

**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**

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

Sven Rustler

aus Lich

Hauptberichter : Prof. Dr. Andreas Stolz
Mitberichter : Prof. Dr. Dieter Jendrossek
Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2011

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart

2011

Erklärung

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Stolz im Institut für Mikrobiologie der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart durchgeführt. Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Pohlheim, Dezember 2010

Sven Rustler

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	8
Kurzfassung	10
1 Einleitung	12
1.1 Nitrile - Vorkommen, Bedeutung und industrielle Nutzung	12
1.1.1 Biogene Nitrile	12
1.1.2 Anthropogene Nitrile.....	13
1.2 Vergleich der chemischen und enzymatischen Transformationen von Nitrilen zu Carbonsäuren und Carbonsäureamiden	13
1.2.1 Beispiele für etablierte industrielle Biotransformationen von Nitrilen zu Carbonsäuren und Carbonsäureamiden.....	15
1.3 Chiralität	19
1.3.1 Definition.....	19
1.3.2 Pharmakologische Bedeutung chiraler Verbindungen – Die Geschichte vom „guten“ Eutomer und dem „bösen“ Distomer	20
1.3.3 Herstellung enantiomerenreiner Produkte.....	22
1.4 Enantiomerenreine α-substituierte Carbonsäuren und Carbonsäureamide	23
1.4.1 Bedeutung.....	23
1.4.2 Enantioselektive Synthese von enantiomerenreinen α -Hydroxycarbonsäuren ausgehend von Aldehyden oder Ketonen mit Hilfe enantioselektiver Nitrilasen oder enantioselektiver Oxynitrilasen.....	24
1.4.2.1 Reaktionsführung in Gegenwart organischer Lösungsmittel	26
1.4.2.2 Reaktionsführung in sauren wässrigen Medien.....	27
1.5 Die Arylacetonitrilase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> EBC191	28
1.6 Ziele der Arbeit	29
2 Ergebnisse	31
2.1 Chemische Stabilität des Modellsubstrats Mandelonitril bei unterschiedlichen pH-Werten	31

2.2	Umsatz von (R,S)-Mandelonitril durch Zellextrakte oder ganze Zellen von <i>E. coli</i> JM109(pIK9) in Reaktionsmedien mit unterschiedlichen pH-Werten	32
2.2.1	Umsatz von Mandelonitril durch Zellextrakte von <i>E. coli</i> JM109(pIK9)	32
2.2.2	Umsatz von Mandelonitril durch ganze Zellen von <i>E. coli</i> JM109(pIK9)	34
2.2.3	Umsatz unterschiedlicher Konzentrationen an Mandelonitril durch ganze Zellen und Zellextrakte von <i>E. coli</i> JM109(pIK9)	36
2.2.4	Bildung von Mandelsäureamid beim Umsatz von Mandelonitril durch ganze Zellen und Zellextrakte von <i>E. coli</i> JM109(pIK9)	37
2.3	Umsatz von enantiomerenreinen (S)- bzw. (R)- Mandelonitril durch ganze Zellen von <i>E. coli</i> JM109(pIK9) in Reaktionsmedien mit unterschiedlichen pH-Werten	38
2.4	Integration der Arylacetonitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 und der (S)-Oxynitrilase aus <i>Manihot esculenta</i> in ein säuretolerantes Expressionssystem	40
2.4.1	<i>Pichia pastoris</i> als Expressionssystem	40
2.4.2	Integration des Gens der Arylacetonitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 in das Genom von <i>P. pastoris</i>	41
2.4.3	Umsatz von (R,S)-Mandelonitril durch Ruhezellen von <i>P. pastoris</i> pJOE5537.4 bei unterschiedlichen pH-Werten	42
2.4.4	Gemeinsame Integration der Gene der Arylacetonitrilase aus <i>P. fluorescens</i> EBC191 und der (S)-Oxynitrilase aus <i>Manihot esculenta</i> in das Genom von <i>P. pastoris</i>	44
2.4.5	Umsatz von (R,S)-Mandelonitril durch Ruhezellen von <i>P. pastoris</i> pJOE5557.2 bei unterschiedlichen pH-Werten	45
2.5	Umsatz von Benzaldehyd und Cyanid zu (S)-Mandelsäure und (S)-Mandelsäureamid durch Ruhezellen von <i>P. pastoris</i> pJOE5557.2	47
2.6	Anreicherung Nitrile hydrolysierender Mikroorganismen aus sauren Umweltproben	50
2.7	Charakterisierung der Wachstumseigenschaften von <i>E. oligosperma</i> R1	51
2.7.1	Wachstum von <i>E. oligosperma</i> R1 mit Phenylacetonitril als einziger Stickstoffquelle	51
2.7.2	Wachstum von <i>E. oligosperma</i> R1 mit Ammoniumsulfat oder Casaminsäuren als Stickstoffquelle	52

2.7.3	Wachstum von <i>E. oligosperma</i> R1 in Mineralmedien mit verschiedenen Konzentrationen an Phenylacetonitril	54
2.7.4	Wachstum von <i>E. oligosperma</i> R1 mit Phenylacetonitril oder Phenylelessigsäure als einziger Kohlenstoffquelle	55
2.7.5	Wachstum von <i>E. oligosperma</i> R1 in Mineralmedien mit pH-Werten von 1,5-9.....	56
2.8	Umsatz von Phenylacetonitril durch ganze Zellen und Zellextrakte von <i>E. oligosperma</i> R1.....	57
2.8.1	Umsatz von Phenylacetonitril zu Phenylelessigsäure und 2-Hydroxyphenylelessigsäure durch ganze Zellen von <i>E. oligosperma</i> R1.....	57
2.8.2	Umsatz von Phenylacetonitril durch ganze Zellen von <i>E. oligosperma</i> R1 unter sauren Bedingungen	59
2.8.3	Umsatz von Phenylacetonitril durch Zellextrakte von <i>E. oligosperma</i> R1	60
2.8.4	Umsatz von Phenylacetonitril und Phenylelessigsäureamid durch Zellextrakte von <i>E. oligosperma</i> R1.....	62
2.9	Substratspezifität der Nitril-hydrolysierenden Aktivität aus Zellextrakten von Phenylacetonitril induzierten Zellen von <i>E. oligosperma</i> R1.....	63
2.10	Optimierung der Induktion der Nitril-hydrolysierenden Aktivität von <i>E. oligosperma</i> R1	65
2.11	Substratspezifität der Nitril-hydrolysierenden Aktivität aus <i>E. oligosperma</i> R1 nach Induktion mit 2-Cyanopyridin	68
2.11.1	Umsatz von Phenylacetonitril, Benzonitril, 2-, 3-, 4-Cyanopyridin und Acrylonitril durch Zellen und Zellextrakte von <i>E. oligosperma</i> R1	68
2.11.2	Substratspezifität der Nitril-hydrolysierenden Aktivität aus Zellextrakten von <i>E. oligosperma</i> R1	71
2.11.3	Vergleich der Substratspezifitäten der Nitril-hydrolysierenden Aktivitäten aus <i>E. oligosperma</i> R1, <i>P. multicolor</i> CCF 2244, <i>F. solani</i> O1 und <i>A. niger</i> K10	73
2.12	Umsatz von 2-Hydroxy-3-butennitril durch ganze Zellen von <i>E. oligosperma</i> R1 unter sauren Bedingungen	74

2.13 Vergleich der möglichen Strategien zur Synthese optisch aktiver α-Hydroxycarbonsäuren und α-Hydroxycarbonsäureamide mittels „bienzymatischer“ Katalysatoren	76
2.13.1 (<i>S</i>)-Oxynitrilase katalysierte Synthese von α -Hydroxynitrilen in organischen Reaktionsmedien	76
2.13.2 Nitrilase katalysierte Hydrolyse von Nitrilen in Gegenwart organischer Lösungsmittel	77
2.13.3 Möglichkeiten zur enzymatischen Synthese von α -Hydroxycarbonsäuren ausgehend von Aldehyden und HCN in wassergesättigten organischen Reaktionsmedien oder biphasischen Reaktionsmedien	78
2.13.4 Synthese von (<i>S</i>)-Mandelsäure ausgehend von Benzaldehyd und HCN durch ein zellfreies „bienzymatisches System“ in einem biphasischen Medium	79
2.13.5 Entwicklung eines säuretoleranten „bienzymatischen Ganzzellkatalysators“ zur Synthese von (<i>S</i>)-Mandelsäure in sauren wässrigen Medien	79
2.13.6 Vergleich der enantioselektiven Synthese von (<i>S</i>)-Mandelsäure durch das zellfreie System und das Ganzzellsystem	80
2.13.7 Möglichkeiten zur Erweiterung des Konzepts der säuretoleranten „bienzymatischen Katalysatoren“	82
2.13.8 Alternative Ansätze zur Biotransformation von Nitrilen in sauren wässrigen Medien	83
2.13.9 Alternative Möglichkeiten zur Anwendung „bienzymatischer Ganzzellkatalysatoren“	85
3 Literatur	87
4 Veröffentlichungen	95
4.1 Conversion of mandelonitrile and phenylglycinenitrile by recombinant <i>E. coli</i> cells synthesizing a nitrilase from <i>Pseudomonas fluorescens</i> EBC191	95
4.2 Simultaneous expression of an arylacetonitrilase from <i>Pseudomonas fluorescens</i> and a (<i>S</i>)-oxynitrilase from <i>Manihot esculenta</i> in <i>Pichia pastoris</i> for the synthesis of (<i>S</i>)-mandelic acid	116
4.3 Isolation and characterization of a nitrile hydrolysing acidotolerant black yeast- <i>Exophiala oligosperma</i> R1	140

4.4	Characterization of the substrate specificity of the nitrile hydrolysing system of the acidotolerant black yeast <i>Exophiala oligosperma</i> R1.....	161
	Danksagung.....	184

Abstract

Enantiomerically pure α -hydroxycarboxylic acids are important precursors for the synthesis of a variety of (chiral) compounds. They can be synthesized by the enzymatic conversion of α -hydroxynitriles. For that purpose either racemic or enantiomerically pure α -hydroxynitriles can be used as starting substrates. The enantiomeric excess of the products of these biotransformations is limited by the instability of α -hydroxynitriles in aqueous media and the spontaneous chemical hydrocyanation of the decay products. These adverse reactions can be suppressed by the use of acidic reaction media. Therefore, in the present thesis the enzymatic hydrolysis of nitriles under acidic conditions was investigated. The aim of the study was to enable the enantioselective synthesis of (*S*)- α -hydroxycarboxylic acids starting from aldehydes and cyanide under acidic conditions. As a model reaction, it was aspired to synthesize (*S*)-mandelic acid from benzaldehyde plus cyanide.

Initial stability tests demonstrated that mandelonitrile was almost stable in aqueous media at pH-values <5. Therefore, the biotransformation of mandelonitrile was investigated at pH-values ≤ 5 . *E. coli* JM109(pIK9) which is recombinantly synthesizing an arylacetone nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191, was used as biocatalyst. Resting cells and crude extracts of *E. coli* JM109(pIK9) converted mandelonitrile at pH-values of 4-7 to mandelic acid and mandeloamide. Resting cells hydrolyzed mandelonitrile with significantly higher activities than crude extracts and converted mandelonitrile in initial concentration ≤ 150 mM. Thus, it could be clearly shown that *E. coli* whole-cell catalysts are in principle suited for the desired biotransformation.

For comparison, the arylacetone nitrilase from *P. fluorescens* EBC191 was also expressed in the acidotolerant yeast *Pichia pastoris*. Resting cells of the recombinant strain converted mandelonitrile at pH 3-7. The simultaneous expression of the (*S*)-oxynitrilase from cassava (*Manihot esculenta*) and the arylacetone nitrilase from *P. fluorescens* EBC191 in *P. pastoris* finally resulted in a "bienzymatic whole-cell catalyst", which catalyzed the transformation of benzaldehyde and KCN to (*S*)-mandelic acid and (*S*)-mandeloamide at a pH-value of 3.8.

Enrichments cultures were performed at pH-values of 3 and 4 with phenylacetone nitrile as sole source of nitrogen. The inocula were taken from various acidic habitats. The enrichments resulted in the isolation of the "black yeast" *Exophiala oligosperma* R1, which was able to use phenylacetone nitrile as sole source of nitrogen, carbon and energy. *E. oligosperma* R1 metabolized phenylacetone nitrile to phenylacetic acid. Phenylacetic acid was converted via 2-hydroxyphenylacetic acid to homogentisate, which was finally oxidized to maleylacetoacetate. Resting cells of *E. oligosperma* R1 hydrolyzed phenylacetone nitrile at pH-values of 1.5-9.

E. oligosperma R1 probably converted phenylacetonitrile by the action of a nitrilase. The highest nitrile converting activities were achieved after growing the organism in the presence of 2-cyanopyridine. Crude extracts were prepared from these cells and shown to convert a variety of different ring substituted benzonitriles, phenylacetonitriles, cyanopyridines as well as mandelonitrile, phenylpropionitrile and acrylonitrile to the corresponding carboxylic acids. Only traces of the corresponding amides were detected during the conversion of most nitriles. The nitrilase activity of *E. oligosperma* R1 hydrolyzed a wider range of nitriles compared to other fungal nitrilases. A potential application of the new biocatalyst was demonstrated by the conversion of 2-hydroxy-3-butenitrile to 2-hydroxy-3-butenoic acid by resting cells of *E. oligosperma* R1 at pH 4.

Kurzfassung

Enantiomerenreine α -Hydroxycarbonsäuren stellen bedeutende Ausgangsstoffe für die Synthese einer Vielzahl von (chiralen) Verbindungen dar. Die enzymatische Umsetzung von α -Hydroxynitrilen stellt eine Möglichkeit zur enantioselektiven Synthese von α -Hydroxycarbonsäuren dar. Hierbei können entweder racemische oder enantiomerenreine α -Hydroxynitrile als Ausgangssubstrate dienen. Die Enantiomerenüberschüsse der Produkte dieser Biotransformationen werden durch die Instabilität der α -Hydroxynitrile in wässrigen Medien und die spontane chemische Hydrocyanierung der Zerfallsprodukte limitiert. Diese unerwünschten Nebenreaktionen können durch die Verwendung saurer Reaktionsmedien unterdrückt werden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die enzymatische Hydrolyse von Nitrilen unter sauren Bedingungen untersucht. Das Ziel war es hierbei, die enantioselektive Synthese von (*S*)- α -Hydroxycarbonsäuren ausgehend von Aldehyden und Cyanid zu ermöglichen. Als Modellreaktion wurde die Synthese von (*S*)-Mandelsäure angestrebt.

Anfängliche Stabilitätstest zeigten, dass Mandelonitril in wässrigen Medien bei pH-Werten <5 weitgehend stabil vorliegt. Daher wurde die Biotransformation von Mandelonitril bei pH-Werten ≤ 5 untersucht. Als Biokatalysator wurde *E. coli* JM109(pIK9) eingesetzt, der eine Arylacetonitrilase aus *Pseudomonas fluorescens* EBC191 rekombinant synthetisiert. Ruhezellen und Rohextrakte von *E. coli* JM109(pIK9) setzten Mandelonitril bei pH-Werten von 4-7 zu Mandelsäure und Mandelsäureamid um. Ruhezellen hydrolysierten Mandelonitril mit signifikant höheren Aktivitäten als Rohextrakte und setzten Mandelonitril in Konzentrationen ≤ 150 mM um. Es konnte somit deutlich gezeigt werden, dass die eingesetzten *E. coli* Ganzzell-Katalysatoren prinzipiell für die angestrebte Biotransformation geeignet sind.

Die Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 wurde zum Vergleich auch in der säuretoleranteren Hefe *Pichia pastoris* exprimiert. Ruhezellen des rekombinanten Stamms setzten Mandelonitril bei pH 3-7 um. Die simultane Expression der (*S*)-Oxynitrilase aus Maniok (*Manihot esculenta*) und der Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 in *P. pastoris* führte zu einem "bienzymatischen Ganzzellkatalysator", welcher die Transformation von Benzaldehyd und KCN zu (*S*)-Mandelsäure und (*S*)-Mandelsäureamid bei pH 3,8 katalysierte.

Es wurden Anreicherungen bei pH 3 und 4 mit Phenylacetonitril als Stickstoffquelle durchgeführt. Hierbei wurden Inokula aus verschiedenen sauren Biotopen verwendet. Es wurde ein neues Isolat der „schwarzen Hefe“ *Exophiala oligosperma* angereichert, das Phenylacetonitril als einzige Stickstoff-, Kohlenstoff und Energiequelle nutzen konnte. *E. oligosperma* R1 setzte Phenylacetonitril zu Phenylelessigsäure um und metabolisierte dieses Intermediat über 2-Hydroxyphenylelessigsäure zu Homogentisat, welches dann zu

Maleylacetoacetat oxidiert wurde. Ruhezellen von *E. oligosperma* R1 hydrolysierten Phenylacetonitril bei pH-Werten von 1,5-9. Phenylacetonitril wurde von *E. oligosperma* R1 wahrscheinlich durch eine Nitrilase umgesetzt. Die höchsten Nitrilase-Aktivitäten wurden nach Anzucht des Organismus in Gegenwart von 2-Cyanopyridin erreicht. Rohextrakte aus derart induzierten Zellen setzten eine Vielzahl unterschiedlich ringsubstituierter Benzonitrile, Phenylacetonitrile, Cyanopyridine, sowie Mandelonitril, Phenylpropionitril und Acrylonitril zu den korrespondierenden Carbonsäuren um. Spuren von Carbonsäureamiden konnten nur in wenigen Umsätzen nachgewiesen werden. Der Vergleich der Nitrilase-Aktivität von *E. oligosperma* R1 mit verschiedenen anderen Nitrilasen aus Pilzen zeigte, dass die Nitrilase aus *E. oligosperma* R1 ein breiteres Spektrum an Nitrilen hydrolysierte. Die potentielle Nutzbarkeit des neuen Biokatalysators wurde durch den Umsatz von 2-Hydroxy-3-butenitril zu 2-Hydroxy-3-butensäure durch Ruhezellen von *E. oligosperma* R1 bei pH 4 verifiziert.

1 Einleitung

1.1 Nitrile - Vorkommen, Bedeutung und industrielle Nutzung

Als Nitrile bezeichnet man organisch chemische Verbindungen, die eine Cyanogruppe (-CN) als funktionelle Gruppe tragen. Sie leiten sich formal von Blausäure (HCN) durch den Austausch des Wasserstoffatoms durch einen organischen Rest ab und werden mit der allgemeinen Formel R-CN bezeichnet. Nitrile können natürlichen Ursprungs (biogen) sein, oder durch chemische Synthesen hergestellt werden (anthropogene Nitrile).

1.1.1 Biogene Nitrile

Nitrile sind in der Natur weit verbreitet und wurden insbesondere in Form von Cyanglykosiden, Cyanlipiden oder Cyanhydrinen (α -Hydroxynitrilen) in verschiedenen Gruppen niederer Organismen, wie Bakterien, Pilzen, Algen und Schwämmen, aber auch in höheren Organismen, wie Insekten und Pflanzen nachgewiesen (Legras *et al.* 1990, Bartling *et al.* 1992, Zagrobelny *et al.* 2008). Während sich ihre Verbreitung im Tierreich nach dem aktuellen Wissensstand auf wenige Vertreter der Porifera und Arthropoda beschränkt, sind Nitrile im Pflanzenreich vergleichsweise weit verbreitet. Man findet sie in über 3000 Pflanzenspezies aus über 110 Pflanzenfamilien. Sie stellen in vielen Pflanzen Stoffwechselintermediate dar, wie z. B. Indol-3-acetonitril, das in einigen Pflanzen offenbar das Ausgangssubstrat für die Synthese des Pflanzenwachstumshormons Indol-3-essigsäure darstellt (Legras *et al.* 1990, Bartling *et al.* 1992, Piotrowski 2008). Als Strukturelemente von Cyanglykosiden, wie z. B. Amygdalin (D-Mandelonitril- β -gentobiose) und Linamarin (α -Hydroxyisobutyronitril- β -D-glukose) oder Alkaloiden, wie z. B. Ricin (N-Methyl-3-cyano-4-methoxy-2-pyridon) sind Nitrile zudem bedeutende Verbindungen des pflanzlichen Sekundärmetabolismus (Legras *et al.* 1990, Vetter 2000, Robinson & Hook 1964, Piotrowski 2008).

Eine besondere Funktion kommt Nitrilen in cyanogenen Pflanzen zu, in welchen sie in Form der Cyanglykoside Ausgangssubstrate für die Cyanogenese, der enzymatisch katalysierten Freisetzung von Cyanwasserstoff zum Schutz der Pflanze vor Herbivoren darstellen. Bei Verletzung von cyanogenen Pflanzengewebe kommt es hierbei zu einer durch β -Glykosidasen katalysierten Umsetzung der gespeicherten Cyanglykoside zu den korrespondierenden Cyanhydrinen und Zuckern. Die freiwerdenden Cyanhydrine werden im Anschluss durch spontane chemische und / oder enzymatische Reaktionen [katalysiert durch Hydroxynitril-Lyasen (Oxynitrilasen)] zu deren korrespondierenden Aldehyden bzw. Ketonen umgesetzt, wobei äußerst toxischer Cyanwasserstoff (Blausäure) freigesetzt wird (Vetter 2000).

Viele cyanogene Pflanzen sind wirtschaftlich von großem Interesse und finden als Heil- und Nutzpflanzen Verwendung (Jones 1998). Die Wurzelknollen des Kassava-Strauches (*Manihot esculenta*) dienen z. B. aufgrund ihres hohen Stärkegehalts als wichtiges Grundnahrungsmittel in Südamerika und Zentralafrika. Durch den hohen Gehalt an den Cyanglykosiden Linamarin und Lotaustralin (2-Hydroxy-2-methylbutyronitril- β -D-glukose) in den Wurzelknollen (bis zu 500 mg/kg Frischgewicht) und dem Potential daraus entsprechende Mengen Cyanid freizusetzen, kommt es in den entsprechenden Regionen in Folge unsachgemäßer Zubereitung immer wieder zu akuten Intoxikationen und chronischen Erkrankungen, wie z. B. Konzo (endemisch spastische Paraparese) - einer unheilbaren Lähmung der unteren Extremitäten (Jones 1998, Vetter 2000, Kaiser 2002).

1.1.2 Anthropogene Nitrile

Ogleich Nitrile aufgrund ihrer direkten oder indirekten Toxizität für den Menschen oftmals problematische und insbesondere in Nutzpflanzen unerwünschte Verbindungen darstellen, sind sie wirtschaftlich und industriell von großer Bedeutung und werden in großindustriellen Maßstäben hergestellt. Sie finden in Form einfacher Nitrile bzw. komplexer Nitrilderivate als Lösemittel (z. B. Acetonitril), Ausgangsstoffe für die Herstellung von Kunststoffen, Synthesekautschuk und Kunstfasern (z. B. Acrylonitril für die Synthese von ABS - Acrylonitril-Butadien-Styrol-Copolymerisat, NBR - (Acrylo)-Nitrile-Butadiene-Rubber und PAN - Polyacrylnitrilfasern), sowie als Klebstoffe (z. B. Ethyl-/Methyl-2-cyanacrylat) oder Herbizide / Biozide (z. B. Bromoxynil = 3,5-Dibrom-4-hydroxybenzonitril, Dichlobenil = 2,6-Dichlorbenzonitril) Verwendung (Knowles & Wyatt 1992, Arpe 2007).

Nitrile stellen zudem bedeutende Ausgangsstoffe für die Synthese einer Vielzahl von wirtschaftlich interessanten, höherwertigen Carbonsäuren und Carbonsäureamiden dar, wie z. B. α -Aminosäuren, Nikotinsäure, Pyrazinsäure und Nikotinamid (Jallageas *et al.* 1980, Liese *et al.* 2006, Thomas *et al.* 2002).

1.2 Vergleich der chemischen und enzymatischen Transformationen von Nitrilen zu Carbonsäuren und Carbonsäureamiden

Die traditionelle großtechnische chemische Umsetzung von Nitrilen zu Carbonsäuren bzw. Carbonsäureamiden erfolgt durch die saure bzw. basische Umsetzung der Ausgangsstoffe. Diese Verfahren sind mit gravierenden ökonomischen und ökologischen Nachteilen behaftet. Sie erfordern, neben extrem sauren bzw. basischen Reaktionsbedingungen, hohe Prozesstemperaturen, sowie vielfach den Einsatz von chemischen Katalysatoren (Nagasawa &

Yamada 1989, Arpe 2007). Im Verlauf dieser Prozesse entstehen, außer den gewünschten Zielprodukten, durch Nebenreaktionen vielfach unerwünschte, mitunter toxische und somit in der Entsorgung bzw. Aufbereitung problematische Nebenprodukte. Diese Nebenreaktionen führen zudem dazu, dass häufig nur geringe Produktausbeuten erreicht werden können und das gewünschte Produkt im Anschluss an den eigentlichen Syntheseprozess durch aufwendige chemische und / oder physikalische Verfahren von unverbrauchten Edukten, Nebenprodukten sowie den eingesetzten Katalysatoren abgetrennt und aufgereinigt werden muss.

Aufgrund der weiten Verbreitung von Nitrilen in der Natur ist es nicht verwunderlich, dass eine Vielzahl von (Mikro-)Organismen Nitrile verseifende Enzymsysteme besitzen, die ihnen die Fähigkeit verleihen, Nitrile zu hydrolysieren und die daraus resultierenden Produkte als Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquellen zu nutzen. Derzeit sind zwei Enzymsysteme bekannt, welche den Umsatz von Nitrilen zu Carbonsäuren bzw. Carbonsäureamiden katalysieren (Abb. 1) und somit potentiell als Biokatalysatoren eingesetzt werden können (O'Reilly & Turner 2003):

Nitrilasen (E.C. 3.5.5.1) katalysieren, unabhängig von Co-Faktoren, die direkte Umsetzung von Nitrilen zu den korrespondierenden Carbonsäuren und Ammoniak in einer 1-Stufen Reaktion.

Nitril-Hydratase (E.C. 4.2.1.84) katalysieren, in Abhängigkeit von Co-Faktoren (Fe oder Co-Ionen), die Umsetzung von Nitrilen zu den korrespondierenden Carbonsäureamiden (Banerjee *et al.* 2002), welche in einer weiteren, durch Amidase (E.C. 3.5.1.4) katalysierten, Folgereaktion zu den korrespondierenden Carbonsäuren und Ammoniak umgesetzt werden können.

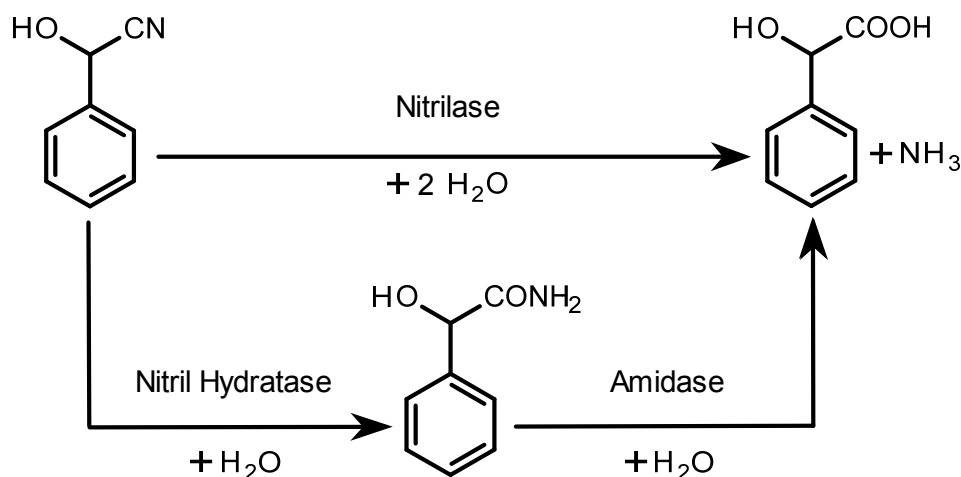


Abb. 1: Enzymatischer Abbau von Nitrilen am Beispiel von Mandelonitril

In Kontrast zu den bereits angeführten verfahrenstechnischen, ökonomischen und ökologischen Nachteilen der traditionellen chemischen Nitril-Hydrolyse bietet die Biotransformation von

Nitrilen mit Hilfe der angesprochenen Enzyme eine Reihe potentieller Vorteile. So finden derartige Biotransformationen unter vergleichsweise milden Reaktionsbedingungen statt. Dies hat neben dem geringen Einsatz von Energie im Vergleich zur traditionellen chemischen Umsetzung den Vorteil, dass beispielsweise auch Substanzen mit unter sauren oder basischen Bedingungen labilen Gruppen ohne den Einsatz von aufwendigen Schutzgruppen-Techniken umgesetzt werden können.

Die wesentlichen Vorteile von Biotransformation begründen sich aber in der Selektivität der eingesetzten Enzyme. So sind Enzyme in der Regel chemoselektiv. Hierunter versteht man, dass genau eine Art Transformation durch das eingesetzte Enzym katalysiert wird. Des Weiteren sind Enzyme vielfach regioselektiv, dies bedeutet, dass diese Substratumsetzung bevorzugt an einer von mehreren möglichen Positionen durchgeführt wird. Während die Chemoselektivität eines Enzyms also in der Regel unspezifische Nebenreaktionen ausschließt und damit zur Minimierung von Nebenprodukten und Maximierung der Ausbeute beiträgt, kann die Regioselektivität eines Enzyms die gezielte Transformation an einer bestimmten Position des Edukts ermöglichen, z. B. die selektive Monohydrolyse eines Dinitrils.

Ein weiterer möglicher Vorteil von Enzymen besteht in diesem Zusammenhang noch in der möglichen Stereoselektivität. Ein stereoselektives Enzym kann im Fall von chiralen Verbindungen (siehe Abschnitt 1.3 und 1.4) die gezielte Produktion von enantiomerenreinen Verbindungen ermöglichen.

1.2.1 Beispiele für etablierte industrielle Biotransformationen von Nitrilen zu Carbonsäuren und Carbonsäureamiden

Nitrile hydrolysierende Enzyme werden aufgrund der angeführten Vorteile bereits in einer Reihe von industriellen Prozessen erfolgreich zur Produktion von Carbonsäuren und Carbonsäureamiden eingesetzt. Hierbei finden sie sowohl in großtechnischen Prozessen zur Produktion von Bulkchemikalien, wie z. B. Acrylamid im Maßstab von >100.000 Jahrestonnen, als auch bei der Produktion von Feinchemikalien mit Produktionsvolumina von wenigen Kilogramm pro Jahr Verwendung, wie z. B. bei der Herstellung von 5-Hydroxypyrazin-2-carbonsäure (Tab. 1).

Edukt	Produkt	Enzym/Stamm	Prozessmaßstab	Unternehmen	Produktverwendung	Quelle
Acrylonitril	Acrylamid	Nitril-Hydratase / <i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1	>100 000 t/a	Mitsubishi Chemical Holding, Japan	Flockungsmittel, Herstellung von Polymeren	Liese et al. 2006, Thomas et al. 2002
3-Cyanopyridin	Nikotinamid	Nitril-Hydratase / <i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1	6000 t/a	Lonza AG, Schweiz	Vitamin/ Nahrungsergänzungsmittel	Liese et al. 2006
Adipodinitril	5-Cyanovaleriansäureamid	Nitril-Hydratase / <i>Pseudomonas chlororaphis</i> B23	mehrere Tonnen	DuPont, USA	Intermediat für die Synthese des Herbizids Azafenidin	Liese et al. 2006
2-Cyanopyridin	1. Picolinsäure 2. 6-Hydroxypicolinsäure	1. Nitrilase 2. Hydroxylase / <i>Alcaligenes faecalis</i> DSM 6335	~ 1 t/a	Lonza AG, Schweiz	Intermediate für die Synthese von Pharmazeutika und Herbiziden	Liese et al. 2006
2-Cyanopyrazin	1. Pyrazin-2-carbonsäure 2. 5-Hydroxypyrazin-2-carbonsäure	1. Nitrilase 2. Hydroxylase / <i>Agrobacterium</i> sp. DSM 6336	mehrere kg	Lonza AG, Schweiz	Intermediate für die Synthese von Tuberkulostatika	Liese et al. 2006
(R,S)-Mandelonitril	(R)- Mandelsäure	(R)-enantioselektive Nitrilase / <i>E. coli</i> JM109 (pDHE19.2)	mehrere Tonnen	BASF AG, Deutschland	Intermediat für die Synthese von chiralen Pharmazeutika / Reagenz zur Diastereomerenbildung bei Racemattrennungen	Liese et al. 2006, Gröger 2001

Tab. 1: Industriell angewandte Biotransformationen von Nitrilen

Das prominenteste Beispiel für eine etablierte großtechnische Biotransformation von Nitrilen ist die Herstellung von Acrylamid aus Acrylonitril (Thomas *et al.* 2002). Das Verfahren wurde in den 1980er Jahren durch die japanische Arbeitsgruppe um Yamada entwickelt und wird derzeit insbesondere durch die Mitsubishi Chemical Holding (Japan) zur großtechnischen Produktion von Acrylamid eingesetzt (Nagasawa & Yamada 1995, Antranikian 2006).

Während die konventionelle chemische Synthese von Acrylamid Prozesstemperaturen von 80-120 °C und den Einsatz extrem saurer Reaktionsmedien (6M HCl), sowie Raney-Kupfer als chemischen Katalysator erfordert, erfolgt die Biotransformation von Acrylonitril zu Acrylamid unter vergleichsweise milden Bedingungen bei 5-10 °C in neutraler wässriger Lösung (Nagasawa & Yamada 1989, Arpe 2007). Als Biokatalysatoren kommen hierbei ganze Zellen von *Rhodococcus rhodochrous* J1 zum Einsatz. Der Organismus verfügt über eine Nitril-Hydratase, welche die Umsetzung von Acrylonitril zu Acrylamid katalysiert. Als Produkt entsteht, bei vollständiger Umsetzung des Edukts, fast ausschließlich Acrylamid und nur kaum nachweisbare Spuren von Acrylsäure, so dass sich die Aufbereitung der Produktlösung auf das einfache Abtrennen der Zellen, das Entfärben und die Aufkonzentration des Acrylamids beschränkt (Abb. 2). Im Gegensatz hierzu fallen bei der konventionellen chemischen Synthese große Mengen an toxischen Abfallprodukten und Kupfersalzen an (Hagen 2006). Dies hat zur Folge, dass die Produktlösung im Anschluss an den eigentlichen chemischen Prozess durch chemische und physikalische Verfahren aufwendig und kostenintensiv aufgereinigt werden muss.

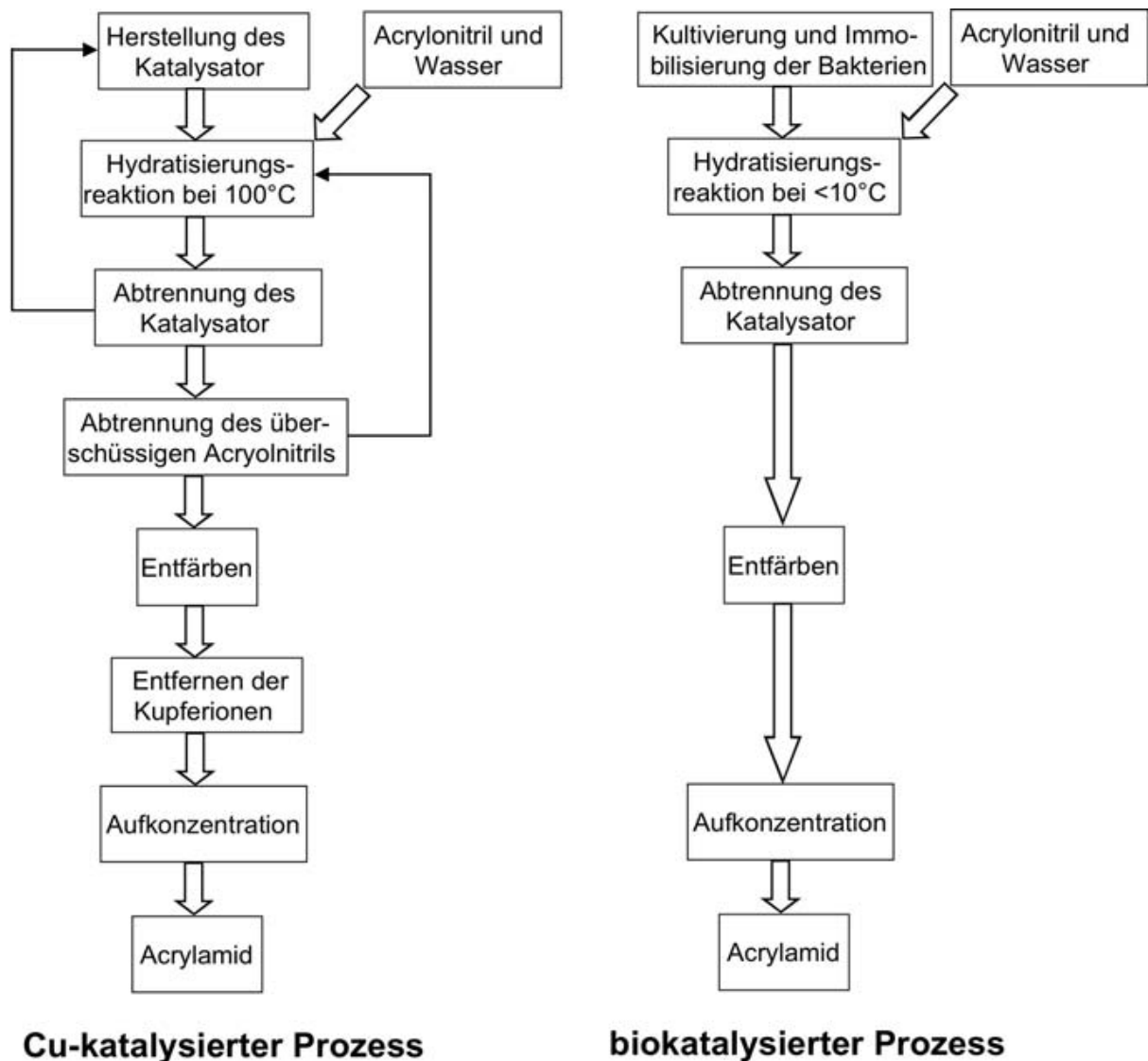


Abb. 2: Schematischer Vergleich des traditionellen Cu-katalysierten Herstellungs-Prozesses von Acrylamid und des biokatalytischen Acrylamid-Ganzzellverfahrens der Mitsubishi Chemical Holding, Japan (aus Antranikian 2006)

Neben den überwiegend nicht stereoselektiven Prozessen, in welchen Nitrile hydrolysierende Enzyme seit fast zwei Jahrzehnten zum Einsatz kommen, konnten durch die Applikation von stereoselektiven Enzymen in den vergangenen Jahren auch asymmetrische Synthesen etabliert werden. Als erfolgreichster Prozess ist hier die Produktion von (*R*)-Mandelsäure (sowie einiger chlosubstituierter (*R*)-Mandelsäurederivate) durch die BASF AG anzuführen (Liese *et al.* 2006, Gröger 2001, Chipros[®]-Produktportfolio, BASF AG). Das racemische Edukt [(chlorsubstituiertes) (*R,S*)-Mandelonitril] wird in diesem Prozess durch eine (*R*)-enantioselektive Nitrilase zum weitestgehend enantiomerenreinen [Enantiomerenüberschuss (*ee*) >99 %] Produkt [(chlorsubstituierte) (*R*)-Mandelsäure] umgesetzt (Liese *et al.* 2006, Gröger 2001).

1.3 Chiralität

1.3.1 Definition

Chiralität (eine Wortschöpfung basierend auf dem griechischen Wort für Hand, *cheir*) bezeichnet die “Händigkeit” dreidimensionaler Objekte. Ein Objekt wird als chiral bezeichnet, wenn es weder eine Spiegelebene noch eine Drehspiegelachse besitzt und somit mit einem spiegelbildlichen Objekt nicht durch Drehung oder Translation zur Deckung gebracht werden kann (Hellwich 2007). Prominenteste Beispiele für chirale Strukturen und zugleich namensgebend sind die linke und rechte Hand des Menschen.

Aufgrund der tetraedrischen Konformation von sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatomen erfüllen auch organische Verbindungen, in welchen ein asymmetrisch substituiertes Kohlenstoffatom vorliegt, d. h. ein Kohlenstoffatom, das von 4 verschiedenen Substituenten umgeben ist, diese Voraussetzung. Das asymmetrisch substituierte Kohlenstoffatom wird dann als Chiralitäts- oder Asymmetriezentrum bezeichnet. Besitzt eine Verbindung genau ein Chiralitätszentrum, so kann diese in zwei unterschiedlichen Konfigurationen vorliegen (Abb. 3).

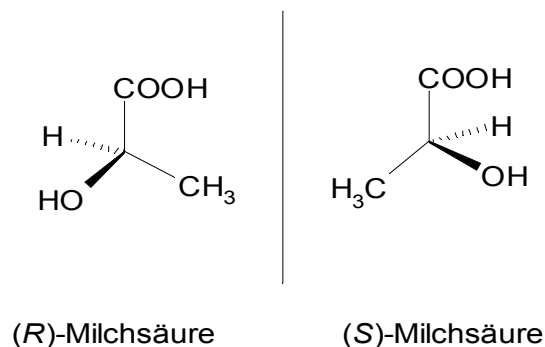


Abb. 3: Die Enantiomere der Milchsäure

Die unterschiedlichen Konfigurationen einer solchen Verbindung bezeichnet man als Enantiomere (vom griechischen *enantion* ~ Gegenteil; veraltet: optische Antipoden).

Besitzen Verbindungen mehr als ein Chiralitätszentrum, so bezeichnet man nur die Stereoisomere als Enantiomere, die sich hinsichtlich der Konfiguration aller ihrer Chiralitätszentren unterscheiden. Stereoisomere, die sich nicht in Bezug auf die Konfiguration aller ihrer Chiralitätszentren unterscheiden, werden als Diastereomere bezeichnet, da sie sich nicht spiegelbildlich zueinander verhalten.

Während Diastereomere sich in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften unterscheiden, besitzen die Enantiomere einer Verbindung identische chemische und physikalische Eigenschaften. Eine Ausnahme stellt hierbei nur die unterschiedliche optische

Aktivität der Enantiomere dar, die zu einer gegensätzlichen Drehung der Schwingungsebene von linear polarisiertem Licht führt. Als chirale Verbindungen unterscheiden sich aber sowohl Enantiomere als auch (chirale) Diastereomere allgemein in ihren Interaktionen mit anderen chiralen Substanzen (Hellwich 2007).

1.3.2 Pharmakologische Bedeutung chiraler Verbindungen – Die Geschichte vom „guten“ Eutomer und dem „bösen“ Distomer

In der Natur beobachtet man vielfach eine ausgeprägte Enantiomerendiskriminierung, so sind in biologischem Material fast ausschließlich L-Aminosäuren und D-Zucker vorhanden. Dies führt dazu, dass komplexe biologische Strukturen in der Regel optisch aktiv sind. Enantiomere einer niedermolekularen Verbindung können mit biologischen Strukturen, wie z. B. Enzymen, Rezeptoren und Transportproteinen, unterschiedlich reagieren. Diese unterschiedlichen Interaktionen der Enantiomere führen zu stereospezifischen Unterschieden hinsichtlich deren biologischen Aktivität, Funktion, Wirkung, Verteilung und Ausscheidung.

Die unterschiedliche Wirkung von Enantiomeren wird besonders deutlich an Beispielen pharmakologisch aktiver Verbindungen. Sie kann sich im einfachsten Fall darin äußern, dass lediglich ein Enantiomer eine pharmakologische Wirkung aufweist, sein „Spiegelbild“ hingegen in jeder Beziehung unwirksam ist. Ein solcher Fall liegt zum Beispiel bei Panthothensäure vor. Während (*R*)-Panthothensäure (ein Vitamin des B-Komplexes) eine biologisch aktive und wirksame Verbindung darstellt, ist (*S*)-Panthothensäure unwirksam (Coxon *et al.* 2005).

Ein ähnlicher Fall liegt auch bei Ibuprofen [(*R,S*)-2-(4-Isobutylphenyl)propionsäure / (*R,S*)-4-Isobutyl- α -methylphenylelessigsäure] vor. Während (*S*)-Ibuprofen das pharmakologisch wirksame Enantiomer darstellt, ist (*R*)-Ibuprofen pharmakologisch unwirksam. (*R*)-Ibuprofen wird allerdings im Körper nach Aktivierung zum CoA-Ester durch eine Isomerase (2-Arylpropionyl-CoA-Epimerase) zum (*S*)-Enantiomer umgewandelt, so dass auch die reine Gabe von (*R*)-Ibuprofen zu einer, wenn auch schwächeren, Wirkung führt (Geisslinger *et al.* 1989).

Anders verhält es sich bei Adrenalin und Noradrenalin. Hier haben jeweils beide Enantiomere prinzipiell die gleiche pharmakologische Wirkung, welche sich jedoch in ihrer Intensität unterscheidet. So sind die natürlich vorkommenden (*R*)-Enantiomere von Adrenalin und Noradrenalin etwa 20-50-mal wirksamer als die synthetischen (*S*)-Enantiomere (Rice *et al.* 1989).

Oftmals ist es aber so, dass die Stereoisomere einer Verbindung sehr unterschiedliche biologische Wirkungen entfalten (Tab. 2).

Chirale Substanz	Stereoisomer	Effekt
Aspartam	(<i>R,R</i>)-Isomer	süßer Geschmack
	(<i>S,R</i>)-Isomer	bitterer Geschmack
Barbiturate	(<i>S</i>)-Isomer	Sedativum
	(<i>R</i>)-Isomer	krampflösend
Limonen	(<i>S</i>)-Isomer	Zitronengeruch
	(<i>R</i>)-Isomer	Orangengeruch
Opiate	(<i>R,S</i>)-Isomer	Narkotika (Abhängigkeit!)
	(<i>S,R</i>)-Isomer	Hustenmittel
Penicillamin	(<i>D</i>)-Isomer	Antiarthritikum
	(<i>L</i>)-Isomer	toxisch
Thalidomid	(<i>S</i>)-Isomer	fruchtschädigend
	(<i>R</i>)-Isomer	schlaffördernd

Tab. 2: Beispiele für chirale Substanzen und ihre biologischen Effekte (nach White & Subramanian 1994)

Als bekanntestes Beispiel sei hier die unterschiedliche Wirkung der Enantiomere von Thalidomid angeführt. Thalidomid wurde im Jahre 1957 als Thalidomid-Racemat (äquimolare Mischung beider Enantiomere) unter dem Namen Contergan[®] auf den Markt gebracht und diente als Schlaf- und Beruhigungsmittel (Roth 2005). Da es sich als besonders wirksam gegen die morgendliche Übelkeit von schwangeren Frauen erwies, wurde es bevorzugt von diesen eingenommen. Es kam in mehreren tausend Fällen zu Wachstumsstörungen an den Gliedmaßen ansonsten gesunder Kinder, was man auf die teratogene Wirkung des (*S*)-Enantiomers zurückführte (Roth 2005). Man geht derzeit davon aus, dass nur das (*R*)-Enantiomer die gewünschte sedative und antiemetische Wirkung entfaltet. Es gibt allerdings auch Hinweise, dass es auch im Fall Thalidomid zu einer Racemisierung im Körper kommen kann, so dass eine teratogene Wirkung eventuell auch bei Gabe von reinem (*R*)-Thalidomid zu erwarten ist (Testa *et al.* 1993, Roth 2005). Der Wirkstoff Thalidomid wurde in Form des Racemats 2001 nichtsdestotrotz als so genanntes “Arzneimittel für seltene Leiden” (orphan drug) ausgewiesen und 2008 von der EU-Kommission zur Behandlung von multiplen Myelomen zugelassen (Celegene Cooperation, NJ, USA). Er gilt zudem weiterhin als einer der potentesten Wirkstoffe gegen Lepra und wird in vielen Ländern weiterhin unter strengen Kontrollen eingesetzt.

Anhand der angeführten Beispiele ist es verständlich, dass es unter pharmakologischen Gesichtspunkten unerlässlich ist, die Wirkungen aller Stereoisomere einer Verbindung zu analysieren und diese nur nach detaillierten Untersuchungen einzusetzen. Neben den pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Vorteilen, die die Applikation eines reinen Eutomers (Enantiomer mit einer beabsichtigten biologischen Aktivität; Gegenteil: Distomer) gegenüber einem ebenfalls wirksamen (und unschädlichen) Racemat mit sich ziehen kann, führten in den letzten Jahrzehnten auch rein wirtschaftliche Interessen zu einem Anstieg beim

Einsatz chiraler Pharmazeutika. So ist das "Chiral Switch"-Konzept, das die Vermarktung des reinen Eutomers eines zuvor bereits auf den Markt befindlichen Wirkstoffracemats beschreibt, für viele Pharmaunternehmen patent- und lizenzrechtlich besonders interessant, da sich der chirale Wirkstoff im Anschluss an die Vermarktung des Racemats erneut exklusiv vermarkten lässt und dies mit geringen Entwicklungskosten verbunden ist – dies wurde z. B. bei der Vermarktung von Ibuprofen realisiert (Hutt & Valentová 2003).

Aufgrund der pharmakologischen und ökonomischen Bedeutung enantiomerenreiner chiraler Verbindungen ist es nicht verwunderlich, dass es in den letzten Jahrzehnten zu einer starken Expansion des Marktes an chiralen Verbindungen kam. Der globale Umsatz mit enantiomerenreinen Medikamenten hat sich in den letzten fünfzehn Jahren von ca. 40 Mrd. US\$ Mitte der 90er Jahre auf geschätzte 200 Mrd. US\$ für das Jahr 2008 verfünffacht. Enantioselektive Synthesewege sind daher von entscheidender Bedeutung für die Wirkstoffentwicklung und -produktion (Dechema 2006).

1.3.3 Herstellung enantiomerenreiner Produkte

Die Mehrzahl chiraler Produkte wird derzeit noch durch klassische chemische Synthesen hergestellt. Diese haben jedoch vielfach den Nachteil, dass chemische Reaktionen meist nur zur Bildung von Racematen führen. Ist ein enantiomerenreines Produkt erwünscht, so muss dies vom unerwünschten Enantiomer abgetrennt werden. Hierfür setzt man klassischerweise chemische und physikalische Methoden zur Racemattrennung ein [Diastereomerentrennung, präparative chirale High-Performance-Liquid-Chromtography (HPLC)].

Die überschüssige und unwirtschaftliche Produktion des unerwünschten Enantiomers und dessen kostenintensive Abtrennung kann durch den Einsatz enantioselektiver Katalysatoren vermieden werden. Hierfür kommen chemische oder biologische Katalysatoren in Frage. Für eine nachhaltige Synthese sind Enzyme besonders interessant, da sie - wie bereits angeführt - oftmals in der Lage sind, asymmetrische Reaktionen stereo- bzw. enantiospezifisch zu katalysieren.

