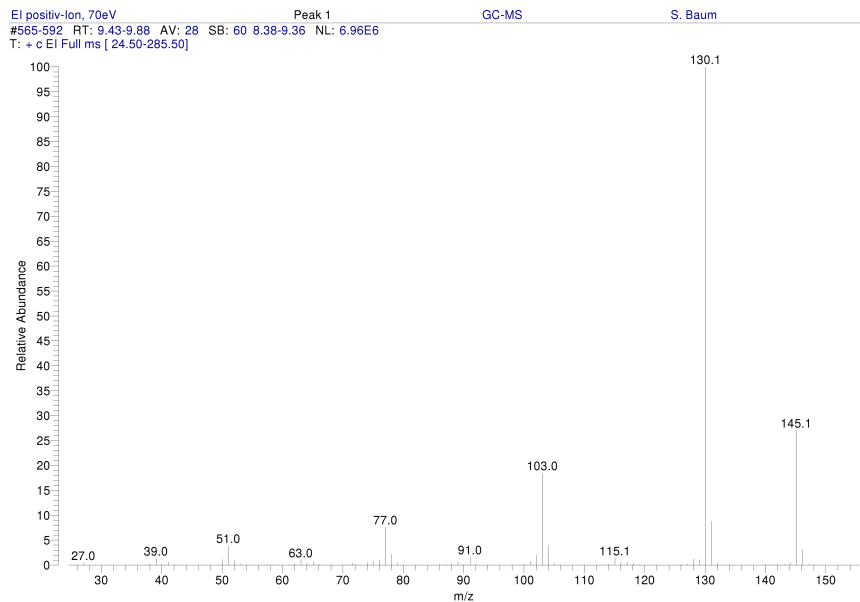


Abbildung A.4: Feinmassenbestimmung von Peak 1 (2-Methyl-2-phenylpropanitril).

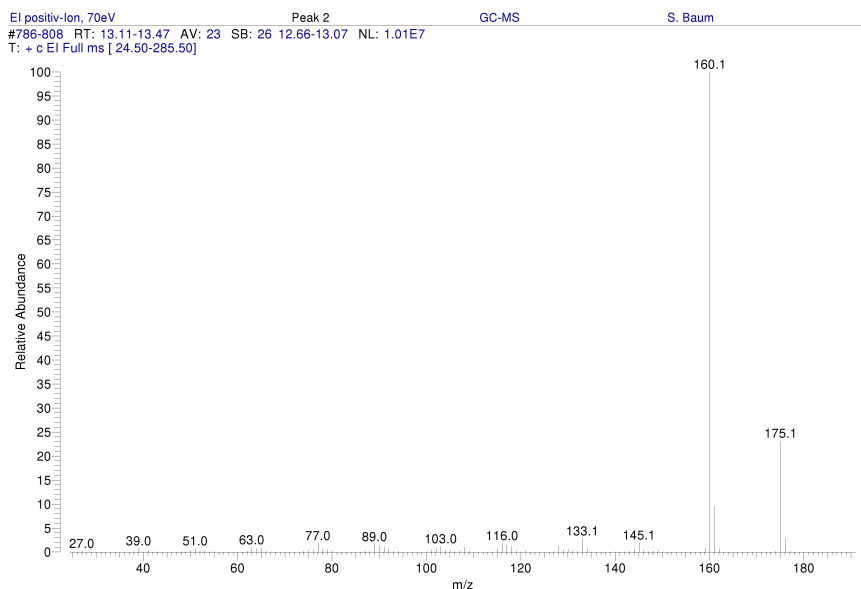


Abbildung A.5: Feinmassenbestimmung von Peak 2 (p-Methoxy-2-methyl-2-phenylpropannitril, Verunreinigung).

Stoffdaten ionischer Flüssigkeiten

Tabelle A.1: Stoffdaten der in dieser Arbeit verwendeten ionischen Flüssigkeiten.