Stereoselektive Biokatalysatoren werden bereits in vielen Prozessen eingesetzt. Durch die rasante Entwicklung des chiralen Marktes und die Vielfalt der möglichen Applikationen ist weiterhin davon auszugehen, dass deren Einsatz in großtechnischen Prozessen zukünftig weiter zunehmen wird (Patel 2002, 2008).

1.4 Enantiomerenreine α -substituierte Carbonsäuren und Carbonsäureamide

1.4.1 Bedeutung

Enantiomerenreine α -substituierte Carbonsäuren und α -substituierte Carbonsäureamide (z. B. α -Hydroxycarbonsäuren, α -Hydroxycarbonsäureamide, α -Aminocarbonsäuren und α -Aminocarbonsäureamide) stellen bedeutende Ausgangsstoffe für die Synthese einer Vielzahl von (chiralen) Verbindungen dar und sind aus diesem Grund industriell von großem Interesse (Nagasawa & Yamada 1989, Gröger 2001). Enantiomerenreine (*R*)- und (*S*)-Mandelsäure sowie deren substituierte Derivate werden beispielsweise vielfach als Intermediate für die Synthese verschiedener Pharmazeutika (z. B. für die Synthese des Gerinnungshemmers (*S*)-Clopidogrel oder für die Synthese verschiedener semisynthetischer Cephalosporine), sowie als Ausgangsstoffe für die Synthese einer Reihe weiterer chiraler Verbindungen eingesetzt (Gröger 2001, Saravanan & Singh 1998, Furlmeier *et al.* 1976, Sharma *et al.* 2005, Breuer & Hauer 2003). Zudem finden die reinen Enantiomere der Mandelsäure als Reagenzien bei der klassischen Trennung von Racematen durch Diastereomerentrennung Verwendung (Gröger 2001, Zhou *et al.* 1994).

Eine weitere interessante Applikation enantiomerenreiner (*R*)- oder (*S*)-Mandelsäure könnte zukünftig in der Synthese von „SAMMA“ (sulfuric acid-modified mandelic acid) liegen. Neuesten Untersuchungen zufolge verhindert „SAMMA“, ein bislang nicht eindeutig spezifiziertes Polymandelsäurekondensat, aktiv die Übertragung von / Infektion mit HIV (Humanes Immundefizienz Virus), HSV 1+2 (Herpes Simplex Virus), Rinder Papillomavirus, *Neisseria gonorrhoeae* und *Chlamydia trachomatis* und kommt somit zukünftig eventuell für Präventionsapplikationen in Frage (Zaneveld *et al.* 2002, Herold *et al.* 2002, Chang *et al.* 2007). Da bislang weder Struktur noch Wirkung von „SAMMA“ eindeutig geklärt sind, ist nicht auszuschließen, dass die Wirkung des racemischen Kondensats auf spezifischen hetero- oder homochiralen Strukturen beruht (Ward *et al.* 2007). Gewissheit würde hier die Isolation / definierte Synthese entsprechender Strukturen und die Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung erbringen. Für den pharmakologischen Einsatz der wirksamen Verbindung könnte später eine definierte Synthese notwendig werden oder von Vorteil sein, für welche wiederum enantiomerenreine (*R*)- und (*S*)-Mandelsäure benötigt werden würde.

Während (*R*)-Mandelsäure, wie bereits in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, durch die großtechnische Umsetzung von (*R,S*)-Mandelonitril auf biokatalytischem Wege zugänglich ist, konnte bislang kein enantioselektiver biokatalytischer Prozess zur Herstellung des korrespondierenden (*S*)-Enantiomers kommerziell etabliert werden (Huang & Xu 2006).

1.4.2 Enantioselektive Synthese von enantiomerenreinen α -Hydroxycarbonsäuren ausgehend von Aldehyden oder Ketonen mit Hilfe enantioselektiver Nitrilasen oder enantioselektiver Oxynitrilasen

Derzeit sind zwei Enzym-katalysierte Wege bekannt, die die enantioselektive Synthese von enantiomerenreinen α -Hydroxycarbonsäuren ausgehend von leicht zugänglichen Aldehyden oder Ketonen und HCN ermöglichen (Gröger 2001).

Die erste Methode (Abb. 4 A) basiert auf der basenkatalysierten chemischen Kondensation von Aldehyden bzw. Ketonen mit HCN. Das dadurch entstehende Cyanhydrin-Racemat [(*R,S*)- α -Hydroxynitril] kann im Anschluss mit Hilfe einer (*R*)- bzw. (*S*)- enantioselektiven Nitrilase zur korrespondierenden (*R*)- bzw. (*S*)- α -Hydroxycarbonsäure umgesetzt werden. Diese Methode wird derzeit durch die BASF AG zur Synthese von (*R*)-Mandelsäure genutzt (Ress-Löschke *et al.* 1998, Gröger 2001). Aufgrund der Tatsache, dass derzeit nur wenige enantiospezifische Nitrilasen bekannt sind und es sich dabei ausschließlich um (*R*)-enantioselektive Enzyme handelt, welche ausschließlich (*R,S*)-Mandelonitril (sowie einige wenige chloresubstituierte (*R,S*)-Mandelonitrile) zu den entsprechenden (*R*)-Mandelsäuren umsetzen, ist diese Methode derzeit nicht für die Synthese vieler kommerziell interessanter (*S*)- α -Hydroxycarbonsäuren oder komplexer substituierter aromatischer oder aliphatischer (*R*)- α -Hydroxycarbonsäuren anwendbar (Yamamoto *et al.* 1991, 1992, Kaul *et al.* 2004, 2007, Banerjee *et al.* 2009).

Dieses Problem greift die zweite mögliche Methode (Abb. 4 B) auf. Der enantioselektive Schritt wird bei dieser Methode auf die Hydrocyanierung der Aldehyde bzw. Ketone verlagert. Hierbei werden Hydroxynitril-Lyasen (Oxynitrilasen, E.C. 4.1.2.10, E.C. 4.1.2.11, E.C. 4.1.2.37) eingesetzt. Diese Enzyme katalysieren in cyanogenen Pflanzen (siehe Abschnitt 1.1) die Umsetzung von Cyanhydrinen zu den korrespondierenden Aldehyden oder Ketonen und HCN. Die Enzyme können aber auch die gegenläufige Reaktion katalysieren - die (enantioselektive) Hydrocyanierung von Aldehyden und Ketonen (Effenberger *et al.* 2000, Johnson *et al.* 2000, Griengl *et al.* 2000, Sharma *et al.* 2005).

Hochenantioselektive (*R*)- bzw. (*S*)-Oxynitrilasen aus Pflanzen, wie z. B. die (*S*)-Oxynitrilasen aus *Manihot esculenta* und *Hevea brasiliensis*, sind bereits kommerziell erhältlich und können aufgrund ihres breiten Substratspektrums für die enantioselektive Synthese einer Vielzahl aromatischer, heteroaromatischer und aliphatischer Cyanhydrine eingesetzt werden (Effenberger *et al.* 2000, Hughes *et al.* 1994, Sharma *et al.* 2005, Mateo *et al.* 2006, Semba *et al.* 2008). Die so synthetisierten (enantiomerenreinen) (*R*)- bzw. (*S*)-Cyanhydrine können anschließend chemisch durch saure Hydrolyse oder biokatalytisch durch enantiokonservative Nitrilasen zu den korrespondierenden (*R*)- bzw. (*S*)- α -Hydroxycarbonsäuren umgesetzt werden (Effenberger *et al.* 1990, 2000, Effenberger 1994, Gröger 2001).

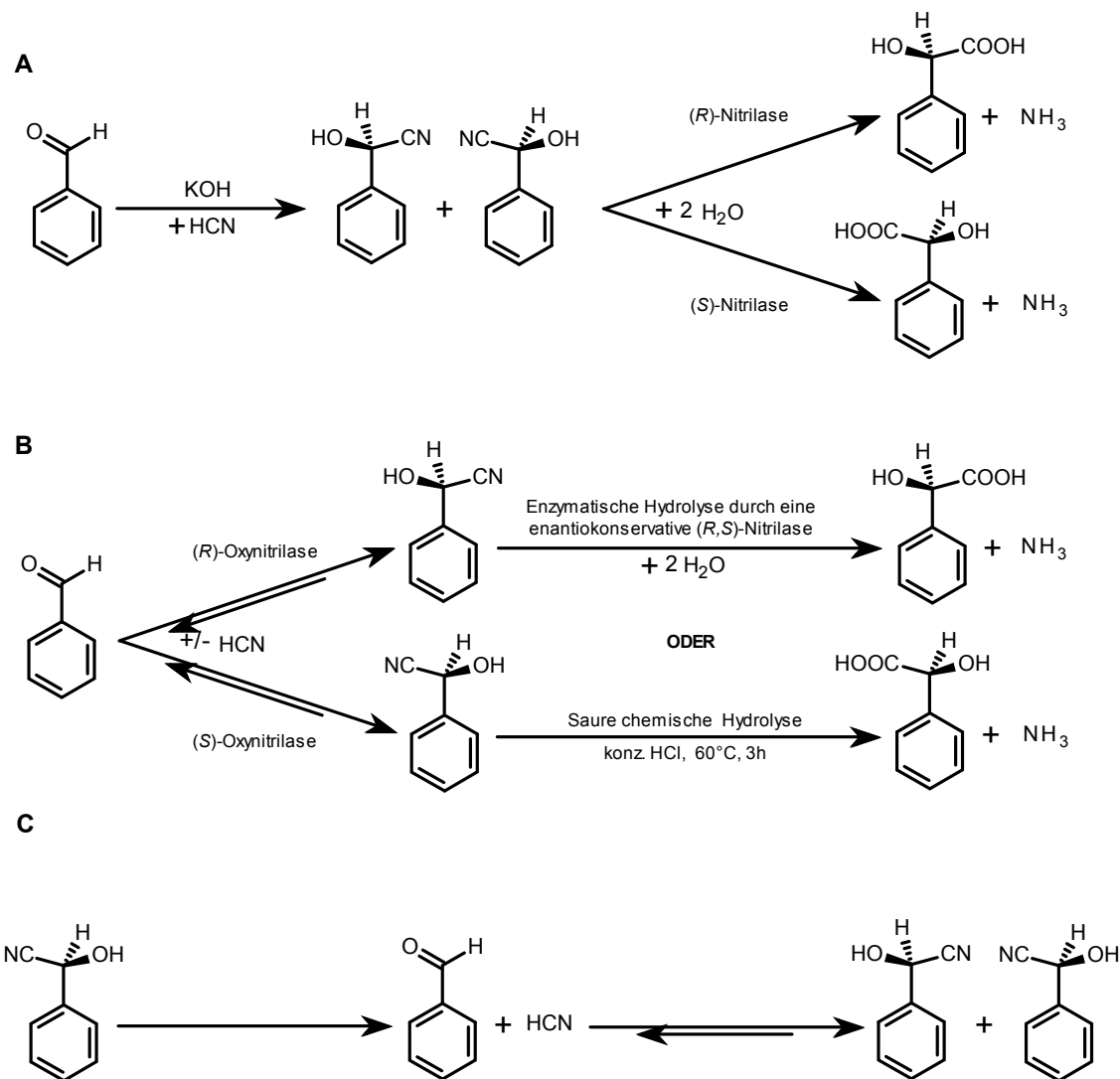


Abb. 4: Möglichkeiten zur enantioselektiven Synthese enantiomerenreiner (*R*)- oder (*S*)-Mandelsäure unter Verwendung enantioselektiver Nitrilasen (A) bzw. Oxynitrilasen (B). Schematisierte Darstellung der Racemisierung enantiomerenreiner Cyanhydrine in neutralen wässrigen Medien am Beispiel von (*S*)-Mandelonitril (C).

Wie bereits in Abschnitt 1.2 ausführlich beschrieben, ist hier die Biotransformation der unkatalysierten sauren Hydrolyse aus ökologischen Gründen vorzuziehen, da diese unter anderem zur signifikanten Reduzierung der Salzlasten führt. Die enzymatische Katalyse bietet zudem potentiell den verfahrenstechnischen Vorteil, beide Reaktionen direkt in einem nachhaltigen biologischen System koppeln zu können. Der Enantiomerenüberschuss der gewünschten Zielprodukte ist bei dieser Methode, die enantiokonservative Transformation der Cyanhydrine vorausgesetzt, entscheidend vom Enantiomerenüberschuss der enzymatisch synthetisierten (*R*)- bzw. (*S*)-Cyanhydrine abhängig. Dieser wird in wässrigen Medien bei neutralen pH-Werten maßgeblich von der Instabilität der Cyanhydrine und der spontanen

chemischen Hydrocyanierung der Aldehyde bzw. Ketone beeinflusst. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die spontane chemische Hydrocyanierung der Aldehyde und Ketone zur Bildung von Cyanhydrin-Racematen führt. In Verbindung mit der Instabilität der gebildeten Cyanhydrine, welche zu einem spontanen Zerfall in die Ausgangsprodukte führt, kann dies zu einer Racemisierung der enzymatisch synthetisierten, enantiomerenreinen Cyanhydrine führen (Abb. 4 C).

1.4.2.1 Reaktionsführung in Gegenwart organischer Lösungsmittel

Um die spontane chemische Reaktion zu unterdrücken, können Oxynitrilase katalysierte Reaktionen in einphasigen organischen Reaktionsmedien bzw. organischen Reaktionsmedien mit geringem Wassergehalt (<5 % v/v) durchgeführt werden (Effenberger *et al.* 1987, Effenberger 1994, Costes *et al.* 1999, Gröger 2001, Paravidino *et al.* 2010). Hierfür eignen sich neben Ethylacetat besonders Etherverbindungen, wie z. B. Diisopropylether, als Lösungsmittel, da diese sich oftmals zugleich positiv auf die Oxynitrilase-Aktivität und den Enantiomerenüberschuss der synthetisierten Cyanhydrine auswirken (Effenberger 1994, Costes *et al.* 1999). So konnten in Diisopropylether durch die (*R*)-Oxynitrilase von *Prunus amygdalus* bzw. die (*S*)-Oxynitrilasen von *Hevea brasiliensis*, *Sorghum bicolor* und *Manihot esculenta* hohe Enantiomerenüberschüsse (*ee* >95 %) für verschiedene aromatische und aliphatische (*R*)- bzw. (*S*)-Cyanhydrine erzielt werden (Effenberger 1994, Effenberger *et al.* 2000, Costes *et al.* 1999, Gröger 2001).

Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung organischer Reaktionsmedien liegt in der allgemein besseren Löslichkeit der Aldehyde bzw. Ketone und Cyanhydrine in diesen Medien (Effenberger 1994, Costes *et al.* 1999, Gröger 2001). Nachteile ergeben sich auf verfahrenstechnischer Seite hingegen beim Umgang mit HCN. Während Cyanid in wässrigen Reaktionsmedien in Form des gelösten Kaliumsalzes eingebracht werden kann, bedarf es bei Applikation organischer Reaktionsmedien des direkten Umgangs mit reinem HCN (Gröger 2001).

Eine Alternative zu organischen Reaktionsmedien mit geringen Wassergehalten stellen biphasische Medien dar. Hierbei liegen die Carbonylsubstrate überwiegend in der organischen Phase gelöst vor, während das Enzym in der wässrigen Phase verbleibt (Costes *et al.* 1999). Aufgrund des hohen Wasseranteils in diesen Systemen (im Vergleich zu wassergesättigten organischen Lösungsmitteln) kommt es allerdings auch hier zu einer, wenn auch verlangsamten, Racemisierung der enzymatisch synthetisierten Cyanhydrine (Costes *et al.* 1999, Bauer *et al.* 1999, Mateo *et al.* 2006).

Der entscheidende Nachteil einphasiger organischer und biphasischer Reaktionsmedien liegt jedoch darin, dass im Gegensatz zu Oxynitrilasen, welche offensichtlich eine hohe Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln aufweisen, Nitrilasen oftmals bereits bei vergleichsweise geringen Anteilen organischer Lösungsmittel in den Reaktionsmedien inaktiviert werden (Costes *et al.* 1999, Heinemann *et al.* 2003, Kaul & Banerjee 2008).

1.4.2.2 Reaktionsführung in sauren wässrigen Medien

Eine Alternative zu organischen bzw. biphasischen Reaktionsmedien stellt die Verwendung von sauren wässrigen Medien dar (Effenberger 1994, Gröger 2001). So konnten Niedermeyer & Kula (1990) zeigen, dass sich in mit Citrat gepufferten wässrigen Medien bei pH-Werten <4 mit Hilfe der (*S*)-Oxynitrilase aus *S. bicolor* hohe Enantiomerenüberschüsse (*ee* >96 %) verschiedener aromatischer (*S*)-Cyanhydrine erzielen lassen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die spontane chemische Hydrocyanierung der Aldehyde in diesen Reaktionsgemischen weitestgehend unterdrückt wird.

Obwohl sich alle bislang untersuchten Oxynitrilasen durch pH-Optima im Bereich von pH 5-6 auszeichnen, sind sie oftmals, wie beispielsweise die (*S*)-Oxynitrilasen aus *S. bicolor* und *M. esculenta*, in der Lage, die enantioselektive Hydrocyanierung von Aldehyden auch unter relativ sauren Bedingungen (pH 3,5-6,5) zu katalysieren (Hughes *et al.* 1997, Seely *et al.* 1966, Sharma *et al.* 2005). Im direkten Vergleich der für die angestrebte Applikation in Frage kommenden „säuretoleranten“ (*S*)-Oxynitrilasen ist das Enzym aus *M. esculenta* besonders interessant. Es zeichnet sich im Kontrast zur (*S*)-Oxynitrilase aus *S. bicolor* durch eine leichte Verfügbarkeit, ein weites Substratspektrum und die Möglichkeit der einfachen Überexpression in pro- und eukaryotischen Expressionssystemen aus, wie z. B. *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris* (Förster *et al.* 1996, Effenberger *et al.* 2000, Sharma *et al.* 2005, Semba *et al.* 2008).

Während die (*S*)-Oxynitrilase aus *M. esculenta* zur enantioselektiven Hydrocyanierung aliphatischer und aromatischer Cyanhydrine in wässrigen Reaktionsmedien mit pH-Werten $\geq 3,5$ befähigt ist, sind bislang keine Nitrilasen bekannt, die aromatische Cyanhydrine in Reaktionsmedien mit pH-Werten $\leq 5,5$ hydrolysieren können (Banerjee *et al.* 2002). Die enantiokonservative Umsetzung enantiomerenreiner Cyanhydrine in sauren Reaktionsgemischen wird daher durch das Fehlen entsprechend säuretoleranter Nitrilasen limitiert.

1.5 Die Arylacetonitrilase aus *Pseudomonas fluorescens* EBC191

Der Stamm *Pseudomonas fluorescens* EBC191 wurde von Layh *et al.* (1992) im Zuge der Anreicherung Nitril-verseifender Mikroorganismen mit Ethylbenzylcyanid als einziger zur Verfügung stehender Stickstoffquelle isoliert. Das für die Nitril-Hydrolyse verantwortliche Enzym wurde im Folgenden von Moser (1996) aufgereinigt und charakterisiert. Das für die Nitrilase kodierende Gen wurde von Conradt (1997) identifiziert, isoliert und in *E. coli* JM109(pIK9) heterolog exprimiert. Die heterologe Produktion der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 in *E. coli* JM109(pIK9) wurde von Kiziak (1998) untersucht und das rekombinante Enzym aufgereinigt und biochemisch charakterisiert (Kiziak *et al.* 2005). Die Nitrilase wurde aufgrund der bevorzugt umgesetzten Substrate (2-Phenylvaleronitril, Phenylacetonitril, Mandelonitril, Phenylglycinonitril, 2-Phenylpropionitril, 2-Acetylmandelonitril, 2-Phenylbutyronitril) als Arylacetonitrilase klassifiziert (Kiziak *et al.* 2005). Die untersuchten Substrate wurden durch die Nitrilase zu den korrespondierenden Säuren und im Fall einiger Substrate in geringen Anteilen zu den korrespondierenden Säureamiden umgesetzt. Im Gegensatz zu früher beschriebenen Arylacetonitrilasen setzte das Enzym (*R,S*)-Mandelonitril nur mit einem geringen Enantiomerenüberschuss (*ee*) von 31 % zu (*R*)-Mandelsäure um (Kiziak *et al.* 2005). Für das in der Reaktion gebildete Mandelsäureamid wurde hingegen ein *ee*-Wert von 85 % für das (*S*)-Enantiomer festgestellt. In weiterführenden Arbeiten konnten Mateo *et al.* (2006) zeigen, dass Zellextrakte von *E. coli* JM109(pIK9) enantiomerenreines (*S*)- bzw. (*R*)-Mandelonitril weitestgehend enantiokonservativ zu Mandelsäure und Mandelsäureamid umsetzten. Die Nitrilase kann daher für die in Abb. 4 B aufgezeigte enantiokonservative Transformation von enantiomerenreinen (*S*)- bzw. (*R*)-Mandelonitril eingesetzt werden. Die biochemische Untersuchung des rekombinanten Enzyms ergab zudem, dass sich das Enzym durch ein breites pH-Optimum auszeichnet und dass das Enzym 2-Phenylpropionitril im Bereich von pH 5,5-8,5 mit annähernd gleich bleibender Aktivität umsetzt (Kiziak *et al.* 2005). Das breite pH-Optimum stand in scharfen Kontrast zu den pH-Optima der meisten bislang bekannten Nitrilasen, welche in der Regel ein sehr enges pH-Optimum im alkalischen Bereich aufweisen (Kiziak *et al.* 2005, Banerjee *et al.* 2002). Auffällig war in diesem Zusammenhang zudem, dass sich das pH-Optimum der Arylacetonitrilase von *P. fluorescens* EBC191 bei pH 5,5 mit dem pH-Optimum der (*S*)-Oxynitrilase aus *M. esculenta* überschneidet. Es wurde daher angenommen, dass ein System aus beiden Enzymen die enantioselektive Umsetzung von Aldehyden und Ketonen zu enantiomerenreinen (*S*)- α -Hydroxycarbonsäuren bei pH 5,5 katalysieren kann. Dieses Konzept wurde durch Untersuchungen von Mateo *et al.* (2006) bestätigt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die in CLEAs (cross-linked enzyme aggregates) immobilisierten Enzyme in einem biphasischen Reaktionsgemisch bei pH 5,5 die Synthese von (*S*)-Mandelsäure

und (*S*)-Mandelsäureamid ausgehend von Benzaldehyd und HCN mit Enantiomerenüberschüssen (*ee*) >94 % katalysierten (Mateo *et al.* 2006, Sheldon 2007).

1.6 Ziele der Arbeit

Wie vorangehend ausführlich beschrieben, stellt die enantioselektive Synthese enantiomerenreiner Cyanhydrine durch Oxynitrilasen in Verbindung mit der anschließenden enantiokonservativen Transformation der Cyanhydrine durch Nitrilasen eine viel versprechende Synthesemöglichkeit für enantiomerenreine α -Hydroxycarbonsäuren dar. Der Enantiomerenüberschuss der auf diesem Weg synthetisierten α -Hydroxycarbonsäuren wird hierbei maßgeblich von der spontanen chemischen Hydrocyanierung der Ausgangssubstrate und der Instabilität der enantiomerenreinen Cyanhydrine in wässrigen Medien beeinflusst. Eine Möglichkeit, die unselektive Hydrocyanierung der Ausgangssubstrate zu unterdrücken und die Stabilität der enantiomerenreinen Zwischenprodukte zu gewährleisten, besteht in der Verwendung saurer Reaktionsmedien. Dies erfordert den Einsatz entsprechend säuretoleranter Biokatalysatoren. In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund zunächst die enzymatische Hydrolyse von α -Hydroxynitrilen unter sauren Bedingungen untersucht. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte dann versucht werden, ein bienzymatisches System, bestehend aus einer enantioselektiven (*S*)-Oxynitrilase und einer enantiokonservativen Nitrilase zu entwickeln, welches die enantioselektive Synthese von (*S*)- α -Hydroxycarbonsäuren ausgehend von deren korrespondierenden Aldehyden bzw. Ketonen unter sauren Bedingungen ermöglichen sollte. Hierbei wurde einerseits versucht, mit Hilfe rekombinanter Organismen bereits vorhandene Enzymsysteme zu nutzen und andererseits durch Anreicherungen aus der Natur neuartige säuretolerante Nitril-hydrolysierende Katalysatoren zu isolieren.

Als möglicherweise nutzbarer säuretoleranter Biokatalysator kam die Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 in Betracht. Das Enzym zeichnet sich durch ein vergleichsweise breites pH-Optimum und die Fähigkeit sowohl (*S*)- als auch (*R*)-Enantiomere umzusetzen aus und könnte somit die enantiokonservative Hydrolyse von α -Hydroxynitrilen unter (schwach) sauren Bedingungen ermöglichen. Da der erzielbare Enantiomerenüberschuss der Produkte hierbei direkt von der Stabilität der Cyanhydrine abhängt, sollte zunächst deren chemische Stabilität bei unterschiedlichen pH-Werten analysiert werden. Im Anschluss sollte dann versucht werden, eine enzymatische Nitril-Hydrolyse bei pH-Werten zu erreichen, unter denen α -Hydroxynitrile eine ausreichende Stabilität aufweisen.

Mikroorganismen sind generell bestrebt, einen eher neutralen intrazellulären pH-Wert aufrecht zu erhalten, wenn sie in sauren Medien inkubiert werden (Cobley & Cox 1983, Baker-Austin &

Dopson 2007). Dies deutete daraufhin, dass der Einsatz von ganzen Zellen als Biokatalysatoren vorteilhafter sein könnte als die Verwendung von Zellextrakten bzw. der reinen Enzyme. Um genaueren Aufschluss hierüber zu erhalten, sollten die Nitrilase-Aktivitäten von Zellextrakten und ganzen Zellen von *E. coli* JM109(pIK9) unter sauren Bedingungen vergleichend analysiert werden.

Da Pilze in vielen Fällen säuretoleranter sind als Bakterien (Wartenberg 1989), sollte das Gen der Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 zudem in einer säuretoleranten Hefe exprimiert werden und die Nitril-Hydrolyse durch ganze Zellen des rekombinanten eukaryotischen Organismus unter sauren Bedingungen untersucht werden.

Im Anschluss an diese Untersuchung sollte das überlegene System durch das Einfügen des für die (*S*)-Oxynitrilase aus *M. esculenta* codierenden Gens ergänzt werden, mit dem Ziel einer simultanen Expression von Oxynitrilase- und Nitrilase-Aktivitäten in einer Zelle. Das so konstruierte System sollte anschließend in sauren wässrigen Medien in Hinblick auf die enantioselektive Synthese von (*S*)-Mandelsäure, ausgehend von Benzaldehyd und KCN, untersucht werden.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die selektive Anreicherung Nitril-hydrolysierender Mikroorganismen aus sauren Umweltproben verfolgt. Die angereicherten Organismen sollten isoliert und deren Nitrile hydrolysierenden Eigenschaften charakterisiert werden. Hierdurch sollte geklärt werden, welche Strategie am Besten geeignet ist, um säuretolerante Nitril-hydrolysierende Aktivitäten zu generieren.

2 Ergebnisse

2.1 Chemische Stabilität des Modellsubstrats Mandelonitril bei unterschiedlichen pH-Werten

Wie bereits vorstehend ausführlich beschrieben, stellt die Synthese von α -Hydroxynitrilen mit Hilfe enantioselektiver Oxynitrilasen und die anschließende Umsetzung der Produkte mit Hilfe enantiokonservativer Nitrilasen ein viel versprechendes System zur Synthese von enantiomerenreinen (*S*)- bzw. (*R*)- α -Hydroxycarbonsäuren dar. Der durch dieses System erzielbare Enantiomerenüberschuss an (*S*)- bzw. (*R*)- α -Hydroxycarbonsäuren wird in wässrigen Medien jedoch maßgeblich von der chemischen Hydrocyanierung der Aldehyde bzw. Ketone und der chemischen Instabilität der gebildeten α -Hydroxynitrile beeinflusst.

Wie Niedermayer und Kula (1990) anhand der enzymatischen Synthese von (*S*)-4-Hydroxymandelonitril durch die (*S*)-Oxynitrilase aus *S. bicolor* zeigen konnten, lassen sich die chemischen Reaktionen und damit die Racemisierung der enantiomerenreinen α -Hydroxynitrile durch eine Reaktionsführung unter sauren Bedingungen unterdrücken.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher zunächst analysiert, welche pH-Werte notwendig sind, um das Modellsubstrat Mandelonitril in wässrigen Medien zu stabilisieren. Hierzu wurde Mandelonitril in Na-Citrat-Phosphat-Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten (pH 3-6) inkubiert und der Zerfall zu Benzaldehyd und HCN untersucht. Es konnte in allen Lösungen ein Zerfall von Mandelonitril zu Benzaldehyd (+ HCN) nachgewiesen werden (Abb. 5). Die Zerfallsraten und das sich einstellende chemische Gleichgewicht zwischen Mandelonitril und den Zerfallsprodukten Benzaldehyd und HCN waren hierbei abhängig vom pH-Wert des Reaktionsmediums, und es zeigte sich, dass Mandelonitril in sauren Medien stabilisiert wurde. Die Reaktionskinetiken deuteten darauf hin, dass die enantiokonservative Biotransformation von enantiomerenreinen Mandelonitril eine Reaktionsführung in Medien mit pH-Werten ≤ 5 erfordert (Rustler *et al.* 2007).

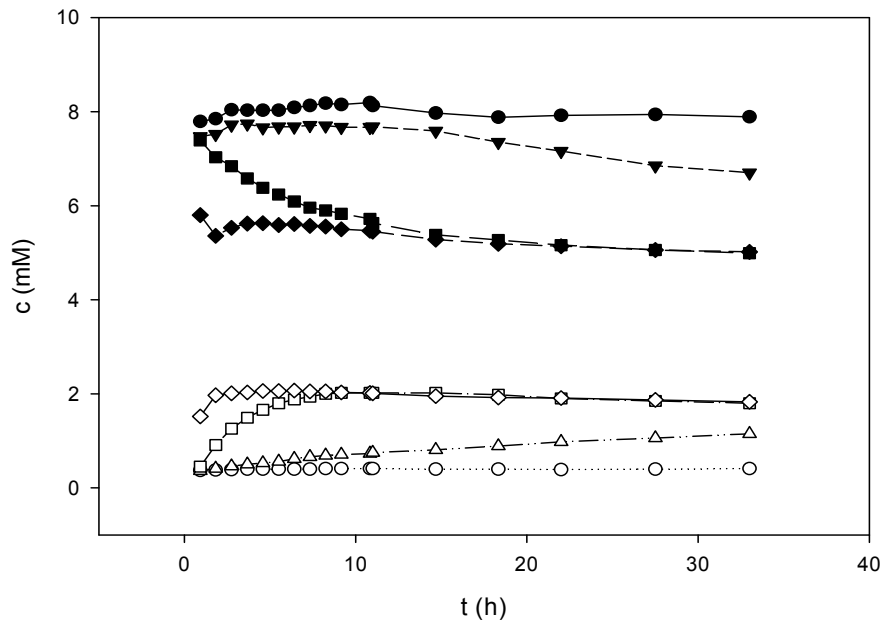


Abb. 5: Chemischer Zerfall von (*R,S*)-Mandelonitril (● pH 3, ▼ pH 4, ■ pH 5, ◆ pH 6) bei unterschiedlichen pH-Werten unter Bildung von Benzaldehyd (○ pH 3, △ pH 4, □ pH 5, ◇ pH 6)

2.2 Umsatz von (*R,S*)-Mandelonitril durch Zellextrakte oder ganze Zellen von *E. coli* JM109(pIK9) in Reaktionsmedien mit unterschiedlichen pH-Werten

2.2.1 Umsatz von Mandelonitril durch Zellextrakte von *E. coli* JM109(pIK9)

Vorangegangene Untersuchungen von Kiziak *et al.* (2005) hatten gezeigt, dass sich die in *E. coli* JM109(pIK9) produzierte rekombinante Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 durch ein relativ breites pH-Optimum von pH 5,5 bis 8,5 auszeichnet. Das Enzym kam somit potentiell für die Biotransformation von Mandelonitril unter schwach sauren Bedingungen in Frage. Im Folgenden wurden daher Umsätze von Mandelonitril durch zellfreie Extrakte von *E. coli* JM109(pIK9) bei Werten von pH 4 bis 7 analysiert.

Hierzu wurde *E. coli* JM109(pIK9) in dYT-Medium angezogen und die Expression der Nitrilase-Aktivität mit 0,1 % (*w/v*) Rhamnose induziert. Die Zellen wurden zu Beginn der stationären Phase geerntet und mit 100 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7) gewaschen. Nach Überführung der Zellen in frischen Na-Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7) wurde ein Aliquot der Zellen mittels French-Press mit einem Druck von 80 MPa aufgeschlossen. Das gewonnene Lysat wurde anschließend durch Ultrazentrifugation (100000×*g*, 40 min, 4 °C) geklärt. Der Überstand wurde abgenommen und der Proteingehalt nach Bradford (1976) bestimmt. Der gewonnene Zellextrakt wurde anschließend in Na-Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7) verdünnt und Aliquots hiervon für die Umsätze von Mandelonitril in Reaktionsmedien mit pH Werten von pH 4 bis pH 7 eingesetzt.

Die Zellextrakte von *E. coli* JM109(pIK9) waren in der Lage, Mandelonitril in Reaktionsmedien mit pH-Werten ≥ 4 zu Mandelsäure und Mandelsäureamid umzusetzen (Abb. 6; Rustler *et al.* 2007).

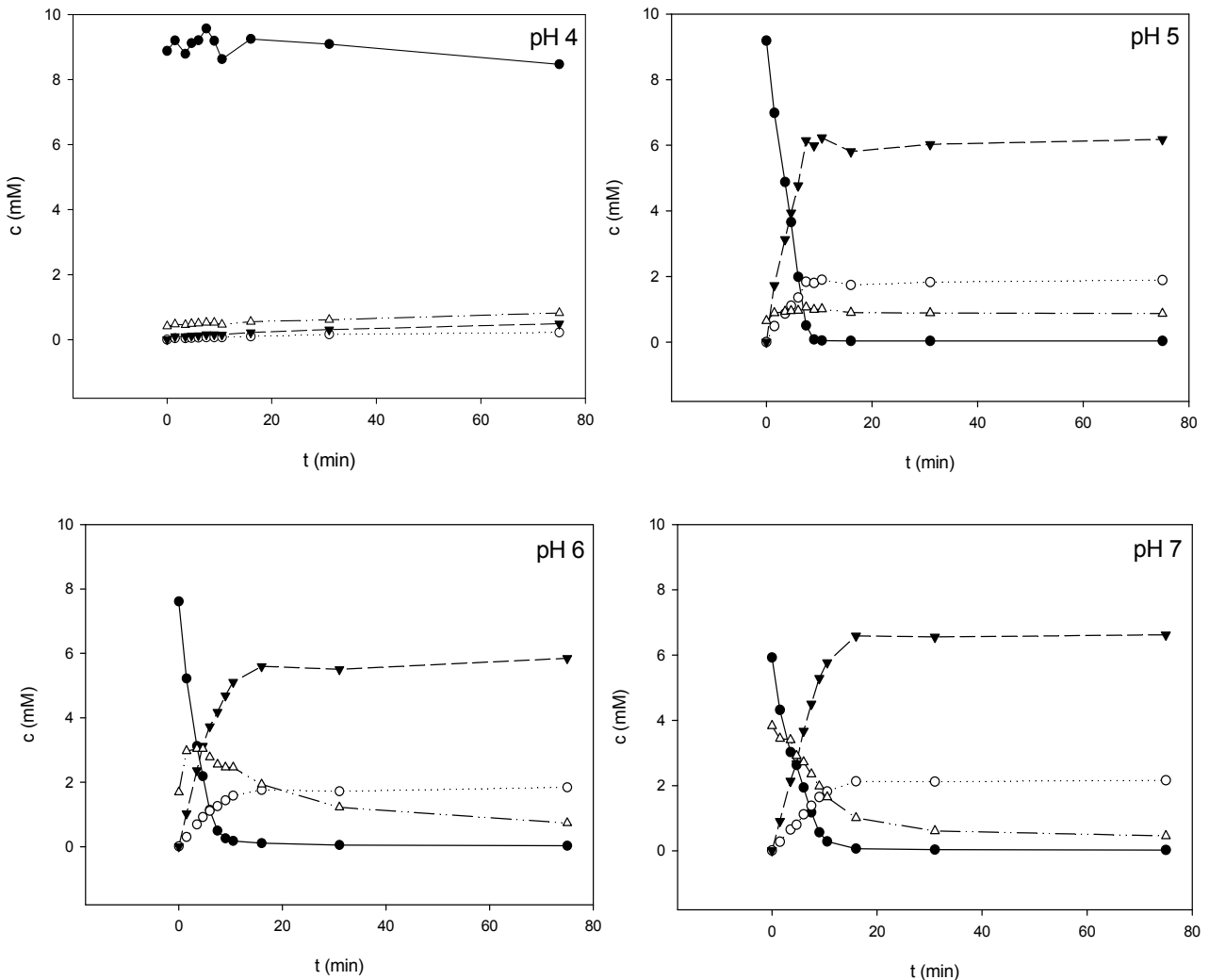


Abb. 6: Umsatz von 10 mM (*R,S*)-Mandelonitril durch Zellextrakte von *E. coli* JM109(pIK9) bei pH 4, 5, 6 und 7. Die Reaktionen wurden in 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4-6) bzw. Na-Phosphat-Puffer (pH 7) durchgeführt. Es wurde eine Zellextraktkonzentration von 0,1 mg löslichem Protein pro ml Reaktionspuffer eingesetzt. Die Reaktionsgemische wurden bei 34 °C und 1400 U/min in einem Eppendorf Thermomixer inkubiert. Den Reaktionsgemischen wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die Reaktionen mit 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Die Bestimmung der Konzentrationen von Mandelonitril (●), Mandelsäureamid (○), Mandelsäure (▼) und Benzaldehyd (Δ) in den Überständen der gezogenen Proben erfolgte mittels HPLC.

Die höchste Enzymaktivität wurde bei pH 5 festgestellt (siehe Abb. 6 und 8). Dies wurde darauf zurückgeführt, dass einerseits das Enzym bei pH 5 eine hohe Aktivität aufwies, andererseits aber auch Mandelonitril bei pH 5 weitgehend stabilisiert wurde und somit annähernd in der zugegebenen Ausgangskonzentration als Substrat zur Verfügung stand. Im Gegensatz hierzu konnte in Medien mit pH 6 und pH 7 nach Zugabe von Mandelonitril ein unmittelbarer Zerfall zu Benzaldehyd (+ HCN) nachgewiesen werden. Dies führte dazu, dass in diesen Ansätzen zu Beginn der Reaktion lediglich ~70 % (pH 6) bzw. ~60 % (pH 7) des eingesetzten Substrats als Mandelonitril zur Verfügung standen. Nichtsdestotrotz konnte auch in den Umsätzen bei pH 6 und pH 7 ein annähernd vollständiger Umsatz des eingesetzten Substrats festgestellt werden, was auf die chemische Rückreaktion von Benzaldehyd (+HCN) zu Mandelonitril zurückgeführt wurde. In den Medien zurückgebliebene Reste an Benzaldehyd waren durch Ausgasung des Reaktionspartners HCN bei der Probennahme zu erklären.

Im Gegensatz zu den Umsätzen bei pH 5-7 konnte im analysierten Reaktionszeitraum bei pH 4 kein vollständiger Umsatz des Substrats festgestellt werden. Lediglich ca. 15 % des eingesetzten Substrats wurden umgesetzt. Dies wurde auf die zunehmende Inaktivierung der Arylacetonitrilase bei pH 4 zurückgeführt (Abb. 6; Rustler *et al.* 2007).

Die Versuche zeigten, dass aufgrund der zunehmenden Inaktivierung der Arylacetonitrilase in Medien mit pH <5 und der daraus resultierenden geringen Aktivität, Zellextrakte von *E. coli* JM109(pIK9) nur bedingt für die angestrebte Biotransformation einsetzbar waren.

2.2.2 Umsatz von Mandelonitril durch ganze Zellen von *E. coli* JM109(pIK9)

Aufgrund der Bestrebung der meisten Mikroorganismen einen eher neutralen cytoplasmatischen pH-Wert aufrechtzuerhalten, wenn sie sauren Bedingungen ausgesetzt werden (Baker-Austin & Dopson 2007), wurde angenommen, dass der Einsatz von intakten Zellen von *E. coli* JM109(pIK9) bei Umsätzen in Reaktionsmedien mit pH-Werten <5 vorteilhafter sein könnte. Aus diesem Grund wurde der Umsatz von Mandelonitril durch Zellextrakte mit dem Umsatz durch Ruhezellen bei pH-Werten von 4-7 vergleichend analysiert. Für die Umsätze durch ganze Zellen wurde jeweils eine, der zuvor applizierten Enzymmenge, entsprechende Menge Ruhezellen eingesetzt. Hierzu wurde die Effizienz des Zellaufschlusses mittels French Press durch Lebendzellzahlbestimmung vor und nach Aufschluss der Zellen berechnet und über die Proteinkonzentration des zuvor gewonnenen Zellextrakts und die beim Umsatz mit Zellextrakten eingesetzte Proteinkonzentration die einzusetzende Ruhezellkonzentration berechnet (Rustler *et al.* 2007).

Die Untersuchungen zeigen, dass Ruhezellen von *E. coli* JM109(pIK9) Mandelonitril im Vergleich zu Zellextrakten bei pH 4-7 generell mit deutlich höheren Aktivitäten umsetzen (Abb. 7 und 8). Besonders deutlich zeigte sich dies im Reaktionsmedium mit einem pH-Wert von 4. Während beim Einsatz von Zellextrakten lediglich eine rudimentäre Enzymaktivität bei pH 4 festgestellt werden konnte und nur ca. 15 % des eingesetzten Mandelonitrils umgesetzt wurden, konnte beim Umsatz durch Ruhezellen eine deutlich höhere Enzymaktivität und der Umsatz von etwa 40 % des eingesetzten Substrats festgestellt werden. Es zeigte sich somit, dass der Einsatz von Ruhezellen gegenüber zellfreien Extrakten generell vorzuziehen war (Abb. 8).

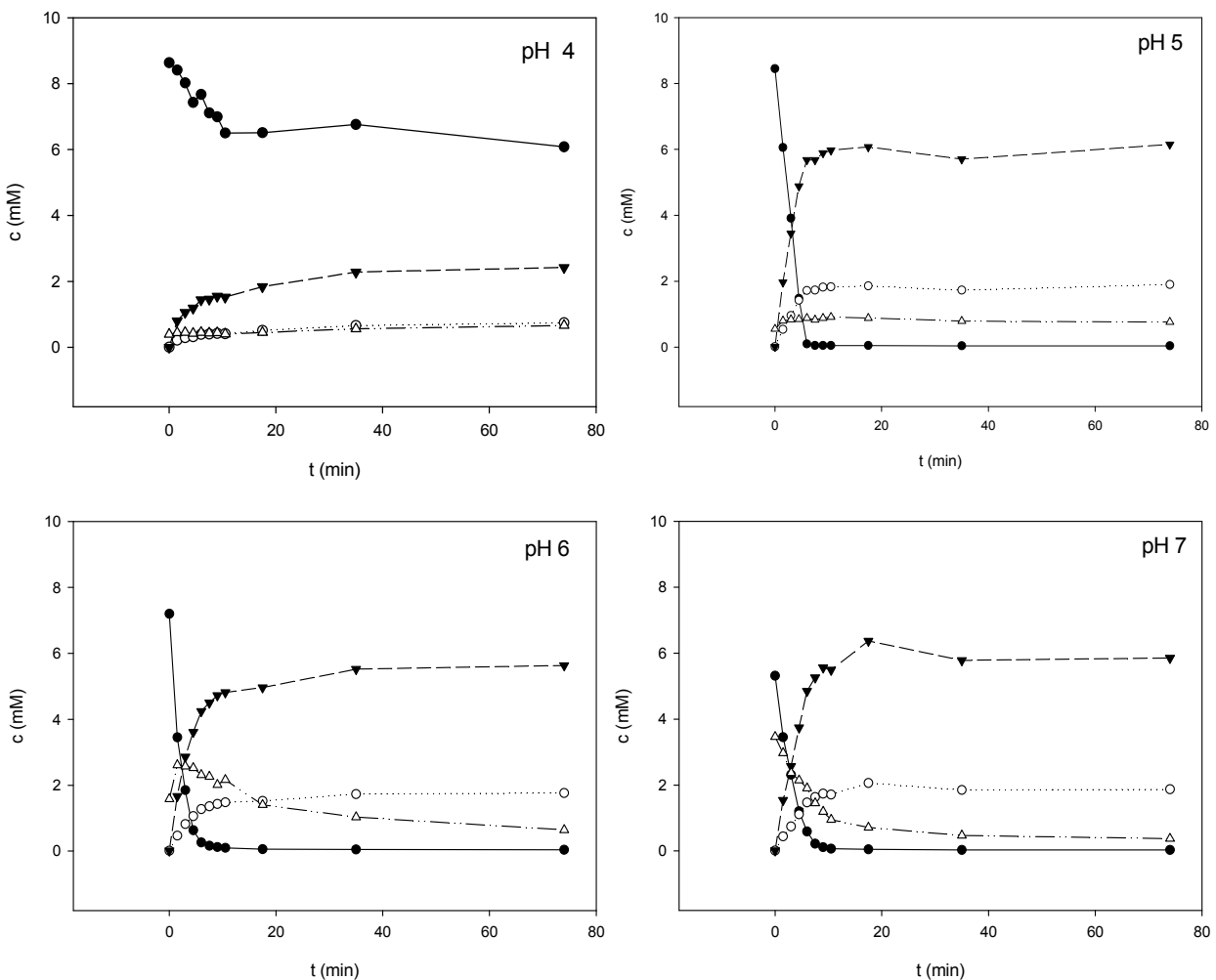


Abb. 7: Umsatz von 10 mM (*R,S*)-Mandelonitril durch Ruhezellen von *E. coli* JM109(pIK9) bei pH 4, 5, 6 und 7. In den Ansätzen wurde jeweils eine Zellkonzentration entsprechend einer Optischen Dichte bei 600nm (OD_{600nm}) von 1 eingesetzt. Es wurden Aliquots der Zellen eingesetzt, welche zuvor für die Herstellung der Zellextrakte verwendet worden waren. Die Reaktionen wurden in 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4-6) bzw. Na-Phosphat-Puffer (pH 7) durchgeführt. Die Reaktionsgemische wurden bei 34 °C und 1400 U/min in einem Eppendorf Thermomixer inkubiert. Den Reaktionsgemischen wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die Reaktionen mit 10 % (v/v) 1M HCl abgestoppt. Die Bestimmung der Konzentration von Mandelonitril (●), Mandelsäureamid (○), Mandelsäure (▼) und Benzaldehyd (Δ) in den Überständen der gezogenen Proben erfolgte mittels HPLC.

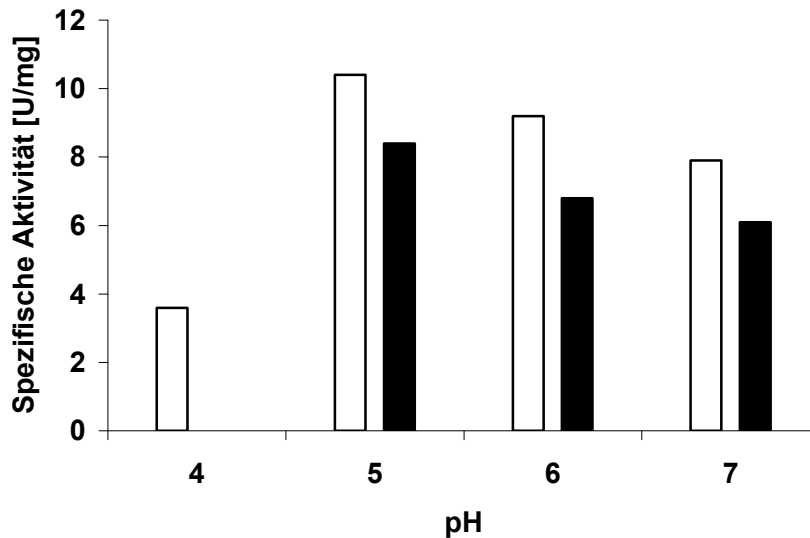


Abb. 8: Vergleich der Mandelonitril-hydrolysierenden Aktivitäten von Ruhezellen (□) und Zellextrakten (■) von *E. coli* JM109(pIK9) bei unterschiedlichen pH-Werten. Die spezifischen Aktivitäten (U/mg lösliches Protein) wurden anhand der Entstehung von Mandelsäure in den in Abb. 6 und 7 dargestellten Versuchen berechnet.

2.2.3 Umsatz unterschiedlicher Konzentrationen an Mandelonitril durch ganze Zellen und Zellextrakte von *E. coli* JM109(pIK9)

Im Folgenden wurde der Einfluss erhöhter Substratkonzentrationen auf das zellfreie System und das Ganzzellsystem untersucht. Hierzu wurden Zellextrakte oder Ruhezellen mit 25, 50, 100, 150 und 200 mM Mandelonitril bei pH 5 inkubiert und die Umsätze vergleichend analysiert. Sowohl Zellextrakte als auch Ruhezellen setzten Mandelonitril bis zu einer Konzentration von 100 mM vollständig um. In den Ansätzen mit 150 mM Mandelonitril wurde hingegen kein vollständiger Umsatz von Mandelonitril durch die eingesetzten Ruhezellen oder Zellextrakte erreicht. Die Zellextrakte wiesen bei dieser Substratkonzentration nur noch eine rudimentäre Nitrilase-Aktivität auf, und setzten weniger als 10 % des eingesetzten Mandelonitrils um. Ruhezellen hingegen zeichneten sich in diesem Ansatz durch eine deutlich höhere Nitrilase-Aktivität aus und setzten ca. 40 % des eingesetzten Mandelonitrils um.

Bei einer Substratkonzentration von 200 mM Mandelonitril konnten weder beim Einsatz von Ruhezellen, noch beim Einsatz von Rohextrakten signifikante Nitrilase-Aktivitäten festgestellt werden.

Der Vergleich der spezifischen Aktivitäten bestätigte die bereits in den vorangegangenen Versuchen mit Substratkonzentrationen von 10 mM ermittelten höheren Aktivitäten bei Applikation ganzer Zellen auch für Mandelonitrilkonzentrationen von 25-100 mM (Abb. 9). Es konnte demnach davon ausgegangen werden, dass beim Umsatz von Mandelonitril im getesteten

Konzentrationsbereich im Ganzzellsystem keine Limitationen durch die Aufnahme des Substrats auftraten.

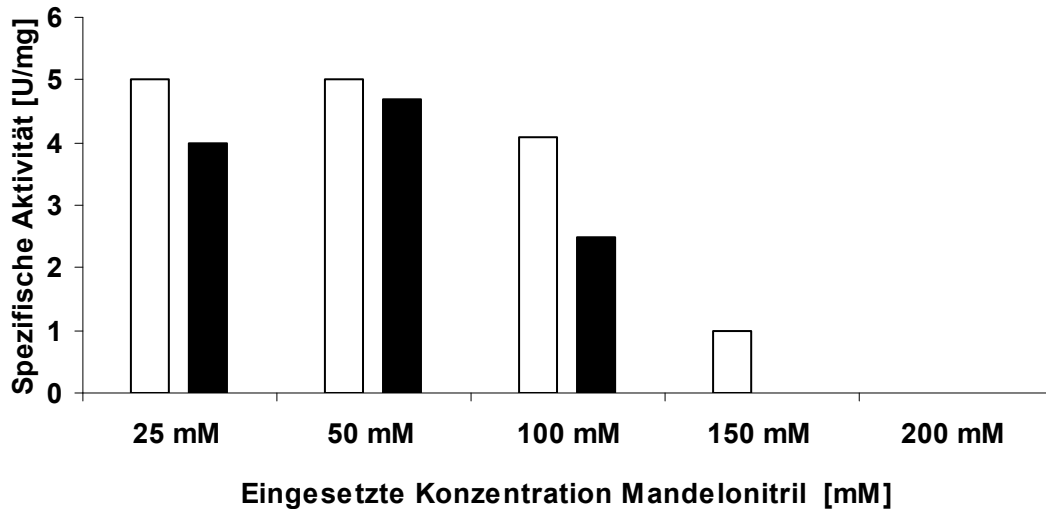


Abb. 9: Vergleich der spezifischen Aktivitäten von Ruhezellen (□) und Zellextrakten (■) von *E. coli* JM109(pIK9) beim Umsatz von 25-200 mM Mandelonitril bei pH 5. Die spezifischen Aktivitäten wurden anhand der Entstehung von Mandelsäure berechnet und beziehen sich auf U/mg löslichem Protein.

2.2.4 Bildung von Mandelsäureamid beim Umsatz von Mandelonitril durch ganze Zellen und Zellextrakte von *E. coli* JM109(pIK9)

In den vorstehend beschriebenen Versuchen wurde (*R,S*)-Mandelonitril durch die rekombinante Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 umgesetzt. Neben dem erwarteten Hauptprodukt, Mandelsäure, wurde in den Umsätzen auch die Entstehung von Mandelsäureamid festgestellt. Auch Kiziak *et al.* (2005) beobachteten die Entstehung von Mandelsäureamid beim Umsatz von Mandelonitril durch die aufgereinigte Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191.

Die Entstehung von Amiden als Nebenprodukte bei Nitrilase katalysierten Reaktionen wurde darüber hinaus bereits für verschiedene Nitrilasen pflanzlicher, bakterieller oder pilzlicher Herkunft beschrieben, wie z. B. für die Nitrilasen aus *Rhodococcus* ATCC 39484, *Arabidopsis thaliana*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* und *Aspergillus niger* K10 (Goldlust & Bohak 1989, Stevenson *et al.* 1992, Effenberger & Osswald 2001, Osswald *et al.* 2002, Šnajdrová *et al.* 2004, Kaplan *et al.* 2006 b, c). Es wird derzeit davon ausgegangen, dass die Bildung von Amiden als Nebenprodukte Nitrilase katalysierter Reaktionen auf eine atypische Spaltung des während der Reaktion entstehenden tetrahedratischen Intermediats zurückzuführen ist. Das Auftreten dieser

Nebenreaktion wird offenbar durch sterische und / oder elektronenziehende Effekte der α -Substituenten beeinflusst (Fernandes *et al.* 2006).

Die Bildung von Mandelsäureamid beim Umsatz von Mandelonitril durch die Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 wurde bislang nur für Umsätze in biphasischen Medien (Mateo *et al.* 2006) und für Umsätze in wässrigen Medien mit pH 7,5 (Kiziak *et al.* 2005) beschrieben. Daher wurde im Folgenden der Einfluss des pH-Wertes auf die Nitril-Hydratase-Aktivität der rekombinanten Arylacetonitrilase untersucht. Hierzu wurde die Bildung von Mandelsäureamid in den zuvor durchgeführten Umsätzen von (*R,S*)-Mandelonitril durch Zellextrakte bei pH-Werten von pH 4-7 analysiert. In allen Ansätzen konnte die Bildung des Amids als Nebenprodukt nachgewiesen werden. In Bezug auf die Konzentration der entstandenen Mandelsäure wurde bei pH 5 die geringste relative Amidkonzentration (20 %) festgestellt. Zudem konnte eine leichte Zunahme der relativen Amidbildung mit steigendem pH des Reaktionsmediums festgestellt werden (Rustler *et al.* 2007).

2.3 Umsatz von enantiomerenreinen (*S*)- bzw. (*R*)- Mandelonitril durch ganze Zellen von *E. coli* JM109(pIK9) in Reaktionsmedien mit unterschiedlichen pH-Werten

Die gewonnenen Erkenntnisse deuteten darauf hin, dass die enantiokonservative Hydrolyse von (*R*)- bzw. (*S*)-Mandelonitril durch den Einsatz von ganzen Zellen in Reaktionsmedien mit pH-Werten ≤ 5 möglich sein sollte. Um dies zu verifizieren, wurden Zellen von *E. coli* JM109(pIK9) mit (*S*)- bzw. (*R*)-Mandelonitril inkubiert und der Umsatz der enantiomerenreinen Substrate bei pH 5 und pH 7 untersucht. Die enantiomerenreinen Substrate wurden in allen Ansätzen zu Mandelsäure und Mandelsäureamid umgesetzt. Die chirale Analyse der Produkte zeigte, dass die enantiomerenreinen Edukte (*S*)-Mandelonitril bzw. (*R*)-Mandelonitril bei pH 5 annähernd enantiokonservativ zu den korrespondierenden Enantiomeren der Mandelsäure und des Mandelsäureamids umgesetzt wurden (Abb. 10; Rustler *et al.* 2007).

Die quantitative Analyse der entstandenen Produkte zeigte, dass (*S*)-Mandelonitril bei pH 5 in einem Verhältnis von ca. 4:5 zu (*S*)-Mandelsäureamid und (*S*)-Mandelsäure umgesetzt wurde. Hingegen wurde (*R*)-Mandelonitril bei pH 5 fast ausschließlich zu (*R*)-Mandelsäure hydrolysiert - lediglich ~10 % des eingesetzten (*R*)-Mandelonitrils wurden zu (*R*)-Mandelsäureamid umgesetzt. Die gefundenen Ergebnisse bestätigten die vorangegangenen Untersuchungen mit Zellextrakten von *E. coli* JM109(pIK9) durch Mateo *et al.* (2006).

Im Vergleich zu den Umsätzen bei pH 5 ergab die Analyse der Umsätze bei pH 7 ein anderes Bild. Es zeigte sich, dass die enantiomerenreinen Substrate (*S*)-Mandelonitril und (*R*)-Mandelonitril bei pH 7 zu Mandelsäure und Mandelsäureamid im Verhältnis von etwa 3:1 umgesetzt wurden (Abb. 10). Dies war mit der raschen Racemisierung der enantiomerenreinen

Substrate bei pH 7 und der Unterschiede in Bezug auf die Amidbildung beim Umsatz der einzelnen Enantiomere zu erklären.

Die chirale Analyse der Produkte ergab, dass die jeweils eingesetzten enantiomerenreinen Substrate bei pH 7 gleichermaßen zu (*R,S*)-Mandelsäure und (*R,S*)-Mandelsäureamid umgesetzt wurden (Rustler *et al.* 2007). Die Entstehung der racemischen Produkte bestätigte somit die rasche Racemisierung der eingesetzten enantiomerenreinen Substrate in neutralen Medien und verdeutlichte einmal mehr, dass die angestrebte enantiokonservative Umsetzung von enantiomerenreinen Mandelonitril in wässrigen Medien niedrigere pH-Werte erfordert.

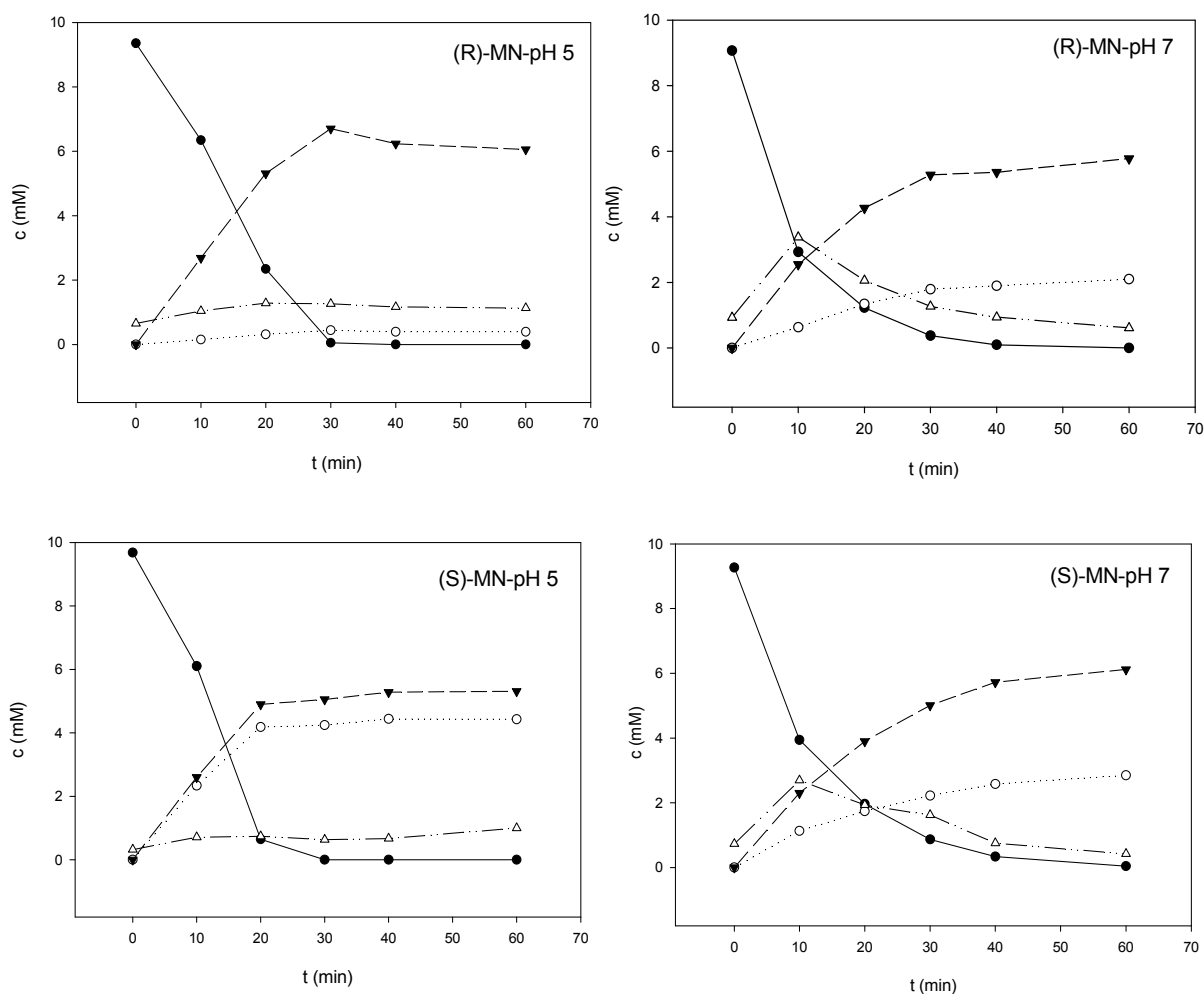


Abb. 10: Umsatz von 10 mM enantiomerenreinem (*R*)- bzw. (*S*)-Mandelonitril durch ganze Zellen von *E. coli* JM109(pIK9) bei pH 5 und 7. Die Zellen in den gezogenen Proben wurden durch Zentrifugation abgetrennt und die Reaktionen damit beendet. Die Bestimmung der Konzentrationen von Mandelonitril (●), Mandelsäureamid (○), Mandelsäure (▼) und Benzaldehyd (Δ) und die chirale Analyse der Produkte erfolgte mittels HPLC.

2.4 Integration der Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 und der (S)-Oxynitrilase aus *Manihot esculenta* in ein säuretolerantes Expressionssystem

Die vorhergehenden Stabilitätsversuche hatten gezeigt, dass das verwendete Modells substrat Mandelonitril in wässrigen Medien mit einem pH-Wert ≤ 4 weitestgehend stabil vorliegt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ganze Zellen von *E. coli* JM109(pIK9) prinzipiell in der Lage sind, Mandelonitril bei pH 5 weitestgehend enantiokonservativ zu Mandelsäure und Mandelsäureamid umzusetzen. Aufgrund der Tatsache, dass das Modells substrat Mandelonitril in wässrigen Reaktionsmedien bei pH 5 nicht vollständig stabilisiert vorliegt, bedarf es hierzu jedoch der Applikation hoher Enzymaktivitäten, um beim Einsatz von enantiomerenreinen Mandelonitril eine rasche Umsetzung zu gewährleisten und der drohenden Racemisierung des Substrats entgegen zu wirken. Da die Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 sich durch eine hohe spezifische Aktivität in Bezug auf Mandelonitril auszeichnet, war der Einsatz entsprechend hoher Aktivitäten in den vorhergehenden Versuchen unproblematisch. Der Umsatz anderer instabiler α -Hydroxynitrile, welche durch die Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 gegebenenfalls mit geringeren spezifischen Aktivitäten umgesetzt werden, könnte sich diesbezüglich als deutlich problematischer erweisen. Aus diesem Grund wurden weiterführend Möglichkeiten untersucht, die Biotransformation von α -Hydroxynitrilen in wässrigen Reaktionsmedien bei pH-Werten ≤ 4 zu ermöglichen.

Da Pilze in vielen Fällen säuretoleranter sind als Bakterien (Wartenberg 1989) sollte das Gen der Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 hierzu in ein potentiell säuretoleranteres eukaryotisches Expressionssystem kloniert werden und die Nitril-Hydrolyse durch ganze Zellen des rekombinanten eukaryotischen Organismus unter sauren Bedingungen untersucht werden.

2.4.1 *Pichia pastoris* als Expressionssystem

Ein potentiell säuretoleranteres Expressionssystem stellte die Hefe *Pichia pastoris* dar. *P. pastoris* ist für die Expression heterologer Proteine eines der am besten charakterisierten Systeme (Cereghino & Cregg, 2000; Cereghino *et al.* 2002). Als methylotrophe Hefe ist *P. pastoris* in der Lage mit Methanol als einziger C-Quelle zu wachsen. Die durch das Enzym Alkohol-Oxidase (AOX) katalysierte Oxidation von Methanol zu Formaldehyd stellt die erste Reaktion der Methanolverstoffwechslung dar. Das Enzym Alkohol-Oxidase ist in Zellen, die auf Glukose, Glycerin oder Ethanol wachsen, nicht nachweisbar. In Zellen dagegen, die auf Methanol als einziger C-Quelle angezogen werden, macht sie bis zu 30 % des Zellproteins aus (Couderc & Baratti 1980). Methanol induziert dabei die Expression der Alkohol-Oxidase-Gene *AOX1* und *AOX2*, wobei *AOX1* für den überwiegenden Teil der Alkohol-Oxidase-Aktivität in

den Zellen verantwortlich ist. Daraus folgt, dass durch Zugabe von Methanol ein heterologes Protein unter der Kontrolle des *AOX1* Promotors in großen Mengen über ein leicht regulierbares System hergestellt werden kann.

Vorversuche zeigten zudem, dass *P. pastoris* X-33 (Invitrogen) in Mineralmedien bei pH 4 kultiviert werden kann und somit im Vergleich zu *E. coli* JM109 potentiell ein säuretoleranteres Expressionssystem darstellt.

2.4.2 Integration des Gens der Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 in das Genom von *P. pastoris*

Das Gen der Arylacetonitrilase von *P. fluorescens* EBC191 wurde durch Herrn Dr. Hassan Motejadded (Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart) von Plasmid pIK9 amplifiziert und in das Genom kompetenter Zellen von *P. pastoris* X-33 integriert (Rustler *et al.* 2008a). Nach Selektion der Klone auf Zeocin-Resistenz wurden die positiven Klone in YPG-Medium [1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Pepton, 1 % (v/v) Glycerin in 0,1 M K-Phosphat-Puffer (pH 6)] angezogen. Mit Erreichen einer Optischen Dichte (OD_{600nm}) von 4-6 wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in 0,1 M K-Phosphat-Puffer gewaschen und zur Induktion der Enzymexpression in YPM-Medium [1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Pepton, 0,5 % (v/v) Methanol in 0,1 M K-Phosphat-Puffer (pH 6)] überführt. Nach 96 h Inkubation unter regelmäßiger Zugabe von Methanol [0,5 % (v/v) Methanol / 24h] wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und in 0,1 M K-Phosphat-Puffer (pH 6) gewaschen (Rustler *et al.* 2008a). Die so gewonnenen Zellen wurden anschließend auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Mandelonitril umzusetzen. Es zeigte sich, dass alle untersuchten Klone in der Lage waren, Mandelonitril zu hydrolysieren. In den Experimenten konnten Enzymaktivitäten von bis zu 0,08 U/mg Zelltrockenmasse für den Umsatz von Mandelonitril festgestellt werden (bestimmt anhand der Entstehung von Mandelsäure). Die höchste Aktivität wurde bei Einsatz von Zellen von *P. pastoris* pJOE5537.4 festgestellt. Ein Kontrollexperiment zeigte, dass Zellen von *P. pastoris* X-33 ohne das integrierte Gen der Arylacetonitrilase Mandelonitril nicht hydrolysieren konnten. Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass die Nitril-hydrolysierende Aktivität auf die erfolgreiche Integration und Expression des Gens der Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* in *P. pastoris* zurückzuführen war.

2.4.3 Umsatz von (R,S)-Mandelonitril durch Ruhezellen von *P. pastoris* pJOE5537.4 bei unterschiedlichen pH-Werten

Ruhezellen von *P. pastoris* pJOE5537.4 setzten Mandelonitril bei pH-Werten von 3-7 zu Mandelsäure und Mandelsäureamid um (Abb. 11). Das Produktverhältnis zwischen Mandelsäure und Mandelsäureamid entsprach hierbei dem bereits bei Umsätzen von (R,S)-Mandelonitril durch ganze Zellen von *E. coli* JM109(pIK9) ermittelten Wert von etwa 4:1.

Die höchste Nitril-hydrolysierende Aktivität der Zellen (0,13 U/mg Zelltrockenmasse) konnte hierbei, wie auch bei den vorangegangenen Umsätzen mit *E. coli* JM109(pIK9), in Reaktionsmedien mit einem pH-Wert von 5 festgestellt werden. Der Vergleich mit den vorangegangenen Umsätzen mit *E. coli* JM109(pIK9) zeigte jedoch, dass Zellen von *P. pastoris* pJOE5537.4 Mandelonitril generell mit deutlich geringeren Aktivitäten umsetzten. Dies deutete auf eine vergleichsweise schwache Expression der Arylacetonitrilase in *P. pastoris* pJOE5537.4 hin.

Zellen von *P. pastoris* pJOE5537.4 setzten Mandelonitril bei pH 4 mit bis zu 75 % der maximalen Aktivität (gefunden bei pH 5) um (Rustler *et al.* 2008a). Im Vergleich dazu konnte für Zellen von *E. coli* JM109(pIK9) bei Umsätzen von Mandelonitril unter vergleichbaren Bedingungen lediglich eine Restaktivität von bis zu 34 % der maximalen Aktivität (ebenfalls gefunden bei pH 5) nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 2.2.2). Im Gegensatz zu Zellen von *E. coli* JM109(pIK9) konnten Zellen von *P. pastoris* pJOE5537.4 zudem Mandelonitril auch in Reaktionsmedien mit pH 3 hydrolysieren, allerdings konnten hier nur geringe Restaktivitäten beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass *P. pastoris* X-33 ein säuretolerantes und für Ganzzellumsätze bei pH-Werten <5 geeignetes Expressionssystem darstellt. Allerdings entsprachen die festgestellten Aktivitäten von *P. pastoris* pJOE5537.4 bei pH 5-7 weniger als 10 % der beim Einsatz von *E. coli* JM109(pIK9) festgestellten Aktivitäten.

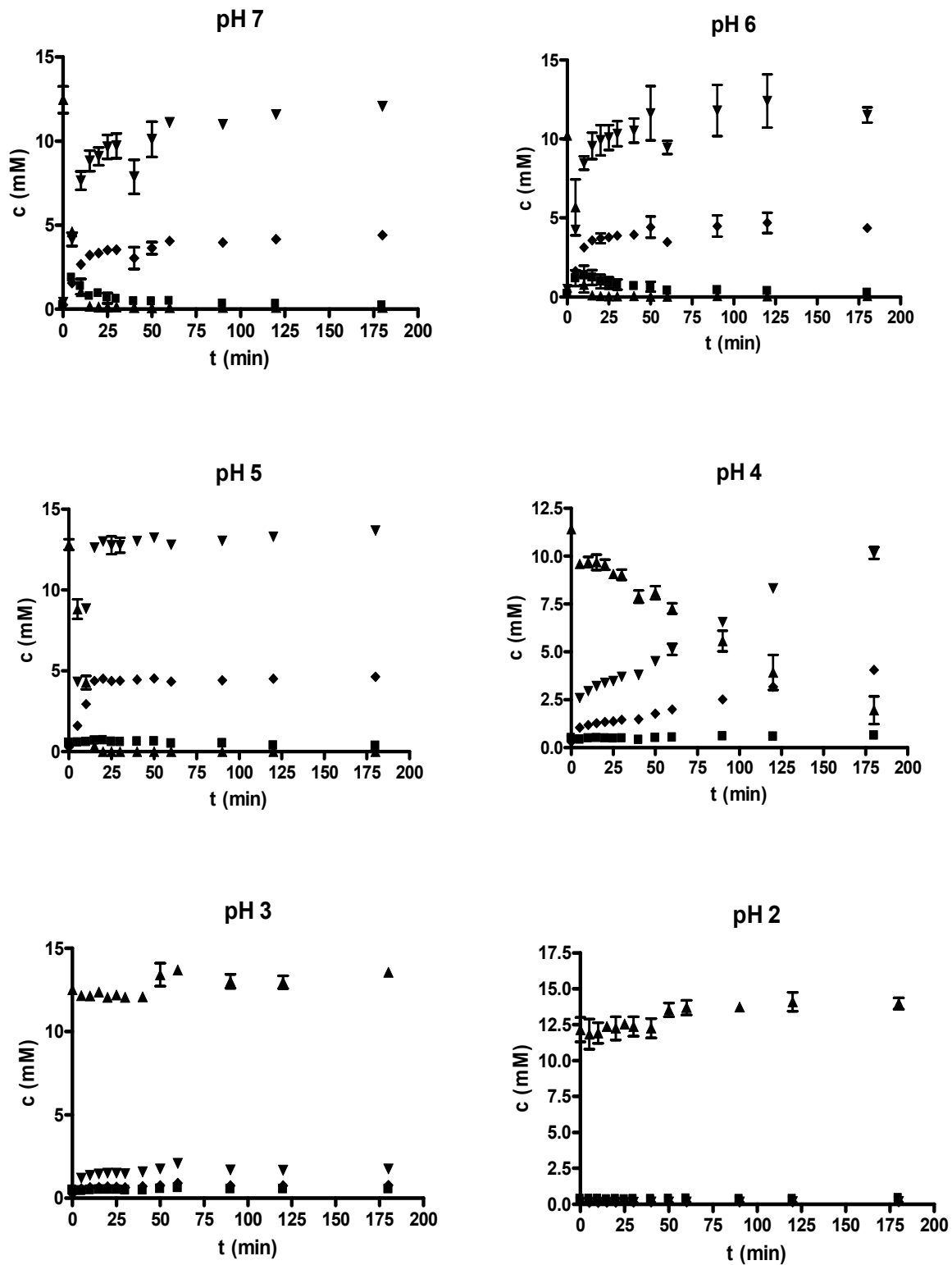


Abb. 11: Umsatz von Mandelonitril durch Ruhezellen von *P. pastoris* pJOE5537.4 bei pH 2–7. Die Reaktionen wurden in 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4-5), K-Phosphat-Puffer (pH 6) oder Tris/HCl-Puffer (pH 7) durchgeführt. Es wurde eine Zellkonzentration entsprechend einer OD_{600nm} von 25 eingesetzt. Die Reaktionsgemische wurden bei 34 °C und 1400 U/min in einem Eppendorf Thermomixer inkubiert. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 15 mM Mandelonitril gestartet. Anschließend wurden den Reaktionsgemischen in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die Reaktionen mit 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt und die Zellen durch Zentrifugation ($21000 \times g$, 10 min, 4 °C) abgetrennt. Die Bestimmung der Konzentrationen von Mandelonitril (▲), Mandelsäureamid (◆), Mandelsäure (▼) und Benzaldehyd (■) im Anschluss erfolgte mittels HPLC.

2.4.4 Gemeinsame Integration der Gene der Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 und der (*S*)-Oxynitrilase aus *Manihot esculenta* in das Genom von *P. pastoris*

Basierend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche wurde angenommen, dass eine simultane Expression der (*S*)-Oxynitrilase aus *M. esculenta* und der Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 die Synthese von enantiomerenreiner (*S*)-Mandelsäure ausgehend von Benzaldehyd und KCN ermöglichen könnte. Aus diesem Grund wurde versucht, die Gene beider Enzyme in das Genom *P. pastoris* zu integrieren und simultan zu exprimieren. Die Gene der (*S*)-Oxynitrilase aus *M. esculenta* und der Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 wurden durch Dr. Hassan Motejadded (Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart) von Plasmid pOE4-MeHNLwt und pJOE5537 amplifiziert und unter Kontrolle zweier separater *AOX1* Promotoren in ein Plasmid integriert (Rustler *et al.* 2008a). Das so konstruierte Plasmid pJOE5557 wurde linearisiert und in das Genom kompetenter *P. pastoris* X-33 Zellen integriert. Nach Selektion der rekombinanten Klone auf Zeocin-Resistenz, wurden die positiven Klone angezogen und die relevanten Enzymaktivitäten mit Methanol induziert. Die induzierten Zellen wurden im Anschluss bei pH 6 mit Mandelonitril inkubiert, um zunächst die Nitrilase-Aktivität der Zellen nachzuweisen. Lediglich 2 der 16 untersuchten Klonen (pJOE5557.2 und pJOE5557.8) hydrolysierten Mandelonitril.

Anschließend wurde die Integration des Gens der (*S*)-Oxynitrilase in den Nitrilase positiven Klonen überprüft. Hierzu wurde mit Hilfe spezifischer Primer versucht, das Gen der (*S*)-Oxynitrilase aus den Klonen pJOE5557.2 und pJOE5557.8 zu amplifizieren (Rustler *et al.* 2008a). Als Positivkontrolle dienten *P. pastoris* pJOE5507.51 [mit integriertem (*S*)-Oxynitrilase Gen] bzw. Plasmid pJOE5361 [ebenfalls mit integriertem (*S*)-Oxynitrilase Gen]. Als Negativkontrolle wurde genomische DNA von *E. coli* JM109 und *P. pastoris* pJOE5537.4 eingesetzt. Die gewonnenen PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 12). Aus der genomischen DNA der Klone pJOE5557.2, pJOE5557.8 sowie pJOE5507.51 und von Plasmid pJOE5361 konnte ein DNA-Fragment mit einer Größe von ca. 700-800 bp amplifiziert werden. Im Gegensatz hierzu konnte kein PCR-Produkt in den Negativkontrollen nachgewiesen werden.

Aufgrund der Größe der Fragmente konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Amplifikaten um das (*S*)-Oxynitrilase Gen aus *M. esculenta* mit einer Größe von 777 bp handelte (Hughes *et al.* 1994).

Damit wurde gezeigt, dass das Gen der (*S*)-Oxynitrilase erfolgreich in das Genom beider Nitrilase positiver Klone integriert worden war.

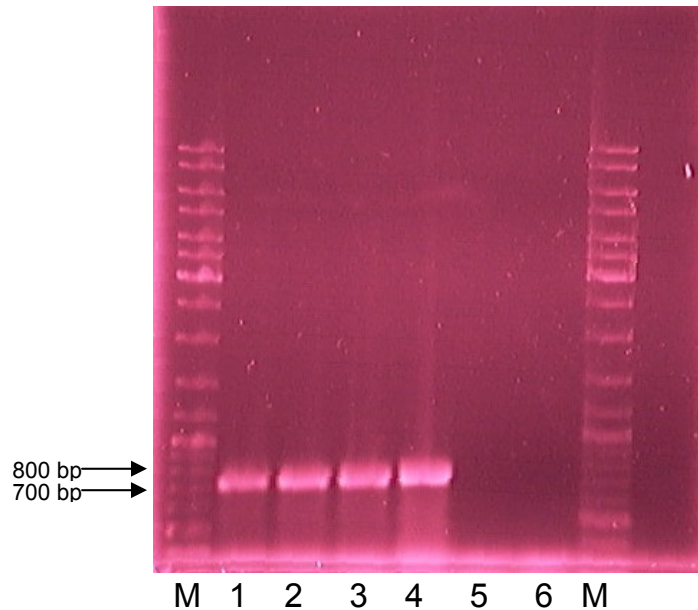


Abb. 12: Nachweis der PCR-Produkte in einem 1% Agarosegel. Spuren: **1** *P. pastoris* pJOE5557.2, **2** *P. pastoris* pJOE5557.8, **3** *P. pastoris* pJOE5507.51, **4** pJOE5361, **5** *E. coli* JM109, **6** *P. pastoris* pJOE5537.4, **M** Marker (zur Vorgehensweise siehe Textabschnitt 2.4.4).

2.4.5 Umsatz von (*R,S*)-Mandelonitril durch Ruhezellen von *P. pastoris* pJOE5557.2 bei unterschiedlichen pH-Werten

Durch die simultane Expression der Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 und der (*S*)-Oxynitrilase aus *M. esculenta* in *P. pastoris* pJOE5557.2 und der Fähigkeit beider Enzyme Mandelonitril umzusetzen waren Auswirkungen auf den Umsatz des Modellsubstrats zu erwarten. Daher wurden Zellen von *P. pastoris* pJOE5557.2 unter identischen Bedingungen wie zuvor die Zellen von *P. pastoris* pJOE5537.4 bei pH 2-7 inkubiert und der Umsatz von Mandelonitril vergleichend analysiert.

Die Zellen von *P. pastoris* pJOE5557.2 setzten, ebenso wie Zellen von *P. pastoris* pJOE5537.4 in den vorangegangenen Versuchen, Mandelonitril bei pH-Werten von pH 3-7 um (Abb. 13). Die stöchiometrischen Verhältnisse der entstandenen Produkte, Mandelsäure und Mandelsäureamid, glichen dabei den bereits zuvor in den Umsätzen durch *P. pastoris* pJOE5537.4 beobachteten Werten. Allerdings konnte in den Umsätzen durch *P. pastoris* pJOE5557.2 bei pH 4-6 eine verstärkte Bildung von Benzaldehyd zu Beginn der Umsätze festgestellt werden. Dieses wurde auf den Umsatz von Mandelonitril durch die (*S*)-Oxynitrilase zurückgeführt und lieferte ein erstes Indiz für eine erfolgreiche Expression des Enzyms in *P. pastoris* pJOE5557.2.

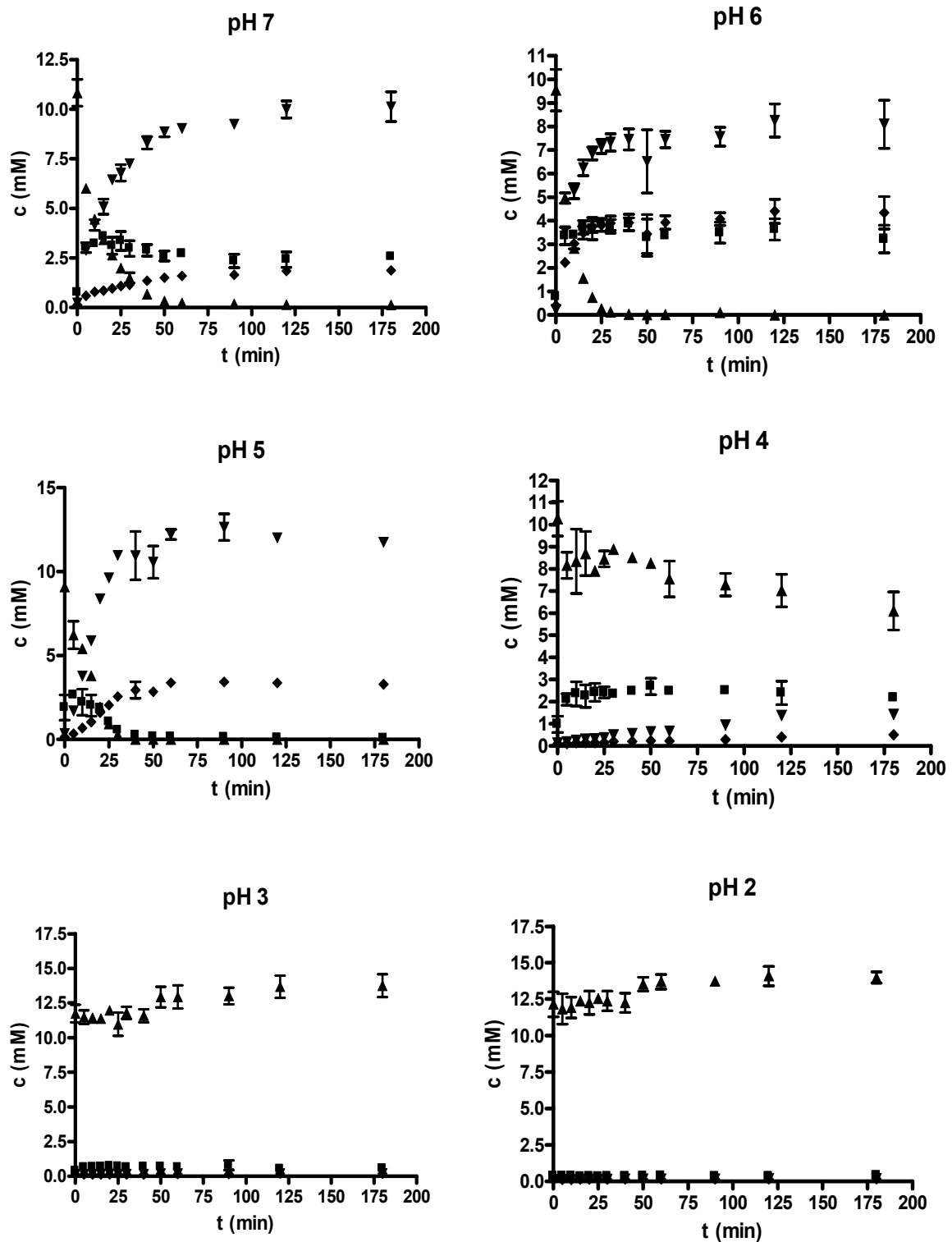


Abb. 13: Umsatz von Mandelonitril durch Ruhezellen von *P. pastoris* pJOE5557.2 bei pH 2–7. Die Reaktionen wurden in 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4-5), K-Phosphat-Puffer (pH 6) oder Tris/HCl-Puffer (pH 7) durchgeführt. Es wurde eine Zellkonzentration entsprechend einer OD_{600nm} von 15 eingesetzt. Die Reaktionsgemische wurden bei 34 °C und 1400 U/min in einem Eppendorf Thermomixer inkubiert. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 15 mM Mandelonitril gestartet. Anschließend wurden den Reaktionsgemischen in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die Reaktionen mit 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt und die Zellen durch Zentrifugation ($21000 \times g$, 10 min, 4 °C) abgetrennt. Die Bestimmung der Konzentrationen von Mandelonitril (▲), Mandelsäureamid (◆), Mandelsäure (▼) und Benzaldehyd (■) in den Überständen erfolgte mittels HPLC.

2.5 Umsatz von Benzaldehyd und Cyanid zu (S)-Mandelsäure und (S)-Mandelsäureamid durch Ruhezellen von *P. pastoris* pJOE5557.2

Die vorangegangenen Versuche bestätigten die erfolgreiche Integration der Gene der Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 und der (S)-Oxynitrilase in das Genom von *P. pastoris* pJOE5557.2 und lieferten Indizien für deren Expression in dem rekombinanten Organismus. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es sich bei *P. pastoris* im Vergleich zu *E. coli* JM109 um ein deutlich säuretolanteres Expressionssystem handelte, da das System auch bei pH-Werten <5 funktionell war. Hierbei war besonders interessant, dass die Zellen von *P. pastoris* pJOE5537.4 bzw. pJOE5557.2 Mandelonitril auch bei pH 4 über einen längeren Zeitraum umsetzten. Wie aus den vorhergehenden Stabilitätsexperimenten ersichtlich war, liegt Mandelonitril bei pH 4 in wässrigen Lösungen weitestgehend stabil vor. Zellen von *P. pastoris* pJOE5537.4 bzw. pJOE5557.2 sollten demnach in der Lage sein, enantiomerenreines Mandelonitril bei pH 4 enantiokonservativ zu enantiomerenreiner Mandelsäure und Mandelsäureamid umzusetzen. Die in *P. pastoris* pJOE5557.2 simultan zur Arylacetonitrilase exprimierte (S)-Oxynitrilase sollte zudem die Synthese von enantiomerenreinem (S)-Mandelonitril ausgehend von Benzaldehyd und Cyanid ermöglichen. Demzufolge wurde angenommen das Zellen von *P. pastoris* pJOE5557.2 in der Lage sein sollten, die Umsetzung von Benzaldehyd und Cyanid zu enantiomerenreiner (S)-Mandelsäure und (S)-Mandelsäureamid zu katalysieren. Um diese Annahme zu verifizieren, wurden Zellen von *P. pastoris* pJOE5557.2 in 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 3,8) inkubiert und die Biotransformation von Benzaldehyd und Cyanid untersucht (Abb. 14; Rustler *et al.* 2008a).

Innerhalb der ersten 3 min der Reaktion konnte die Entstehung von Mandelonitril nachgewiesen werden. Dagegen konnte im mitgeführten Kontrollexperiment (ohne Zellen) keine signifikante Bildung von Mandelonitril bzw. kein Abbau von Benzaldehyd beobachtet werden. Dies deutete darauf hin, dass die Bildung von Mandelonitril primär auf die Aktivität der (S)-Oxynitrilase zurückzuführen war und die chemische Hydrocyanierung von Benzaldehyd durch die sauren Bedingungen weitestgehend unterdrückt wurde. Anhand des Abbaus von Benzaldehyd konnte eine spezifische Enzymaktivität von 0,006 U/mg Zelltrockengewicht für die (S)-Oxynitrilase berechnet werden.

Das gebildete Mandelonitril wurde durch die Nitrilase-Aktivität der eingesetzten Zellen zu Mandelsäure und Mandelsäureamid umgesetzt. Anhand der Bildung von Mandelsäure konnte eine Enzymaktivität von 0,01 U/mg Zelltrockengewicht für die Arylacetonitrilase berechnet werden.

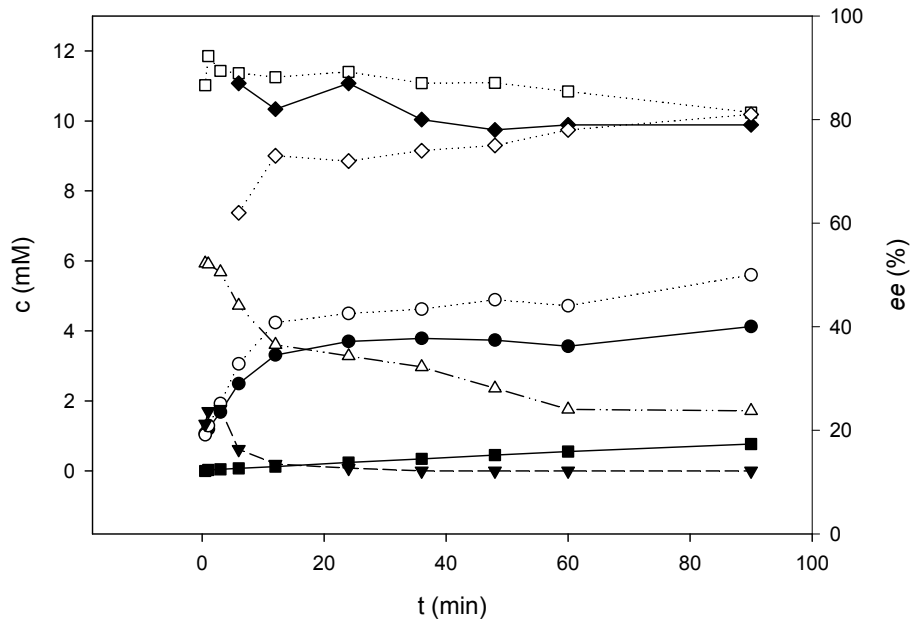


Abb. 14: Umsatz von Benzaldehyd und KCN durch Ruhezellen von *P. pastoris* pJOE5557.2 bei pH 3,8. Der Umsatz erfolgte in 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 3,8). Die eingesetzte Zellkonzentration entsprach einer OD_{600nm} von 103. Ein weiterer Ansatz ohne Zellen diente als Kontrollversuch. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von jeweils 10 mM Benzaldehyd und KCN gestartet. Die Analyse der Konzentrationen von Benzaldehyd (Δ), (*R,S*)-Mandelonitril (\blacktriangledown), (*R,S*)-Mandelsäure (\circ) und (*R,S*)-Mandelsäureamid (\bullet), sowie (*R,S*)-Mandelonitril (\blacksquare) und Benzaldehyd (\square) im Kontrollversuch erfolgte mittels RP-HPLC. Die Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse von (*S*)-Mandelsäure (\blacklozenge) und (*S*)-Mandelsäureamid (\blacklozenge) erfolgte durch die Auftrennung der Produkte mittels chiraler HPLC.

Die Quantifizierung der entstandenen Produkte ergab ein Verhältnis von etwa 4:3 von Mandelsäure zu Mandelsäureamid. Das Produktverhältnis war somit mit dem Produktverhältnis vergleichbar, welches zuvor beim Umsatz von reinem (*S*)-Mandelonitril durch Zellen von *E. coli* JM109(pIK9) bei pH 5 festgestellt worden war (Rustler *et al.* 2007). Dieser Wert unterschied sich deutlich von dem Verhältnis von etwa 4:1 (Mandelsäure zu Mandelsäureamid), das beim Umsatz von racemischen Mandelonitril durch die Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 festgestellt worden war. Hieraus konnte geschlossen werden, dass es sich bei dem gebildeten Mandelonitril überwiegend um das (*S*)-Enantiomer handelte und dass die (*S*)-Oxynitrilase aktiv war (Rustler *et al.* 2008a).

Die im Folgenden durchgeführte chirale Analyse der Produkte bestätigte, dass überwiegend (*S*)-Mandelsäure und (*S*)-Mandelsäureamid mit Enantiomerenüberschüssen von ca. 80 % gebildet wurden. Die Entstehung geringer Anteile von (*R*)-Mandelsäure und (*R*)-Mandelsäureamid konnte mit der nicht vollständig unterdrückten Hydrocyanierung von Benzaldehyd in Verbindung mit der geringen (*S*)-Oxynitrilase-Aktivität erklärt werden.

Das konstruierte bienzymatische System setzte also Benzaldehyd und KCN primär zu (*S*)-Mandelonitril um und metabolisierte dies weiter zu (*S*)-Mandelsäure und (*S*)-Mandelsäureamid. Damit handelte es sich um das erste Beispiel für die Konstruktion eines „bienzymatischen Ganzzellkatalysators“ für die enantioselektive Synthese von (*S*)- α -Hydroxycarbonsäuren ausgehend von Aldehyden und Cyanid. Allerdings ist das beschriebene System bezüglich der Enantioselektivität der Reaktion und den Umsatzraten noch weit von einer Anwendbarkeit entfernt.

Eine Möglichkeit um die Enantioselektivität des Systems bzw. die Enantiomerenüberschüsse der entstehenden Produkte zu steigern, könnte in einer weiteren Ansäuerung der Reaktionsmedien zur vollständigen Unterdrückung der chemischen Hydrocyanierung von Benzaldehyd liegen. Dies würde in dem vorgestellten System jedoch wahrscheinlich zum Verlust der Nitrilase-Aktivität führen. Eine weitere Möglichkeit den Enantiomerenüberschuss zu steigern, würde in der Steigerung der Enzymaktivitäten, speziell der (*S*)-Oxynitrilase liegen. Die Erhöhung der Oxynitrilase-Aktivität würde zur verstärkten Bildung von (*S*)-Mandelonitril führen und könnte somit die chemische Bildung von (*R*)-Mandelonitril überlagern.

Eine generelle Erhöhung der Effektivität könnte durch eine gesteigerte Expression der verantwortlichen Enzyme in *P. pastoris* erreicht werden. Dies könnte auf klassischem Wege durch die Optimierung der Induktionsbedingungen erreicht werden (Zhang & Yang 2006). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Konstruktion sogenannter „Multi-Copy-Strains“ (Cereghino & Cregg 2000, Cereghino *et al.* 2002). Hierbei werden mehrere Kopien der zu exprimierenden Gene in das Genom von *P. pastoris* eingefügt, was bei entsprechender Induktion zu einer verstärkten Enzymproduktion führt. Diese Möglichkeit bietet zudem den potentiellen Vorteil, das Verhältnis zwischen Oxynitrilase- und Nitrilase-Aktivität optimieren zu können.

2.6 Anreicherung Nitrile hydrolysierender Mikroorganismen aus sauren Umweltproben

Die enantiokonservative Umsetzung von α -Hydroxynitrilen wird von der Instabilität der Substrate in wässrigen Medien beeinflusst. Eine Möglichkeit die Substrate zu stabilisieren besteht, wie bereits beschrieben, in der Verwendung saurer Reaktionsmedien. Die Durchführung von Biotransformationen in solchen Medien erfordert entsprechend säuretolerante Biokatalysatoren.

Aus diesem Grund wurde versucht, Nitrile hydrolysierende Mikroorganismen aus verschiedenen Biotopen anzureichern. Hierbei wurden Wasser- und Sedimentproben eines sauren Minengewässers (Parys Mountain, Wales, Großbritannien), eines sauren Bergbausees in Brandenburg (Restsee 111) und Sedimentproben des Hochmoors rund um den Wildsee (Schwarzwald, Baden-Württemberg) eingesetzt. Die Proben des sauren Minengewässers bei Parys Mountain und des sauren Bergbausee wurden dankenswerterweise durch Prof. Dr. David Barrie Johnson (School of Biological Science, University of Wales, Bangor, Großbritannien) bzw. Dr. Katrin Wendt-Potthoff und Dr. Mathias Koschorreck (Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung, Department Seen-Mikrobiologie, Leipzig / Halle) zur Verfügung gestellt.

Die sauren Proben wurden mit Phenylacetonitril oder 2-Phenylpropionitril als einziger Stickstoffquelle in unterschiedlichen Mineralmedien mit 20 mM Glukose oder 10 mM Glukose und 10 mM Glycerin als Kohlenstoffquellen bei pH-Werten von 2,5-5 inkubiert.

In Mineralmedien mit pH 3 und pH 4, Glukose als Kohlenstoffquelle und Phenylacetonitril als einziger Stickstoffquelle, konnte aus Sedimentproben des sauren Bergbausees (Restsee 111, Brandenburg) ein Mikroorganismus angereichert werden, der in der Lage, war Phenylacetonitril als Stickstoffquelle zu verwerten. Der Organismus (R1) wurde für weitere Untersuchungen auf festen Komplexmedien vereinzelt und isoliert (Rustler & Stolz 2007). Hierbei konnte die Bildung ungewöhnlicher schwarzer Kolonien beobachtet werden (Abb. 15 A). Die mikroskopische Untersuchung zeigte hefeartige Zellen mit einer Größe von etwa $3 \times 5 \mu\text{m}$ (Abb. 15 B). Zudem konnten Hyphen-ähnliche Strukturen beobachtet werden. Aufgrund der relativ starken Pigmentierung der Kolonien wurde angenommen, dass es sich bei dem Neuisolat um einen Vertreter der sogenannten „Schwarzen Hefen“ handeln könnte, zu welchen Organismen der Gattungen *Cladiosporum*, *Exophiala*, *Fonsecaea*, *Hortaea*, *Philaophora*, *Ramichloridium* und *Rhinochadiella* gerechnet werden (Unterreiner *et al.* 1995, 1999, Hölker *et al.* 2004).

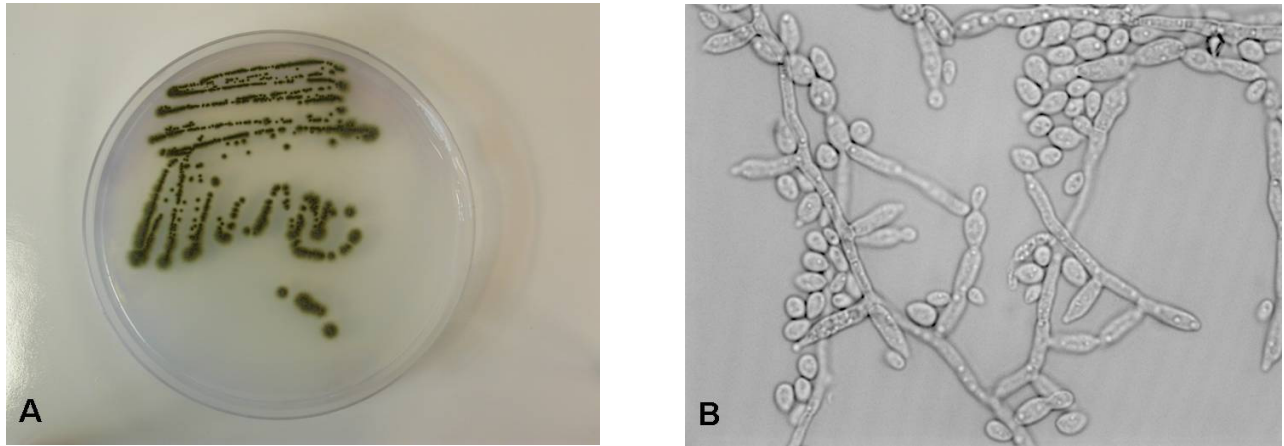


Abb. 15: (A) Wachstum des Neuisolats R1 auf einer Agarplatte mit 0,2 % (w/v) Casaminsäuren als Stickstoffquelle. (B) Mikroskopische Aufnahme einer Flüssigkultur des Stamms R1 bei einer Gesamtvergrößerung von 1250x. Das Bild wurde nach 72 h Wachstum in Mineralmedium mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) plus 20 mM Glukose, 0,2 % (w/v) Casaminsäuren und 2 mM Phenylacetonitril angefertigt.