Ionische Flüssigkeit	Molekulargewicht ¹ (g/mol)	pH-Wert ^{1,2}	Dichte ¹ (g/mL)	Schmelzpunkt ¹ (°C)	dynamische Viskosität ³ (mm ² /s)
BMim PF ₆	284,18	5	1,38	12	393
					312
					450
					397, w
BMpl NTf ₂	422,41	5	1,40	-6	85
					70
BMim NTf ₂	419,37	7	1,44	2	54,5
					69
					27, w

¹ Merck Datenbank

² wässrige Lösung, bei 20°C

³ aus (Zhang et al., 2006) bei 25 °C

w = wassergesättigt

Danksagung

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Andreas Stolz für die Überlassung des interessanten Themas, für das in mich gesetzte Vertrauen, die stete Diskussionsbereitschaft, die Unterstützung und für die sehr angenehmen Arbeitsbedingungen. Insbesondere bedanke ich mich ganz herzlich für die Geduld und die Bereitschaft sich noch einmal mit der vorliegenden Arbeit zu beschäftigen, obwohl die experimentellen Arbeiten schon lange zurück liegen. Das ist wahrlich keine Selbstverständlichkeit und ich weiß dies sehr zu schätzen.

Herrn Prof. Dr. G. Sprenger danke ich für die Möglichkeit, dass ich den experimentellen Teil dieser Doktorarbeit am Institut für Mikrobiologie anfertigen konnte.

Bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Für die Möglichkeit der Synthese von Acetophenoncyanhydrin und Atrolactamid am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg danke ich Herrn Prof. Dr. D. Geffken.

I thank Prof. T. Sewell and Dael Williamson at University of Cape Town (South Africa) for the homology model of the nitrilase from *P. fluorescens* EBC191.

Additionally, my thanks go to Prof. F. van Rantwijk from the Department of Biotechnology at TU Delft for the possibility to work in the laboratory of Biocatalysis and Organic Chemistry. A special thanks go to Sander for his support during my time in Delft. Additionally, I would like to thank Andrzej for the good cooperation, the nice conversations and joint ventures during his short stay in our lab in Stuttgart.

Lisa Schweizer möchte ich für die exzellente Hilfe beim Screening der Mutantenbibliothek danken.

Bei Janosch Gröning und Erik Eppinger bedanke ich mich ganz herzlich für die Hilfe mit den Sequenz-Dateien bzw. die hilfreichen Tipps.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen damaligen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie für die kollegiale Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit. Ein riesengroßes Dankeschön geht an meine damaligen Laborkolleginnen Sibylle Bürger und Olga Sosedov. Liebe Olga und liebe Sibylle, vielen Dank für eure großartige Unterstützung, die guten Tipps, eure Herzlichkeit, eure Freund-

schaft und die tolle Zusammenarbeit! Ich finde es unglaublich schön, dass wir nach so vielen Jahren immer noch Kontakt haben und freue mich jedes Jahr auf unseren gemeinsamen Wilhelma-Besuch.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie; meiner Mutter, meinem Ehemann Felix und meinen Kindern Luisa und Tim. Liebe Mutti, tausend Dank für deine fortwährende und unermüdliche Unterstützung; sei es beim Kinder hüten für diese Arbeit oder jedweden anderen Dingen, um die ich dich bitte. Ich kann mich immer 100 % auf dich verlassen und mir deiner Hilfe stets sicher sein. Um es in den Worten eines Kindes zu sagen: du bist die beste Mutti der Welt. Lieber Felix, ich kann nicht in Worte fassen wie froh und dankbar ich bin dich an meiner Seite zu haben. Seit 23 Jahren unterstützt du mich in jedweder Hinsicht. Tausend Dank für deine unermüdliche Hilfe (selbstverständlich nicht nur bei den vielen Latex-Problemen, die während dieser Arbeit aufgetreten sind), dein Verständnis und deine unendliche Geduld. Egal, um was ich dich bitte, ich weiß, dass du mich unterstützt. Liebe Luisa, lieber Tim, nichts könnte schöner sein als eure Energie und Fröhlichkeit, euer Enthusiasmus und eure Freude über die kleinen Dinge im Leben und natürlich euer strahlendes Lächeln und die (teils feuchten) Küsse. Ihr Vier gebt mir stets das Gefühl der wichtigste Mensch in eurem Leben zu sein und dies ist ein unglaubliches Geschenk.