Die endgültige Identifizierung des isolierten Mikroorganismus erfolgte durch Prof. Sybren deHoog am Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) in Utrecht (Niederlande) mittels 18S rDNA Sequenzierung. Der Organismus konnte als neues Isolat der Art *Exophiala oligosperma* identifiziert werden und wurde in der dortigen Stammsammlung als *Exophiala oligosperma* R1 (Stamm CBS120260) hinterlegt (Rustler & Stolz 2007).

2.7 Charakterisierung der Wachstumseigenschaften von *E. oligosperma* R1

2.7.1 Wachstum von *E. oligosperma* R1 mit Phenylacetonitril als einziger Stickstoffquelle

Im Folgenden wurde untersucht, ob *E. oligosperma* R1 tatsächlich in der Lage war, Phenylacetonitril als Stickstoffquelle zu verwerten. Hiermit sollte ausgeschlossen werden, dass das Wachstum in den Anreicherungskulturen auf den Reststickstoffgehalt der Umweltprobe zurückzuführen war. Der isolierte Stamm wurde daher in Mineralmedien mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer bei pH 3 bzw. pH 4 plus jeweils 20 mM Glukose und 2 mM Phenylacetonitril angeimpft, und die Zelldichte in den Kulturen, sowie die Konzentration an Phenylacetonitril in den Kulturüberständen in regelmäßigen Abständen bestimmt. *E. oligosperma* R1 erreichte in den Kulturen eine OD_{600nm} von ca. 0,5 (Abb. 16 A). In den Kulturüberständen konnte innerhalb von 10 Tagen ein vollständiger Abbau des eingesetzten Phenylacetonitrils nachgewiesen werden (Abb. 16 B). In einem mitgeführten Kontrollexperiment ohne Zellen konnte hingegen keine Abnahme der Nitrilkonzentration festgestellt werden. Es konnte somit gezeigt werden, dass das Neuisolat tatsächlich Phenylacetonitril metabolisierte. Potentielle Abbauprodukte von

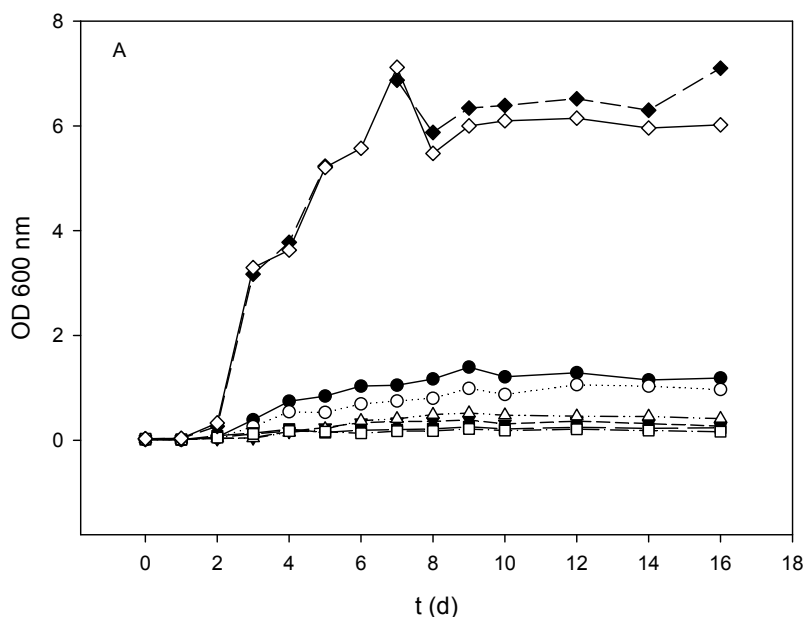
Phenylacetonitril, wie zum Beispiel Phenyllessigsäure oder Phenyllessigsäureamid, konnten in den untersuchten Kulturüberständen nicht nachgewiesen werden (Rustler & Stolz 2007).

2.7.2 Wachstum von *E. oligosperma* R1 mit Ammoniumsulfat oder Casaminosäuren als Stickstoffquelle

E. oligosperma R1 erreichte in Kulturen mit Phenylacetonitril als einziger Stickstoffquelle nur geringe Zelldichten. Aus diesem Grund wurde das Wachstum mit 1 mM Ammoniumsulfat bzw. 0,2 % (w/v) Casaminosäuren als Stickstoffquelle unter identischen Bedingungen vergleichend analysiert (Abb. 16 A). Hierbei zeigte sich, dass der Einsatz von Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle lediglich geringfügig höhere Zelldichten ($OD_{600nm} \sim 1,5$) zur Folge hatte. Dagegen führte der Einsatz von Casaminosäuren zu deutlich höheren Zellerträgen ($OD_{600nm} \geq 6$). Die geringen Zellausbeuten und Wachstumsraten mit 2 mM Phenylacetonitril bzw. 1 mM Ammoniumsulfat könnten möglicherweise auf eine zu geringe Stickstoffkonzentration im Medium hindeuten. Daher wurde das Wachstum des Isolats in Mineralmedien mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) plus 20 mM Glukose und 1-10 mM Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle untersucht. Die Erhöhung der Ammoniumsulfatkonzentration führte jedoch weder zu einer Steigerung der Zellerträge noch zu einer Steigerung der Wachstumsrate. In den Kulturen mit 1-10 mM Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle konnten in den Experimenten lediglich Verdopplungszeiten von ca. 15 h festgestellt werden. In Kontrast hierzu konnten für Kulturen mit 0,2 % (w/v) Casaminosäuren als Stickstoffquelle Verdopplungszeiten von 8 h berechnet werden.

In weiterführenden Experimenten wurde zusätzlich das Wachstum in Mineralmedien mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) plus 20 mM Glukose als Kohlenstoffquelle und 2-20 mM Natriumnitrat als alternativer anorganischer Stickstoffquelle untersucht. Verdopplungszeiten und Zellerträge entsprachen in diesen Experimenten jedoch weitgehend den bereits bei Anzucht mit Ammoniumsulfat gefundenen Verhältnissen (Rustler & Stolz 2007).

Wachstum von *E. oligosperma* R1



Umsatz von Phenylacetonitril

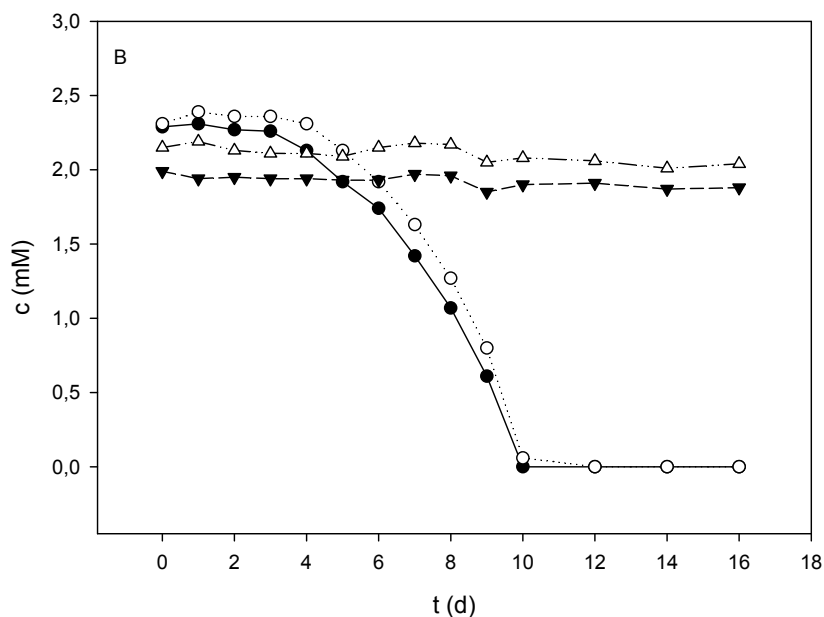


Abb. 16: (A) Wachstum von *E. oligosperma* R1 mit unterschiedlichen Stickstoffquellen bei pH 3 und pH 4. Die Anzucht von *E. oligosperma* R1 erfolgte in Mineralmedium mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer plus 20 mM Glukose bei pH 3 oder pH 4. Es wurde 1 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [pH 3 (●), pH4 (○)], 2 mM Phenylacetonitril [pH3 (▼), pH 4 (Δ)] oder 0,2 % (w/v) Casamminosäuren [pH 3 (◆), pH 4 (◇)] als jeweils einzige Stickstoffquelle eingesetzt. In einem Kontrollansatz wurde *E. oligosperma* R1 in Stickstoff-freiem Mineralmedium mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer [pH3 (■) bzw. pH 4 (□)] plus 20 mM Glukose inkubiert. (B) Abbau von Phenylacetonitril durch *E. oligosperma* R1 in den Kulturmedien mit 2 mM Phenylacetonitril bei pH 3 (●) bzw. pH 4 (○). Als Kontrolle wurde ein zellfreier Ansatz mit 2 mM Phenylacetonitril [pH3 (▼), pH 4 (Δ)] mitgeführt.

2.7.3 Wachstum von *E. oligosperma* R1 in Mineralmedien mit verschiedenen Konzentrationen an Phenylacetonitril

Im Folgenden wurde der Einfluss von Phenylacetonitril auf das Wachstum von *E. oligosperma* R1 näher untersucht. Hierzu wurde versucht, den Organismus in Mineralmedium mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) plus 20 mM Glukose, 0,2 % (w/v) Casaminsäuren ohne Phenylacetonitril bzw. mit unterschiedlichen Konzentrationen an Phenylacetonitril (1-6 mM) anzuziehen (Abb. 17). *E. oligosperma* R1 konnte in Medien mit 1-6 mM Phenylacetonitril angezogen werden. In Medien mit Phenylacetonitrilkonzentrationen >1 mM wurden jedoch deutliche Auswirkungen auf das Wachstum und den Zellertrag festgestellt. Diese äußerten sich mit zunehmender Konzentration an Phenylacetonitril in verlängerten lag-Phasen und deutlich reduzierten Zellerträgen.

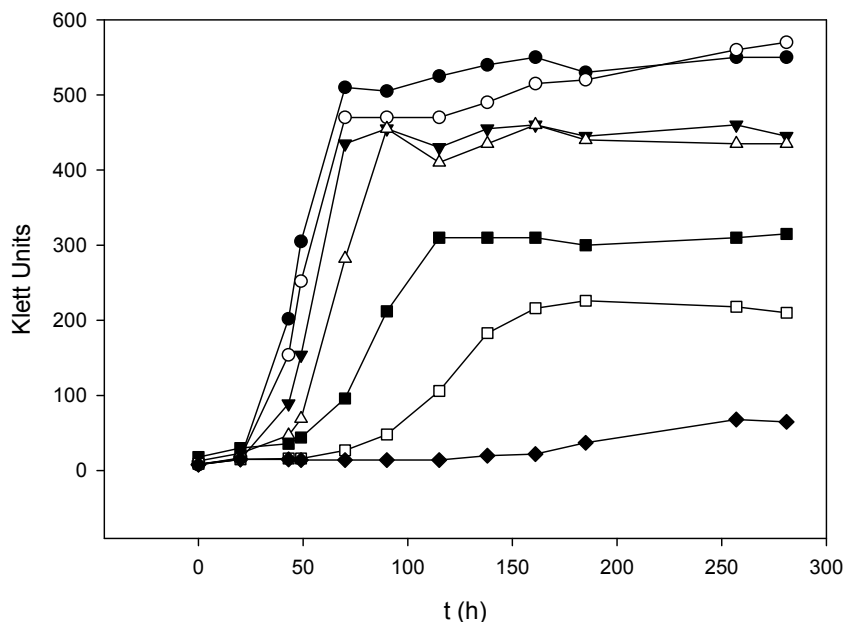


Abb. 17: Wachstum von *E. oligosperma* R1 in Mineralmedium mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) plus 20mM Glukose, 0,2 % (w/v) Casaminsäuren und 0 mM (●), 1 mM (○), 2 mM (▼), 3 mM (Δ), 4 mM (■), 5 mM (□), oder 6 mM (◆) Phenylacetonitril als zusätzlicher Stickstoffquelle. Die Kulturen wurden bei 30 °C und 100 U/min in Klett-Kolben auf einem Schüttler inkubiert. Die Bestimmung der Optischen Dichte der Kulturen erfolgte mit Hilfe eines Klett-Photometers.

2.7.4 Wachstum von *E. oligosperma* R1 mit Phenylacetonitril oder Phenylelessigsäure als einziger Kohlenstoffquelle

Wie bereits unter Punkt 2.7.1 beschrieben konnte *E. oligosperma* R1 Phenylacetonitril als Stickstoffquelle verwerten. Potentielle Abbauprodukte, wie Phenylelessigsäure oder Phenylelessigsäureamid, welche bei einer Nitrilase bzw. Nitril-Hydratase-Amidase katalysierten Verwertung von Phenylacetonitril im Kulturmedium zu erwarten gewesen wären, konnten in den Kulturüberständen jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies deutete darauf hin, dass der Organismus diese Umsatzprodukte weiter metabolisierte. Aus diesem Grund wurde untersucht ob *E. oligosperma* R1 mit Phenylacetonitril bzw. Phenylelessigsäure als Kohlenstoffquelle kultiviert werden konnte. Hierzu wurde versucht *E. oligosperma* R1 in Mineralmedium mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) plus 10 mM Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle und 1-10 mM Phenylacetonitril oder Phenylelessigsäure als Kohlenstoffquelle anzuziehen. Der Organismus konnte in Medien mit bis zu 5 mM Phenylacetonitril bzw. in Medien mit bis zu 1 mM Phenylelessigsäure als Kohlenstoffquelle angezogen werden (Rustler & Stolz 2007). Das stärkste Wachstum wurde bei einer Konzentration von 3 mM Phenylacetonitril festgestellt. In einem Kontrollansatz ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle aber mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle zeigte *E. oligosperma* R1 kein signifikantes Wachstum.

Ein weiterführendes Experiment zeigte, dass der Organismus in Medien mit bis zu 3 mM Phenylacetonitril als einziger Stickstoff-, Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert werden konnte (Abb. 18).

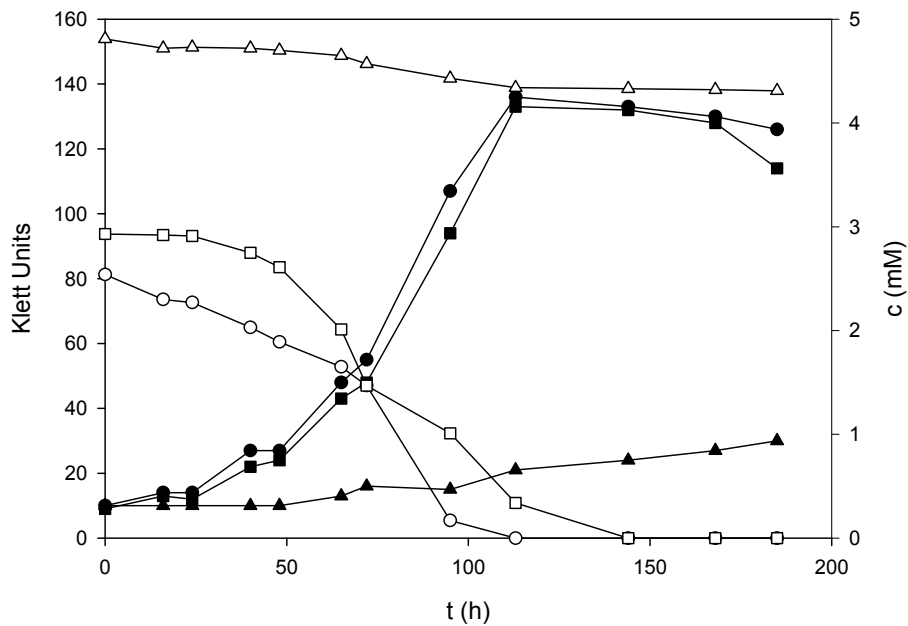


Abb. 18: Wachstum von *E. oligosperma* R1 mit Phenylacetoneitril als einziger Kohlenstoff und Stickstoffquelle. *E. oligosperma* R1 wurde zunächst in Vorkulturen in Mineralmedium mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) plus 20 mM Glukose, 0,2 % (w/v) Casaminsäuren und 2 mM Phenylacetoneitril angezogen. Mit Beginn der stationären Wachstumsphase wurden Aliquots dieser Vorkultur im Verhältnis 1:50 in frisches Stickstoff-freies Mineralmedium mit 100 mM Na-Citrat-Phosphatpuffer (pH 4) überführt. Die Ansätze wurden anschließend mit 3 mM Phenylacetoneitril (■) bzw. 3 mM Phenylacetoneitril plus 3 mM Ammoniumsulfat (●) supplementiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne weitere Kohlenstoff- und Stickstoffquelle (▲). Die Zunahme der Optischen Dichte in den Kulturen wurde mit Hilfe eines Klett-Photometers verfolgt. Die Konzentrationen von Phenylacetoneitril in den Kulturen mit 3 mM Phenylacetoneitril (□), 3 mM Phenylacetoneitril plus 3 mM Ammoniumsulfat (○), und in einem zusätzlichen zellfreien Kontrolllexperiment mit 3 mM Phenylacetoneitril (Δ) wurden mittels HPLC bestimmt.

2.7.5 Wachstum von *E. oligosperma* R1 in Mineralmedien mit pH-Werten von 1,5-9

Die Säuretoleranz des isolierten Organismus wurde in unterschiedlich gepufferten Mineralmedien mit pH-Werten von 1,5 bis 9 untersucht. Hierbei wurden jeweils 20 mM Glukose als Kohlenstoffquelle und 0,2 % (w/v) Casaminsäuren als Stickstoffquelle eingesetzt.

E. oligosperma R1 konnte bei allen getesteten pH-Werten kultiviert werden. In Medien mit pH-Werten von 1,5 bis 8 konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Verdopplungszeiten und Zellerträge festgestellt werden. Lediglich bei einem pH-Wert von 9 war eine verlängerte lag-Phase zu beobachten (Rustler & Stolz 2007). Es konnte somit gezeigt werden, dass *E. oligosperma* R1 eine deutlich höhere Säuretoleranz aufwies als die zuvor untersuchten rekombinanten *E. coli* und *P. pastoris* Stämme. Dies verdeutlichte, dass die Anreicherung von neuen Organismen aus der Natur ein erfolgversprechendes Konzept für die Bereitstellung extrem säuretoleranter Organismen darstellt.

2.8 Umsatz von Phenylacetonitril durch ganze Zellen und Zellextrakte von *E. oligosperma* R1

2.8.1 Umsatz von Phenylacetonitril zu Phenylelessigsäure und 2-Hydroxyphenylelessigsäure durch ganze Zellen von *E. oligosperma* R1

Im Folgenden wurde die Verwertung von Phenylacetonitril durch *E. oligosperma* R1 eingehender untersucht. Hierzu wurde der Organismus zunächst in Mineralmedium mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) plus 20 mM Glukose, 0,2 % (w/v) Casaminosäuren und 2 mM Phenylacetonitril angezogen. Nach 96 h Inkubation wurden die Zellen geerntet und nach einem Waschschrift in frisches Mineralmedium mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) plus 20 mM Glukose und 2 mM Phenylacetonitril ohne zusätzliche Stickstoffquelle überführt und bei 30 °C inkubiert. Aus diesem Versuchsansatz wurden in regelmäßigen Abständen Proben genommen und die zellfreien Kulturüberstände mittels HPLC analysiert.

Durch die chromatographische Analyse konnte so erstmals, einhergehend mit dem Abbau von Phenylacetonitril, die Entstehung von Produkten aus Phenylacetonitril nachgewiesen werden (Abb. 19). Diese wurden durch den Vergleich mit authentischen Standards als Phenylelessigsäure und 2-Hydroxyphenylelessigsäure identifiziert. Die Entstehung von Phenylelessigsäureamid konnte indes nicht festgestellt werden.

Die zeitliche Abfolge der Produktbildung deutete darauf hin, dass *E. oligosperma* R1 Phenylacetonitril zunächst zu Phenylelessigsäure umsetzte und dieses Zwischenprodukt weiter zu 2-Hydroxyphenylelessigsäure metabolisierte. Im weiteren Verlauf des Experiments konnte der vollständige Abbau beider zuvor gebildeten Intermediate nachgewiesen werden. Dies zeigte, dass der Organismus in der Lage war auch 2-Hydroxyphenylelessigsäure weiter zu metabolisieren.

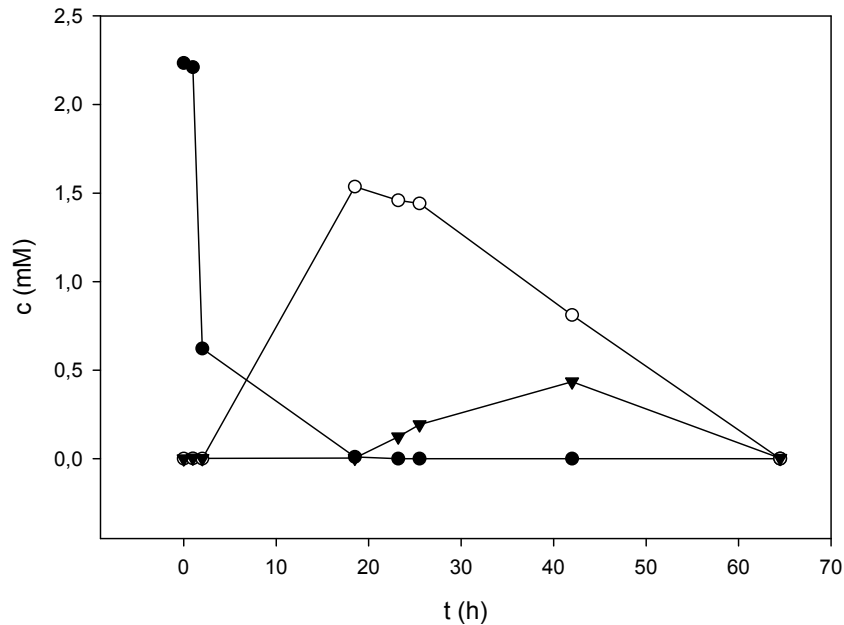


Abb. 19: Umsatz von Phenylacetonitril zu Phenyllessigsäure und 2-Hydroxyphenyllessigsäure durch Ruhezellen von *E. oligosperma* R1. Dargestellt sind die Konzentrationen von Phenylacetonitril (●) Phenyllessigsäure (○) und 2-Hydroxyphenyllessigsäure (▼) in den analysierten zellfreien Kulturüberständen.

Der Umsatz von Phenyllessigsäure zu 2-Hydroxyphenyllessigsäure wurde bereits von Cox *et al.* (1996) im Abbauweg von Styrol durch *E. jeanselmei* beschrieben. Dies deutete darauf hin, dass Phenyllessigsäure in *Exophiala*-Arten offensichtlich ein wichtiges Intermediat im Abbau aromatischer Substanzen darstellt. In der Literatur fanden sich Hinweise dafür, dass *Exophiala*-Stämme 2-Hydroxyphenyllessigsäure weiter zu Homogentisat umsetzen und dieses Zwischenprodukt im Anschluss durch eine ringspaltende Dioxygenase zu Maleylacetoacetat abbauen (Cox *et al.* 1996; Gunsch *et al.* 2005, Prenafeta-Boldú *et al.* 2006). Maleylacetoacetat wird in eukaryotischen Organismen als Metabolit des Tyrosinkatabolismus gebildet und üblicherweise über eine Maleylacetoacetat-Isomerase zu Fumarylacetoacetat umgesetzt, welches mit Hilfe einer Hydrolase zu Acetoacetat und Fumarat abgebaut wird (McMurry & Begley 2006). Fumarat und Acetoacetat können in den Citratzyklus einfließen und so für den Anabolismus und zur Energiegewinnung genutzt werden.

Der angenommene Abbauweg konnte durch spektrophotometrische Untersuchungen für *E. oligosperma* R1 bestätigt werden (Rustler *et al.* 2008b).

2.8.2 Umsatz von Phenylacetonitril durch ganze Zellen von *E. oligosperma* R1 unter sauren Bedingungen

Die Säuretoleranz der Nitril-hydrolysierenden Aktivität ganzer Zellen von *E. oligosperma* R1 wurde durch den Umsatz von Phenylacetonitril bei unterschiedlichen pH-Werten von pH 1,5-9 untersucht. Hierzu wurde *E. oligosperma* R1 in Mineralmedium mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) plus 20 mM Glukose, 0,2 % (w/v) Casamino-säuren und 2 mM Phenylacetonitril angezogen. Die so gewonnenen Zellen wurden bei pH-Werten von pH 1,5 - 9 mit 2 mM Phenylacetonitril bei 30 °C inkubiert und die Konzentration des eingesetzten Substrats in den Reaktionsgemischen in regelmäßigen Abständen mittels HPLC analysiert. Es wurde festgestellt, dass Zellen von *E. oligosperma* R1 das eingesetzte Substrat unter allen getesteten Bedingungen innerhalb von 10 Stunden annähernd vollständig hydrolysierten. Im Gegensatz hierzu konnte in einem Kontrollansatz ohne Zellen keine Abnahme der Phenylacetonitril-Konzentration nachgewiesen werden. Die höchste Aktivität wurde für Zellen ermittelt, die bei pH 8 oder pH 9 inkubiert worden waren (Abb. 20). Es zeigte sich zudem, dass die Zellen Phenylacetonitril während der gesamten Inkubationsdauer in allen Ansätzen mit weitestgehend konstanten Reaktionsraten umsetzten.

Die hohe Säuretoleranz von *E. oligosperma* R1 (siehe auch Abschnitt 2.7.5) und die Fähigkeit ganzer Zellen, Phenylacetonitril auch unter sehr sauren Bedingungen zu hydrolysieren, deutete darauf hin, dass *E. oligosperma* R1 potentiell für die Hydrolyse von α -Hydroxynitrilen unter sauren Bedingungen in Frage kommen könnte.

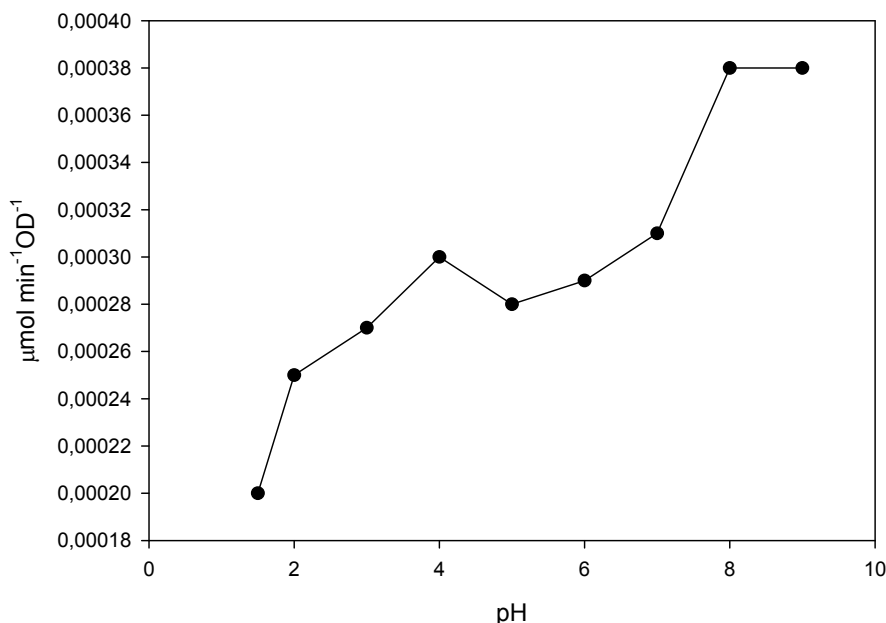


Abb. 20: Umsatz von Phenylacetone nitril durch Ruhezellen von *E. oligosperma* R1 bei pH-Werten von pH 1,5-9. *E. oligosperma* R1 wurde in Mineralmedium mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) plus 20 mM Glukose, 0,2 % (w/v) Casaminosäuren und 2 mM Phenylacetone nitril in einem Schikanenkolben angezogen. Die Zellen wurden nach 96 h Inkubation bei 30 °C auf einem Schüttler (100 U/min) durch Zentrifugation (15 min, 11000×g, 4 °C) geerntet. Anschließend wurden Aliquots der Zellen zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 15 in 100 mM KCl/HCl-Puffer (pH 1,5), Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 2-6) bzw. Tris/HCl-Puffer (pH 7-9) resuspendiert. Je 1,5 ml der so hergestellten Zellsuspensionen wurden in 2 ml Eppendorf-Gefäßen in einem Thermoschüttler (1400 U/min; 30 °C) inkubiert. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von Phenylacetone nitril (2 mM) gestartet. Im Folgenden wurden aus den Ansätzen in regelmäßigen Abständen Proben entnommen, die Reaktionen mit 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt und die zellfreien Überstände nach Zentrifugation (5 min, 21000×g) mittels HPLC analysiert. Die spezifischen Aktivitäten wurden anhand des Abbaus von Phenylacetone nitril bestimmt.

2.8.3 Umsatz von Phenylacetone nitril durch Zellextrakte von *E. oligosperma* R1

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Nitril-hydrolysierende Aktivität in *E. oligosperma* R1 konstitutiv vorliegt oder der Induktion durch Phenylacetone nitril bedarf. Hierzu wurde *E. oligosperma* R1 in Mineralmedien mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) plus 20 mM Glukose und 0,2 % (w/v) Casaminosäuren mit oder ohne 2,5 mM Phenylacetone nitril angezogen. Aus den so gewonnenen Zellen wurden Zellextrakte hergestellt und der Umsatz von Phenylacetone nitril durch diese analysiert. Es zeigte sich, dass sowohl Zellextrakte von Zellen, welche mit Phenylacetone nitril angezogen worden waren, als auch Zellextrakte von Zellen, welche ohne Phenylacetone nitril angezogen worden waren, Phenylacetone nitril zu Phenyllessigsäure umsetzten (Abb. 21).

Die beiden Zellextrakte setzten Phenylacetone nitril nur mit geringen spezifischen Aktivitäten um ($<0,01$ U/mg lösliches Protein). Der direkte Vergleich der Umsätze zeigte jedoch, dass

Zellextrakte aus Zellen, die in Gegenwart von Phenylacetonitril angezogen worden waren, das Substrat mit einer signifikant höheren Aktivität umsetzten (Rustler & Stolz 2007). Offenbar verfügte *E. oligosperma* R1 also über eine konstitutiv exprimierte Nitril-hydrolysierende Aktivität, deren Expression aber durch die Anzucht in Gegenwart von Phenylacetonitril gesteigert werden konnte.

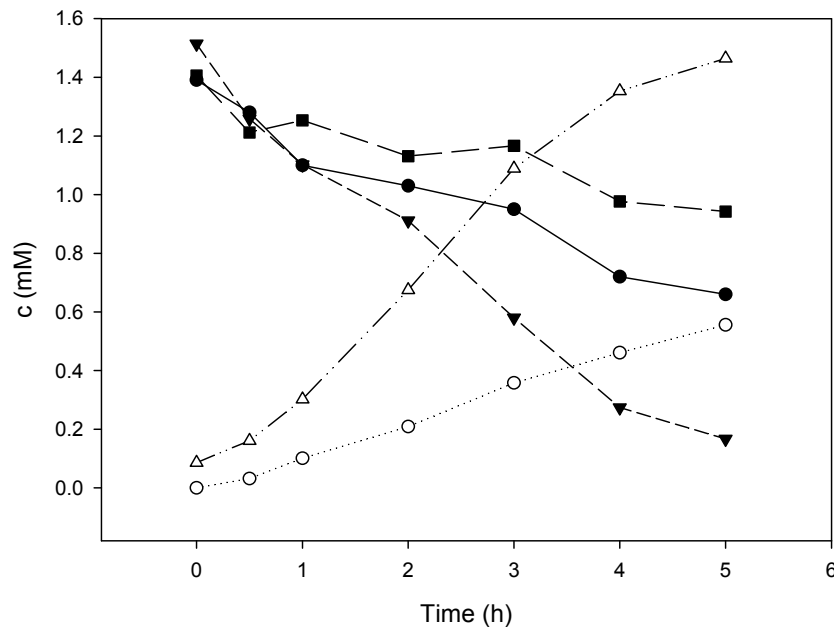


Abb. 21: Umsatz von Phenylacetonitril durch Zellextrakte von *E. oligosperma* R1. *E. oligosperma* R1 wurde in zwei 3000 ml Schikankolben in Mineralmedium (1000 ml) mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) plus 20 mM Glukose und 0,2 % (w/v) Casaminsäuren einmal mit und einmal ohne 2,5 mM Phenylacetonitril als zusätzlicher Stickstoffquelle angezogen. Die Zellen wurden nach 72 h Inkubation auf einem Schüttler (30 °C; 100 U/min) bei einer OD_{600nm} von 4,7 (Kultur mit Casaminsäuren) bzw. 4,0 (Kultur mit Casaminsäuren und Phenylacetonitril) durch Zentrifugation (11000×g, 20 min, 4 °C) geerntet. Die so gewonnenen Zellen wurden zweimal in 100 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 6,5) gewaschen und anschließend für die Herstellung der Zellextrakte nochmals in 100 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 6,5) resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Schwingkugelmühle. Die Zellextrakte wurden anschließend durch Zentrifugation (100000×g, 60 min, 4 °C) geklärt. Die so gewonnenen Zellextrakte wurden anschließend für Umsätze von Phenylacetonitril in 100 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7) verwendet. Es wurde eine Proteinkonzentration von 3 mg/ml eingesetzt. Die Reaktionsgemische wurden bei 30 °C auf einem Schüttler (1400 U/min) inkubiert. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von Phenylacetonitril gestartet. Den Reaktionsgemischen wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die Reaktionen mit 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Anschließend wurden nach Zentrifugation (5 min, 21000×g, 4 °C) die Konzentrationen an Phenylacetonitril (▼ Phenylacetonitril induzierte Zellen; ● nicht induzierte Zellen) und Phenylelessigsäure (Δ Phenylacetonitril induzierte Zellen; ○ nicht induzierte Zellen) in den zellfreien Überständen bestimmt. Als Kontrolle wurde Phenylacetonitril in einem Ansatz ohne Zellextrakt (■) inkubiert.

2.8.4 Umsatz von Phenylacetonitril und Phenylelessigsäureamid durch Zellextrakte von *E. oligosperma* R1

In diesem Versuch sollte das für die Nitril-Hydrolyse verantwortliche System von *E. oligosperma* R1 näher charakterisiert werden. Ziel war es hierbei, einen ersten Hinweis zu erhalten, ob es sich bei der Nitril-hydrolysierenden Aktivität um eine Nitrilase oder ein System bestehend aus einer Nitril-Hydratase und einer Amidase handelte (siehe Abbildung 1). Hierzu wurden Zellextrakte von *E. oligosperma* R1 mit Phenylacetonitril bzw. Phenylelessigsäureamid inkubiert und der Umsatz der Substrate vergleichend analysiert.

Die Zellextrakte setzten beide Substrate zu Phenylelessigsäure um (Abb. 22). Der direkte Vergleich der Umsätze zeigte jedoch, dass Phenylacetonitril mit deutlich höheren Aktivitäten zu Phenylelessigsäure umgesetzt wurde als Phenylelessigsäureamid. Die Amidase-Aktivität der Zellextrakte war also wesentlich niedriger als deren Nitril-hydrolysierende Aktivität. Da weder in diesem noch in früheren Umsätzen von Phenylacetonitril die Entstehung von Phenylelessigsäureamid nachgewiesen werden konnte, wurde geschlossen, dass die Phenylacetonitril-hydrolysierende Aktivität von *E. oligosperma* R1 primär auf einer Nitrilase basieren musste (Rustler & Stolz 2007).

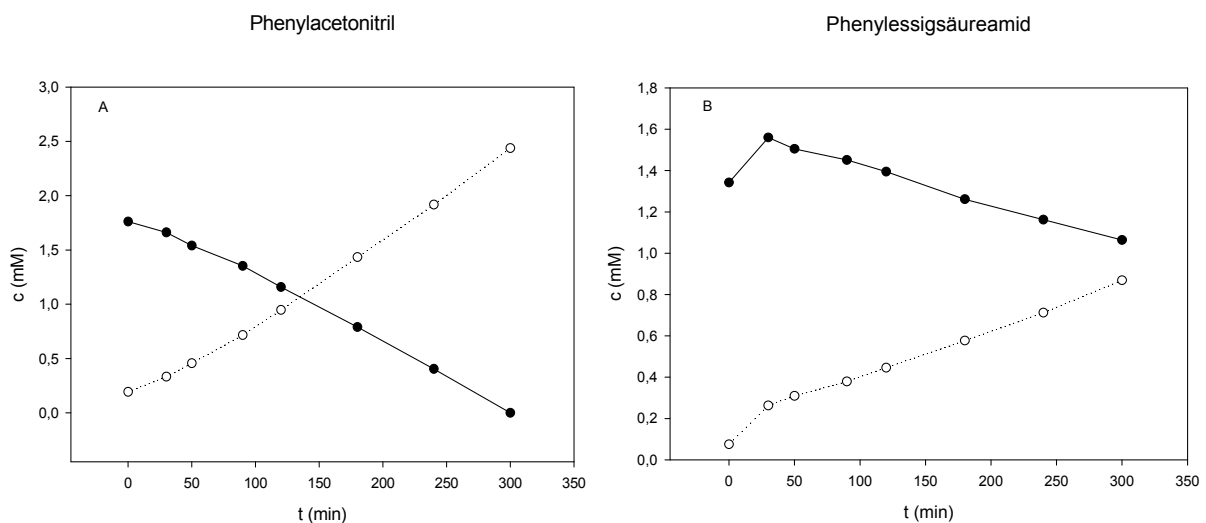


Abb. 22: Umsatz von Phenylacetonitril (A) und Phenylelessigsäureamid (B) durch Zellextrakte von *E. oligosperma* R1. Der Organismus wurde in Mineralmedium mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) plus 20 mM Glukose, 0,2 % (w/v) Casaminosäuren und 2 mM Phenylacetonitril angezogen. Die Zellen wurden nach 120 h Inkubation bei 30 °C auf einem Schüttler (100 U/min) mit einer OD_{600nm} von 8 durch Zentrifugation ($11000 \times g$, 20 min, 4 °C) geerntet. Die so gewonnenen Zellen wurden zweimal in 100 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 6,5) gewaschen und anschließend für die Herstellung von Rohextrakten eingesetzt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Uhrwerkskugelmühle. Die geklärten Extrakte (Proteingehalt 2,8 mg/ml) wurden für den Umsatz von Phenylacetonitril und Phenylelessigsäureamid zu Phenylelessigsäure bei pH 6,5 eingesetzt.

2.9 Substratspezifität der Nitril-hydrolysierenden Aktivität aus Zellextrakten von Phenylacetonitril induzierten Zellen von *E. oligosperma* R1

Um die Substratspezifität der Nitril-hydrolysierenden Aktivität von *E. oligosperma* R1 näher zu charakterisieren, wurden Zellextrakte von Zellen, welche zuvor mit Casamino-säuren und Phenylacetonitril als Stickstoffquelle angezogen worden waren, mit verschiedenen Nitrilen inkubiert und die Hydrolyse der eingesetzten Substrate vergleichend analysiert. Die Zellextrakte setzten eine Vielzahl unterschiedlich substituierter Phenylacetonitrile, sowie Benzonitril und Indol-3-acetonitril um (Tab. 3). Die höchste Aktivität konnte für den Umsatz von 3-Chlorphenylacetonitril festgestellt werden. Das Substrat wurde ca. 1,5-mal schneller umgesetzt als Phenylacetonitril. Im Gegensatz dazu wurde Benzonitril mit einer deutlich niedrigeren Aktivität umgesetzt als Phenylacetonitril. Dies deutete darauf hin, dass sich die durch Phenylacetonitril induzierte Nitrilase-Aktivität aus *E. oligosperma* R1 von anderen Nitrilasen pilzlicher Herkunft unterscheidet, da diese Benzonitril gegenüber Phenylacetonitril oftmals bevorzugt umsetzen. Dies war zum Beispiel bei den Nitrilasen von *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* K10, *Fusarium solani* O1 und *Penicillium multicolor* CCF 2244 der Fall (Harper 1977, Kaplan *et al.* 2006 a, c; Vejvoda *et al.* 2008).

Substrat	Relative Aktivität
Phenylacetonitril	100
2-Chlorphenylacetonitril	44
3-Chlorphenylacetonitril	154
4-Chlorphenylacetonitril	70
2,6-Dichlorphenylacetonitril	6
4-Hydroxyphenylacetonitril	69
Indol-3-acetonitril	45
Benzonitril	<5
Naphthalincarbonitril	<5

Tab. 3: Umsatz verschiedener aromatischer Nitrile durch Zellextrakte von *E. oligosperma* R1. *E. oligosperma* R1 wurde für diesen Versuch in Mineralmedium mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) plus 20 mM Glukose, 0,2 % (w/v) Casaminosäuren, 1 mM (NH₄)₂SO₄, und 1.5 mM Phenylacetonitril angezogen. Die Zellen wurden nach 120 h Inkubation bei 30 °C auf einem Schüttler (100 U/min) durch Zentrifugation geerntet. Nach einem Waschschrift in 100 mM Na-Phosphat Puffer (pH 6,5) wurden die so gewonnenen Zellen zur Herstellung von Rohextrakten eingesetzt. Der Zellaufschluss erfolgte hierbei mit Hilfe einer Uhrwerkskugelmühle. Die Zellextrakte wurden anschließend für den Umsatz verschiedener Nitrile bei pH 6,5 (100 mM Na-Phosphat-Puffer) verwendet. Es wurde eine Proteinkonzentration von 2,8 mg/ml eingesetzt. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe des jeweiligen Substrats gestartet. Die Reaktionsgemische wurden bei 30 °C auf einem Schüttler (1400 U/min) inkubiert. Es wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen, die Reaktionen mit 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt, und die Konzentrationen der Substrate in den Überständen mittels HPLC analysiert. Die spezifischen Aktivitäten wurden anhand des Abbaus des jeweiligen Substrats bestimmt. Die Tabelle zeigt die relativen spezifischen Aktivitäten in Bezug auf den Umsatz von Phenylacetonitril (100 % = 0,005 U/mg Protein).

2.10 Optimierung der Induktion der Nitril-hydrolysierenden Aktivität von *E. oligosperma* R1

Die Induktion der Nitril-hydrolysierenden Aktivität von *E. oligosperma* R1 durch Phenylacetonitril führte in den vorangegangenen Versuchen lediglich zu einer etwa 1,5-fachen Steigerung der Nitril-hydrolysierenden Aktivität im Vergleich zu nicht induzierten Zellen. Angesichts der geringen Aktivität der Zellen bedurfte es einer Steigerung der enzymatischen Aktivität, um eine detaillierte Charakterisierung des Nitril-hydrolysierenden Systems zu ermöglichen. Deshalb wurde der Einfluss potentieller Induktoren auf das Nitril-hydrolysierende System untersucht. *E. oligosperma* R1 wurde hierzu in Gegenwart potentieller Induktoren, wie ϵ -Caprolactam, Isovaleriansäurenitril, 2-, 3- oder 4-Cyanopyridin (Nagasawa *et al.* 1990, Kobayashi *et al.* 1991, Kaplan *et al.* 2006b) bzw. in Gegenwart der bevorzugt umgesetzten Nitrile (Phenylacetonitril, 2-, 3-, 4-Chlorphenylacetonitril, 4-Hydroxyphenylacetonitril, Indol-3-acetonitril) oder Benzonnitril angezogen.

Während die Kultivierung von *E. oligosperma* R1 in Gegenwart von 2-, 3- oder 4-Chlorphenylacetonitril bzw. Indol-3-acetonitril nicht möglich war, konnten in Kulturen mit ϵ -Caprolactam, 2-, 3- oder 4-Cyanopyridin keinerlei inhibitorische Auswirkungen auf das Wachstum von *E. oligosperma* R1 festgestellt werden (Rustler *et al.* 2008b).

Der Einfluss der eingesetzten Substanzen auf die Induktion der Nitril-hydrolysierenden Aktivität der Zellen wurde durch den Umsatz von Phenylacetonitril untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Phenylacetonitril-hydrolysierende Aktivität der Zellen durch die Anzucht in Gegenwart von 2-Cyanopyridin, ϵ -Caprolactam und Isovaleriansäurenitril um das 4,4-, 2,9- bzw. 2-fache gesteigert werden konnte. Die Anzucht in Gegenwart von Phenylacetonitril führte, wie auch in den vorangegangenen Versuchen beobachtet, nur zu einer 1,5-fachen Steigerung der Nitril-hydrolysierenden Aktivität im Vergleich zu nicht induzierten Zellen (Rustler *et al.* 2008b).

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden die Einflüsse der Induktorkonzentrationen und des Vorhandenseins weiterer Stickstoffquellen untersucht. Hierzu wurden Zellen in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an ϵ -Caprolactam und 2-Cyanopyridin mit und ohne Casaminsäuren, Ammoniumsulfat oder Natriumnitrat als zusätzlicher Stickstoffquelle angezogen. Anschließend wurde die Hydrolyse von Phenylacetonitril durch die gewonnenen Zellen bestimmt. Die höchste Nitril-hydrolysierende Aktivität (0,0123 U/mg Zelltrockenmasse) konnte in diesen Experimenten für Zellen ermittelt, welche zuvor mit 10 mM 2-Cyanopyridin und 4 mM Natriumnitrat als zusätzlicher Stickstoffquelle angezogen worden waren (Abb. 23).

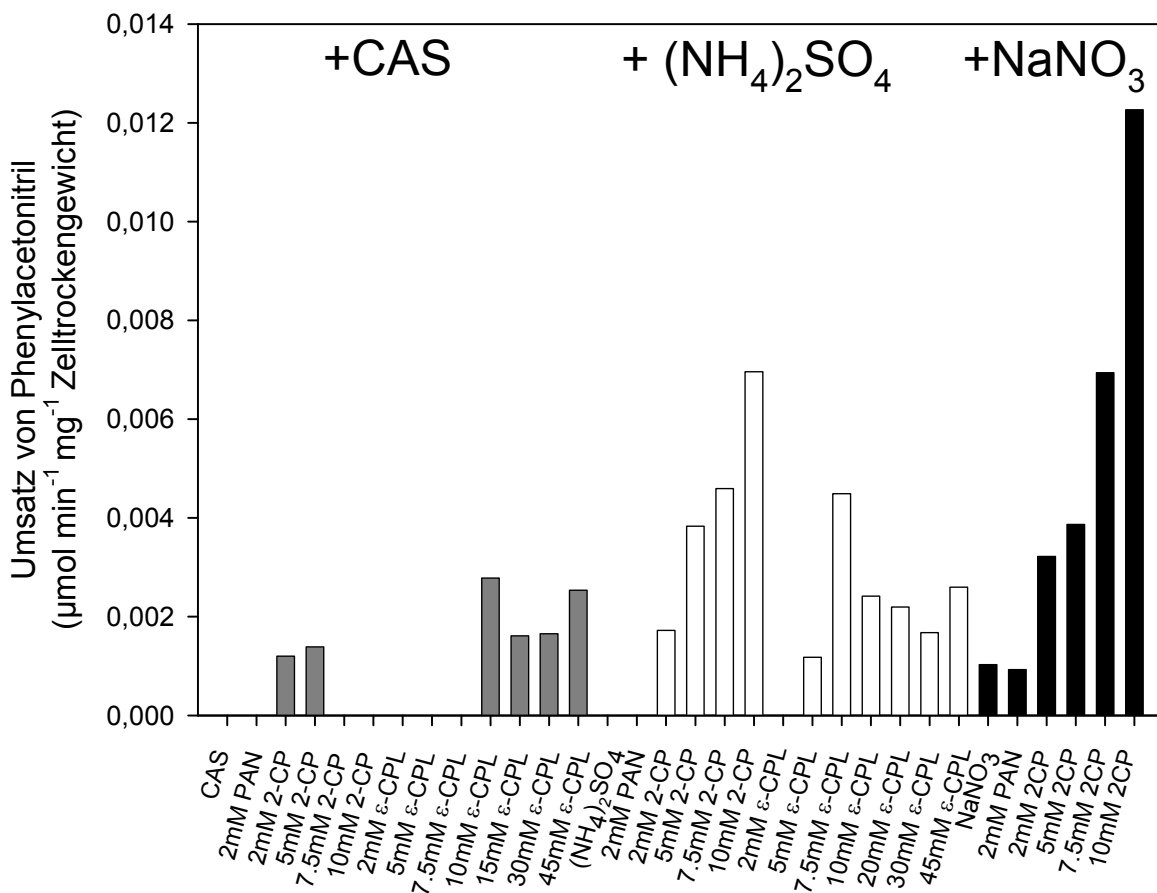


Abb. 23: Nitril-hydrolysierende Aktivität von Ruhezellen von *E. oligosperma* R1 nach Anzucht in Gegenwart unterschiedlicher Stickstoffquellen und unterschiedlicher Konzentrationen an ϵ -Caprolactam (ϵ -CPL), 2-Cyanopyridin (2-CP) oder Phenylacetonitril (PAN). Die Zellen wurden in Mineralmedium mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) plus 20 mM Glukose und 0,2 % (w/v) Casamminosäuren (CAS; ■), 4 mM NaNO₃ (■), bzw. 2 mM (NH₄)₂SO₄ (□) und unterschiedlichen Konzentrationen an Phenylacetonitril, 2-Cyanopyridin oder ϵ -Caprolactam angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (11000×g, 15 min, 4 °C), in 0,1 M Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) gewaschen und abschließend in 0,1 M Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) zu einer OD_{600nm} von 15 resuspendiert. Der Umsatz von Phenylacetonitril erfolgte bei 30 °C und 1400 U/min und wurde durch die Zugabe des Substrats gestartet. Der Abbau von Phenylacetonitril in den Ansätzen wurde durch die Analyse der zellfreien Überstände mittels HPLC bestimmt.

Die Induktion der Nitril-hydrolysierenden Aktivität durch Anzucht in Gegenwart von 2-Cyanopyridin und Natriumnitrat konnte in weiteren Experimenten durch die sukzessive Erhöhung der Induktorkonzentration weiter gesteigert werden. Die höchste spezifische Aktivität für den Umsatz von Phenylacetonitril (0,021 U/mg Zellrockenmasse) wurde beim Einsatz von Zellen festgestellt, welche in Gegenwart von 15 mM 2-Cyanopyridin und 4 mM Natriumnitrat als Stickstoffquellen angezogen worden waren (Rustler *et al.* 2008b). Die Untersuchungen zeigten zudem, dass *E. oligosperma* R1 in Medien mit 2-Cyanopyridin (10-15 mM) als einziger Stickstoffquelle kultiviert werden konnte und 2-Cyanopyridin im Kulturmedium zu Picolinsäure

und Picolinsäureamid umgesetzt wurde (Abb. 24). In den Kulturüberständen konnte somit erstmalig die Entstehung eines korrespondierenden Säureamids als Produkt der Nitril-Hydrolyse durch *E. oligosperma* R1 festgestellt werden.

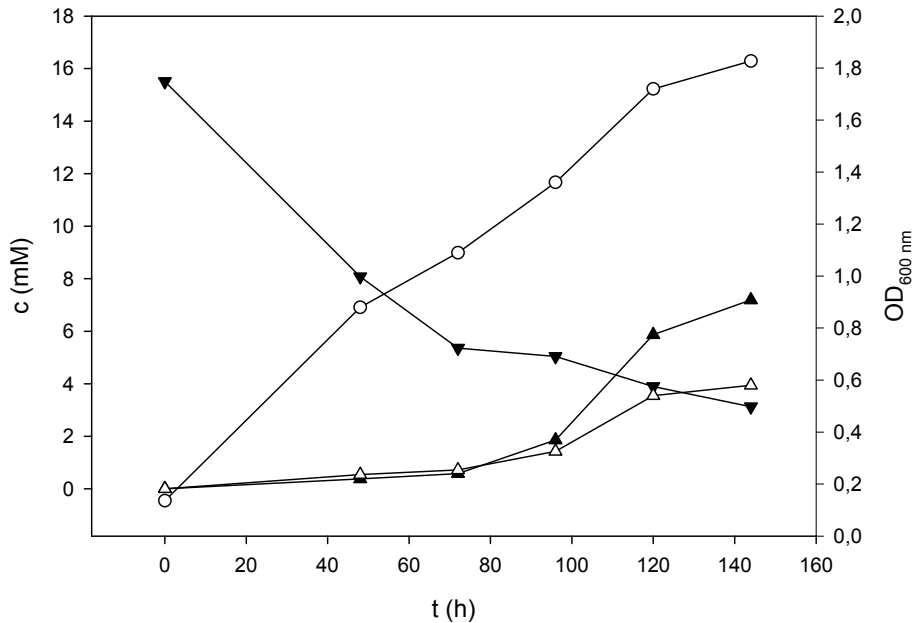


Abb. 24: Umsatz von 2-Cyanopyridin durch wachsende Zellen von *E. oligosperma* R1. Die Zellen wurden in Mineralmedium mit 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) plus 20 mM Glukose, 4 mM NaNO₃ und 15 mM 2-Cyanopyridin als Induktor und zusätzlicher Stickstoffquelle angezogen. Das Wachstum der Kultur wurde durch das Bestimmen der OD_{600nm} (○) verfolgt. Der Kultur wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen. Die Reaktionen wurden mit 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt, die Zellen durch Zentrifugation (21000×g, 10 min, 4 °C) entfernt und die Konzentrationen an 2-Cyanopyridin (▼), Picolinsäure (▲) und Picolinsäureamid (△) in den zellfreien Kulturüberständen mittels HPLC analysiert.

2.11 Substratspezifität der Nitril-hydrolysierenden Aktivität aus *E. oligosperma* R1 nach Induktion mit 2-Cyanopyridin

2.11.1 Umsatz von Phenylacetonitril, Benzonitril, 2-, 3-, 4-Cyanopyridin und Acrylonitril durch Zellen und Zellextrakte von *E. oligosperma* R1

2-Cyanopyridin wurde bereits durch Kaplan *et al.* (2006a-c) als starker Induktor der Nitrilase aus *Aspergillus niger* K10 beschrieben. Die in *A. niger* K10 induzierte Aktivität setzte bevorzugt 4-Cyanopyridin und Benzonitril zu den korrespondierenden Säuren und Säureamiden um. Auch die Nitrilasen aus *Fusarium solani* O1 und *Penicillium multicolor* CCF 2244 setzten diese Substrate bevorzugt um (Vejvoda *et al.* 2008; Kaplan *et al.* 2006 a, c).

Aus diesem Grund wurde die Verwertung dieser, offensichtlich von Nitrilasen pilzlicher Herkunft bevorzugten, Substrate durch *E. oligosperma* R1 untersucht. Hierzu wurde *E. oligosperma* R1 in Gegenwart von 15 mM 2-Cyanopyridin und 4 mM Natriumnitrat mit 20 mM Glukose bei pH 4 angezogen. Ein Teil der gewonnenen Zellen wurde dazu verwendet, den Umsatz von 3- und 4-Cyanopyridin, Benzonitril, Phenylacetonitril und Acrylonitril zu untersuchen (Abb. 25 A). Es zeigte sich, dass *E. oligosperma* R1 alle eingesetzten Substrate zu den korrespondierenden Säuren hydrolysierte. Die höchste Aktivität (0,27 U/mg Zelltrockenmasse) konnte für den Umsatz von 4-Cyanopyridin ermittelt werden.

Die Entstehung geringer Spuren der korrespondierenden Säureamide, wie sie zuvor bereits im Kulturmedium mit 2-Cyanopyridin nachgewiesen worden war, konnte nur in den Umsätzen von 4-Cyanopyridin und Acrylonitril festgestellt werden.

Die Experimente zeigten, dass ausnahmslos alle getesteten Substrate im Vergleich zu Phenylacetonitril mit deutlich höheren Aktivitäten umgesetzt wurden (Abb. 25 A / Tab. 4). Dagegen war in den zuvor beschriebenen Umsätzen mit Zellextrakten aus Zellen, welche zuvor in Gegenwart von Phenylacetonitril angezogen worden waren, Benzonitril mit einer deutlich geringeren relativen Aktivität (in Bezug auf den Umsatz von Phenylacetonitril) umgesetzt worden. Die in diesem Versuch gefundenen höheren spezifischen Aktivitäten für den Umsatz von Benzonitril (im Vergleich zum Umsatz von Phenylacetonitril) standen somit in scharfen Kontrast zu den mit Zellextrakten aus Phenylacetonitril-induzierten Zellen erhaltenen Ergebnissen. Dies deutete auf die Induktion unterschiedlicher Nitril-hydrolysierender Aktivitäten in *E. oligosperma* R1 nach Anzucht in Gegenwart von Phenylacetonitril oder 2-Cyanopyridin hin.

Im Folgenden wurde der Umsatz der zuvor untersuchten Substrate durch Zellextrakte von *E. oligosperma* R1 untersucht und die Aktivitäten mit den Aktivitäten der Ruhezellen verglichen. Hierzu wurde aus einem Aliquot der, mittels 2-Cyanopyridin induzierten, Zellen ein Zellextrakt hergestellt. Die Zellextrakte setzten die eingesetzten Substrate mit hohen Aktivitäten um

(Abb. 25 B / Tab. 4). Die höchste Aktivität konnte, wie bereits im vorangegangenen Versuch, für den Umsatz von 4-Cyanopyridin ermittelt werden. Es zeigte sich, dass Benzotrifluorid auch durch die Zellextrakte im Vergleich zu Phenylacetotrifluorid bevorzugt umgesetzt wurde.

Die ermittelten spezifischen Aktivitäten der Zellextrakte wurden im Anschluss unter der Annahme eines Proteingehalts von 50 % in Bezug auf das Zelltrockengewicht (Verduyn 1991) mit den zuvor ermittelten Aktivitäten der Zellen verglichen. Es stellte sich hierbei insbesondere in Bezug auf die schnell umgesetzten Substrate 3-Cyanopyridin und 4-Cyanopyridin heraus, dass in dem „Ganzellsystem“ offenbar Limitationen bei der Aufnahme der Substrate auftraten. Des Weiteren zeigte der Vergleich der relativen Aktivitäten bei den Umsätzen von Benzotrifluorid und Acrylonitril, dass Acrylonitril im Vergleich zu Benzotrifluorid durch den Zellextrakt mit einer höheren relativen Aktivität umgesetzt wurde, während bei Umsätzen mit Zellen das Gegenteil der Fall war. Es konnte also auch von einer massiven Limitation bei der Aufnahme von Acrylonitril durch die Zellen ausgegangen werden.

Substrat	Aktivität der Ruhezellen		Aktivität der Zellextrakte	
	U/mg Zelltrockengewicht	Relative Aktivität	U/mg Gesamtprotein	Relative Aktivität
Benzotrifluorid	0,115	100	0,48	100
Phenylacetotrifluorid	0,021	18	0,11	22
3-Cyanopyridin	0,14	124	1	208
4-Cyanopyridin	0,27	232	2,46	512
Acrylonitril	0,058	50	0,58	121

Tab. 4: Nitril-hydrolysierende Aktivitäten von Ruhezellen und Rohextrakten von *E. oligosperma* R1. Die Aktivitäten wurden anhand des Abbaus des jeweils eingesetzten Substrats basierend auf den Daten in Abb. 25 berechnet und mit dem eingesetzten Trockengewicht der Zellen bzw. dem eingesetzten Proteingehalt des Zellextrakts in Beziehung gesetzt.

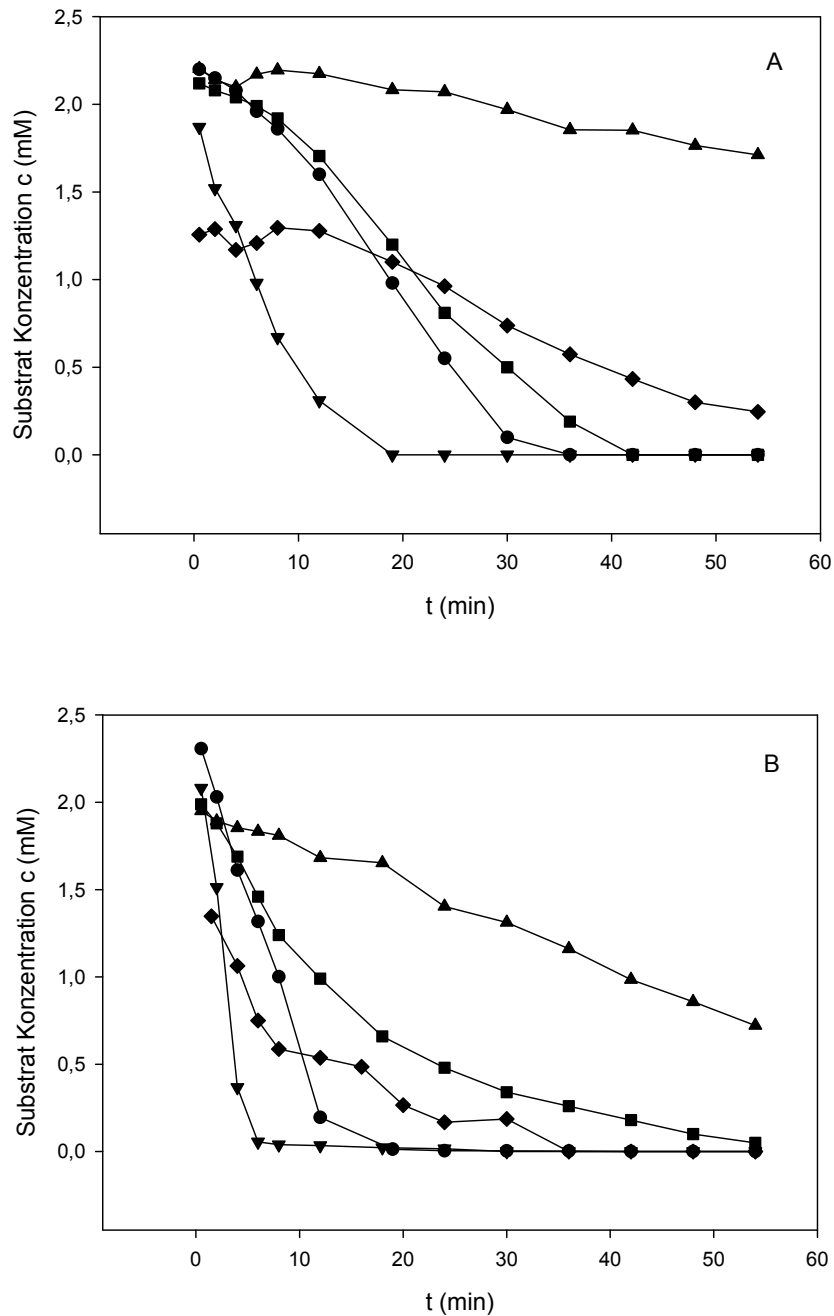


Abb. 25: Umsatz von verschiedenen Nitrilen durch Ruhezellen (A) und Zellextrakte (B) von *E. oligosperma* R1. Die Zellen bzw. Zellextrakte wurden in 100 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 6,5) überführt und in 1,5 ml Eppendorfgefäßen bei 30 °C auf einem Schüttler inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 4-Cyanopyridin (▼), 3-Cyanopyridin (●), Benzonitril (■), Phenylacetonitril (▲) (jeweils 2 mM), bzw. Acrylonitril (◆; 1,5 mM) gestartet. Im Folgenden wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die Reaktionen durch Zugabe von 20 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Im Anschluss wurden die Proben durch Zentrifugation (21000×g, 10 min, 4 °C) geklärt und die Überstände mittels HPLC analysiert.

2.11.2 Substratspezifität der Nitril-hydrolysierenden Aktivität aus Zellextrakten von *E. oligosperma* R1

Die Substratspezifität der durch 2-Cyanopyridin induzierten Nitril-hydrolysierenden Aktivität von *E. oligosperma* R1 wurde durch den Umsatz verschiedener Substrate untersucht. Hierzu wurden Zellextrakte mit verschiedenen ringsubstituierten Benzonitrilen, Phenylacetonitrilen, Acrylonitril, 2-Phenylpropionitril, Mandelonitril und 2-, 3- oder 4-Cyanopyridin inkubiert und der Umsatz der eingesetzten Substrate mittels HPLC analysiert. Es zeigte sich, dass die Zellextrakte alle getesteten Substrate umsetzen (Tab. 5). Der Vergleich der spezifischen Aktivitäten für die Isomere der eingesetzten unterschiedlich ringsubstituierten Nitrile zeigte, dass die *meta*-substituierten Isomere durchweg mit den höchsten spezifischen Aktivitäten umgesetzt wurden. Hierbei fiel auf, dass die *meta*-substituierten Isomere vielfach sogar mit deutlich höheren Aktivitäten metabolisiert wurden als die korrespondierenden unsubstituierten Nitrile. Im Gegensatz hierzu wurden die *ortho*-substituierten Nitrile generell mit den niedrigsten Aktivitäten umgesetzt.

Die höchsten spezifischen Aktivitäten konnten, wie bereits zuvor anhand von Umsätzen mit ganzen Zellen gezeigt worden war, für die Umsätze von 3- und 4-Cyanopyridin ermittelt werden. Eine vergleichsweise hohe spezifische Aktivität konnte auch für den Umsatz des aliphatischen Nitrils Acrylonitril berechnet werden.

Die niedrigsten Aktivitäten wurden bei den Umsätzen von 2-Methylbenzonitril (2-Tolunitril), 2-Phenylpropionitril und Mandelonitril festgestellt. Auf Grund der speziell für Mandelonitril sehr geringen spezifischen Aktivität der Zellextrakte musste so geschlossen werden, dass die Nitril-hydrolysierende Aktivität nicht für Umsätze des Modellsubstrats Mandelonitril durch ganze Zellen in Frage kommen würde.

Der Vergleich der in den Reaktionsmedien entstandenen Produkte mit entsprechenden Säure- und Amid-Standards zeigte, dass der überwiegende Teil der eingesetzten Nitrile ausschließlich zu den korrespondierenden Säuren umgesetzt wurde. Lediglich in den Überständen der Umsätze von 2- und 3-Chlorbenzonitril, 4-Cyanopyridin, Mandelonitril und Acrylonitril konnte die Entstehung geringer Mengen der korrespondierenden Säureamide nachgewiesen werden.

Um einen Abbau von potentiell entstehenden Säureamiden in den Reaktionsmedien ausschließen zu können, wurden die korrespondierenden Amide von 2-, 3- und 4-Cyanopyridin (Picolinsäureamid, Nikotinsäureamid, und Isonikotinsäureamid) exemplarisch mit Zellextrakten inkubiert. Es zeigte sich, dass lediglich Isonikotinsäureamid zu Spuren von Isonikotinsäure umgesetzt wurde. Aufgrund der im Vergleich zur Nitril-hydrolysierenden Aktivität lediglich rudimentären Amidase-Aktivität konnte so geschlossen werden, dass die durch 2-Cyanopyridin induzierte Nitril-hydrolysierende Aktivität auf einer Nitrilase basieren muss.

Substrate	<i>E. oligosperma</i> R1 (Zellextrakte)		<i>P. multicolor</i> CCF 2244 ¹ (Ruhezellen)	<i>F. solani</i> O1 ² (Gereinigtes Enzym)	<i>A. niger</i> K10 ³ (Gereinigtes Enzym)
	Relative Aktivität (%)	Bildung von Amid (% der Gesamtprodukte)	Relative Aktivität (%)	Relative Aktivität (%)	Relative Aktivität (%)
Benzonitril	100	nd	100	100	100
2-Methylbenzonitril	≤5	nd	nd	nd _m	nd
3-Methylbenzonitril	154	nd	11,3	33	5,5
4-Methylbenzonitril	16	nd	nd	16	3,4
2-Hydroxybenzonitril	≤5	nd	nd	nd _m	nd
3-Hydroxybenzonitril	140	nd	0,8	80	5,8
4-Hydroxybenzonitril	10	nd	nd	3	nd
2-Chlorbenzonitril	<10	29	nd	nd _m	nd
3-Chlorbenzonitril	100	<5	14,3	87	41
4-Chlorbenzonitril	49	nd	2,8	40	29,8
2-Cyanopyridin	<10	nd	40	nd _m	14,2
Picolinisäureamid	nd	-	nd	nd _m	-
3-Cyanopyridin	208	nd	15	28	32,4
Nikotinamid	nd	-	18	nd _m	-
4-Cyanopyridin	566	<10	72	130	410,7
Isonikotinamid	<5	-	nd	nd _m	-
Phenylacetoneitril	19	nd	2,3	nd _m	10,8
2-Chlorphenylacetoneitril	11	nd	nd _m	nd _m	nd _m
3-Chlorphenylacetoneitril	35	nd	nd _m	nd _m	nd _m
4-Chlorphenylacetoneitril	22	nd	nd _m	nd _m	nd _m
Mandelonitril	<5	Spuren	nd _m	nd _m	nd _m
2-Phenylpropionitril	<10	nd	nd	nd	1
Acrylonitril	121	<10	nd _m	nd _m	nd _m

Tab. 5: Vergleich der relativen Nitril-hydrolysierenden Aktivitäten von Zellextrakten von *Exophiala oligosperma* R1 mit den Nitril-hydrolysierenden Aktivitäten von Ruhezellen von *Penicillium multicolor* CCF 2244 und den gereinigten Nitrilasen von *F. solani* O1 und *Aspergillus niger* K10. Die Versuche mit Zellextrakten aus *E. oligosperma* R1 wurden in 0,1 M Tris/HCl (pH 7) durchgeführt. Es wurden 0,2 mg/ml Gesamtprotein eingesetzt. Die Reaktionsgemische wurden bei 30 °C und 1400 U/min inkubiert. Die Umsätze wurden durch die Zugabe der jeweiligen Substrate (jeweils 2 mM) gestartet. Den Ansätzen wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen. Die Reaktionen in den Proben wurden durch die Zugabe von 20 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (21000×g, 10 min, 4 °C) und die geklärten Überstände mittels HPLC analysiert. Die Kalkulation der Umsatzraten erfolgte anhand des Abbaus des jeweiligen Substrates. Die relative Aktivität wurde auf den Umsatz von Benzonitril bezogen (100 % = 0,48 U/mg Gesamtprotein).^{1,3} Die Daten für den *Penicillium* und *Aspergillus* Stamm wurden aus Kaplan *et al.* (2006a, c) adaptiert.² Die Daten für den *Fusarium* Stamm wurden Vejvoda *et al.* (2008) entnommen.

nd: nicht detektiert; nd_m: nicht bestimmt

2.11.3 Vergleich der Substratspezifitäten der Nitril-hydrolysierenden Aktivitäten aus *E. oligosperma* R1, *P. multicolor* CCF 2244, *F. solani* O1 und *A. niger* K10

Die mit *E. oligosperma* R1 gewonnenen Ergebnisse zur Substratspezifität wurden für einen Vergleich mit den Nitrilasen aus *P. multicolor* CCF 2244, *F. solani* O1 und *A. niger* K10 herangezogen (Tab. 5). Auf den ersten Blick ähnelten sich die Substratspezifitäten der untersuchten Aktivitäten. So waren die Extrakte von *E. oligosperma* R1 wie auch ganze Zellen von *P. multicolor* CCF 2244 und die gereinigten Enzyme aus *F. solani* O1 und *A. niger* K10 in der Lage Benzonitril und 4-Cyanopyridin mit hohen spezifischen Aktivitäten umzusetzen.

Der Vergleich der relativen Aktivitäten für die untersuchten Substrate (in Bezug auf den Umsatz von Benzonitril) zeigte jedoch, dass die Nitrilase-Aktivität aus *E. oligosperma* R1 alle getesteten Substrate, mit Ausnahme von 2-Cyanopyridin, mit deutlich höheren relativen Aktivitäten umsetzte, als die Nitrilasen aus *P. multicolor* CCF 2244, *F. solani* O1 und *A. niger* K10. Dies wurde besonders deutlich beim Umsatz unterschiedlich substituierter Benzonitrile, welche durch die Nitrilasen aus *P. multicolor* CCF 2244, *F. solani* O1 und *A. niger* K10 oftmals gar nicht oder nur mit deutlich geringeren relativen Aktivitäten (in Bezug auf Benzonitril) umgesetzt wurden. Dagegen hydrolysierte die „Nitrilase“ aus *E. oligosperma* R1 diese Substrate aber (insbesondere die meta-substituierten Substrate) mit höheren relativen Aktivitäten als das unsubstituierte Benzonitril. Die Nitrilase-Aktivität von *E. oligosperma* R1 unterscheidet sich in diesen Punkt somit signifikant von anderen beschriebenen pilzlichen Nitrilasen.

Die Verwertung von Acrylonitril wurde für *P. multicolor* CCF 2244, *F. solani* O1 und *A. niger* K10 nicht beschrieben, so dass ein Vergleich der Aktivitäten nicht möglich war. Die Verwertung von Acrylonitril und einiger weiterer aliphatischer Nitrile wurde jedoch bereits von Goldlust & Bohak (1989) für die Nitrilase aus *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* nachgewiesen. Im Vergleich zum bevorzugten Substrat Benzonitril, wurden für die Nitrilase aus *F. oxysporum* f. sp. *melonis* jedoch deutlich geringere Aktivitäten für Acrylonitril und noch weitaus geringere für diverse andere aliphatische Nitrile festgestellt. Dies stand im Gegensatz zur Nitrilase-Aktivität von *E. oligosperma* R1, die im Vergleich zu Benzonitril, Acrylonitril offensichtlich sogar bevorzugt umsetzte. Dies deutet daraufhin, dass das Enzym aus *E. oligosperma* R1 in Bezug auf den Umsatz aliphatischer Nitrile gegenüber anderen pilzlichen Nitrilasen eine besondere Position einnehmen könnte.

2.12 Umsatz von 2-Hydroxy-3-butennitril durch ganze Zellen von *E. oligosperma* R1 unter sauren Bedingungen

Die vorangegangenen Versuche hatten bereits gezeigt, dass ganze Zellen von *E. oligosperma* R1 Nitrile bei pH-Werten $\geq 1,5$ hydrolysierten. Die Zellen konnten somit potentiell für die Hydrolyse von instabilen α -Hydroxynitrilen (siehe Abschnitt 1.4.2) unter sauren Bedingungen eingesetzt werden. Unglücklicherweise zeigten die zuvor beschriebenen Umsatzversuche, dass Mandelonitril durch die Nitrilase aus *E. oligosperma* R1 lediglich mit geringen spezifischen Aktivitäten umgesetzt wurde. Im Gegensatz dazu wurde überraschenderweise festgestellt, dass die Nitril-hydrolysierende Aktivität Acrylonitril mit relativ hohen spezifischen Aktivitäten umsetzte. Dies eröffnete die Möglichkeit, Zellen von *E. oligosperma* R1 für den Umsatz instabiler aliphatischer α -Hydroxynitrile einzusetzen. Daher wurde im Folgenden der Umsatz von 2-Hydroxy-3-butennitril durch ganze Zellen von *E. oligosperma* R1 untersucht.

Das Substrat, sowie die für die chromatographische Analyse des Umsatzes notwendigen Standards, mussten hierzu eigens synthetisiert werden, da sie kommerziell nicht erhältlich waren. Die Synthese der Substrate und Standards wurde dankenswerter Weise durch Herrn Andrzej Chmura vom „Laboratory of Biocatalysis and Organic Chemistry“ der „University of Technology“ in Delft (Die Niederlande) durchgeführt.

Für den Umsatz wurden 10 mM des Substrats mit ganzen Zellen von *E. oligosperma* R1 in Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) inkubiert. Zusätzlich wurde ein Kontrollexperiment ohne Zellen mitgeführt, um die Stabilität von 2-Hydroxy-3-butennitril bei pH 4 zu untersuchen.

In Gegenwart von Zellen von *E. oligosperma* R1 konnte im beobachteten Reaktionszeitraum der Abbau von ca. 50 % des eingesetzten Substrats festgestellt werden (Abb. 26). Im Gegensatz hierzu konnte im Kontrollexperiment ohne Zellen keine signifikante Abnahme der Konzentration von 2-Hydroxy-3-butennitril nachgewiesen werden. In keinem der Ansätze wurde die Entstehung signifikanter Mengen an Acrylaldehyd als Produkt des möglichen chemischen Zerfalls von 2-Hydroxy-3-butennitril beobachtet.

In dem Versuch mit Zellen konnte die Entstehung eines Produkts nachgewiesen werden, welches anhand eines authentischen Standards als 2-Hydroxy-3-butensäure identifiziert wurde. Die Entstehung von 2-Hydroxy-3-butensäureamid wurde nicht beobachtet (Rustler *et al.* 2008b).

Anhand der Experimente konnte somit gezeigt werden, dass 2-Hydroxy-3-butennitril bei pH 4 ausreichend stabil war und der chemische Zerfall des Substrats in Acrylaldehyd und HCN erfolgreich unterdrückt wurde. Ferner waren Zellen von *E. oligosperma* R1 in der Lage, 2-Hydroxy-3-butennitril zu 2-Hydroxy-3-butensäure umzusetzen. Dies zeigte, dass *E. oligosperma* R1 für den Umsatz von aliphatischen α -Hydroxynitrilen unter sauren Bedingungen und somit für die Synthese von aliphatischen α -Hydroxycarbonsäuren geeignet ist.

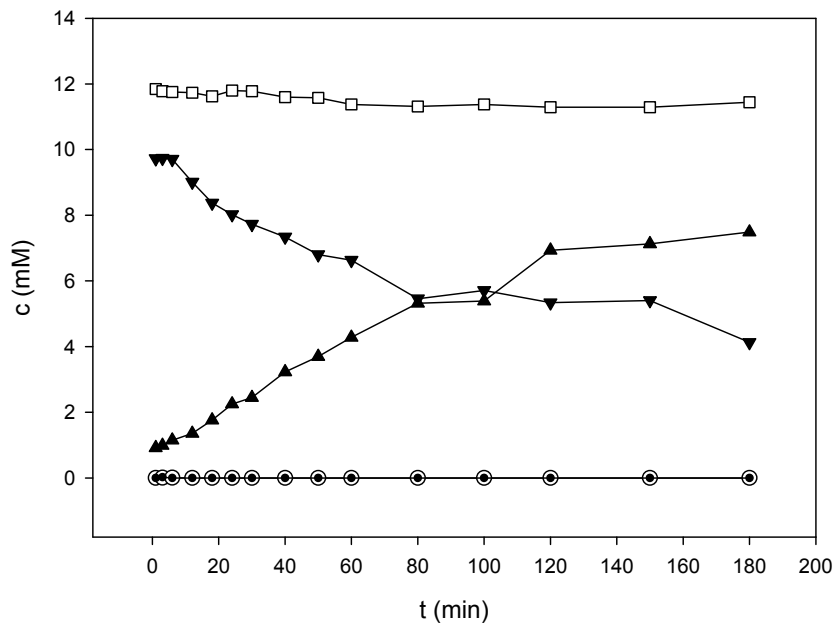


Abb. 26: Umsatz von 2-Hydroxy-3-butennitril durch Ruhezellen von *E. oligosperma* R1 bei pH 4. Die durch 2-Cyanopyridin induzierten Zellen von *E. oligosperma* wurden in 100 mM Na-Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4) zu einer OD_{600nm} von 100 resuspendiert. Zur Kontrolle wurde ein zweiter Ansatz ohne Zellen mitgeführt. Die Reaktionsgemische wurden bei 30 °C und 1400 U/min inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von jeweils 10 mM 2-Hydroxy-3-butennitril gestartet. Anschließend wurden den Ansätzen in regelmäßigen Abständen Proben entnommen. Die Reaktionen in den Proben wurden durch die sofortige Zugabe von 10 % (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Im Anschluss daran wurden die Zellen durch Zentrifugation (21000×g, 10 min, 4 °C) abgetrennt und die zellfreien Überstände mittels HPLC analysiert. Das Diagramm zeigt die ermittelten Konzentrationen von 2-Hydroxy-3-butennitril (▼), Acrolein (●) und 2-Hydroxy-3-butensäure (▲) im Ansatz mit Zellen von *E. oligosperma* R1, sowie die Konzentrationen von 2-Hydroxy-3-butennitril (□) und Acrylaldehyd (○) im Kontrollexperiment ohne Zellen.

2.13 Vergleich der möglichen Strategien zur Synthese optisch aktiver α -Hydroxycarbonsäuren und α -Hydroxycarbonsäureamide mittels „bienzymatischer“ Katalysatoren

2.13.1 (*S*)-Oxynitrilase katalysierte Synthese von α -Hydroxynitrilen in organischen Reaktionsmedien

Die Verwendung organischer Reaktionsmedien kann die Racemisierung von α -Hydroxynitrilen vollständig unterdrücken. Aus diesem Grund werden organische Reaktionsmedien oftmals für die enantioselektive Synthese von α -Hydroxynitrilen in Oxynitrilase katalysierten Reaktionen genutzt (Effenberger 1994, Effenberger *et al.* 2000, Costes *et al.* 1999, Paravidino *et al.* 2010). Hierbei werden häufig Etherverbindungen, wie z. B. Diisopropylether oder Dibutylether, als Lösungsmittel eingesetzt, da sich die Etherfunktion offenbar positiv auf die Oxynitrilase-Aktivität und den Enantiomerenüberschuss der synthetisierten Cyanhydrine auswirkt (Effenberger 1994, Costes *et al.* 1999).

Kinetische Untersuchungen der Synthese von (*S*)-2-Hydroxy-4-phenylbutannitril [ausgehend von 3-Phenylpropionaldehyd (200 mM) und HCN (300 mM)] durch eine an Celite immobilisierte (*S*)-Oxynitrilase aus *Hevea brasiliensis* in unterschiedlichen organischen Medien zeigten, dass sowohl der Wasser- bzw. Puffergehalt der organischen Reaktionsmedien als auch die Hydrophobizität der verwendeten organischen Komponente(n) die Aktivität der eingesetzten (*S*)-Oxynitrilase signifikant (und in geringeren Maßen den Enantiomerenüberschuss von (*S*)-2-Hydroxy-4-phenylbutannitril) beeinflussten (Costes *et al.* 1999). In den Experimenten wurde die höchste Oxynitrilase-Aktivität in Dibutylether (log P=2,9) mit einem Wassergehalt von 1-1,5 % festgestellt. Niedrigere oder höhere Wasseranteile führten hingegen zu deutlich geringeren Aktivitäten. Im Falle von Wasseranteilen <1 % wurde dies auf die unzureichende Hydratation der Enzyme zurückgeführt. Die Untersuchung der Modellreaktion in Reaktionsmedien mit optimalem Wassergehalt und organischen Komponenten unterschiedlicher Hydrophobizität zeigte zudem, dass organische Lösungsmittel mit hoher Hydrophobizität höhere (*S*)-Oxynitrilase-Aktivitäten ermöglichten. Der Einsatz besonders hydrophober Lösungsmittel wurde hierbei allerdings durch die eingeschränkte Löslichkeit von HCN in organischen Lösungsmitteln mit log P-Werten >2,9 limitiert. Diese Untersuchungen zeigten also, dass möglichst hydrophobe Lösungsmittel mit geringem Wassergehalt in dem Modellsystem die höchsten (*S*)-Oxynitrilase-Aktivitäten ermöglichten.

Die durch Costes *et al.* (1999) gewonnenen Erkenntnisse konnten in einer späteren Arbeit durch Paravidino *et al.* (2010) prinzipiell auch für die Synthese von (*S*)-Mandelonitril (ausgehend von Benzaldehyd und HCN) durch die in CLEAs immobilisierte (*S*)-Oxynitrilase von *M. esculenta* bestätigt werden. Hierbei wurden die Reaktionen in unterschiedlichen organischen

Reaktionsmedien mit unterschiedlichen Wassergehalten durchgeführt. Die höchsten Reaktionsraten wurden in Octan ($\log P=5,15$) mit einer initialen Gesamtwasserkonzentration von ~ 70 ppm festgestellt. (*S*)-Oxynitrilasen katalysieren also offenbar die enantioselektive Synthese von α -Hydroxynitrilen optimal in hydrophoben organischen Lösungsmitteln mit geringen Wassergehalten.

2.13.2 Nitrilase katalysierte Hydrolyse von Nitrilen in Gegenwart organischer Lösungsmittel

Im Gegensatz zu (*S*)-Oxynitrilasen weisen Nitrilasen in organischen Medien im Vergleich zu wässrigen Medien oftmals vielfach niedrigere Aktivitäten auf oder werden sogar inaktiviert.

So untersuchten Layh & Willetts (1998) den Umsatz von Phenylacetonitril durch eine Nitrilase aus *Pseudomonas* sp. DSM11387 in wassergesättigten primären Alkoholen mit unterschiedlichen $\log P$ -Werten. Die Nitrilase wurde hierbei in Form von lyophilisierten Rohextrakten von *Pseudomonas* sp. DSM11387 eingesetzt. Im Vergleich zu einem Umsatz in einem rein wässrigem Medium (Tris/HCl-Puffer, pH 7,4) wurden in den Experimenten mit einer maximalen relativen Aktivität von 58 % in 1-Hexanol ($\log P=1,8$) und einer minimalen relativen Aktivität von 25 % in 1-Undecanol ($\log P=4,5$) geringere Nitrilase-Aktivitäten festgestellt. Die geringeren Aktivitäten in Lösungsmitteln mit hoher Hydrophobizität wurden in diesen Experimenten auf den mit zunehmender Hydrophobizität der Reaktionsmedien abnehmenden Wassergehalt in den Alkoholen zurückgeführt.

In weiteren Experimenten wurde der Umsatz von Phenylacetonitril in wassergesättigtem 1-Octanol ($\log P=2,9$) und in einem biphasischen Medium bestehend aus 50 % (v/v) 1-Octanol und 50 % (v/v) Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) untersucht. Hierbei wurden im Vergleich zu Umsätzen in reinem Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) relative Aktivitäten von 44 % (in wassergesättigtem 1-Octanol) bzw. 47 % [in 50 % (v/v) 1-Octanol plus 50 % (v/v) Tris/HCl-Puffer (pH 7,4)] festgestellt (Layh & Willetts 1998). Dies zeigte, dass die niedrigeren Enzym-Aktivitäten in Gegenwart organischer Lösungsmittel nicht generell auf einen zu niedrigen Wassergehalt zurückgeführt werden konnten. Weiterführende Experimente in biphasischen Reaktionsmedien mit organischen Komponenten unterschiedlicher Hydrophobizität ($2,9 \leq \log P \leq 8,8$) zeigten, dass die Aktivität der Nitrilase ähnlich wie bei Umsätzen durch (*S*)-Oxynitrilasen von der Hydrophobizität der organischen Komponenten beeinflusst wurde. So wurden in den untersuchten biphasischen Reaktionsmedien wiederum die höchsten relativen Reaktionsraten [66 % bzw. 97 % im Vergleich zu einem Umsatz in Tris/HCl-Puffer (pH 7,4)] bei Verwendung organischer Komponenten mit hohen $\log P$ -Werten [50 % (v/v) Octan ($\log P=4,5$) bzw. 50 % (v/v) Hexadecan ($\log P=8,8$)] erreicht (Layh & Willetts, 1998).

Eine ähnliche Korrelation wurde von Heinemann *et al.* (2003) bei Umsätzen von Benzonnitril durch eine mittels His-Tag aufgereinigte Nitrilase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 in Reaktionsmedien mit unterschiedlichen Anteilen verschiedener organischer Lösungsmittel festgestellt. Die Experimente zeigten, dass die untersuchte Nitrilase mit steigender Hydrophobizität der organischen Komponenten tendenziell höhere Lösungsmittelanteile tolerierte (mit Ausnahme von Octan-haltigen Medien). So war die untersuchte Nitrilase auch noch in Reaktionsmedien mit 80 % (v/v) n-Heptan oder n-Hexadecan aktiv. In diesen Medien konnten im Vergleich zu Umsätzen in reinem Phosphatpuffer (pH 7) noch relative Reaktionsraten von etwa 30 % (n-Heptan) bzw. 20 % (n-Hexadecan) festgestellt werden. Obwohl in allen Umsätzen in Gegenwart organischer Lösungsmittel (abgesehen von wenigen Ausnahmen bei der Verwendung geringer Anteile überwiegend aprotischer organischer Lösungsmittel mit sehr niedrigen log P-Werten) im Vergleich zu Umsätzen in reinem Phosphatpuffer (pH 7) geringere Nitrilase-Aktivitäten festgestellt wurden, zeigten die Ergebnisse doch, dass Umsätze von Nitrilen durch Nitrilasen prinzipiell auch in Gegenwart relativ hoher Anteile von organischen Lösungsmitteln möglich sind.

2.13.3 Möglichkeiten zur enzymatischen Synthese von α -Hydroxycarbonsäuren ausgehend von Aldehyden und HCN in wassergesättigten organischen Reaktionsmedien oder biphasischen Reaktionsmedien

Die Untersuchungen von Layh & Willets (1998) zeigten, dass die untersuchte Nitrilase aus *Pseudomonas* sp. DSM11387 in wassergesättigtem 1-Octanol (log P=2,9) aktiv war. Zudem stellten Costes *et al.* (1999) fest, dass die untersuchte Oxynitrilase aus *Hevea brasiliensis* in einem organischen Medium mit gleicher Hydrophobizität [Dibutylether (log P=2,9)] und geringem Wassergehalt die Synthese von (*S*)-2-Hydroxy-4-phenylbutannitril ermöglichte. Es kann somit die Vermutung aufgestellt werden, dass die beiden Enzyme *in-vitro* möglicherweise die Synthese von α -Hydroxycarbonsäuren ausgehend von Aldehyden und HCN in einem organischen Reaktionsmedium bestehend aus wassergesättigtem Dibutylether oder 1-Octanol katalysieren könnten.

Die aufgeführten Untersuchungen zeigten weiterhin, dass die Oxynitrilase aus *M. esculenta* und die Nitrilase aus *Pseudomonas* sp. DSM11387 in Gegenwart von ≥ 50 % Octan aktiv sind. Ein System aus beiden Enzymen könnte also *in-vitro* eventuell die Synthese von α -Hydroxycarbonsäuren ausgehend von Aldehyden und HCN in einem biphasischen Medium mit Octan als organischer Komponente katalysieren.

Bislang sind jedoch keine Untersuchungen derartiger Systeme in wassergesättigten Lösungsmitteln, wie z. B. 1-Octanol oder Dibutylether, oder in einem biphasischen Medium mit

einer derart hydrophoben organischen Komponente wie Octan bekannt.

2.13.4 Synthese von (*S*)-Mandelsäure ausgehend von Benzaldehyd und HCN durch ein zellfreies „bienzymatisches System“ in einem biphasischen Medium

Die ersten Versuche zur Kopplung von Oxynitrilasen und Nitrilasen in einem *in-vitro* System wurden von Mateo *et al.* (2006) unternommen. Hierbei wurde von einer kooperierenden Gruppe am Institut für Biokatalyse und Organische Chemie der Technischen Universität in Delft die enzymatische Synthese von (*S*)-Mandelsäure ausgehend von Benzaldehyd und HCN in einem biphasischen Medium basierend auf Diisopropylether und einer Pufferkomponente untersucht. Zum Einsatz kam hierbei das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Enzymsystem bestehend aus der (*S*)-Oxynitrilase aus *M. esculenta* und der rekombinanten Arylacetonitrilase von *P. fluorescens* EBC191. Für die Experimente wurde eine kommerziell erhältliche Präparation der (*S*)-Oxynitrilase aus *M. esculenta* und Rohextrakte von *E. coli* JM109(pIK9) eingesetzt. Zur Stabilisierung wurden die Enzyme gemeinsam in Combi-CLEAs immobilisiert und anschließend für die Umsätze in biphasischen Medien eingesetzt (Mateo *et al.* 2006). Die immobilisierten Enzyme waren in einem biphasischen Reaktionsmedium bestehend aus 90 % (v/v) Diisopropylether ($\log P=1,9$) und 10 % (v/v) Citrat-Puffer (pH 5,5) über Stunden aktiv und setzten Benzaldehyd und HCN mit Enantiomerenüberschüssen von bis zu 98 % zu (*S*)-Mandelsäure und (*S*)-Mandelamid um (Mateo *et al.* 2006). Auf Basis der in Mateo *et al.* (2006) und Rustler *et al.* (2007) dargestellten Daten kann für die Entstehung von (*S*)-Mandelsäure eine spezifische Aktivität von etwa 0,1 U/mg Protein kalkuliert werden.

2.13.5 Entwicklung eines säuretoleranten „bienzymatischen Ganzzellkatalysators“ zur Synthese von (*S*)-Mandelsäure in sauren wässrigen Medien

Als Alternative zu den Umsätzen in biphasischen Medien wurde in der vorliegenden Arbeit die Reaktionsführung in sauren wässrigen Systemen untersucht. Es wurde gezeigt, dass das Modellsubstrat Mandelonitril bei pH-Werten ≤ 5 weitestgehend chemisch stabil vorlag und die chemischen Reaktionen, die zu einer Racemisierung von enantiomerenreinem Mandelonitril führen könnten, unterdrückt wurden. Anhand der durchgeführten Umsatzexperimente konnte weiterhin gezeigt werden, dass mit der in *E. coli* JM109(pIK9) heterolog exprimierten Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 ein Biokatalysator gefunden wurde, der die enantiokonservative Umsetzung von Mandelonitril bei pH-Werten ≥ 4 prinzipiell katalysieren kann. Allerdings konnten aufgrund der schnell fortschreitenden Inaktivierung des Enzyms bei Umsätzen durch Rohextrakte von *E. coli* JM109(pIK9) bei einem pH-Wert von 4 lediglich nur rudimentäre

Aktivitäten festgestellt werden. Durch den Einsatz von Ruhezellen konnten die Umsatzraten jedoch auf 3,6 U/mg Protein gesteigert werden. Dies entsprach etwa 34 % der maximalen Aktivität, die bei pH 5 bestimmt worden war. Die anschließende Übertragung des für die Arylacetonitrilase codierenden Gens in *P. pastoris* führte zu einem rekombinanten System, das bei Einsatz ganzer Zellen den Umsatz von Mandelonitril bei pH-Werten ≥ 3 ermöglichte.

Das Einfügen der für die (*S*)-Oxynitrilase aus *M. esculenta* und die Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 codierenden Gene in *P. pastoris* führte letztlich zu einem „bienzymatischen Ganzzellkatalysator“, *P. pastoris* pJOE5557.2, der die enantioselektive Synthese von (*S*)-Mandelsäure und (*S*)-Mandelamid bei pH 3,8 ausgehend von Benzaldehyd und Cyanid ermöglichte. Die Biokatalysatoren waren dabei über die gesamte Versuchsdauer von 90 min aktiv. In dem Experiment wurden Enantiomerenüberschüsse von etwa 80 % für (*S*)-Mandelsäure bzw. (*S*)-Mandelamid erreicht. Für die Aktivität der (*S*)-Oxynitrilase und Nitrilase konnten in diesem Experiment anhand des Abbaus von Benzaldehyd bzw. der Entstehung von (*S*)-Mandelsäure Aktivitäten von 0,006 bzw. 0,01 U/mg Zelltrockengewicht kalkuliert werden. Diese geringen katalytischen Aktivitäten sind vermutlich auf eine schwache Expression der relevanten Gene in *P. pastoris* pJOE5557.2 zurückzuführen. Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass auch bei Umsätzen von Mandelonitril bei pH 4-7 lediglich Umsatzraten $\leq 0,06$ U/mg Zelltrockengewicht (pH 4) bzw. $\leq 0,11$ U/mg Zelltrockengewicht (pH 7) erreicht wurden. Angesichts der im Vergleich zur Nitrilase geringeren Aktivität der Oxynitrilase, ist im Fall des „bienzymatischen Ganzzellkatalysators“ jedoch auch nicht auszuschließen, dass die Nitrilase-Aktivität auch durch Substratmangel limitiert werden könnte.

2.13.6 Vergleich der enantioselektiven Synthese von (*S*)-Mandelsäure durch das zellfreie System und das Ganzzellsystem

In dem *Pichia*-Ganzzellsystem kann für die Nitrilase anhand der Entstehung von Mandelsäure eine Reaktionsrate von 0,02 U/mg Protein kalkuliert werden [ausgehend von einem durchschnittlichen Gesamtproteinanteil von etwa 50 % (*w/w*) am Zelltrockengewicht in Hefezellen (Verduyn 1991)]. Der Vergleich dieser Umsatzrate mit der Aktivität der CLEAs in dem biphasischen Medium ($\sim 0,1$ U/mg Protein; siehe Abschnitt 2.13.4) zeigt, dass das *Pichia*-System bei pH 3,8 eine etwa fünffach geringere Nitrilase-Aktivität aufwies. Der Umsatz durch das zellfreie CLEA-System in dem biphasischen Reaktionsmedium ist daher derzeit hinsichtlich der erreichten Reaktionsraten dem Umsatz durch das *Pichia*-Ganzzellsystem bei pH 3,8 überlegen. Dies ist vermutlich in erster Linie auf die geringere Expression der relevanten Enzyme in *P. pastoris* im Vergleich zu *E. coli* JM109(pIK9) zurückzuführen. So wurde anhand der Umsätze von Mandelonitril durch ganze Zellen von *P. pastoris* pJOE5537.4 und *E. coli*

JM109(pIK9) festgestellt, dass die Nitrilase-Aktivität der *Pichia*-Zellen bei pH 5-7 deutlich weniger als 10 % der Nitrilase-Aktivität der entsprechenden rekombinanten *E. coli* Zellen entsprach. Daraus kann geschlossen werden, dass in den CLEAs bei gleicher Proteinmenge vermutlich ein Vielfaches an Aktivität vorhanden war. Nach einer Optimierung der Expression der Enzyme in *P. pastoris* (vgl. Abschnitt 2.5), könnte das vorgestellte *Pichia*-Ganzzellsystem hinsichtlich der Reaktionsraten daher eventuell konkurrenzfähig werden.

Ein weiterer Faktor der die Umsatzraten beeinflusst haben könnte, ist in der bei pH 3,8 geringeren Aktivität der Nitrilase (im Vergleich zu Umsätzen bei pH 5) zu sehen (Abb. 13).

Der Vergleich der Enantiomerenüberschüsse von (*S*)-Mandelsäure und (*S*)-Mandelamid in den Umsätzen durch das „bienzymatische“ zellfreie System (*ee* ~98 %) mit den Enantiomerenüberschüssen, die durch das Ganzzellsystem erreicht wurden (*ee* ~80 %), zeigt, dass durch das zellfreie System höhere Enantiomerenüberschüsse erzielt werden konnten. Dies kann vermutlich auf die bereits angesprochene geringe (*S*)-Oxynitrilase-Aktivität des *Pichia*-Ganzzellsystems zurückgeführt werden. Die chemische Hydrocyanierung von Benzaldehyd wurde bei pH 3,8 wahrscheinlich nicht 100%ig unterdrückt, so dass durch die chemischen Reaktionen auch geringe Mengen (*R,S*)-Mandelonitril entstanden, welche durch die Nitrilase umgesetzt wurden. Durch den Einsatz entsprechend höherer (*S*)-Oxynitrilase-Aktivitäten (vgl. Abschnitt 2.5) könnten die Auswirkungen der verbleibenden chemischen Hydrocyanierung von Benzaldehyd in dem wässrigen Medium bei pH 3,8 möglicherweise vollständig unterdrückt werden. Ein ähnliches Konzept wurde auch durch Mateo *et al.* (2006) verfolgt, indem für die Herstellung der Combi-CLEAs (*S*)-Oxynitrilase und Nitrilase-Aktivitäten im Verhältnis von etwa 35:1 eingesetzt wurden. Chmura (2010) zeigte durch Aktivitäts-Vergleiche zwischen der freien (*S*)-Oxynitrilase bzw. Arylacetonitrilase und den in Combi-CLEAs immobilisierten Enzymen, dass in den Combi-CLEAs 56% [(*S*)-Oxynitrilase] bzw. 90% (Arylacetonitrilase) der Aktivitäten der freien Enzyme wiedergefunden werden konnten. Unter Berücksichtigung des zur Herstellung der Combi-CLEAs eingesetzten Verhältnisses von (*S*)-Oxynitrilase- und Arylacetonitrilase-Aktivitäten, kann somit davon ausgegangen werden, dass in dem Umsatz durch das zellfreie System im Vergleich zur Nitrilase letztendlich eine rund 22-fach höhere (*S*)-Oxynitrilase-Aktivität eingesetzt wurde. Hierdurch wurde offenbar erfolgreich der verbleibenden chemischen Hydrocyanierung von Benzaldehyd in der wässrigen Phase des biphasischen Reaktionsgemisches entgegen gewirkt.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass das unter sauren Bedingungen aktive „bienzymatische Ganzzellsystem“ zur enantioselektiven Synthese von (*S*)-Mandelsäure hinsichtlich der erreichten Reaktionsraten und der erzielten Enantiomerenüberschüsse derzeit dem durch Mateo *et al.* (2006) vorgestellten zellfreien „bienzymatischen System“ zur

enantioselektiven Synthese von (*S*)-Mandelsäure in einem biphasischen Reaktionsmedium unterlegen ist. Dies ist jedoch in erster Linie auf die schwache Expression der relevanten Enzyme in *Pichia* zurückzuführen. Durch eine Optimierung der Expression der Enzyme und eine gezielte Veränderung des Verhältnisses zwischen (*S*)-Oxynitrilase- und Nitrilase-Aktivität der Zellen könnten sowohl die Reaktionsraten als auch die Enantiomerenüberschüsse der Produkte gesteigert werden (vgl. Abschnitt 2.5). Durch derartige Optimierungen könnte das vorgestellte „bienzymatische Ganzzellsystem“ zukünftig für synthetische Anwendungen in Frage kommen und stellt somit eine vielversprechende Alternative zur Reaktionsführung in biphasischen Reaktionsmedien dar.

2.13.7 Möglichkeiten zur Erweiterung des Konzepts der säuretoleranten „bienzymatischen Katalysatoren“

Ein Vorteil der vorgestellten „bienzymatischen Katalysatoren“ ist darin zu sehen, dass diese durch den Austausch der (*S*)-Oxynitrilase durch eine (*R*)-Oxynitrilase potentiell auch für eine (*R*)-enantioselektive Synthese eingesetzt werden könnten. Eine weitere Anwendung ist in der Synthese enantiomerenreiner α -Hydroxycarbonsäureamide zu sehen, die durch den Austausch der Nitrilase gegen eine Nitril-Hydratase ermöglicht werden könnte.

Auch im Falle der Kopplung von Oxynitrilasen mit Nitril-Hydratase ist prinzipiell eine Verfahrensführung in (bzw. in Gegenwart von) organischen Lösungsmitteln oder in sauren Medien vorstellbar. Hierbei ist dann zu berücksichtigen, dass auch die Biotransformation von Nitrilen durch Nitril-Hydratase durch die Gegenwart organischer Lösungsmittel beeinflusst wird. So untersuchten Layh & Willetts (1998) den Umsatz von Phenylacetonitril durch eine Nitril-Hydratase aus *Rhodococcus* sp. DSM11397 (eingesetzt in Form lyophilisierter Rohextrakte) in wassergesättigten primären Alkoholen mit unterschiedlichen log P-Werten und stellten fest, dass das Enzym unabhängig von der Hydrophobizität der organischen Komponenten rasch inaktiviert wurde. Im Vergleich zu einem Umsatz in Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) konnten in den Umsätzen lediglich Restaktivitäten $\leq 5\%$ festgestellt werden. In weiterführenden Experimenten in biphasischen Medien konnte jedoch festgestellt werden, dass die untersuchte Nitril-Hydratase die Umsetzung von Phenylacetonitril in Medien mit bis zu 75 % (v/v) Octan (log P=4,5) bzw. 95 % (v/v) Hexadecan (log P=8,8) katalysieren konnte. Die Aktivitäten entsprachen hierbei in etwa der Aktivität in Tris/HCl-Puffersystemen (pH 7,4). Dies deutete darauf hin, dass Nitril-Hydratase im Vergleich zu Nitrilase (vgl. Abschnitt 2.13.2) deutlich höhere Lösungsmittelanteile tolerieren und somit in Kombination mit einer (selektiven) Oxynitrilase möglicherweise die *in-vitro* Synthese von enantiomerenreinen α -Hydroxycarbonsäureamiden in organischen Medien mit geringem Wassergehalt katalysieren

könnten.

Die Kopplung einer (*S*)-Oxynitrilase mit einer Nitril-Hydratase wurde kürzlich durch eine kooperierende Gruppe in Delft untersucht. Hierbei wurde versucht, die enantioselektive Synthese von (*S*)- α -Hydroxycarbonsäureamiden durch ein zellfreies System bestehend aus der (*S*)-Oxynitrilase von *M. esculenta* und einer Nitril-Hydratase aus *Nitriliruptor alkaliphilus* zu ermöglichen (van Pelt *et al.* 2009). Als Modellreaktion wurde unter anderem die Biotransformation von Acrylaldehyd und HCN zu (*S*)-2-Hydroxy-3-butensäureamid angestrebt. Stabilitätsversuche mit der in CLEAs immobilisierten Nitril-Hydratase aus *N. alkaliphilus* in Reaktionsmedien, die aus Diisopropylether und einer Pufferkomponente in unterschiedlichen Verhältnissen bestanden, zeigten, dass die organische Komponente zu einer raschen Inaktivierung der Nitril-Hydratase führte. Daher wurden im weiteren Verlauf der Untersuchung die Stabilität des immobilisierten Enzyms und die Biotransformation in sauren wässrigen Medien untersucht. Es zeigte sich auch hier, dass die Aktivität der eingesetzten Nitril-Hydratase mit zunehmender Ansäuerung der Reaktionsmedien immer weiter abnahm. Nichtsdestotrotz konnte bei pH 4,5 die Synthese verschiedener aliphatischer (*S*)- α -Hydroxycarbonsäureamide mit hohen Enantiomerenüberschüssen erreicht werden. Allerdings stellte auch bei diesen Untersuchungen die Instabilität der eingesetzten Nitril-Hydratase unter sauren Bedingungen ein Problem dar. Diesem könnte zukünftig durch die Konstruktion eines rekombinanten säuretoleranten „bienzymatischen Ganzzellbiokatalysators“, wie er in der vorliegenden Untersuchung konstruiert und eingesetzt wurde, begegnet werden.

Das Gesamtkonzept der enzymatischen Synthese von enantiomerenreinen (*S*)- α -Hydroxycarbonsäuren bzw. (*S*)- α -Hydroxycarbonsäureamiden bzw. deren (*R*)-Enantiomere in sauren wässrigen Reaktionsmedien mit Hilfe eines (säuretoleranten) „bienzymatischen Ganzzellkatalysators“ stellt somit aufgrund der Empfindlichkeit der derzeit verfügbaren Nitrilasen und Nitril-Hydratasen gegenüber organischen Lösungsmitteln und der *in-vitro* beobachteten Empfindlichkeit der zellfreien Systeme gegenüber sauren pH-Werten, eine interessante Alternative dar.

2.13.8 Alternative Ansätze zur Biotransformation von Nitrilen in sauren wässrigen Medien

Eine Alternative zum vorgestellten Ganzzellsystem würde potentiell auch in der Verwendung säuretoleranterer Nitrilasen bestehen, die *in-vitro* auch bei pH-Werten von pH 4-5 aktiv und stabil sein müssten. Derzeit sind solche Enzyme allerdings nicht bekannt. So ist aus den, von Bannerjee *et al.* (2002) zusammengestellten, Daten ersichtlich, dass die meisten bekannten Nitrilasen ein pH-Optimum im neutralen bis leicht alkalischen Bereich aufweisen. Die in der

vorliegenden Arbeit eingesetzte Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 scheint im Vergleich zu den meisten bekannten Nitrilasen aufgrund ihres breiten pH-Optimums (pH 5,5-8,5; Kiziak *et al.* 2005) daher außergewöhnlich säuretolerant zu sein.

Im Verlauf der Untersuchungen mit Rohextrakten von *E. oligosperma* R1 wurde festgestellt, dass auch die verantwortliche Aktivität aus *E. oligosperma* R1 bei pH-Werten ≤ 5 inaktiviert wurde. Allerdings waren Ruhezellen dieses Stammes in der Lage, Nitrile unter extrem sauren Bedingungen (pH $\geq 1,5$) zu hydrolysieren. Unglücklicherweise wurde das untersuchte Modellsubstrat Mandelonitril durch die Nitril-hydrolysierende Aktivität nur mit verschwindend geringen Reaktionsraten umgesetzt, so dass eine Anwendung zur präparativen Synthese nicht möglich war. Anhand der Biotransformation von 2-Hydroxy-3-butennitril konnte jedoch weiterführend gezeigt werden, dass der acidotolerante Mikroorganismus potentiell für die Hydrolyse von aliphatischen α -Hydroxynitrilen unter sauren Bedingungen eingesetzt werden könnte.

Anreicherungen aus sauren Biotopen können somit prinzipiell zu Biokatalysatoren führen, die Nitrile unter sauren Bedingungen hydrolysieren können. Daher könnte es zielführend sein, Neuanreicherungen aus sauren Biotopen mit sterisch gehemmten Nitrilen, wie z. B. Phenylpropionitril, als einziger Stickstoffquelle durchzuführen.

Aufgrund der Tatsache, dass Pilze in vielen Fällen säuretoleranter sind als Bakterien (Wartenberg 1989), besteht eine weitere Möglichkeit um geeignete säuretolerante Biokatalysatoren zu erhalten, im Screening von Genomsequenzen von Pilzen auf Nitrilase Sequenzen („Genome-Mining“). Erste Erfolge in Bezug auf Arylacetonitrilasen wurden hier kürzlich durch Kaplan *et al.* (2010) erzielt. Hierbei wurden durch Sequenzvergleiche Nitrilasegene in den Genom-Sequenzen von *Gibberella moniliformis*, *Aspergillus niger* CBS 513.88 und *Neurospora crassa* OR74A gefunden. Die betreffenden Gene wurden daher synthetisiert und anschließend in *E. coli* heterolog exprimiert. Die rekombinanten Nitrilasen konnten aufgrund der bevorzugt umgesetzten Substrate als aromatische Nitrilase (aus *Gibberella moniliformis*) bzw. Arylacetonitrilasen (aus *Aspergillus niger* CBS 513.88 und *Neurospora crassa* OR74A) charakterisiert werden. Neueste Untersuchungen zeigten, dass die gefundenen Arylacetonitrilasen in der Lage sind, Mandelonitril zu hydrolysieren (A. Stolz, persönliche Mitteilung). Die Induktion der relevanten Nitrilase-Aktivitäten in *Aspergillus niger* CBS 513.88 und *Neurospora crassa* OR74A sowie deren potentielle Eignung als säuretolerante Ganzzellbiokatalysatoren sollten daher zukünftig eingehend untersucht werden.

2.13.9 Alternative Möglichkeiten zur Anwendung „bienzymatischer Ganzzellkatalysatoren“

Eine Alternative zur Generierung säuretoleranter Ganzzellkatalysatoren ist, wie Sosedov *et al.* (2009) zeigten, mit der Einbringung der Enzymaktivitäten in geeignetere Expressionssysteme, wie z. B. *E. coli* JM109 gegeben, welche sich zwar nicht durch eine besonders ausgeprägte Säuretoleranz auszeichnen, aber dafür eine höhere Expression der Aktivitäten ermöglichen. So konnte durch die simultane Expression der (*S*)-Oxynitrilase aus *M. esculenta* und der Arylacetonitrilase aus *P. fluorescens* EBC191 in *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1) kürzlich ein Biokatalysator generiert werden, der die Synthese von (*S*)-Mandelsäure und (*S*)-Mandelamid mit Enantiomerenüberschüssen >99 % in wässrigen Medien bei pH 5 mit deutlich höheren Aktivitäten katalysierte, als das hier vorgestellte *Pichia*-System (Soesedov *et al.* 2009). Anhand der in dieser Veröffentlichung dargestellten Daten für die Entstehung von (*S*)-Mandelsäure kann eine Reaktionsrate von etwa 0,28 U/mg Zelltrockengewicht [ausgehend von einem Zelltrockengewicht von 0,3 mg/ml/OD_{600nm} für *E. coli* (Soini *et al.* 2008); bzw. 0,56 U/mg Protein, bei einem angenommenen Proteinanteil am Zelltrockengewicht von 50 % (w/w) (Fuchs 2007)] kalkuliert werden.

Allerdings ist zu vermuten, dass die Nitril-Hydrolyse in diesem Experiment durch die geringere (*S*)-Oxynitrilase-Aktivität im Vergleich zur Nitrilase-Aktivität und einen dadurch verursachten „Substratmangel“ der Nitrilase limitiert wurde. So wurde bei der „unabhängigen“ Ermittlung der Nitrilase- bzw. (*S*)-Oxynitrilase-Aktivitäten des „bienzymatischen“ *E. coli*-Ganzzellkatalysators für die Nitrilase anhand eines Umsatzes von Mandelonitril eine spezifische Aktivität von 2,5 U/mg Protein ermittelt. Hingegen wurde für die (*S*)-Oxynitrilase anhand eines Umsatzes von Benzaldehyd und KCN lediglich eine spezifische Aktivität von 0,4 U/mg Protein kalkuliert (Sosedov *et al.* 2009). Die geringere Oxynitrilase-Aktivität des Ganzzellkatalysators beruht dabei offenbar auf einer schwachen Expression der Oxynitrilase in *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1). So wurde für die Oxynitrilase ein prozentualer Anteil von 2-3 % am löslichen Gesamtprotein festgestellt – für die Nitrilase hingegen ein prozentualer Anteil von 5 % (Sosedov *et al.* 2009). Es kann somit die Vermutung angestellt werden, dass sich die Umsatzrate des Gesamtsystems durch eine Steigerung der Expression der (*S*)-Oxynitrilase noch deutlich erhöhen ließe.

Eine Alternative zur Steigerung der (*S*)-Oxynitrilase-Expression in den „bienzymatischen Ganzzellkatalysatoren“ wurde prinzipiell von Mateo *et al.* (2006) aufgezeigt. In dieser Arbeit wurde für die Herstellung der Combi-CLEAs Oxynitrilase- und Nitrilase-Aktivitäten in einem Verhältnis von 35:1 eingesetzt (vgl. Abschnitt 2.13.6). Adaptiert auf das Ganzzellsystem könnte die getrennte Expression der Enzyme in zwei separaten Zellsystemen und die Verwendung einer adäquaten Mischung der beiden „monoenzymatischen Ganzzellkatalysatoren“ eine Steigerung

der Umsatzraten ermöglichen.

In weiterführenden Experimenten wurde die Synthese von (*S*)-Mandelsäure und (*S*)-Mandelamid durch den konstruierten Biokatalysator, *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1), in einem rein wässrigen Medium (100 mM Citratpuffer, pH 5) und einem biphasischen Medium [70 % (v/v) Diisopropylether, 30 % (v/v) 50 mM Na-Citratpuffer, pH 5] vergleichend untersucht (Sosedov *et al.* 2009). Hierbei zeigte sich, dass *E. coli* JM109(pIK9)(pJOE5361.1), bei gleicher Enantiomerenausbeute (*ee* >99 %), die Synthese in dem rein wässrigen Medium mit rund 18-fach höheren Umsatzraten katalysierte, als in dem biphasischen Medium (Sosedov *et al.* 2009).

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die *in-vivo* Synthese von (*S*)- α -Hydroxycarbonsäuren und (*S*)- α -Hydroxycarbonsäureamiden unter mild-sauren Bedingungen mittels „bienzymatischer Ganzzellkatalysatoren“ in Bezug auf die Enantiomerenausbeuten und Reaktionsraten bereits derzeit eine konkurrenzfähige Alternative zur *in-vivo* und *in-vitro* Reaktionsführung in biphasischen Reaktionsmedien darstellt.

Synthetische Anwendungen erscheinen daher zukünftig für beide Systeme denkbar. Letztendlich werden jedoch auch weitere Faktoren, wie z. B. die Langzeitstabilität der Katalysatoren und die Robustheit der Katalysatoren gegenüber hohen Substratkonzentrationen und weitere ökonomische und ökologische Abwägungen über einen kommerziellen Einsatz der Systeme entscheiden.

3 Literatur

Antranikian, G. (2006) Angewandte Mikrobiologie. Springer-Verlag, Berlin.

Arpe, H. J. (2007) Industrielle Organische Chemie: Bedeutende Vor- und Zwischenprodukte. 6. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim.

Baker-Austin, C., Dopson, M. (2007) Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. Trends Microbiol. 15:165-171.

Banerjee, A., Sharma, R., Banerjee, U. C. (2002) The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60:33-44.

Banerjee, A., Dubey, S., Kaul, P., Barse, B., Piotrowski, M., Banerjee, U. C. (2009) Enantioselective nitrilase from *Pseudomonas putida*: cloning, heterologous expression, and bioreactor studies. Mol. Biotechnol. 41:35-41.

Bartling D., Seedorf M., Mithöfer A., Weiler, E. W. (1992) Cloning and expression of an *Arabidopsis* nitrilase which can convert indole-3-acetonitrile to the plant hormone, indole-3-acetic acid. Eur. J. Biochem. 205:417-424.

Bauer, M., Griengl, H., Steiner, W. (1999) Parameters influencing stability and activity of a *S*-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis* in two-phase systems. Enzyme Microb. Tech. 24:514-522.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72:248–254.

Breuer, M., Hauer, B. (2003) Carbon-carbon coupling in biotransformation. Curr. Opin. Biotechnol. 14:570-576.

Cereghino, J. L., Cregg, J. M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol. Rev. 24:45–66.

Cereghino, G. P. L., Cereghino, J. L., Ilgen, C., Cregg, J. M. (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. Curr. Opin. Biotechnol. 13:329-332.

Chang, T.L. Teleshova, N., Rapista, A., Paluch, M., Anderson, R.A., Waller, D.P., Zaneveld, L.J.D, Granelli-Piperno, A., Klotman, M.E. (2007) SAMMA, a mandelic acid condensation polymer, inhibits dendritic cell-mediated HIV transmission. FEBS Lett. 581:4596-4602.

Chmura, A. (2010) A sustainable, ‘two-enzyme, one-pot procedure’ for the synthesis of enantiomerically pure α -hydroxy acids. Dissertation am Institut für Biokatalyse und Organische Chemie der Technischen Universität Delft (Die Niederlande) ISBN/EAN: 978-90-9025856-0.

Cobley, J. G., Cox, J. C. (1983) Energy conservation in acidophilic bacteria. Microbiol. Rev. 47:579-595.

- Conradt, D. (1997)** Isolierung des Nitrilasegens aus *Pseudomonas fluorescens* EBC191 und Expression in *E. coli*. Diplomarbeit, Universität Stuttgart.
- Costes, D., Wehtje, E., Adlercreutz, P. (1999)** Hydroxynitrile lyase-catalyzed synthesis of cyanhydrins in organic solvents – Parameters influencing activity and enantiospecificity. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 384-391.
- Couderc, R., Baratti, J. (1980)** Oxidation of methanol by the yeast, *Pichia pastoris*. Purification and properties of the alcohol oxidase. *Agric. Biol. Chem.* 44:2270-2289.
- Cox, H. H. J., Faber, B. W., van Heiningen, W. N. M., Radhoe, H., Doddema, H. J., Harder, W. (1996)** Styrene metabolism in *Exophiala jeanselmei* and involvement of a cytochrome P-450 dependent styrene monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1471-1474.
- Coxon, K. M., Chakauya, E., Ottenhof, H. H., Whitney, H. M., Blundell, T. L., Abell, C., Smith, A. G. (2005)** Pantothenate biosynthesis in higher plants. *Biochem. Soc. Trans.* 33:743-746.
- Dechema (2006)** F&E-Strategie Chemie und Biotechnologie für gesellschaftliche Bedürfnisfelder, Nationaler Implementierungsplan der europäischen Technologieplattform Sustainable Chemistry (SusChem).
- Effenberger, F., Ziegler, T., Förster, S. (1987)** Enzymkatalysierte Cyanhydrin-Synthese in organischen Lösungsmitteln. *Angew. Chem.* 99:491-492.
- Effenberger, F., Hörsch, B., Förster, S., Ziegler, T. (1990)** Enzyme-catalyzed synthesis of (*S*)-cyanhydrins and subsequent hydrolysis to (*S*)- α -hydroxy-carboxylic acids. *Tetrahedron Lett.* 9:1249-1252.
- Effenberger, F. (1994)** Synthese und Reaktionen optisch aktiver Cyanhydrine. *Angew. Chem.* 106:1609-1619.
- Effenberger, F., Förster, S., Wajant, H. (2000)** Hydroxynitrile lyases in stereoselective catalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:532-539.
- Effenberger, F., Osswald, S. (2001)** Enantioselective hydrolysis of (*R,S*)-2-fluoroarylacetonitriles using nitrilase from *Arabidopsis thaliana*. *Tetrahedron Asym.* 12:279-285.
- Fernandes, B. C. M., Mateo, C., Kiziak, C., Wacker, J., Chmura, A., van Rantwijk, F., Stolz, A., Sheldon, R. A. (2006)** Nitrile hydratase activity of a recombinant nitrilase. *Adv. Synth. Catal.* 348:2597-2603.
- Förster, S., Roos, J., Effenberger, F., Wajant, H., Sprauer, A. (1996)** Über die erste rekombinante Hydroxynitril-Lyase und ihre Anwendung in der Synthese von (*S*)-Cyanhydrinen. *Angew. Chem.* 108:493-494.
- Fuchs, G. (2007)** Allgemeine Mikrobiologie. 8. Auflage, Georg-Thieme Verlag, Stuttgart.
- Furlemeier, A., Quitt, P., Vogler, K., Lanz, P. (1976)** 6-Acyl derivatives of aminopenicillanic acid, U.S. Patent, 3 957 758.

- Geisslinger, G., Stock, K.-P., Bach, G. L., Loew, D., Brune, K. (1989)** Pharmacological differences between *R*(-)- and *S*(+)-ibuprofen. *Agents Actions*, 27:455-457.
- Goldlust, A., Bohak, Z. (1989)** Induction, purification and characterization of the nitrilase of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Biotech. Appl. Biochem.* 11:581-601.
- Griengl, H., Schwab, H., Fechter, M. (2000)** The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases. *Trends Biotechnol.* 18:252-256.
- Gröger, H. (2001)** Enzymatic routes to enantiomerically pure aromatic α -hydroxy carboxylic acids: A further example for the diversity of biocatalysis. *Adv. Synth. Catal.* 343:547-558.
- Gunsch, C. K., Cheng, Q., Kinney, K. A., Szaniszló, P. J., Whitman, K. A. (2005)** Identification of a homogentisate-1,2-dioxygenase gene in the fungus *Exophiala lecanii-corni*: analysis and implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:405-411.
- Hagen, J. (2006)** Industrial catalysis. 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim.
- Harper, D. B. (1977)** Fungal degradation of aromatic nitriles. Enzymology of C-N cleavage by *Fusarium solani*. *Biochem. J.* 167:685-692.
- Heinemann, U., Engels, D., Bürger, S., Kiziak, C., Mattes, R., Stolz, A. (2003)** Cloning of a nitrilase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. and heterologous expression and characterization of the encoded protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4359-4366.
- Hellwich, K.-H. (2007)** Stereochemie Grundbegriffe. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Herold, B. C., Scordi-Bello, I., Cheshenko, N., Marcellino, D., Dzuzelewski, M., Francois, F., Morin, R., Casullo, V.M., Anderson, R.A., Chany, C. 2nd, Waller, D.P., Zaneveld, L.J., Klotman, M.E. (2002)** Mandelic acid condensation polymer: A novel candidate microbicide for prevention of human immunodeficiency virus and herpes simplex virus entry. *J. Virol.* 76:11236-11244.
- Hölker, U., Bend, J., Pracht, R., Tetsch, L., Müller, T., Höfer, M., de Hoog, G. S. (2004)** *Hortaea acidophila*, a new acid-tolerant black yeast from lignite. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:287-294.
- Huang, H.-R., Xu, J.-E. (2006)** Preparation of (*S*)-mandelic acid from racemate using growing cells of *Pseudomonas putida* ECU1009 with (*R*)-mandelate degradation activity. *Biochem. Eng. J.* 30:11-15.
- Hughes, J., Carvalho, F. J., Hughes, M. A. (1994)** Purification, characterization, and cloning of α -hydroxynitrile lyase from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Arch. Biochem. Biophys.* 311:496-502.
- Hughes, J., Lakey, J. H., Hughes, M. A. (1997)** Production and characterization of a plant α -hydroxynitrile lyase in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 53:332-338.
- Hutt, A. J., Valentová, J. (2003)** The chiral switch: The development of single enantiomer drugs from racemates. *Acta Fac. Pharm. Univ. Comenianae Tomus L*, 7-23.

- Jallageas, J.-C., Arnaud, A., Glazy, P. (1980)** Bioconversion of nitriles and their applications. *Adv. Biochem. Eng.* 14:1-32.
- Johnson, D. V., Zabelinskaja-Mackova, A. A., Griengl, H. (2000)** Oxynitrilases for asymmetric C-C bond formation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:103-109.
- Jones, D. A. (1998)** Why are so many food plants cyanogenic? *Phytochemistry* 42:155-162.
- Kaiser, P. (2002)** Endemische spastische Paraparese (Konzo). *Der Nervenarzt* 73:946-951.
- Kaplan, O., Nikolaou, K., Pišvejcová, A., Martínková, L. (2006a)** Hydrolysis of nitriles and amides by filamentous fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 38:260-264.
- Kaplan, O., Vejvoda, V., Charvátová-Pišvejcová, A., Martínková, L. (2006b)** Hyperinduction of nitrilases in filamentous fungi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 22:891-896.
- Kaplan, O., Vejvoda, V., Plíhal, O., Pompach, P., Kavan, D., Fialová, P., Bezouška, K., Macková, M., Cantarella, M., Jirků, V., Křen, V., Martínková, L. (2006c)** Purification and characterization of a nitrilase from *Aspergillus niger* K10. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73:567-575.
- Kaplan, O., Bezouška, K., Malandra, A., Veselá, A.B., Petříčková, A., Felsberg, J., Rinágelová, A., Křen, V., Martínková, L. (2010)** Genome mining for the discovery of new nitrilases in filamentous fungi. *Biotechnol. Lett.* (online DOI 10.1007/s10529-010-0421-7).
- Kaul P., Banerjee A., Mayilraj S., Banerjee, U. C. (2004)** Screening for enantioselective nitrilases: kinetic resolution of racemic mandelonitrile to (*R*)-mandelic acid by new isolates. *Tetrahedron Asym.* 15:207-211.
- Kaul P., Stolz A., Banerjee, U. C. (2007)** Cross-linked amorphous nitrilase aggregates for enantioselective nitrile hydrolysis. *Adv. Synth. Catal.* 349:2167-2176.
- Kaul, P., Banerjee, U. C. (2008)** Predicting enzyme behavior in nonconventional media: correlating nitrilase function with solvent properties. *J. Ind. Biotechnol.* 35:713-720.
- Kiziak, C. (1998).** Heterologe Produktion der Nitrilase aus *Pseudomonas fluorescens* EBC191 und chimärer Enzymvarianten in *E. coli*. Diplomarbeit, Universität Stuttgart.
- Kiziak, C., Conradt, D., Stolz, A., Mattes, R., Klein, J. (2005)** Nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191: cloning and heterologous expression of the gene and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Microbiology* 151:3639-3648.
- Knowles, C. J., Wyatt J. W. (1992)** The degradation of cyanide and nitriles. S. 113-128 *In: Microbial control of pollution.* Editiert durch: Fry, J. C., Gadd, G. M., Herbert, R. A., Jones, C. W., Watson-Craik, I. A., Cambridge University Press, Port Chester, NY, USA.
- Kobayashi, M., Yanaka, N., Nagasawa, T., Yamada, H. (1991)** Hyperinduction of an aliphatic nitrilase by *Rhodococcus rhodochrous* K22. *FEMS Microbiol. Lett.* 77: 121-124.
- Layh, N., Stolz, A., Förster, S., Effenberger, F., Knackmuss, H.-J. (1992)** Enantioselective hydrolysis of O-acetylmandelonitrile to O-acetylmandelic acid by bacterial nitrilases. *Arch. Microbiol.* 158:405-411.

- Layh, N., Willets, A. (1998)** Enzymatic nitrile hydrolysis in low water systems. *Biotechnol. Lett.* 20:329-331
- Legras, J. L., Ghuzel, G., Arnaud, A., Gazly, P. (1990)** Natural nitriles and their metabolism. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 6:83-108.
- Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. (2006)** *Industrial Biotransformations*. 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim.
- Mateo, C., Chmura, A., Rustler, S., van Rantwijk, F., Stolz, A., Sheldon, R. A. (2006)** Synthesis of enantiomerically pure (*S*)-mandelic acid using an oxynitrilase-nitrilase bienzymatic cascade - A nitrilase surprisingly shows nitrile hydratase activity. *Tetrahedron Asym.* 17:320-323.
- McMurry, J., Begley, T. (2006)** *Organische Chemie der biologischen Stoffwechselwege*. 1. Auflage, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, München.
- Moser, R. (1996)** Charakterisierung, Reinigung und N-terminale Sequenzierung der Nitrilase aus *P. fluorescens* EBC191. Diplomarbeit, Universität Stuttgart.
- Nagasawa, T., Yamada, H. (1989)** Microbial transformation of nitriles. *Tibtech* 7:153-158.
- Nagasawa, T., Nakamura, H., Yamada, H. (1990)** ϵ -Caprolactam, a new powerful inducer for the formation of *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilase. *Arch. Microbiol.* 155: 13–17.
- Nagasawa, T., Yamada, H. (1995)** Microbial production of commodity chemicals. *Pure & Appl. Chem.* 67:1241-1256.
- Niedermeyer, U., Kula, M. R. (1990)** Enzyme catalyzed synthesis of (*S*)-cyanhydrins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29:386-387.
- O'Reilly, C., Turner, P. D. (2003)** The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes- a comparative study. *J. Appl. Microbiol.* 95:1161-1174.
- Osswald, S., Wajant, H., Effenberger, F. (2002)** Characterization and synthetic applications of recombinant AtNIT1 from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* 269:680–687.
- Paravidino, M., Sorgedrager, M. J., Orru, R.V.A., Hanefeld, U. (2010)** Activity and enantioselectivity of the hydroxynitrile lyase MeHNL in dry organic solvents. *Chem. Eur. J.* 16:7596-7604.
- Patel, R. N. (2002)** Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme Microb. Tech.* 31:804-826.
- Patel, R. N. (2008)** Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coord. Chem. Rev.* 252:659-701.
- Piotrowski, M. (2008)** Primary or secondary? Versatile nitrilases in plant metabolism. *Phytochemistry* 69:2655-2667.

Prenafeta-Boldú, F. X., Summerbell, R., de Hoog, G. S. (2006) Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? *FEMS Microbiol. Rev.* **30**: 109–130.

Ress-Löschke, M., Friedrich, T., Hauer, B., Mattes, R. (1998) Verfahren zur Herstellung chiraler Carbonsäuren aus Nitrilen mit Hilfe einer Nitrilase oder Mikroorganismen, die ein Gen für eine Nitrilase enthalten. German Patent Application, DE 19848129A1.

Rice, P. J., Miller, D. D., Sokoloski, T. D., Patil, P. N. (1989) Pharmacologic implications of α -adrenoreceptor. Interactive parameters for epinephrine enantiomers in the rat vas deferens. *Chirality* **1**: 14-19.

Robinson, W. G., Hook, R. H. (1964) Ricinine nitrilase. *J. Biol. Chem.* **239**:4257-4262.

Roth, K. (2005) Eine unendliche chemische Geschichte. *Chem. Unserer Zeit* **39**: 212-217.

Saravanan, P., Singh, V. K. (1998) An efficient synthesis of chiral nonracemic diamines: application in asymmetric synthesis. *Tetrahedron Lett.* **39**:167-170.

Seely, M. K., Criddle, R. S., Conn, E. E. (1966) The metabolism of aromatic compounds in higher plants. *J. Biol. Chem.* **241**:4457-4462.

Semba, H., Dobashi, Y., Matsui T. (2008) Expression of hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* in yeast and its application in (*S*)-mandelonitrile production using an immobilized enzyme reactor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**:457–1463.

Sharma, M., Sharma, N. N., Bhalla, T. C. (2005) Hydroxynitrile lyases: At the interface of biology and chemistry. *Enzyme Microb. Technol.* **37**:279-294.

Sheldon, R. A. (2007) Cross-linked enzyme aggregates (CLEA[®] s): stable and recyclable biocatalysts. *Biochem. Soc. Trans.* **25**:1583-1587.

Šnajdrová, R., Kristová-Mylerová, V., Crestia, D., Nikolaou, K., Kuzma, M., Lemaire, M., Gallienne, E., Bolte, J., Bezouška, K., Křen, V., Martínková, L. (2004) Nitrile biotransformation by *Aspergillus niger*. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **29**:227–232.

Soini, J., Ukkonen, K., Neubauer, P. (2008) High cell density media for *Escherichia coli* are generally designed for aerobic cultivations - consequences for large-scale bioprocesses and shake flask cultures. *Microb. Cell. Fact.* **7**:26 (online doi:10.1186/1475-2859-7-26).

Sosedov, O., Matzer, K., Bürger, S., Kiziak, C., Baum, S., Altenbuchner, J., Chmura, A., van Rantwijk, F., Stolz, A. (2009) 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. *Adv. Synth. Catal.* **351**:1531–1538.

Stevenson, D. E., Feng, R., Dumas, F., Groleau, D., Mihoc, A., Storer, A.C. (1992) Mechanistic and structural studies on *Rhodococcus* ATCC39484 nitrilase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **15**:283–302.

Testa, B., Carrupt, P. A., Gal, J. (1993) The so-called „interconversion“ of stereoisomeric drugs: an attempt at clarification. *Chirality* **5**:105-111.

- Thomas, S. M., DiCosimo, R., Nagarajan, V. (2002)** Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. *Trends Biotechnol.* 20:238-242.
- Untereiner, W. A., Naveau, F. A. (1999)** Molecular systematics of the *Herpotrichiellaceae* with an assessment of the phylogenetic positions of *Exophiala dermatitidis* and *Phialophora americana*. *Mycologia* 91:67–83.
- Untereiner, W. A., Straus, N. A., Malloch, D. (1995)** A molecular-morphotaxonomic approach to the systematics of the *Herpotrichiellaceae* and allied black yeasts. *Mycol. Res.* 99:897–913.
- van Pelt, S., van Rantwijk, F. Sheldon, R. A. (2009)** Synthesis of Aliphatic (*S*)- α -Hydroxycarboxylic Amides using a One-Pot Biocatalytic Cascade of Immobilised Oxynitrilase and Nitrile Hydratase. *Adv. Synth. Catal.* 351:397–404.
- Vejvoda, V., Kaplan, O., Bezouška, K., Pompach, P., Šulc, M., Cantarella, M., Benada, O., Uhnáková, B., Rinágelová, A., Lutz-Wahl, S., Fischer, L., Křen, V., Martínková, L. (2008)** Purification and characterization of a nitrilase from *Fusarium solani* O1. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 50: 99–106.
- Verduyn, C. (1991)** Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Antonie van Leeuwenhoek* 60: 325–353.
- Vetter, J. (2000)** Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon* 38:11-36.
- Ward, M., Yu, B., Wyatt, V., Griffith, J., Craft, T., Neurath, A.R., Strick, N., Li, Y.-Y., Wertz, D.L., Pojman, J.A., Lowe, A.B. (2007)** Anti-HIV-1 activity of poly(mandelic acid) derivatives. *Biomacromolecules* 8:3308-3316.
- Wartenberg, A. (1989)** Einführung in die Biotechnologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- White, C. A., Subramanian, G. (1994)** An introduction to liquid chromatography. Wiley-VCH, Weinheim.
- Yamamoto, K., Oishi, K., Fujimatsu, I., Komatsu, K. I. (1991)** Production of (*R*)-mandelic acid from mandelonitrile by *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3028-3032.
- Yamamoto, K., Fujimatsu, I., Komatsu, K. I. (1992)** Purification and characterization of the nitrilase from *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 responsible for enantioselective hydrolysis of mandelonitrile. *J. Ferment. Bioeng.* 73:425-430.
- Zagrobelny, M., Bak, S., Møller B. L. (2008)** Cyanogenesis in plants and arthropods. *Phytochemistry* 69:1457–1468.
- Zaneveld, L. J. D., Anderson, R. A., Diao, X. H., Waller, D. P., Chany, C., Feathergill, K., Doncel, G., Cooper, M. D., Herold, B. C. (2002)** Use of mandelic acid condensation polymer (SAMMA), a new antimicrobial contraceptive agent, for vaginal prophylaxis. *Fertil. Steril.* 78:1107–1115.
- Zhang, Y., Yang, B. (2006)** In vivo optimizing of intracellular production of heterologous protein in *Pichia pastoris* by fluorescent scanning. *Anal. Biochem.* 357:232–239.

Zhou, Y., Luan, P., Liu, L., Sun, Z. P. (1994) Chiral derivatizing reagents for drug enantiomers bearing hydroxyl groups. *J. Chromatogr. B* 659:109-126.

4 Veröffentlichungen

Erschienen in: *Enzyme and Microbial Technology* (2007) 40:598-606

Conversion of mandelonitrile and phenylglycinenitrile by recombinant *E. coli* cells synthesizing a nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191

**S. Rustler^a, A. Müller^a, V. Windeisen^a, A. Chmura^b,
B. C. M. Fernandez^b, C. Kiziak^{a+}, A. Stolz^{a*}**

^a*Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, Allmandring 31, 70569 Stuttgart, Germany*

^b*Laboratory of Biocatalysis and Organic Chemistry, Delft University of Technology, Julianalaan
136, 2628 BL Delft, The Netherlands*

⁺*Present address: Lonza AG, Biotechnology Research and Development, CH-3930 Visp,
Switzerland*

* Corresponding author. Tel: +49 (0)711 68565489, Fax: +49 (0)711 68565725

E-mail address: andreas.stolz@imb.uni-stuttgart.de

ABSTRACT

The enzymatic conversion of (chiral) α -amino- and α -hydroxynitriles is hampered by the low stability of these compounds under neutral conditions. In contrast, these substrates are much more stable at acidic pH-values. Therefore, the spontaneous decomposition of the model compounds mandelonitrile and phenylglycinenitrile was analysed in acid aqueous buffers at different pH-values. Both compounds showed at 4 °C half-lives of more than 24h in Na-citrate buffer with pH-values of 5 and lower. Phenylglycinenitrile demonstrated a higher stability at all pH-values tested than mandelonitrile. The enzymatic conversion of mandelonitrile was analysed at pH-values of 4–7 using a recombinantly produced nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191. These experiments demonstrated that cell extracts and resting cells of the recombinant organism (*E. coli* JM109(pIK9)) showed at pH 5 the highest conversion rates for mandelonitrile. This was explained by the higher bioavailability of mandelonitrile in combination with significant residual enzyme activities at this pH. The resting cell system was superior to the cell-free system in respect to conversion rates, acid stability, and tolerance against high substrate concentrations. The enantioconservative conversion of the pure enantiomers of mandelonitrile to the respective mandelic acid enantiomers was achieved with resting cells at pH 5, but was not possible at pH 7. Significantly more mandeloamide as side-product was formed from (*S*)-mandelonitrile than from (*R*)-mandelonitrile by resting cells. The higher stability of phenylglycinenitrile in combination with the high enzyme activities allowed an efficient conversion of this substrate already at neutral pH-values.

INTRODUCTION

The enzymatic hydrolysis of nitriles is of synthetic importance for the production of amides or carboxylic acids. Two different enzyme systems for the hydrolysis of nitriles are known: (1) nitrilases which directly hydrolyze nitriles to the corresponding carboxylic acids and nitrile hydratases which convert nitriles to the amides. One possible application for nitriles hydrolysing organisms or enzymes is the conversion of α -hydroxynitriles, because chiral α -hydroxyamides and chiral α -hydroxycarboxylic acids – such as (substituted) mandelic acids – are interesting products for the chemical industry (Gröger 2001). In principle two enzymatic pathways are known (Fig. 1) which involve 2-hydroxynitriles and which result in the formation of enantiopure 2-hydroxy acids.

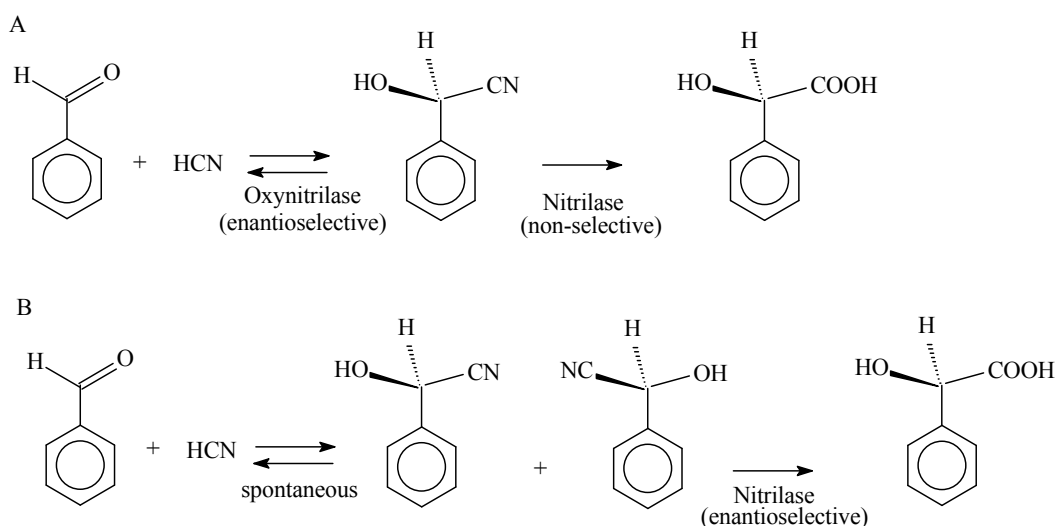


Fig. 1. Schematic representation of the possible pathways for the synthesis of optical active mandelic acid using nitrilases (and oxynitrilases).

The first process is based on *R*- or *S*-specific oxynitrilases from plants which can catalyze the enantioselective addition of HCN to aldehydes or ketones (Effenberger *et al.* 2000, Johnson *et al.* 2000). These enzymes produce either the (*S*)- or (*R*)-forms of the α -hydroxynitriles which subsequently can be chemically or enzymatically (via nitrilases) converted to chiral α -hydroxy acids (Ziegler *et al.* 1990). The second enzymatic strategy for the production of chiral hydroxy acids from aldehydes (or ketones) and HCN uses the (reversible) chemical condensation of the oxo-compounds and HCN in combination with an enantioselective nitrilase. The latter strategy is hampered by the fact that only very few truly enantiospecific nitrilases are currently known and that these nitrilase only convert mandelonitrile (and very few substituted mandelonitriles) to (*R*)-mandelic acid(s) (Yamamoto *et al.* 1992, Yamamoto *et al.* 1991, Ress-Löschke *et al.* 1998, Kaul *et al.* 2004). We are therefore currently trying to establish a two-enzyme process which couples

the enantiospecific oxynitrilase reactions with bacterial nitrilases. This reaction cascade should be environmentally benign and also compatible with a wide range of hydrolysable groups. Nevertheless, several problems have to be solved for the intended enzyme cascade. Thus, synthetic oxynitrilase reactions are usually performed at pH-values <5 in order to suppress the uncatalyzed (and therefore non-enantiospecific) hydrocyanation reactions. Furthermore, the synthetic oxynitrilase reactions are usually performed in the presence of large amounts of organic solvents in order to further suppress the reversible chemical reaction (Bauer *et al.* 1999). In order to successfully couple a nitrilase with the well-established oxynitrilase processes it is therefore necessary to study and optimize the reaction of nitrilases under acidic conditions.

2-Aminonitriles also decompose under neutral conditions and are stabilized under acidic conditions. It has been shown previously that 2-aminonitriles can be converted enzymatically by nitrile hydratases and nitrilases and thus are potential precursors of (chiral) aminoamides and amino acids (Choi *et al.* 1986, Bhalla *et al.* 1992, Wegman *et al.* 2000, Wegman *et al.* 2001). Nevertheless, these reactions have never been studied in greater detail, presumably because of the instability of the substrates in connection with the formation of highly toxic HCN.

We are studying an arylacetonitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191, which converts a broad range of-substituted nitriles (Layh *et al.* 1997, Layh *et al.* 1992, Heinemann *et al.* 2003). The encoding gene has recently been cloned and an *E. coli* clone constructed which highly overexpressed the nitrilase. Furthermore, it has been shown that the nitrilase from *P. fluorescens* EBC 191 converts in contrast to most other described arylacetonitrilases both enantiomers of mandelonitrile (Kiziak *et al.* 2005). It is therefore of potential interest to combine this nitrilase with an *S*-specific oxynitrilase in an attempt to create a two-enzyme cascade for the synthesis of *S*-mandelic acid (Mateo *et al.* 2006a, 2006 b). Therefore, in the present work we systematically studied the behaviour of the recombinantly expressed mandelonitrile converting nitrilase from *P. fluorescens* EBC191 under acidic conditions.

EXPERIMENTAL METHODS

Bacterial strains and culture conditions. *E. coli* JM109(pIK9), which encodes for a His-tagged variant of the nitrilase from *P. fluorescens* EBC191, was used as source of nitrilase activity (Kiziak *et al.* 2005). The strain was routinely grown at 30 °C in dYT medium supplemented with 100 µg/ml ampicillin. The induction of the nitrilase was achieved by the addition of rhamnose (0.1 %, *w/v*) to the growth medium. The cells were harvested by centrifugation in the late exponential or early stationary growth phase.

Preparation of cell extracts. Cell suspensions in 100mM Na-phosphate buffer (pH 7.0), were disrupted by using a French press (Aminco, Silver Springs, MD, USA) at 80MPa. Cell debris was removed by centrifugation at 100,000×g for 40 min at 4 °C. Protein content of the cell extracts was determined by the method of Bradford (1976) with bovine serum albumin as a standard.

Enzyme assays. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that converts 1 µmol of substrate per min. The nitrilase activity of resting cells was determined in reaction mixtures (1.5–2 ml each) containing 100 mM of the indicated buffers, 10 mM nitrile, and an appropriate amount of cells. All nitrile stock solutions (200 mM–5 M) were prepared in methanol. The reaction mixtures were incubated at 34 °C. After different time intervals, samples (50–100 µl each) were taken and the reactions were stopped by the addition of 1 M HCl (5–10µl). The samples were centrifuged in an Eppendorf centrifuge at 15,000×g for 10 min and the supernatants were analysed using high-pressure liquid chromatography (HPLC).

Comparison of the conversion of mandelonitrile by resting cells and cell extract. A culture of rhamnose induced cells of *E. coli* JM109(pIK9) was harvested by centrifugation, resuspended in 100 mM Na-phosphate buffer (pH 7) and split into two samples (6.2–6.5 ml, OD_{600nm} 78–83). The cells were frozen in liquid nitrogen and stored overnight at –70 °C. From one of these samples a cell extract was prepared using seven passages through a French Press. The efficiency of the French press treatment was analysed by plating dilution series before and after the French press treatment. This suggested that only 2 % of the cells survived the French Press treatment. It was therefore assumed that the cell extract contained almost the total soluble proteins (and thus also nitrilase activity) of the cells initially added. The remaining cells and particulate cell constituents were removed by centrifugation (40 min, 100.000×g) and the supernatant used as cell extract for the enzyme assays.

Analytical methods. Mandelonitrile, phenylglycinenitrile, and their corresponding amides and acids were analysed by HPLC (HPLC Millennium Chromatography Manager 3.2, equipped with a diode array detector 996 and HPLC pump M510; Waters Associates, Milford, MA, USA). For the achiral analysis, a reversed-phase column (125mm x 4mm (internal diameter); Trentec, Gerlingen, Germany) filled with 5- μ m-diameter particles of Lichrospher RP8 (E. Merck AG, Darmstadt, Germany) was used to identify individual compounds which were detected spectrophotometrically at 210 nm. Mandelonitrile, mandeloamide, and mandelic acid were analysed using methanol (40 %, v/v) and H₃PO₄ (0.3 %, v/v) in H₂O as mobile phase. Phenylglycinenitrile and the corresponding amide and acid were analysed using a solvent system consisting of 85 % (v/v) 10mM Na-phosphate (pH 2), 15 % (v/v) methanol, and PicB6 (Waters, Eschborn, Germany) as ion-pairing reagent. Separation of the enantiomers of mandelic acid and mandeloamide was achieved on a Chiral-HSA column (ChromTech AB, Hägersten, Sweden). The mobile phases consisted of sodium-phosphate buffer (20 mM, pH 7.0) containing 4.5 % (v/v) acetonitrile or sodium-phosphate buffer (20 mM, pH 6.0) plus 0.5 % (v/v) 2-propanol, respectively. The separation of the enantiomers of 2-phenylglycine and 2-phenylglycineamide was achieved on a Crownpak CR+ column (Daicel Chemical Industries, Tokyo, Japan) at 38 °C with HClO₄ (10.3 g/l, pH 1) plus 10 % (v/v) methanol as mobile phase.

Chemicals. All chemicals were obtained from Sigma–Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Germany) or E. Merck AG (Darmstadt, Germany). Phenylglycinenitrile was obtained from Sigma and purified as described by Wegman *et al.* (2001). (*S*)- and (*R*)-mandelonitrile were synthesized from benzaldehyde and HCN as described by Mateo *et al.* (2006b).

RESULTS

Chemical stability of mandelonitrile and phenylglycinonitrile in aqueous media at different pH-values. It is well known that α -hydroxynitriles are rather unstable at neutral pH-values and decompose to the corresponding aldehyde plus cyanide (Fig. 2), but are significantly more stable at acidic pH-values.

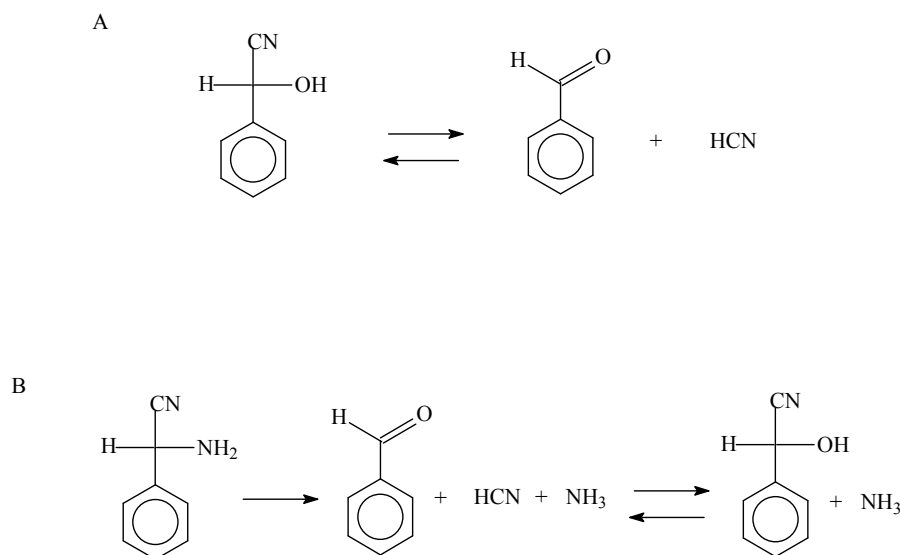


Fig. 2. Schematic representation of the spontaneous decomposition of mandelonitrile and phenylglycinonitrile.

In order to estimate the pH-values that are necessary to stabilize α -hydroxynitriles, the model compound mandelonitrile (α -hydroxyphenylacetonitrile) was incubated at 4 °C at different pH-values and the chemical decomposition analysed by HPLC. Mandelonitrile spontaneously decomposed into benzaldehyde and HCN upon incubation in water at 4 °C.

Eventually, the reaction came to a standstill, presumably because equilibrium had been reached. This conversion at very long (144 h) reaction time was independent of the pH. The reaction rate increased with pH; from almost unnoticeable at pH 3 to instantaneous at pH 6 (Fig. 3A). We conclude that the apparent stability of mandelonitrile at $\text{pH} \leq 5$ is due to reaction kinetics. Furthermore, these experiments suggested that in order to prevent any spontaneous racemization of mandelonitrile during a biotransformation pH-values ≤ 5 should be used.

The analysis of the spontaneous decomposition of phenylglycinonitrile at different pH-values indicated that this compound was significantly more stable under neutral and slightly acidic conditions (Fig. 3B).

Nevertheless, the formation of benzaldehyde was observed at pH-values $> \text{pH} 4$. Furthermore, as expected from the proposed decomposition mechanism (Fig. 2), no indications for the formation of an equilibrium between phenylglycinonitrile and its decomposition products was observed.

The formation of HCN and benzaldehyde as products from phenylglycinenitrile should (especially under neutral conditions) result in the chemical condensation of benzaldehyde and HCN to mandelonitrile, which is also a substrate for the studied nitrilase. Therefore, the utilization of an acidic pH should also be beneficial for the conversion of phenylglycinenitrile by a nitrilase to phenylglycine, in order to minimize the formation of mandelic acid as by-product.

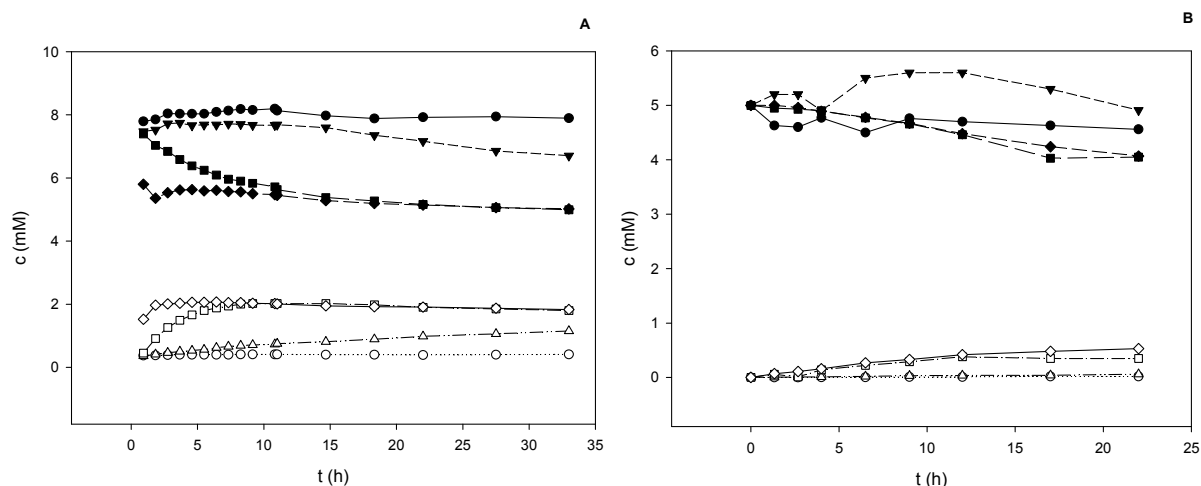


Fig. 3. Spontaneous decomposition of mandelonitrile (**A**) and phenylglycinenitrile (**B**) at different pH-values. Racemic mandelonitrile (**A**) or phenylglycinenitrile (**B**) were added from stock solutions (1 or 0.2 M, respectively, in methanol) to Na-citrate buffers (100 mM) with the indicated pH-values. The samples (liquid volume 1.6 ml) were prepared in 4 ml vessels and aliquots were injected at different time intervals using an automatic sample injector. The decomposition of mandelonitrile or phenylglycinenitrile (● pH 3, ▼ pH 4, ■ pH 5, ◆ pH 6) and the formation of benzaldehyde (○ pH 3, △ pH 4, □ pH 5, ◇ pH 6) were analysed by HPLC.

Enzymatic conversion of mandelonitrile by cell extracts at different pH-values. The mandelonitrile converting nitrilase from *P. fluorescens* was produced in *E. coli* JM109(pIK9) as described previously (Kiziak *et al.* 2005). The optimal pH for the conversion of mandelonitrile was determined using cell extracts. In these experiments the turnover of mandelonitrile and the formation of the products of the enzymatic reaction (mandeloamide and mandelic acid) and the chemical decomposition (benzaldehyde) were simultaneously analysed by HPLC. These experiments demonstrated that at pH-values ≥ 4 an enzymatic conversion of mandelonitrile and the formation of mandelic acid occurred (Fig. 4).

The enzyme rapidly converted mandelonitrile at pH-values ≥ 5 . The reactions at pH-values ≥ 5 significantly differed in the amounts of benzaldehyde formed intermediately and it was found that at neutral pH-values at the start of the reaction almost half of the initial concentration of mandelonitrile was detected as benzaldehyde.

Furthermore, it was found that also the specific activities for the formation of mandelic acid were surprisingly high at pH 5. Nevertheless at the end of the reactions the final amounts of mandelic

acid (and mandeloamide, see below) which were formed at pH-values ≥ 5 were very similar (Fig. 4). This demonstrated the almost complete chemical reformation of mandelonitrile from benzaldehyde and HCN (resulting in the formation of racemic mandelonitrile). These results suggested that the conversion of enantiomerically pure mandelonitrile by nitrilases would require pH-values ≤ 5 .

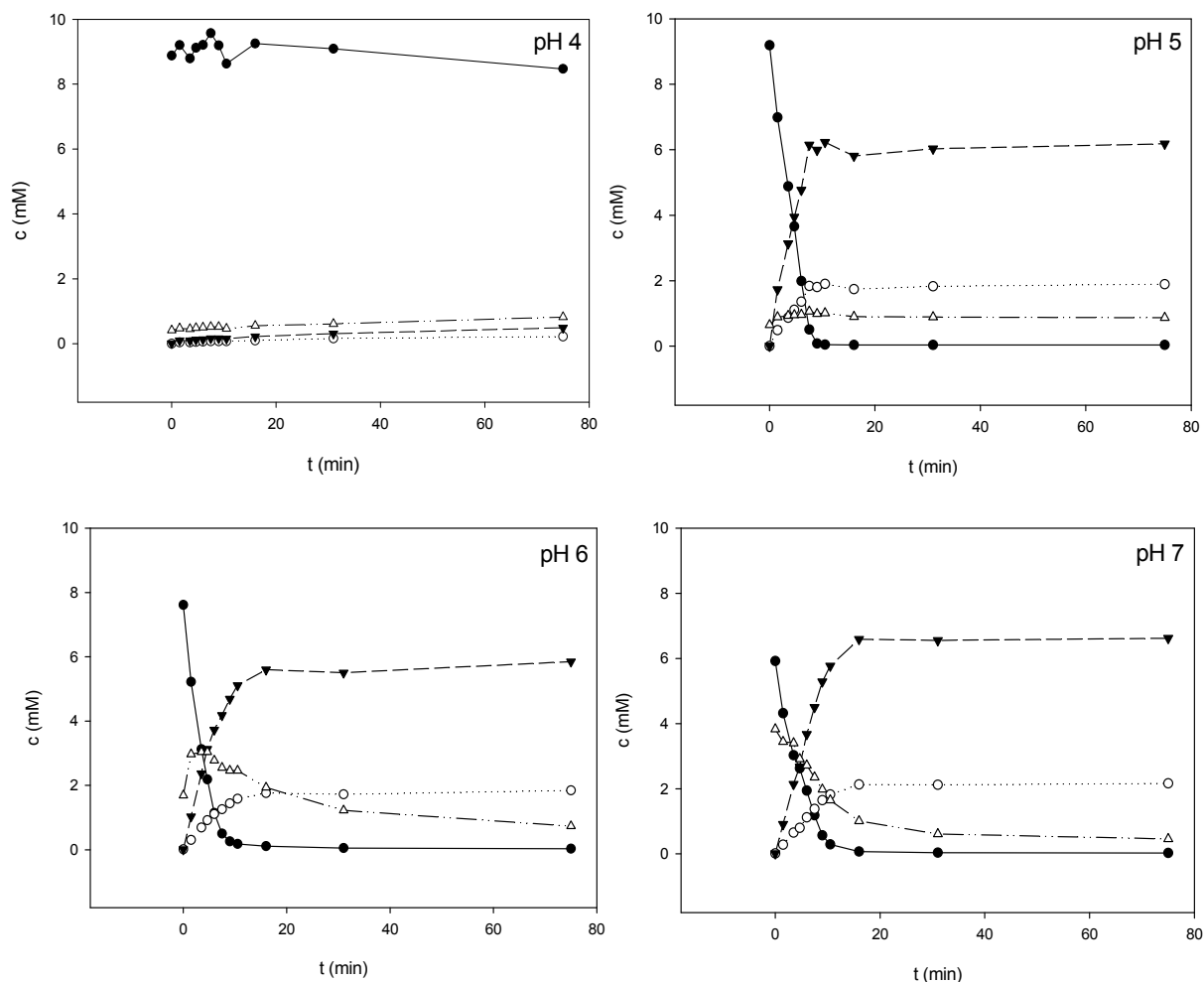


Fig. 4. Conversion of racemic mandelonitrile by cell extracts from *E. coli* JM109(pIK9) at different pH-values. *E. coli* JM109(pIK9) was grown in dYT plus ampicillin, the nitrilase induced by the addition of rhamnose, and cell extracts prepared as described in Section 2. The reaction mixtures contained in a total volume of 1.5 ml 10mM mandelonitrile (from a 1 M stock solution in methanol), 100 mM citrate buffer with the indicated pH-value and 0.1 mg/ml of cell extract. The reaction mixtures were incubated at 34 °C in an Eppendorf shaker at 1400 rpm. Aliquots (70 μ l each) were taken at the indicated time intervals, and the reactions terminated by the addition of 7 μ l 1 M HCl. The samples were immediately frozen in liquid nitrogen. The turnover of mandelonitrile (●) and the formation of mandeloamide (○), mandelic acid (▼), and benzaldehyde (Δ) was analysed by HPLC.

pH-dependence of the amide formation. It was previously reported that the purified nitrilase from *P. fluorescens* formed under standard reaction conditions (in Tris/HCl, pH 7.5) from racemic mandelonitrile about 20 % of mandeloamide in comparison to the amounts of mandelic acid formed and thus demonstrated with this substrate a significant nitrile hydratase activity (Kiziak *et al.* 2005). Therefore, the pH-dependence of the amide formation was analysed and it was found that at all tested pH-values significant amounts of amide were formed (Fig. 5). The experiment suggested that at pH 5 the lowest relative amount of mandeloamide was formed and that the ratio of acid to amide formation slowly decreased for increased pH-values.

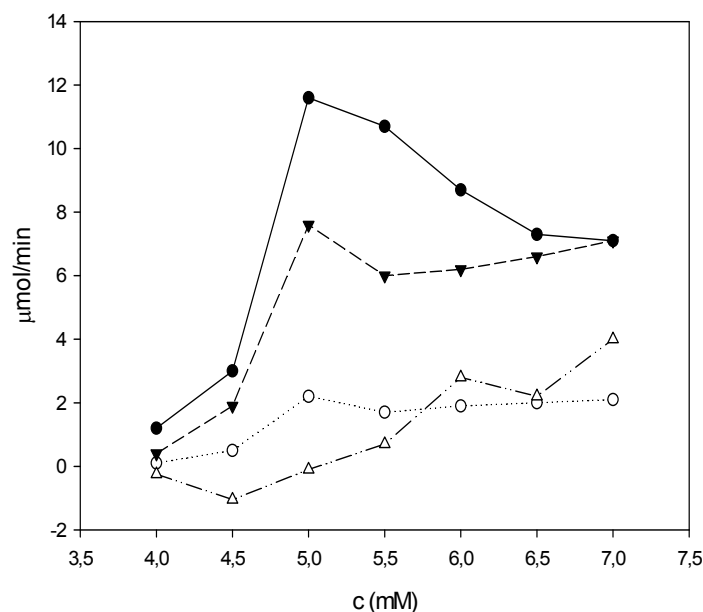


Fig. 5. Specific activities calculated for mandelonitrile turn-over and the formation of mandelic acid and mandeloamide at different pH-values. The experiments were performed basically as described in Fig. 4 but using a water-bath shaker at 100 rpm. The rates for the turn-over of mandelonitrile (●) and the formation of mandelic acid (▼) and mandeloamide (○) are given. Furthermore also the rates for the formation or decay of benzaldehyde (Δ) were indicated.

Conversion of mandelonitrile by resting cells of *E. coli* (pIK9) at different pH-values. The experiments with the cell extracts demonstrated a significant decrease in the in vitro activities of the nitrilase at pH-values < 5. It is well-known that almost all bacteria try to keep a more neutral pH-value inside the cytoplasm if the medium is acidified (Cobley & Cox 1983). Therefore, also whole cells of *E. coli* JM109(pIK9) were incubated at acidic pH-values with mandelonitrile. The whole cells demonstrated a slightly enhanced nitrilase activity at pH 4 compared to the cell extracts. Surprisingly, the cells demonstrated the highest conversion rates for mandelonitrile at pH 5–6 (Fig. 6).

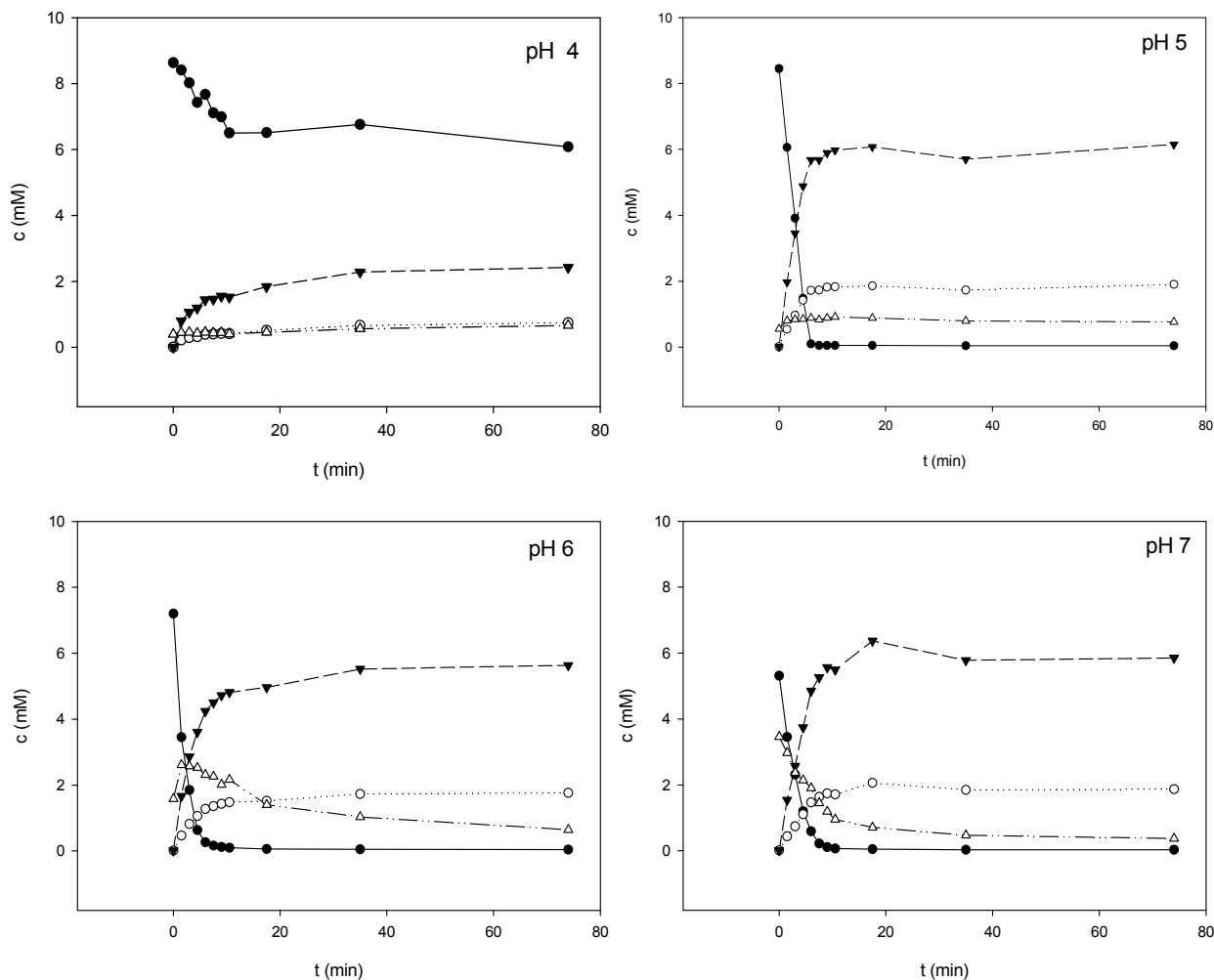


Fig. 6. Conversion of racemic mandelonitrile by resting cells of *E. coli* JM109(pIK9) at different pH-values. *E. coli* JM109(pIK9) was grown in dYT-medium plus ampicillin, the nitrilase induced by the addition of rhamnose, harvested by centrifugation and resuspended in Na-phosphate buffer (pH 7) to an optical density (OD_{600nm}) of 7.8. The reaction mixtures contained in a total volume of 1.5 ml the respective citrate buffers (100 mM), 10 mM mandelonitrile (from a 1 M stock solution in methanol), and 21 μ l of the resting cell suspension (corresponding to 0.1 mg of soluble protein/ml). The turn-over of the substrate was analysed by HPLC. The reaction mixtures were incubated at 34 °C in an Eppendorf shaker at 1400 rpm. Aliquots (70 μ l each) were taken at the indicated time intervals. The reactions were terminated by the addition of 7 μ l 1 M HCl and the samples immediately frozen in liquid nitrogen. Finally, the aliquots were thawed and the turn-over of mandelonitrile (●) and the formation of mandeloamide (○), mandelic acid (▼), and benzaldehyde (△) analysed by HPLC.

Conversion of different concentrations of mandelonitrile by cell extracts and resting cells of *E. coli* JM109(pIK9). The experiments described above were all performed using an initial concentration of mandelonitrile of 10 mM. These experiments suggested that the whole cell system was superior to the cell free system under acidic conditions. Both systems were also compared using different initial mandelonitrile concentrations (25, 50, 100, 150, or 200 mM). The whole cell system and the cell-free system were able to convert up to 100 mM mandelonitrile within 30 min, but it appeared that the specific activities found in the whole cell system were generally slightly higher than the activities found with cell extracts (Fig. 7). This suggested that no significant transport limitations occurred during the transport of the substrate and the product into and out of the cells. The superiority of the intact cells was especially evident with an initial concentration of 150 mM mandelonitrile, because this concentration was only converted by resting cells but not by cell extracts (Fig. 7).

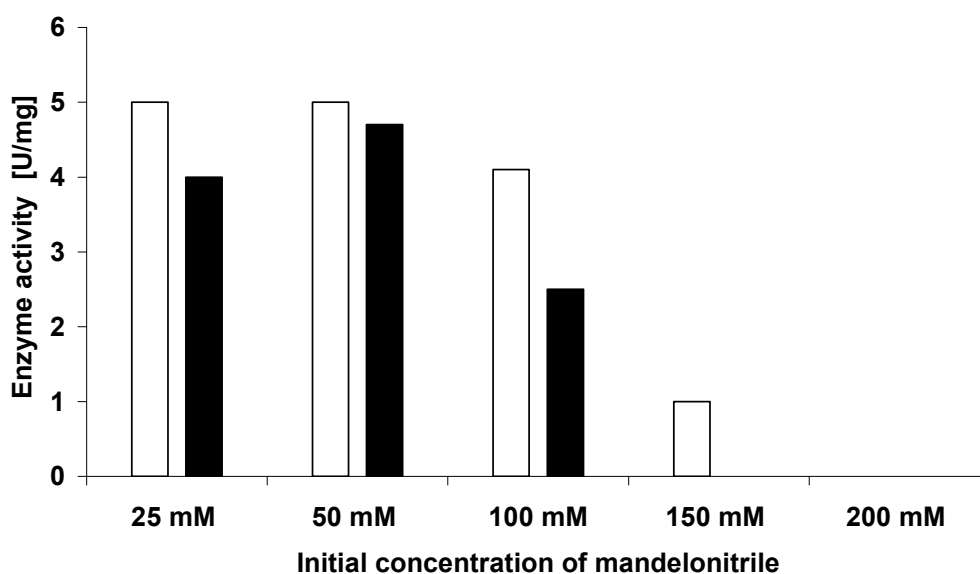


Fig. 7. Conversion of different concentrations of mandelonitrile by cell extracts (black bars) and resting cells (open bars) of *E. coli* JM109(pIK9). The reactions were performed in 1.5 ml Na-citrate buffer (100 mM, pH 5). The reaction mixtures contained 1 mg/ml cell extract or the equivalent amount of bacterial cells. Mandelonitrile was added from a methanolic stock solution (5 M) to the reaction mixture to the indicated initial concentrations. Aliquots (70 μ l) were taken each 2.5 min during the first 20 min of the reaction and then every 10 min for 80 min. The reactions were terminated by the addition of 7 μ l 1 M HCl directly followed by freezing in liquid nitrogen. Finally, the samples were diluted and analysed by HPLC.

Conversion of the separate enantiomers of mandelonitrile by resting cells of *E. coli* JM109(pIK9) at pH 5 or 7. The results obtained suggested that a whole cell system at pH 5 should be optimal for the enantioconservative hydrolysis of mandelonitrile enantiomers. In order to prove this, samples of (*R*-) and (*S*-)mandelonitrile were incubated at pH 5 or 7 with resting cells of *E. coli* JM109(pIK9). These experiments demonstrated that the resting cells formed at pH 5 a much higher proportion of (*S*-)mandeloamide from (*S*-)mandelonitrile than (*R*-)mandeloamide from (*R*-)mandelonitrile (Fig. 8). This had previously also been observed (at pH 5.5) for cell extracts of the recombinant *E. coli* strain (Mateo *et al.* 2006b).

The experiments suggested that at pH 7 about twice as much mandeloamide was formed from (*R*-)mandelonitrile than at pH 5. Furthermore, it appeared that this situation was reversed during the conversion of (*S*-)mandelonitrile. In this case the relative amount of mandeloamide formed was considerably higher when the reaction was performed at pH 5 (Fig. 8). These results could be explained by the rapid racemization of (*R*-) and (*S*-)mandelonitrile at neutral pH-values and the differences in the rates of amide formation from the individual mandelonitrile enantiomers (see Section 4).

The chiral analysis of the reaction mixtures at the end of the reactions using chiral HPLC clearly demonstrated that at pH 5 the (*S*-)mandelonitrile was almost exclusively converted to (*S*-)mandelic acid without any detectable signal for the (*R*-)mandelic acid and that in-turn also the conversion of (*R*-)mandelonitrile lead to the formation of (*R*-)mandelic acid without significant amounts of (*S*-)mandelic acid. In contrast, at pH 7 an almost racemic mixture of mandelic acid was obtained starting with either (*S*-) or (*R*-)mandelonitrile.

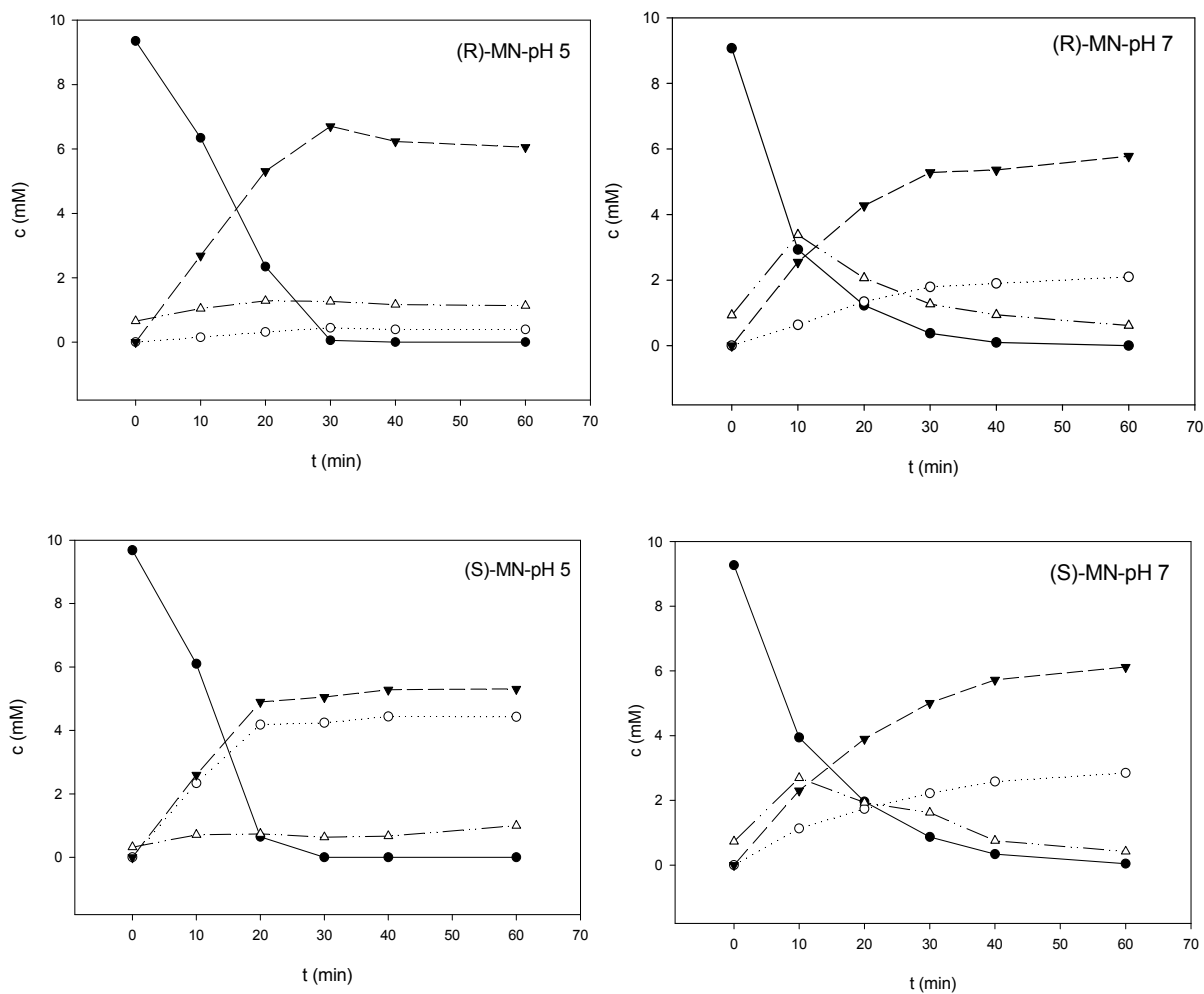


Fig. 8. Conversion of (*R*)- and (*S*)-mandelonitrile by resting cells of *E. coli* JM109(pIK9) at different pH-values. The reaction mixtures contained in a total volume of 1.5 ml 75 μ l of 500 mM Na/K-phosphate buffer (pH 7) or 500 mM Na-citrate buffer (pH 5), 75 μ l of a methanolic stock solution containing 200 mM (*S*)- or (*R*)-mandelonitrile and 1 μ l of a resting cell suspension of *E. coli* JM109(pIK9) with an optical density (OD_{546nm}) of about 100. The reaction mixtures were incubated at 30 $^{\circ}$ C in an Eppendorf shaker at 1400 rpm. Samples (180 μ l each) were withdrawn at the indicated time intervals and the reactions terminated by the addition of 20 μ l 1 M HCl. The concentrations of mandelonitrile (●), mandeloamide (○), mandelic acid (▼), and benzaldehyde (Δ) were determined by HPLC.

Conversion of phenylglycinenitrile. It was previously demonstrated that the purified nitrilase from *P. fluorescens* EBC191 converted phenylglycinenitrile at pH 7.5 with about 80 % of the activity found with mandelonitrile (Kiziak *et al.* 2005) Because it was shown above that also phenylglycinenitrile underwent some spontaneous decomposition at neutral pH-values, the reaction was analysed in more detail. The reaction was performed at pH 7 using an amount of cells of *E. coli* JM109(pIK9) which allowed the conversion of the substrate within about 30 min. The reaction was analysed by non-chiral and chiral HPLC and it was found that the enzyme preferentially converted (*S*)-phenylglycinenitrile to (*S*)-phenylglycine. Furthermore, also significant amounts of (*S*)-phenylglycineamide were detected as by-product, but only very low amounts of (*R*)-phenylglycineamide (Fig. 9A).

Benzaldehyde and mandelic acid were potential by-products of this reaction, because they could be formed by the chemical decomposition of phenylglycinenitrile to benzaldehyde, ammonia, and cyanide, and the subsequent chemical formation of mandelonitrile from benzaldehyde and HCN followed by the enzymatic hydrolysis of mandelonitrile by the nitrilase (see Section 1). Therefore, the formation of benzaldehyde and mandelic acid was analysed during the enzymatic conversion of phenylglycinenitrile and compared to the rate of the spontaneous formation of benzaldehyde and mandelonitrile from phenylglycinenitrile incubated under the same conditions, but with cells of *E. coli* which did not contain the cloned nitrilase gene (*E. coli* JM109(pJOE2702)). Thus, it was found that in the absence of the nitrilase indeed benzaldehyde and a small amount of mandelonitrile were formed during the reaction period (Fig. 9B). In contrast, in the presence of the nitrilase forming cells a significantly lower amount of benzaldehyde was formed (Fig. 9B) and only a very small amount (<0.1 mM) of mandelic acid was formed. This demonstrated that an efficient conversion of phenylglycinenitrile should be possible already at neutral pH-values and does not require especially acidic conditions.

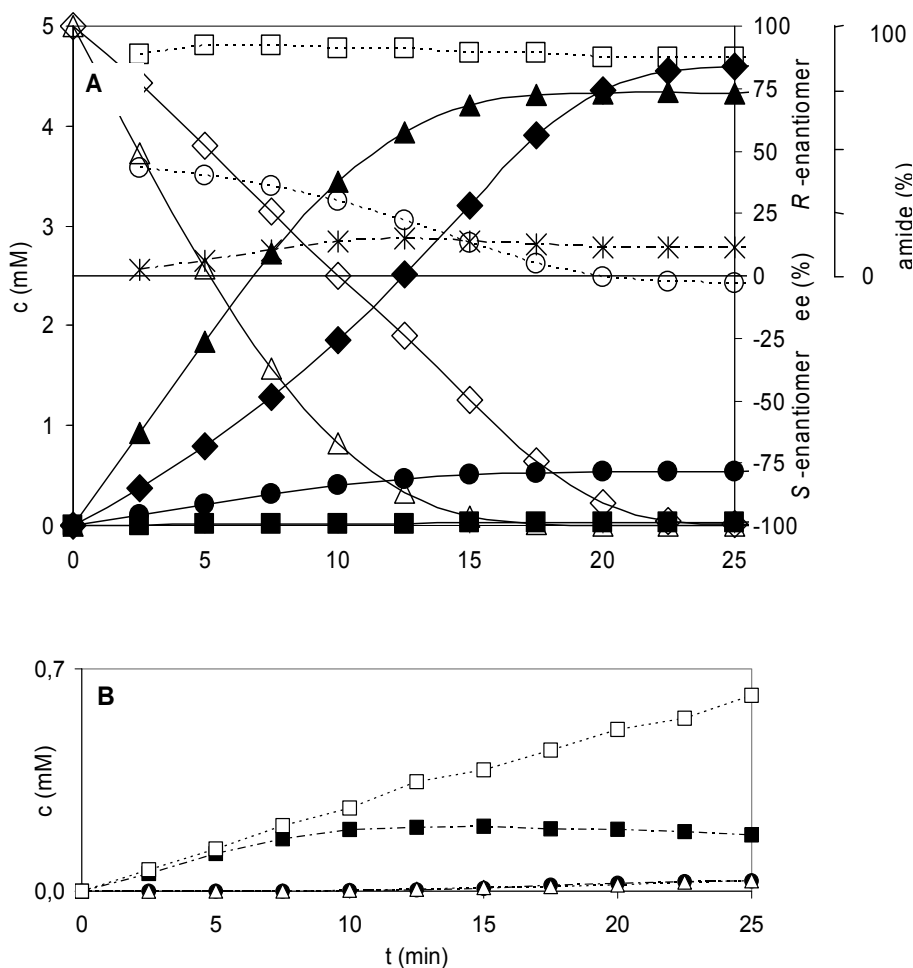


Fig. 9. Conversion of phenylglycinenitrile by resting cells of *E. coli* JM109(pIK9). The cells of *E. coli* JM109(pIK9) were grown with LB plus ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and induced with rhamnose as described under Section 2 (*E. coli* JM109(pJOE2002), which carried the nitrilase-free expression vector was used as control in figure B). The reaction mixtures contained 1365 μl Tris/HCl (100 mM, pH 7.5), 35 μl of the resting cell suspensions (OD = 2), and 74 μl of a stock solution of phenylglycinenitrile·HCl (200 mM in methanol). The reactions were performed at 30 $^{\circ}\text{C}$ in an Eppendorf-shaker. Aliquots (100 μl each) were taken at the indicated time intervals and the reactions terminated by the addition of 100 μl 0.2 M HCl and frozen in liquid nitrogen. Finally, the samples were thawed and the turn-over of the substrates analysed by HPLC. (A) The concentrations of (◇) *R*-phenylglycinenitrile, (Δ) *S*-phenylglycinenitrile, (■) *R*-phenylglycineamide, (●) *S*-phenylglycineamide, (◆) *R*-phenylglycine, and (▲) *S*-phenylglycine were determined using chiral HPLC. The ee-values for (○) phenylglycine and (□) phenylglycineamide and the (*) relative proportion of phenylglycineamide on the total amounts of products formed were calculated from the results of the HPLC analysis. (B) The amounts of benzaldehyde (□ and ■), mandelonitrile (Δ), and mandelic acid (●) formed during the turn-over of phenylglycinenitrile in the presence of *E. coli* JM109(pIK9) (filled symbols) or *E. coli* (pJOE2702) (open symbols) were determined using chiral HPLC.

DISCUSSION

Although there have been several reports about the enzymatic conversion of mandelonitrile by bacterial nitrilases (Ziegler *et al.* 1990, Yamamoto *et al.* 1992, Ress-Löschke *et al.* 1998, Banerjee *et al.* 2006, Banerjee *et al.* 2003), there is only a single publication about the utilization of a recombinant nitrilase (obtained from *Alcaligenes faecalis* ATCC8750) for this reaction (Rey *et al.* 2004). A comparison of the reported specific activities of the wild type organisms with mandelonitrile converting activities with the recombinant strain used here demonstrated that the process using the recombinant organism would be clearly superior. Thus, for cell extracts from *A. faecalis* ATCC 8750 mandelonitrile converting activities of only 0.044 U/mg of protein were reported (Yamamoto *et al.* 1991), and for whole cells of *Pseudomonas putida*, *Microbacterium paraoxydans*, and *Microbacterium liquefaciens* specific activities of 0.31–0.51 U/mg have been described (Kaul *et al.* 2004). In contrast, induced whole cells of *E. coli* JM109(pIK9) converted mandelonitrile with a specific activity of more than 10 U/mg of protein. Also the purified nitrilase from *P. fluorescens* EBC 191 (=32.8 U/mg of protein) showed a much higher specific activity with mandelonitrile than the *R*-enantioselective enzymes from *A. faecalis* ATCC 8750 or *P. putida* (=3.1–3.26 U/mg of protein) (Yamamoto *et al.* 1992, Kiziak *et al.* 2005, Banerjee *et al.* 2006). This might suggest that the ability of the nitrilase from *P. fluorescens* EBC191 to convert both mandelonitrile enantiomers might be connected with an enhanced specific activity compared to the enantioselective enzymes. Furthermore, this might suggest that not only for the synthesis of (*S*)-mandelic acid, but also for the production of (*R*)-mandelic acid a bienzymatic process with a highly enantioselective oxynitrilase and a non-enantioselective nitrilase could be competitive with the established process.

The conversion of mandelonitrile by cell extracts of *E. coli* JM109(pIK9) has already been demonstrated before (Kiziak *et al.* 2005, Mateo *et al.* 2006a, 2006b). The comparison of the mandelonitrile converting activities of the whole cell system and the cell-free system in respect to acid tolerance, substrate tolerance and also specific activities clearly demonstrated the superiority of the whole cell systems. Surprisingly, whole cells and cell extracts of *E. coli* JM109(pIK9) converted mandelonitrile with the highest specific activities at pH-values of about 5. In contrast, it was earlier described that the purified nitrilase demonstrated in vitro with 2-phenylpropionitrile a pH-optimum in the range of 6–8.5 and less than 10 % of its optimal activity at pH 4.9 (Kiziak *et al.* 2005). This demonstrated that the enzyme in general prefers neutral to alkaline pH-values during the conversion of chemically stable substrates. At these pH-values mandelonitrile rapidly decomposed to potentially inhibitory compounds such as HCN and/or benzaldehyde (Rey *et al.* 2004). Nevertheless in all previously described investigations about the

enzymatic conversion of mandelonitrile by nitrilases neutral or even slightly alkaline pH-values were used (Yamamoto *et al.* 1991, Kaul *et al.* 2004). Presumably, the apparent preference of the enzyme for the formation of mandelic acid at pH 5 occurred because at this pH-value the enzyme still showed significant activity and also the amount of mandelonitrile which was available for the enzyme was still high (Fig. 5).

It was previously shown that the nitrilase from *P. fluorescens* EBC 191 produces significant amounts of the corresponding amides (in addition to the carboxylic acids) during the conversion of certain nitriles and it was suggested that the relative amounts of amides formed correlated with the negative inductive effects of the substituents in the α -position of the nitrile. In accordance with this rather high amounts of mandeloamide (almost 20 % of the mandelonitrile converted) are formed by the nitrilase from racemic mandelonitrile (Kiziak *et al.* 2005). Recently, we reported that at pH 5.5 cell extracts from *E. coli* JM109(pIK9) converted (*S*)-mandelonitrile to almost equimolar concentrations of (*S*)-mandeloamide and (*S*)-mandelic acid. In contrast, (*R*)-mandelonitrile was preferentially converted to (*R*)-mandelic acid and only less than 15 % of the nitrile was hydrated to (*R*)-mandeloamide (Mateo *et al.* 2006b). These experiments were basically confirmed at pH 5 with the whole cells investigated during the present study. The comparison of these experiments at acidic pH-values with the attempts to perform the conversion of the pure nitrile-enantiomers at a pH of 7 demonstrated some significant differences. Thus, it appeared that at pH 7 (*R*)-mandelonitrile was converted to more mandeloamide than at pH 5 (Fig. 8). In contrast, the turn-over of (*S*)-mandelonitrile resulted in a higher degree of amide at pH 5 than at pH 7. Although these results were initially puzzling, they could be explained from the differences in the stability of mandelonitrile at pH 5 and 7 and the differences in the degree of amide formation from (*S*)- or (*R*)-mandelonitrile. Thus, at pH 5 (*R*)- and (*S*)-mandelonitrile are only slowly racemized via the intermediate formation of benzaldehyde. Therefore, the observed amounts of amide formed corresponded to the true degree of amide formation from the single enantiomers. In contrast, at pH 7 a significant racemization of the enantiomers takes place prior to enzymatic conversion and therefore more amide is formed from the initially added (*R*)-mandelonitrile and less from the (*S*)-mandelonitrile.

The comparison of the stability of phenylglycinenitrile and mandelonitrile at different pH-values demonstrated that phenylglycinenitrile was much more stable at neutral pH-values than mandelonitrile and thus it appears that the conversion of the amino-compound is much less problematic than the conversion of the structural related hydroxy-compound. In connection to our previous reports about the conversion of phenylglycinenitrile by microorganisms with nitrile hydratase/amidase systems (Wegman *et al.* 2004, Wegman *et al.* 2001, Stolz *et al.* 1998). These

results propose that the conversion of aminonitriles should be considered with much more interest than previously.

In conclusion, it was demonstrated that whole cells of a recombinant *E. coli* strain with a high nitrilase activity are suitable catalysts for the conversion of amino- and hydroxynitriles although it might be necessary for unstable hydroxynitriles to decrease the pH of the reaction to lower pH-values.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the German DFG and the Dutch NWO in the framework of the CERC-3 program.

REFERENCES

- Banerjee, A., Kaul, P., Banerjee, U. C. (2006)** Purification and characterization of an enantioselective arylacetone nitrilase from *Pseudomonas putida*. Arch. Microbiol. 184:407–418.
- Banerjee, A., Kaul, P., Sharma, R., Banerjee, U. C. (2003)** A high-throughput amenable colorimetric assay for enantioselective screening of nitrilase producing microorganisms. J. Biomol. Screen. 8:559–565.
- Bauer, M., Griengl, H., Steiner, W. (1999)** Parameters influencing stability and activity of a *S*-hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis* in two-phase systems. Enzyme. Microb. Technol. 24:514–522.
- Bhalla, T. C., Miura, A., Wakamoto, A., Ohba, Y., Furuhashi, K. (1992)** Asymmetric hydrolysis of α -aminonitriles to optically active amino acids by a nitrilase of *Rhodococcus rhodochromus* PA-34. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37:184–190.
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72:248–254.
- Choi, S. Y., Goo, Y. M. (1986)** Hydrolysis of the nitrile group of aminophenylacetone nitrile by nitrilase: development of a new biotechnology for stereospecific production of *S*- α -phenylglycine. Arch. Pharm. Res. 9:45–47.
- Cobley, J. G., Cox, J. C. (1983)** Energy conservation in acidophilic bacteria. Microbiol. Rev. 47:579–595.
- Effenberger, F., Förster, S., Wajant, H., (2000)** Hydroxynitrile lyases in stereoselective catalysis. Curr. Opin. Biotechnol. 11:532–539.
- Gröger, H. (2001)** Enzymatic routes to enantiomerically pure aromatic α -hydroxy carboxylic acids: a further example for the diversity of biocatalysis. Adv. Synth. Catal. 343:547–558.
- Heinemann, U., Kiziak, C., Zibek, S., Layh, N., Schmidt, M., Griengl, H., Stolz, A. (2003)** Conversion of aliphatic 2-acetoxynitriles by nitrile-hydrolysing bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63:274–281.
- Johnson, D. V., Zabelinskaja-Mackova, A. A., Griengl, H. (2000)** Oxynitrilases for asymmetric C-C-bond formation. Curr. Opin. Chem. Biol. 4:103–109.
- Kaul, P., Banerjee, A., Mayilraj, S., Banerjee, U. C. (2004)** Screening for enantioselective nitrilases: kinetic resolution of racemic mandelonitrile to (*R*)-mandelic acid by new bacterial isolates. Tetrahedron Asym. 15:207–211.
- Kiziak, C., Conradt, D., Stolz, A., Mattes, R., Klein, J. (2005)** Nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191: cloning and heterologous expression of the gene and biochemical characterization of the recombinant enzyme. Microbiology 151:3639–3648.
- Layh, N., Stolz, A., Förster, S., Effenberger, F., Knackmuss, H.-J. (1992)** Enantioselective hydrolysis of *O*-acetylmandelonitrile to *O*-acetylmandelic acid by bacterial nitrilases. Arch. Microbiol. 58:405–411.

- Layh, N., Hirrlinger, B., Stolz, A., Knackmuss, H.-J. (1997)** Enrichment strategies for nitrile-hydrolysing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47:668–674.
- Mateo, C., Fernandes, B., van Rantwijk, F., Stolz, A., Sheldon, R. A. (2006a)** Stabilisation of oxygen-labile nitrilases via co-aggregation with poly(ethyleneimine). *J. Mol. Catal. B Enzymatic.* 38:154–157.
- Mateo, C., Chmura, A., Rustler, S., van Rantwijk, F., Stolz, A., Sheldon, R. A. (2006b)** Synthesis of enantiomerically pure (*S*)-mandelic acid using an oxynitrilase-nitrilase bienzymatic cascade. A nitrilase surprisingly shows nitrile hydratase activity. *Tetrahedron Asym.* 17:320–323.
- Ress-Löschke, M., Friedrich, T., Hauer, B., Mattes, R. (1998)** Verfahren zur Herstellung chiraler Carbonsäuren aus Nitrilen mit Hilfe einer Nitrilase oder Mikroorganismen, die ein Gen für eine Nitrilase enthalten. German Patent Application, DE 19848129A1.
- Rey, P., Rossi, J.-C., Taillades, J., Gros, G., Nore, O. (2004)** Hydrolysis of nitriles using an immobilized nitrilase: applications to the synthesis of methionine hydroxyl analogue derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 52:8155–8162.
- Stolz, A., Trott, S., Binder, M., Bauer, R., Hirrlinger, B., Layh, N., Knackmuss, H.-J. (1998)** Enantioselective nitrile hydratases and amidases from different bacterial isolates. *J. Mol. Catal. B* 5:137–141.
- Wegman, M. A., Heinemann, U., Stolz, A., van Randwijk, F., Sheldon, R. A. (2000)** Stereoretentive nitrile hydratase catalysed hydration of D-phenylglycine nitrile. *Org. Process. Res. Develop.* 4:318–322.
- Wegman, M. A., Heinemann, U., van Randwijk, F., Stolz, A., Sheldon, R. A. (2001)** Hydrolysis of D,L-phenylglycine nitrile by new bacterial cultures. *J. Mol. Catal. B* 11:249–253.
- Yamamoto, K., Fujimatsu, I., Komatsu, K.-I. (1992)** Purification and characterization of the nitrilase from *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 responsible for enantioselective hydrolysis of mandelonitrile. *J. Ferment Bioeng.* 73:425–430.
- Yamamoto, K., Oishi, K., Fujimatsu, I., Komatsu, K.-I. (1991)** Production of *R*-(-)-mandelic acid from mandelonitrile by *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3028–3032.
- Ziegler, T., Hörsch, B., Effenberger, F. (1990)** Ein einfacher Zugang zu (*R*)- α -Hydroxycarbonsäuren und (*R*)-1-Amino-2-alkoholen aus (*R*)-Cyanhydrinen. *Synthesis* 1990:575–578.

**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**

S. Rustler^a, H. Motejadded^b, J. Altenbuchner^b, A. Stolz^{a*}

^a*Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, Allmandring 31, 70569 Stuttgart, Germany*

^b*Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart, Allmandring 31, 70569 Stuttgart,
Germany*

*** Corresponding author. Tel: +49 (0)711 68565489, Fax: +49 (0)711 68565725**

***E-mail address:* andreas.stolz@imb.uni-stuttgart.de**

ABSTRACT

The arylacetonitrilase of *Pseudomonas fluorescens* EBC191 catalyzes the conversion of (*S*)-mandelonitrile to (*S*)-mandelic acid and (*S*)-mandeloamide. This biotransformation is optimally performed under acidic pH-values because (*S*)-mandelonitrile rapidly decomposes under neutral conditions. Therefore, the gene encoding the arylacetonitrilase of *P. fluorescens* EBC191 was integrated and expressed under the control of the *AOXI* promoter in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* which was supposed to act as an acidotolerant expression system. These recombinant strains hydrolyzed (*R,S*)-mandelonitrile at pH-values ≥ 3 to mandelic acid and mandeloamide and were more acidotolerant than previously constructed *Escherichia coli* whole cell catalysts synthesizing the same nitrilase activity. Subsequently, recombinant *P. pastoris* strains were constructed which simultaneously expressed the (*S*)-oxynitrilase of *Manihot esculenta* and the arylacetonitrilase of *P. fluorescens* EBC191 each under the control of individual *AOXI* promoters in order to obtain a whole cell catalyst for the synthesis of (*S*)-mandelic acid from benzaldehyde and cyanide. Resting cells of the recombinant strains converted under acidic conditions benzaldehyde and cyanide initially to mandelonitrile which was immediately converted to mandelic acid and mandeloamide. The chiral analysis of the products formed revealed a high enantiomeric excess for the (*S*)-enantiomers.

INTRODUCTION

Nitriles (R-CN) are used as precursors for the synthesis of a large number of economically important organic compounds such as carboxylic acids or amides. The chemical synthesis of acids and amides from nitriles has many drawbacks such as the requirement for acidic or basic reaction conditions, formation of large quantities of salts, difficulties in separation of the reaction products, and high energy consumption (Nagasawa and Yamada 1990, 1995). In contrast, the enzymatic conversion of nitriles via nitrilases or nitrile hydratases can be performed under neutral and environmentally benign reaction conditions and additionally offers the possibility to synthesize optical active carboxylic acids or amides (*e.g.*, chiral α -hydroxycarboxylic acids or α -hydroxycarboxamides) which are interesting products for the chemical industry and are often only difficult to obtain by purely chemical reactions (Singh *et al.* 2006; Gröger 2001).

Two enzymatic pathways are currently known which potentially lead to the formation of enantiomerically pure α -hydroxycarboxylic acids from aldehydes or ketones and HCN. The first pathway involves (*R*)- or (*S*)-oxynitrilases from plants which catalyze the enantioselective hydrocyanation of aldehydes or ketones (Johnson *et al.* 2000; Effenberger *et al.* 2000; Griengl *et al.* 2000). These biotransformations result in the formation of enantiomerically pure (*R*)- or (*S*)- α -hydroxynitriles which subsequently can be converted via enantioconservative nitrilases to the desired chiral (*R*)- or (*S*)- α -hydroxycarboxylic acids. The second possible pathway for the synthesis of chiral α -hydroxycarboxylic acids from aldehydes (or ketones) and HCN uses the purely chemical condensation of the oxo compounds and HCN. These reactions result in the formation of (*R,S*)- α -hydroxynitriles which can then be hydrolyzed by enantioselective nitrilases to the desired enantiomerically pure α -hydroxycarboxylic acids. Unfortunately, this method is hampered by the fact that only few truly enantiospecific nitrilases are currently known and that these nitrilases only convert mandelonitrile (and a few substituted mandelonitriles) to (*R*)-mandelic acid(s) (Yamamoto *et al.* 1991, 1992; Ress-Löschke *et al.* 1998; Kaul *et al.* 2004, 2007).

We are currently trying to establish a two-enzyme process which couples the enantioselective (*S*)-oxynitrilase from *Manihot esculenta* (cassava) with the arylacetonitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191 (Mateo *et al.* 2006). This process shall combine the advantages of both enzymes. Thus, the (*S*)-oxynitrilase from *M. esculenta* converts a wide range of aromatic, heterocyclic, and aliphatic aldehydes and ketones to (*S*)- α -hydroxynitriles and can be efficiently synthesized in *Escherichia coli* (Hughes *et al.* 1994; Wajant and Pfizenmaier 1996; Sharma *et al.* 2005). The arylacetonitrilase from *P. fluorescens* EBC191 hydrolyzes a wide range of α -substituted nitriles and enantioconservatively converts both enantiomers of mandelonitrile.

Furthermore, also for this enzyme an efficient recombinant expression system has been generated (Heinemann *et al.* 2003; Layh *et al.* 1992, 1997; Kiziak *et al.* 2005, 2007; Rustler *et al.* 2007). Unfortunately, the synthesis of enantiomerically pure (*S*)- α -hydroxycarboxylic acids by the intended two-enzyme cascade is hampered under neutral conditions by the chemical decomposition of the (*S*)- α -hydroxynitriles (formed by the oxynitrilase) and the spontaneous chemical hydrocyanation of aldehydes or ketones which lead to the formation of (*R,S*)- α -hydroxynitriles. These undesired reactions can be suppressed by using acidic reaction conditions (pH<5). Unfortunately, the arylacetoneitrilase from *P. fluorescens* EBC191 and also all other known nitrilases are in vitro rapidly inactivated at pH values lower than 5 (Banerjee *et al.* 2002; Rustler *et al.* 2007).

Most organisms try to keep their cytoplasm at almost neutral pH values when incubated in acidic media (Cobley and Cox 1983). Thus, the conversion of nitriles in media with pH<5 might be possible by using acidotolerant whole cell catalysts. We have therefore previously studied the conversion of mandelonitrile by recombinant *E. coli* strains expressing the arylacetoneitrilase from *P. fluorescens* EBC191 and demonstrated that these whole cell catalysts converted mandelonitrile at pH values ≥ 5 (Rustler *et al.* 2007). It is well known that fungi are in general more acidotolerant than bacteria (Wartenberg 1989) and it was recently shown that the black yeast *Exophiala oligosperma* R1 hydrolyzed nitriles at pH values ≥ 1.5 (Rustler and Stolz 2007). Unfortunately, the nitrilase of this strain hydrolyzed α -substituted nitriles only with low specific activities. Therefore, in the present study, it was attempted to simultaneously express the (*S*)-oxynitrilase from *M. esculenta* and the arylacetoneitrilase from *P. fluorescens* EBC191 in a fungal host strain (*Pichia pastoris*) and to study the conversion of benzaldehyde and cyanide to (*S*)-mandelic acid by the recombinant organism under acidic conditions.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms and culture conditions. Strains of *P. pastoris* were usually cultivated according to the EasySelect Pichia Expression Kit manual (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cells of *P. pastoris* x-33 (Invitrogen) were grown in YPD medium containing 1 % (w/v) yeast extract, 2 % (w/v) peptone, 2 % (w/v) glucose, and water. For selection of positive clones, *P. pastoris* x-33 transformants were plated on a modified solid YPD medium additionally containing 1.5 % (w/v) agar and 75 µg/ml zeocin. For protein production, recombinant strains of *P. pastoris* were usually grown in YPG medium consisting of 1 % (w/v) yeast extract, 2 % (w/v) peptone, and 1 % (v/v) glycerol in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6). For the induction of gene expression, the recombinant strains were incubated in YPM medium (a modified YPG medium containing 0.5 % (v/v) methanol instead of glycerol). Liquid cultures of *P. pastoris* were usually incubated for 18–120 h in Erlenmeyer flasks (1–3 l) with baffles at 30 °C on a rotary shaker (100 rpm). *E. coli* JM109 (Yanisch-Perron *et al.* 1985) was used as host for transformation. *E. coli* JM109 transformants were selected on LB agar plates [1 % (w/v) tryptone, 0.5 % (w/v) yeast extract, and 0.5 % (w/v) NaCl, pH 7.2] containing 25 µg/ml zeocin.

Growth measurements. Growth was monitored photometrically by measuring the optical density at 600 nm (OD_{600nm}) with a Cary 100 Bio spectrophotometer (Varian, Mulgrave, Australia). For *P. pastoris*, an optical density (OD_{600nm}) of 1 corresponded to about 0.33 mg of cell dry weight per milliliter of culture.

Construction of expression systems for the nitrilase from *P. fluorescens* EBC191 and the oxynitrilase from *M. esculenta* in *P. pastoris*. The gene coding for the nitrilase from *P. fluorescens* EBC191 (*nitA*) was amplified from plasmid pIK9 (Kiziak *et al.* 2005) using the primers s4652 and s4653 (Tables 1 and 2). The PCR fragment obtained was digested with *EcoRI* and *XbaI* and inserted into the *EcoRI/XbaI*-cleaved plasmid vector pPICZ-B (Table 1) to give plasmid pJOE5537 (Fig.1a).

The gene encoding the (*S*)-oxynitrilase from *M. esculenta* (MeHNL) was amplified by PCR from plasmid pQE4-MeHNLwt (Wajant and Pfizenmaier 1996) using the primer pair s4299 and s4300 (Tables 1 and 2). The PCR product was subsequently cut with *NdeI* and *HindIII* and the DNA fragment obtained ligated into the vector plasmid pAW229 which was previously cut with the same restriction enzymes. This resulted in the formation of plasmid pJOE5356 which contained the 5' part of the gene encoding the MeHNL (because there was a *HindIII* cleavage site within the PCR product). Subsequently, the PCR product obtained using the primer pair s4299 and

s4300 and plasmid pJOE5356 were cleaved with *Hind*III. The insertion of the *Hind*III fragment obtained from the PCR product into the *Hind*III-cut plasmid pJOE5356 resulted in the formation of plasmid pJOE5361 which contained the complete MeHNL gene under the control of a rhamnose inducible promoter. Plasmid pJOE5361 was cleaved with *Eco*RI and *Xba*I and the gene coding for the MeHNL (plus the rhamnose-inducible promoter sequence) was transferred into *Eco*RI/*Xba*I-cut plasmid pPICZ-B (Table 1) giving plasmid pJOE5507.

For the coexpression of the nitrilase and the (*S*)- oxynitrilase, the DNA fragment harboring *nitA* under the control of the *AOX1* promoter was cut out of plasmid pJOE5537 with *Bgl*II and *Bam*HI and cloned into the *Bgl*II site of plasmid pJOE5507. This resulted in plasmid pJOE5557, which contained a copy each of the nitrilase and oxynitrilase genes under the control of two separate *AOX1* promoters (Fig. 1b).

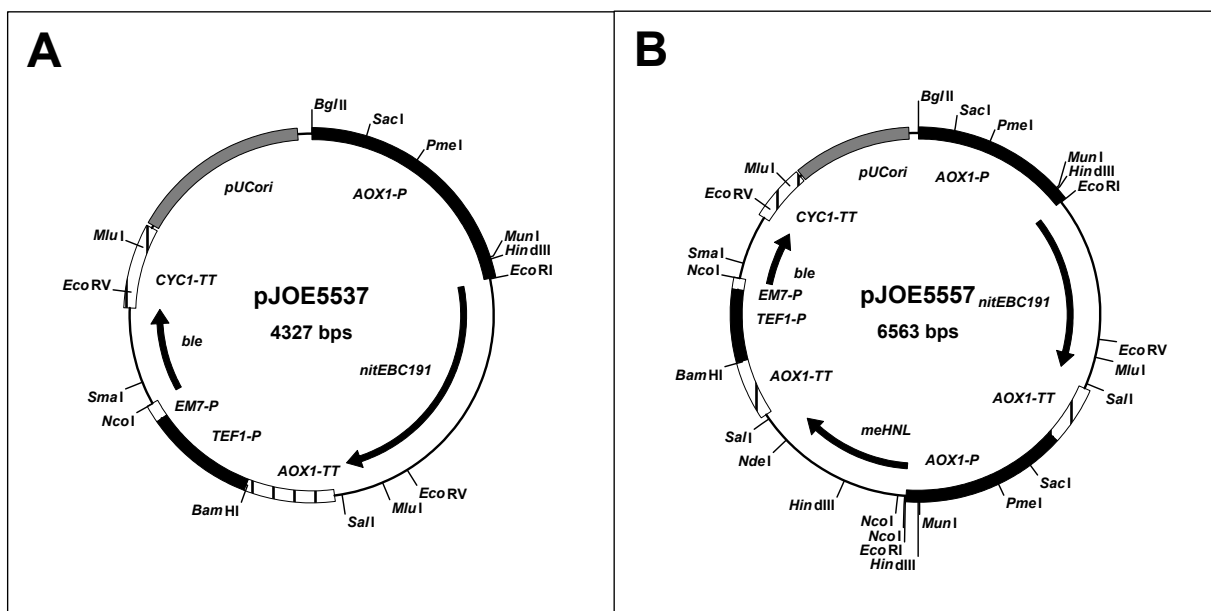


Fig. 1. Plasmid maps of constructed vector plasmids. (A) Plasmid pJOE5537 holding the gene coding for the arylacetone nitrilase of *P. fluorescens* EBC191. (B) Plasmid pJOE5557 holding the genes encoding the (*S*)-oxynitrilase from *M. esculenta* and the arylacetone nitrilase of *P. fluorescens* EBC191. Abbreviations: *AOX1-P*, *AOX1-TT* promoter and transcriptional terminator region of the *P. pastoris* alcohol oxidase *AOX1* gene; *ble* bleomycin/zeocin resistance gene from *Streptoalloteichus hindustanus*; *TEF1-P* transcription elongation factor 1 gene promoter from *Saccharomyces cerevisiae*; *EM7-P* synthetic procaryotic promoter; *CYC1-TT* transcriptional terminator region of *S. cerevisiae* *CYC1* gene; *pUCori* replication region of *E. coli* pUC plasmid.

Table 1 Plasmids used or constructed in the present study

Plasmid	Relevant characteristics	Source or reference,
pAW229	Cam ^r	Wilms <i>et al.</i> 2001
pPICZ-B	<i>E. coli/P. pastoris</i> shuttle vector; methanol inducible <i>AOXI</i> - <i>P</i> , ble ^r	Invitrogen (Carlsbad, CA)
pIK9	Plasmid pJOE2775 with the nitrilase gene from <i>P. fluorescens</i> EBC191 carrying a C-terminal (His) ₆ -tag	Kiziak <i>et al.</i> 2005
pQE4-MeHNLwt	Gene encoding the oxynitrilase from <i>M. esculenta</i> cloned into plasmid pQE4	Wajant & Pfizenmaier 1996
pJOE5356	Part of the gene encoding the oxynitrilase from <i>M. esculenta</i> cloned into plasmid pAW229	This study
pJOE5361	Complete gene encoding the oxynitrilase from <i>M. esculenta</i> cloned into plasmid pAW229	This study
pJOE5507	Gene encoding the oxynitrilase from <i>M. esculenta</i> cloned into plasmid pPICZ-B	This study
pJOE5537	<i>nitA</i> from <i>P. fluorescens</i> EBC191 in pPICZ-B	This study
pJOE5557	Genes for the nitrilase from <i>P. fluorescens</i> and the oxynitrilase from <i>M. esculenta</i> under the control of the <i>AOXI</i> promoter in pPICZ-B	This study

Table 2 Oligonucleotide primers used in the present study

Primer name	Application	Primer sequence (5'→3')
s4652	Amplification of <i>nitA</i> from <i>P. fluorescens</i> EBC191	AAAAAAGAATTCACCATGACGGTGCATAAA AAACAG
s4653	Amplification of <i>nitA</i> from <i>P. fluorescens</i> EBC191	AAAAAATCTAGATTACTTGTGCGCCTTGCTCTT C
s4299	Amplification of the gene coding for the oxynitrilase from <i>M. esculenta</i> from plasmid pEQ4-MeHNLwt	AAAAAACATATGGTAACTGCACATTTTGTT
s4300	Amplification of the gene coding for the oxynitrilase from <i>M. esculenta</i> from plasmid pEQ4-MeHNLwt	AAAAAAAGCTTAAGCATATGCATCAGCCAC
MeHNL-F	Amplification of the gene coding for the oxynitrilase from <i>M. esculenta</i> from plasmid pJOE5557.2, pJOE5557.8, pJOE5507 and pJOE5361	ATGGTAACTGCACATTTTGTTCTGATTCATA CC
MeHNL-R	Amplification of the gene coding for the oxynitrilase from <i>M. esculenta</i> from plasmid pJOE5557.2, pJOE5557.8, pJOE5507 and pJOE5361	TCAAGCATATGCATCAGCCACCTCTTG

Linearization and transformation of the constructed plasmids and selection in *P. pastoris*.

The constructed plasmids pJOE5507 and pJOE5537 were linearized with *PmeI* and pJOE5557 with *BglII* and subsequently integrated into the genome of LiCl competent cells of *P. pastoris* x-33 according to the EasySelect Pichia Expression Kit manual (Invitrogen). For selection of positive clones, the cells were plated on YPD agar plates containing 75 µg/ml zeocin and incubated at 30 °C for 2–4 days. Several clones were arbitrarily selected and screened for the presence of the arylacetonitrilase as described below.

Genetic evidence for the integration of the (*S*)-oxynitrilase gene in *P. pastoris* pJOE5557.2 and pJOE5557.8.

The recombinant strains of *P. pastoris* were grown for 48 h on LB agar plates. Single colonies were resuspended in 30 µl of sterile H₂O and incubated for 10 min at 100 °C in a thermostat. Cell debris was removed by centrifugation (21,000×g, 2 min, 4 °C) and the supernatants were subsequently used for the PCR reactions. For the amplification of the oxynitrilase gene, 2 µl of the DNA preparations was mixed with 2 µl each (10 pmol/µl) of the oxynitrilase primers MeHNL-F and MeHNL-R (Hughes *et al.* 1994; Table 2), 5 µl PCR buffer, 4 µl dNTPs (2.5 mM; Eppendorf AG, Hamburg, Germany), 1 µl Taq DNA polymerase (1 U/µl) (Eppendorf), and 34 µl of sterile H₂O. The PCR reactions were performed by subjecting the reaction mixtures to the following conditions: 1×2 min 96 °C; 30×[1 min 60 °C, 1 min 68 °C, 0.5 min 96 °C]; 1×1 min 60 °C; 1×4 min 68 °C; and finally 4 °C.

Heterologous expression of the nitrilase and (*S*)-oxynitrilase in *P. pastoris*. The cells were grown in Erlenmeyer flasks (1 l) with baffles in YPG medium on a rotary shaker (100 rpm) at 30 °C. The optical densities (OD_{600nm}) of the cultures were determined after 18 h of growth (the cells usually reached an OD_{600nm} of 4–6) and the cells were harvested by centrifugation (11,000×g, 10 min, 4 °C). The cells were washed twice in 0.1 M K-phosphate buffer (pH 6) and resuspended to an OD_{600nm} of 1 in YPM medium (500 ml) for enzyme induction. These cell suspensions were subsequently transferred to Erlenmeyer flasks with baffles (3 l) and incubated at 30 °C on a rotary shaker (100 rpm). Every 24 h, the cultures were supplemented with methanol (0.5 % v/v). The optical densities (OD_{600nm}) of the cultures were determined after 96 h of incubation and the cells were harvested by centrifugation (11,000×g, 10 min, 4 °C). The cells were washed with 0.1 M K-phosphate buffer (pH 6) and either directly used for enzyme assays or frozen in liquid nitrogen and stored at –70 °C for later experiments. In order to exclude an influence of the freezing step on the acid tolerance and nitrilase activity, the specific activities of freshly prepared resting cells and cells which were previously frozen in liquid nitrogen and

stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ were compared during the conversion of mandelonitrile at pH 4. However, no significant differences were observed.

Enzyme assays. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that converted 1 μmol of substrate per minute.

The nitrile-hydrolyzing activities of the cells were determined in reaction mixtures (1.5–2 ml) usually containing 0.1 M K-phosphate buffer (pH 6), an appropriate amount of cells (usually $\text{OD}_{600\text{nm}} \sim 10\text{--}15$), and mandelonitrile (10–20 mM). The stock solutions of mandelonitrile (1 M) were routinely prepared in methanol. The reactions were performed in 2-ml reaction tubes in a thermoshaker at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 1,400 rpm (Thermomixer Comfort, Eppendorf) and started by the addition of the substrate. After different time intervals, samples (50–100 μl) were taken and the reactions were stopped by adding 1 M HCl (5–10 μl). The cells were removed by centrifugation (21,000 $\times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) and the supernatants analyzed by using high pressure liquid chromatography (HPLC).

The compounds were identified and quantified by the use of authentic standards. The nitrilase activity of the cells was usually calculated based on the formation of mandelic acid and related to the applied dry weight of cells.

Analytical methods. Concentrations of benzaldehyde, mandelonitrile, mandelic acid, and mandeloamide were analyzed by HPLC (ChemStation LC3D, Autosampler G1329A, Thermostat 1330B, Diode Array Detector G1315B, Quat-HPLC pump G1311A; Agilent Technologies, Santa Barbara, CA, USA). The samples were cooled at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the columns were incubated at $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a column heater/chiller (Jones Chromatography Model 7956, Alltech Associates Inc., Hesperia, CA, USA). The individual compounds were detected spectrophotometrically at 210 nm.

The standard analysis was performed by using a reversed phase column [125 \times 4 mm (internal diameter), Trentec, Gerlingen, Germany] filled with 5- μm diameter particles of Lichrospher-RP8 endcapped (E. Merck AG, Darmstadt, Germany). The mobile phase usually contained 40 % (v/v) methanol, 0.3 % (v/v) H_3PO_4 , and H_2O .

The chiral analysis of mandelic acid and mandeloamide was performed by using a Chiral HSA150.4 column [150 \times 4 mm (internal diameter), Chromtech AB, Hägersten, Sweden]. The mobile phase consisted of 0.5 % (v/v) isopropanol in 20 mM Na-phosphate buffer (pH 6).

Chemicals. All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Germany) or E. Merck AG (Darmstadt, Germany). (*S*)- and (*R*)-mandelonitrile were synthesized

as described previously (Rustler *et al.* 2007). The enzymes for DNA manipulation were purchased from Roche Diagnostics and NEB and used according to the suggestions of the manufacturers. Oligonucleotides were obtained from Operon Biotechnologies GmbH (Köln, Germany).

RESULTS

Screening of recombinant *P. pastoris* strains for nitrilase activity. The gene coding for the nitrilase of *P. fluorescens* EBC191 was cloned under the control of the *AOX1* promoter and integrated into the genome of *P. pastoris*. Six clones (*P. pastoris* pJOE5537.1 to 6) were grown in YPM medium and resting cells assayed in K-phosphate buffer (pH 6) for nitrilase activity as described in the Materials and methods section. All strains tested converted mandelonitrile to mandelic acid and mandeloamide in a ratio of about 4:1 (exemplarily shown for pJOE5537.4 in Fig. 2a). In this experiment, about 30 % of the initially added amount of mandelonitrile decomposed to benzaldehyde (and presumably cyanide). The specific activities of the nitrilase reaction were calculated as about 0.08 U/mg of dry weight based on the formation of mandelic acid. No formation of mandelic acid and mandeloamide was observed in control experiments without cells or with *P. pastoris* cells without the integrated arylacetonitrilase gene (Fig. 2b).

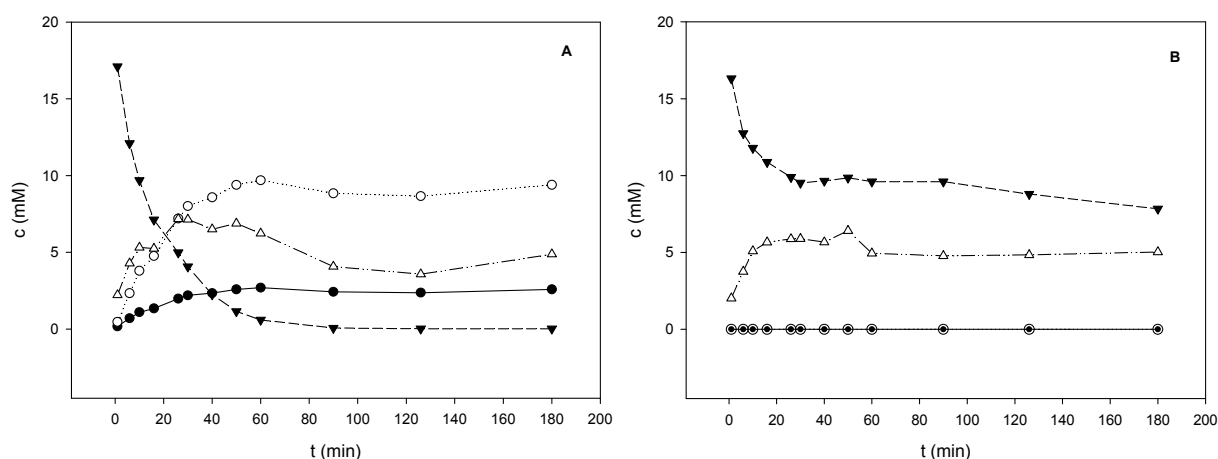


Fig. 2. Turnover of mandelonitrile by resting cells of *P. pastoris* pJOE5537.4. **A** Cells of the recombinant strain were grown and induced in 50 ml of YPM medium in 500-ml Erlenmeyer flasks according to the standard procedure described in the Materials and methods section. The cells were harvested by centrifugation ($11,000\times g$, 10 min, 4 °C) and resuspended in 0.1 M K-phosphate buffer (pH 6) to an OD_{600nm} of 10. The cell suspension was transferred into a 2-ml Eppendorf tube and incubated in a thermoshaker (30 °C, 1,400 rpm). The reaction was started by the addition of mandelonitrile (20 mM). After different time intervals, samples were taken and the reactions terminated by the addition of 10 % (v/v) 1 M HCl. Cells were removed by centrifugation ($21,000\times g$, 10 min, 4 °C) and the supernatants analyzed by HPLC. The concentrations of mandelonitrile (\blacktriangledown), mandelic acid (\circ), mandeloamide (\bullet), and benzaldehyde (Δ) were determined by HPLC. **B** Chemical decomposition of 20 mM mandelonitrile (\blacktriangledown) to benzaldehyde (Δ) in a reaction mixture containing 0.1 M K-phosphate buffer (pH 6).

Conversion of mandelonitrile by resting cells of *P. pastoris* pJOE5537.4 at pH 2–7. Resting cells of *P. pastoris* pJOE5537.4 converted mandelonitrile at pH values of 3 to 7 to mandelic acid and mandeloamide (Fig. 3). The ratios of mandelic acid to mandeloamide formed were at all pH values similar to the ratio found in the previous experiment. Increasing pH values correlated with increased amounts of benzaldehyde formed by the spontaneous chemical decomposition of mandelonitrile. The resting cells demonstrated the highest specific activity (about 0.13 U/mg of dry weight) when incubated at pH 5. In contrast, significantly lower reaction rates were observed at pH 4 and pH 3 and almost no mandelic acid and mandeloamide were formed at pH 2.

Construction of recombinant *P. pastoris* strains simultaneously expressing (*S*)-oxynitrilase and nitrilase activities. The preceding experiments demonstrated that resting cells of recombinant *P. pastoris* strains were capable of hydrolyzing mandelonitrile at pH values ≥ 3 . Under these conditions, the chemical decomposition of mandelonitrile to benzaldehyde and cyanide was almost completely suppressed. Thus, the chemical formation of (*R,S*)-mandelonitrile from benzaldehyde and cyanide should also be suppressed, and this in turn should allow the enzyme-catalyzed formation of (*S*)-mandelonitrile by the oxynitrilase and the subsequent enantioconservative hydrolysis of (*S*)-mandelonitrile to (*S*)-mandelic acid by the nitrilase activity of the investigated system.

Therefore, the genes encoding the (*S*)-oxynitrilase of *M. esculenta* and the nitrilase of *P. fluorescens* EBC191 were cloned together on plasmid pJOE5557 under the control of two separate *AOX1* promoters and the construct integrated into the genome of *P. pastoris* (see Materials and methods). Sixteen clones (*P. pastoris* pJOE5557.1–16) were arbitrarily selected and screened for the presence of the arylacetone nitrilase. Two positive clones were identified (*P. pastoris* pJOE5557.2 and pJOE5557.8) which converted mandelonitrile to mandelic acid and mandeloamide in a ratio of approximately 4:1. Specific activities of about 0.18 U/mg of dry weight (*P. pastoris* pJOE5557.2) and 0.07 U/mg of dry weight (*P. pastoris* pJOE5557.8) were calculated based on the formation of mandelic acid.

The gene encoding the (*S*)-oxynitrilase from *M. esculenta* was amplified from *P. pastoris* pJOE5557.2 and *P. pastoris* pJOE5557.8 in order to demonstrate the integration of the gene into the genomes of the recombinant strains (see Materials and methods). The PCR resulted in the amplification of DNA fragments of approximately 0.7–0.8 kb (expected 777 bp) from *P. pastoris* pJOE5557.2 and *P. pastoris* pJOE5557.8. In contrast, no DNA fragments were amplified from the negative controls *P. pastoris* pJOE5537.4 and *E. coli* JM109.

Conversion of mandelonitrile by resting cells of *P. pastoris* pJOE5557.2 at pH 2–7. The simultaneous expression of the nitrilase and oxynitrilase activities in *P. pastoris* pJOE5557.2 should influence the conversion of mandelonitrile, because this substrate could be converted by both enzymes. Therefore, methanol-induced resting cells of *P. pastoris* pJOE5557.2 were incubated with mandelonitrile at pH 2–7 under the same conditions as used previously for *P. pastoris* pJOE5537.4.

The experiments demonstrated that *P. pastoris* pJOE5557.2 was also able to convert mandelonitrile at pH values of 3 to 7 (Fig. 4). Mandelonitrile was converted to mandelic acid and mandeloamide and the product ratios were similar to the ratios observed previously with cells of *P. pastoris* pJOE5537.4. In contrast, *P. pastoris* pJOE5557.2 formed at pH values of 6 to 4 significantly higher amounts of benzaldehyde (about twice as much within the first 10 min of the reactions) than *P. pastoris* pJOE5537.4. This indicated the enzymatic conversion of mandelonitrile to benzaldehyde and cyanide by the integrated (*S*)-oxynitrilase activity.

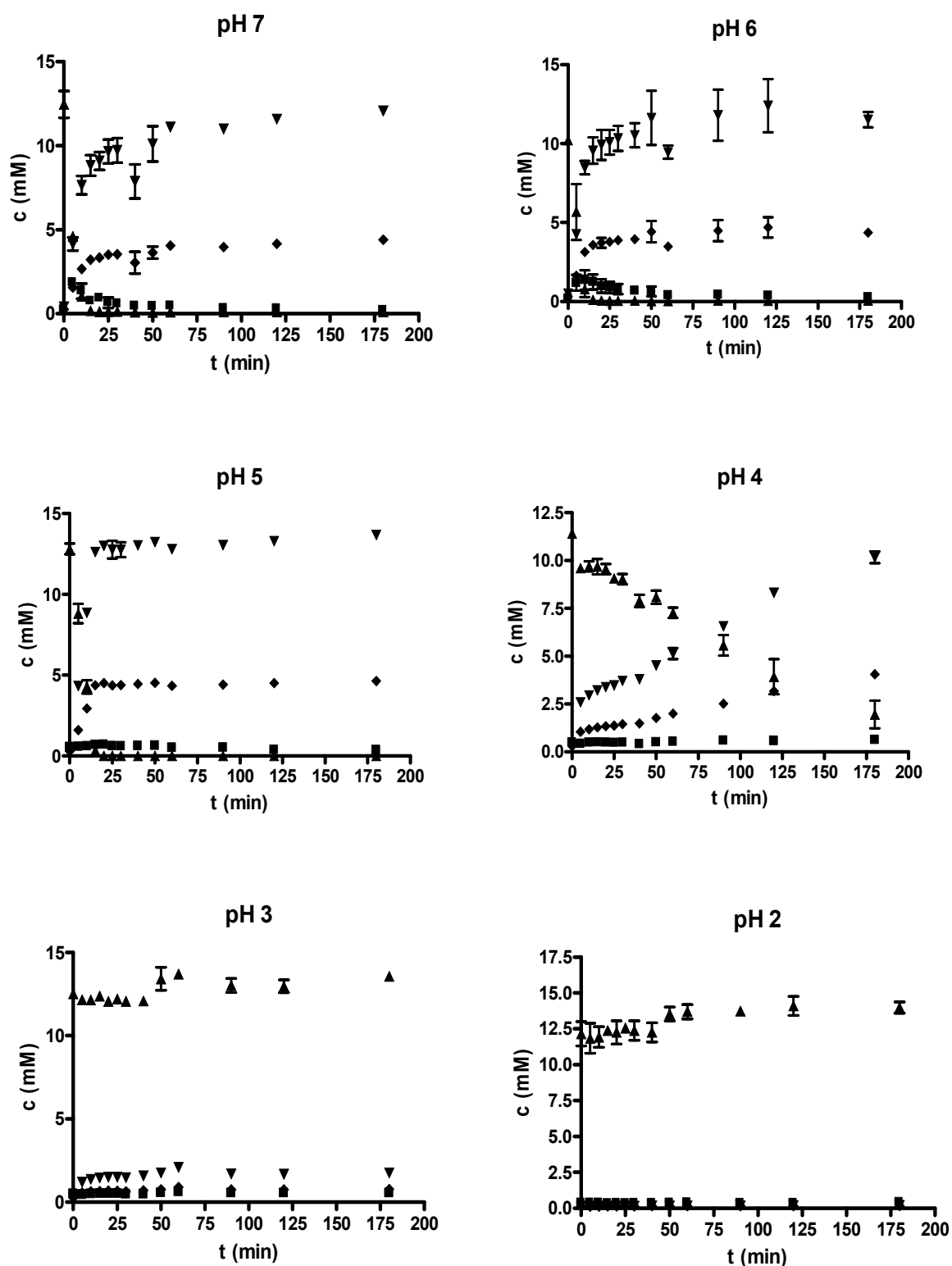


Fig. 3. Conversion of mandelonitrile by resting cells of *P. pastoris* pJOE5537.4 at pH 2–7. The cells were grown and induced according to the standard procedures described in the Materials and methods section. The cells were thawed and resuspended in 0.1 M Na-citrate–phosphate buffer (pH 2–5), K-phosphate buffer (pH 6), or Tris/HCl buffer (pH 7) to an OD_{600nm} of 25. The cell suspensions (2 ml) were transferred into 2-ml Eppendorf tubes and incubated in a thermoshaker (30 °C, 1,400 rpm). The reactions were started by the addition of mandelonitrile (15 mM). After different time intervals, samples (100 μ l each) were taken and the reactions stopped by adding 1 M HCl (10 μ l). Cells were removed by centrifugation (21,000 \times g, 10 min, 4 °C) and the concentrations of mandelonitrile (▲), mandelic acid (▼), mandeloamide (◆) and benzaldehyde (■) in the supernatants analyzed by HPLC.

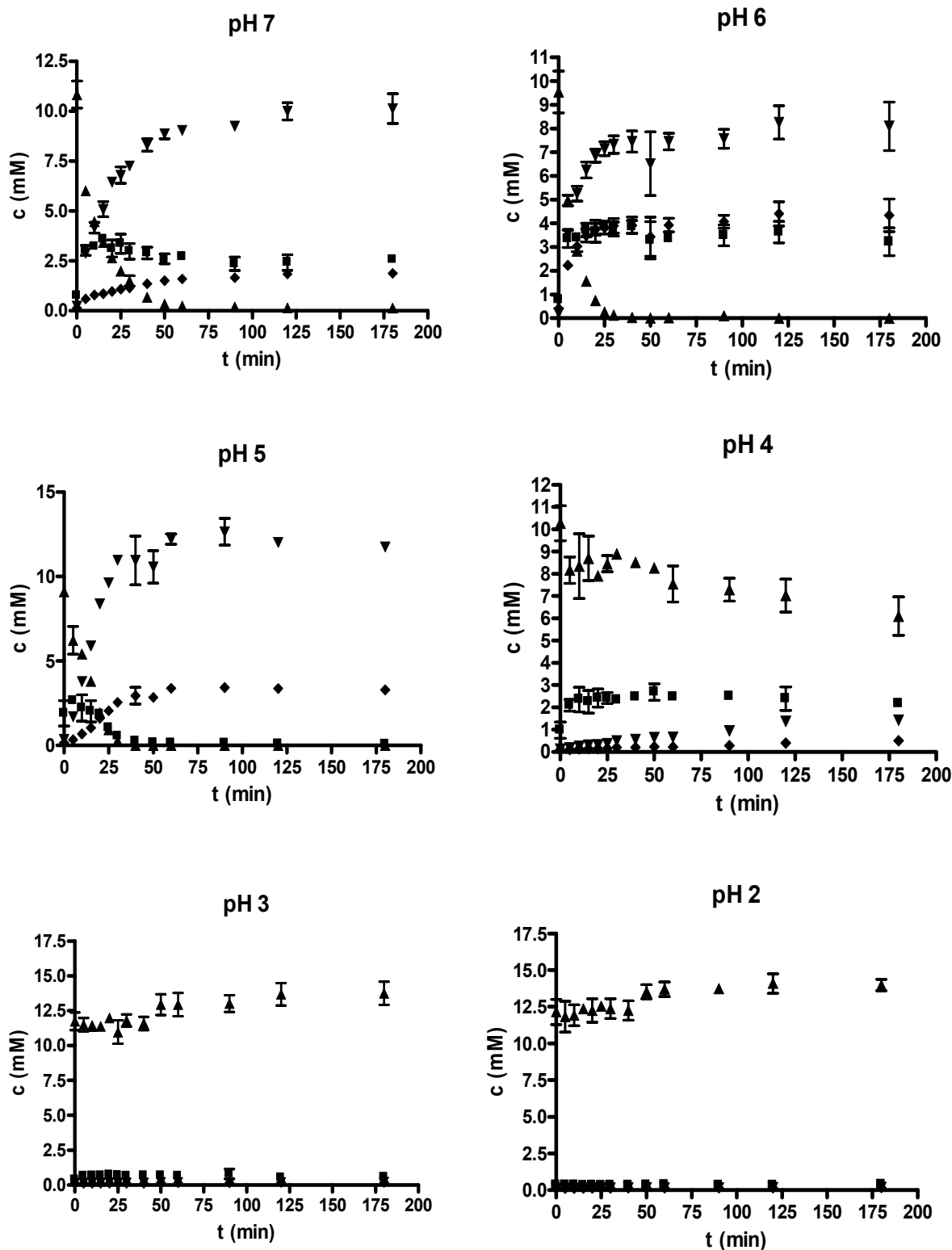


Fig. 4. Conversion of mandelonitrile by resting cells of *P. pastoris* pJOE5557.2 at pH 2–7. The cells were grown, harvested and finally resuspended to an $OD_{600nm}=15$. The reactions were performed as described in the legend of Fig. 3. The concentrations of mandelonitrile (▲), mandelic acid (▼), mandeloamide (◆) and benzaldehyde (■) were determined by HPLC analysis.

Activity of resting cells of *P. pastoris* pJOE5537.4 and *P. pastoris* pJOE5557.2 grown and induced at pH 4 and 5. The previous experiments demonstrated a progressive decrease of the nitrilase activities at pH ≤ 4 for *P. pastoris* pJOE5537.4 and *P. pastoris* pJOE5557.2. The cells used in these experiments were grown and induced at pH 6. It was therefore necessary to clarify if cells grown and induced at pH values < 6 might be more acid tolerant and demonstrate higher nitrilase activities at pH ≤ 4 . Therefore, cells were grown in modified YPG media containing yeast extract (1 % w/v), peptone (2 % w/v), glycerol (1 % v/v), and 0.1 M Na-citrate–phosphate buffer with pH values of 4 or 5. These cultures only reached optical densities (OD_{600nm}) of about 1.5 after 48 h of incubation at 30 °C in Erlenmeyer flasks on a rotary shaker (compared to OD_{600nm} of 4–6 found with cells grown for 18 h at pH 6). The cells were harvested (11,000 ×g, 10 min, 4 °C), washed in 0.1 M Na-citrate buffer (pH 4 or 5, respectively), and transferred into modified YPM media containing yeast extract (1 % w/v), peptone (2 % w/v), and methanol (0.5 % v/v) in 0.1 M Na-citrate– phosphate buffer (pH 4 or 5, respectively). Subsequently, the cells were incubated for gene expression as described in the Materials and methods section. After 96 h of incubation, the cells (OD_{600nm} 5–6) were harvested, washed in 0.1 M Na-citrate–phosphate buffer (pH 5), and immediately frozen in liquid nitrogen. The cells were subsequently stored at –70 °C. Aliquots of the cells were thawed and transferred into 0.1 M Na-citrate–phosphate buffer (pH 2–5), 0.1 M K-phosphate buffer (pH 6), or 0.1 M Tris/HCl buffer (pH 7), respectively. The suspensions were incubated at 30 °C on a thermoshaker (1,400 rpm) and the nitrilase activities of the cells were determined as described in the Materials and methods section.

The resting cells of *P. pastoris* pJOE5537.4 and *P. pastoris* pJOE5557.2 which had been grown and induced in media with pH values of 4 or 5 converted mandelonitrile in reaction mixtures at pH 5–7. The specific activities calculated for cells of *P. pastoris* pJOE5537.4 and *P. pastoris* pJOE5557.2 grown at pH 4 reached only less than 10 % of the specific activities achieved by the cells grown at pH 6. The cells which had been cultivated at pH 4 or 5 did not form any mandelic acid in reaction mixtures with pH values ≤ 4 . Thus, it was concluded that cells grown at pH 4 or 5 were less suitable for the attempted biotransformation than cells grown at pH 6.

Conversion of benzaldehyde and KCN by resting cells of *P. pastoris* pJOE5557.2 at pH 3.8.

The previous experiments suggested the simultaneous expression of the (*S*)-oxynitrilase and the nitrilase in *P. pastoris* pJOE5557.2. Thus, the synthesis of (*S*)-mandelonitrile by the (*S*)-oxynitrilase and the subsequent enantioconservative conversion of (*S*)-mandelonitrile to (*S*)-mandelic acid and (*S*)-mandeloamide by the nitrilase appeared to be feasible. Therefore, cells of *P. pastoris* pJOE5557.2 were incubated with benzaldehyde and KCN (10 mM each) in 0.1 M Na-citrate–phosphate buffer (pH 3.8). The resting cells indeed catalyzed the conversion of benzaldehyde and cyanide to mandelic acid and mandeloamide. Furthermore, within the first 3 min of the reaction, significant amounts of mandelonitrile were formed (Fig. 5). In contrast, almost no formation of mandelonitrile and no decrease of the benzaldehyde concentration were found during this time interval in the control experiment without cells (Fig. 5). Thus, it was concluded that indeed the (*S*)-oxynitrilase activity of the resting cells catalyzed the cyanation of benzaldehyde and that the chemical cyanation of benzaldehyde was almost completely suppressed by the acidic reaction conditions. A specific activity of 0.006 U/mg of dry weight for the (*S*)-oxynitrilase could be calculated for the enzyme-catalyzed conversion of benzaldehyde within the first 12 min of the reaction.

The initially formed mandelonitrile was converted within 25 min to mandelic acid and mandeloamide in a ratio of 4:3. In contrast, racemic mandelonitrile was converted by the nitrilase to mandelic acid and mandeloamide in a ratio of about 4:1 (see Figs. 2 and 3). The chiral analysis of the products demonstrated that primarily (*S*)-mandelic acid and (*S*)-mandeloamide were formed with enantiomeric excess (*ee*) values of approximately 80 % (Fig. 5). A specific activity of 0.01 U/mg of dry weight could be calculated based on the formation of mandelic acid within the first 12 min.

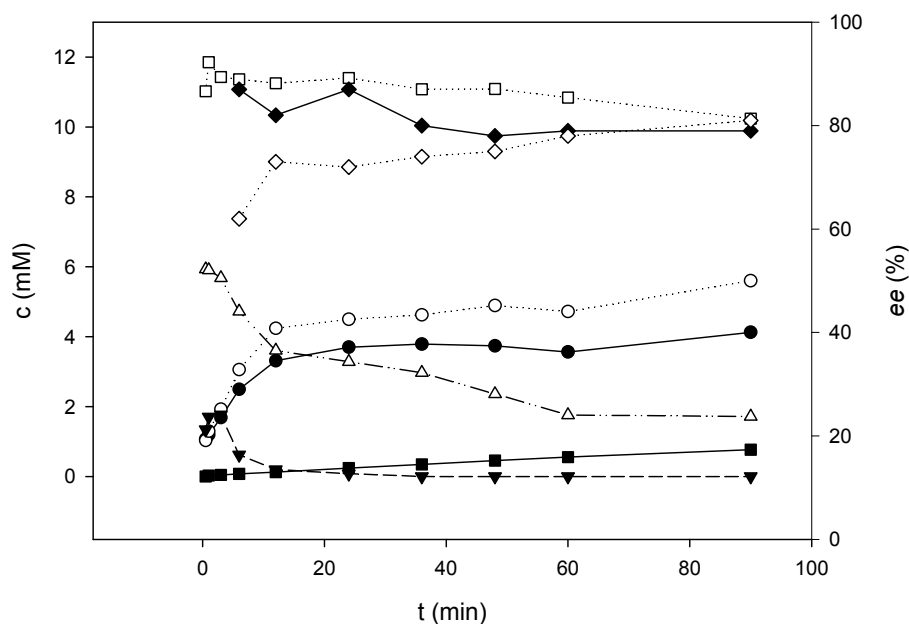


Fig. 5. Conversion of benzaldehyde and KCN by resting cells of *P. pastoris* pJOE5557.2 incubated at pH 3.8. The experiment was performed by using the same resting cells as used in the experiment shown in Fig. 4. The cells were resuspended in 0.1 M Na-citrate–phosphate buffer (pH 3.8) to an OD_{600nm} of 103. The cell suspension (2 ml) was transferred into a 2-ml Eppendorf cup and incubated at 30 °C in a thermoshaker (1,400 rpm). A second cup containing 0.1 M Na-citrate–phosphate buffer (2 ml) without cells served as a negative control. The reactions were started by the addition of benzaldehyde (10 mM) and KCN (10 mM). Cyanide was added from a 0.2-M stock solution in water and benzaldehyde ($\geq 99.5\%$) was added as pure liquid. After different time intervals, two samples (50 μ l each) were taken. The reaction in one sample was stopped by the addition of 1 M HCl (10 μ l). This aliquot was used for the reversed phase HPLC. The other one was immediately frozen in liquid nitrogen, stored at -20 °C, and used for the chiral analysis. The samples obtained were centrifuged ($21,000\times g$, 10 min, 4 °C) and the resulting supernatants analyzed by HPLC. The detection of benzaldehyde (Δ), (*R,S*)-mandelonitrile (\blacktriangledown), (*R,S*)-mandelic acid (\circ), and (*R,S*)-mandeloamide (\bullet) in samples obtained from the reaction mixtures as well as the quantification of (*R,S*)-mandelonitrile (\blacksquare) and benzaldehyde (\square) in samples from the negative control was performed by using the reversed phase chromatography described in the Materials and methods section. The *ee*-values of (*S*)-mandelic acid (\blacklozenge) and (*S*)-mandeloamide (\diamond) were determined by using a chiral HSA column (see Materials and methods). A reliable calculation of the *ee* values of the relevant compounds in the first three samples was not possible because the higher concentration of benzaldehyde present in these samples disturbed the detection of the enantiomers.

DISCUSSION

The major aim of the present study was to construct an acidotolerant whole cell catalyst for the synthesis of (*S*)-mandelonitrile from benzaldehyde and cyanide and it was demonstrated that, in principle, recombinant *P. pastoris* strains could fulfill this task. Thus, it was possible to simultaneously integrate the genes coding for the arylacetone nitrilase of *P. fluorescens* EBC191 and the (*S*)-oxynitrilase of *M. esculenta* into the genome of *P. pastoris* and to heterologously express both enzyme activities in *P. pastoris*. In addition, it could be demonstrated that resting cells of *P. pastoris* pJOE5537.4 (expressing the nitrilase) and *P. pastoris* pJOE5557.2 (expressing the nitrilase and the (*S*)-oxynitrilase) were able to hydrolyze nitriles at pH values ≥ 3 . The initial activities of cells of *P. pastoris* pJOE5537.4 incubated at pH 4 were about 75 % of the activity found at pH 5. Furthermore, there was also some products formed at pH 3. This was different from the situation found with cells of *E. coli* JM109(pIK9) which demonstrated at pH 4 only 34 % of the activity found at pH 5 and did not show any activity at pH 3 (Rustler *et al.* 2007; unpublished result). Furthermore, the recombinant *P. pastoris* strains could also grow at pH 4 which was not possible with the *E. coli* strains previously investigated. This demonstrated that the initial assumption was correct and that *P. pastoris* was indeed more acidotolerant and therefore, in principle, better suited for the intended biotransformation than *E. coli*.

The preferred formation of (*S*)-mandelic acid by *P. pastoris* pJOE5557.2 was in sharp contrast to the results obtained previously for the conversion of racemic mandelonitrile by strains synthesizing the nitrilase from *P. fluorescens* EBC191 without an additional (*S*)-oxynitrilase activity. In all these experiments, always (*R*)-mandelic acid was the preferentially formed enantiomer (Kiziak *et al.* 2005, 2007; Fernandes *et al.* 2006; Rustler *et al.* 2007). Furthermore, it was previously demonstrated that the arylacetone nitrilase from *P. fluorescens* EBC191 converted (*S*)-mandelonitrile exclusively to the (*S*)-enantiomers of mandelic acid and mandeloamide and that in turn (*R*)-mandelonitrile was converted only to the respective (*R*)-enantiomers (Mateo *et al.* 2006). Thus, the preferred formation of the respective (*S*)-enantiomers was a clear indication for the activity of the (*S*)-oxynitrilase in the recombinant *Pichia* strains.

The activity of the (*S*)-oxynitrilase was also evident from the observed ratio of mandelic acid and mandeloamide of 4:3 formed during the conversion of benzaldehyde plus KCN. In contrast, racemic mandelonitrile was converted by the recombinant *Pichia* strains (and also the purified nitrilase) to mandelic acid and mandeloamide in a ration of about 4:1 (see Figs. 2 and 3; Kiziak *et al.* 2005). The formation of an increased proportion of mandeloamide (compared to mandelic acid) had also been described for the conversion of enantiomerically pure (*S*)-mandelonitrile by resting cells and cell extracts of *E. coli* JM109(pIK9) at pH 5 (Rustler *et al.* 2007). These

differences are due to the fact that the nitrilase from *P. fluorescens* EBC191 forms significantly more (*S*)-mandeloamide from (*S*)-mandelonitrile than (*R*)-mandeloamide from (*R*)-mandelonitrile (Mateo *et al.* 2006). Thus, the increased production of mandeloamide by *P. pastoris* pJOE5557.2 also clearly indicated a pronounced surplus of (*S*)-mandelonitrile compared to (*R*)-mandelonitrile within the cells.

The formation of small amounts of the respective (*R*)-enantiomers could be explained by the residual chemical formation of (*R*)-mandelonitrile (observed in the control experiment) in connection with the relatively low (*S*)-oxynitrilase activity. There are several possibilities to further enhance the enantiomeric excess achieved by the established two-enzyme cascade. First, a further acidification of the reaction mixtures should result in the total inhibition of the chemical cyanation of benzaldehyde. Unfortunately, the expression system used in this study did not allow a further acidification of the reaction mixtures without a total loss of nitrilase activity. The second possibility would be an increase of the activities of the recombinantly expressed enzymes (and especially the (*S*)-oxynitrilase activity). This should result in the formation of more (*S*)-mandelonitrile compared to the chemically formed (*R*)-mandelonitrile and this would in turn enhance the enantiomeric excess of the formed (*S*)-mandelic acid and (*S*)-mandeloamide. A comparison of the nitrilase activities determined for the recombinant *P. pastoris* strains and previously constructed recombinant *E. coli* strains clearly demonstrated the weak expression of the relevant enzymes in the fungal host strain. Thus, the nitrilase activities detected in *P. pastoris* pJOE5537.4 (expressing the nitrilase) and pJOE5557.2 (expressing the nitrilase and the oxynitrilase) were only ≤ 0.18 U/mg of dry weight for the conversion of mandelonitrile at pH 5. In contrast, resting cells of *E. coli* JM109(pIK9)—which also synthesized the arylacetonitrilase of *P. fluorescens* EBC191—converted under the same conditions mandelonitrile with specific activities of up to of 7.6 U/mg of dry weight (calculated from Rustler *et al.* 2007). Furthermore, also the estimation of the (*S*)-oxynitrilase activity of *P. pastoris* pJOE5557.2 (0.006 U/mg of dry weight) suggested a rather weak enzyme expression. This was in contrast to the results of a previous study which described the efficient expression of the (*S*)-oxynitrilase from the rubber tree *Hevea brasiliensis* in *P. pastoris* (Hasslacher *et al.* 1997). Therefore, it is necessary to increase the (*S*)-oxynitrilase and nitrilase expression in the *Pichia* background either by genetic or engineering techniques in order to obtain a suitable biocatalyst. A possible increase in enzyme expression by genetic engineering techniques could be done by the construction of ‘multicopy strains’ which harbor higher copy numbers of the relevant genes (Cereghino and Cregg 2000; Cereghino *et al.* 2002). The production of the recombinant proteins could presumably also be increased by modifications in the methanol concentration, the methanol feeding intervals, and the induction times (Zhang and Yang 2006).

To the best of our knowledge, this is the first example for an *in vivo* system which combines an (*S*)-oxynitrilase and a nitrilase in a cascade reaction. Previously, it was shown that it is also possible to couple the two enzymes studied here *in vitro*. In these experiments, the (*S*)-oxynitrilase and the nitrilase were coimmobilized as cross-linked enzyme aggregates and incubated in a biphasic aqueous-diisopropyl ether medium with benzaldehyde and HCN. This enabled the synthesis of (*S*)-mandelic acid with *ee* values up to 98 % (Mateo *et al.* 2006). Therefore, further studies will be necessary in order to decide if an *in vivo* or an *in vitro* system is superior for the attempted production of (*S*)-mandelic acid.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Prof. H. Wajant (Universität Würzburg) for a gift of plasmid pQE4-MeHNLwt and S. Bürger for help during the PCR experiment.

REFERENCES

- Banerjee, A., Sharma, R., Banerjee, U. C. (2002)** The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:33–44.
- Cereghino, G. P. L., Cereghino, J. L., Ilgen, C., Cregg, J. M. (2002)** Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:329–332.
- Cereghino, J. L., Cregg, J. M. (2000)** Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:45–66.
- Cobley, J. G., Cox, J. C. (1983)** Energy conservation in acidophilic bacteria. *Microbiol. Rev.* 47:579–595.
- Effenberger, F., Förster, S., Wajant, H. (2000)** Hydroxynitrile lyases in stereoselective catalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:532–539.
- Fernandes, B. C. M., Mateo, C., Kiziak, C., Wacker, J., Chmura, A., van Rantwijk, F., Stolz, A., Sheldon, R. A. (2006)** Nitrile hydratase activity of a recombinant nitrilase. *Adv. Synth. Catal.* 348:2597–2603.
- Griengl, H., Schwab, H., Fechter, M. (2000)** The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases. *Trends Biotechnol.* 18:252–256.
- Gröger, H. (2001)** Enzymatic routes to enantiomerically pure aromatic α -hydroxy carboxylic acids: a further example for the diversity of biocatalysis. *Adv. Synth. Catal.* 343:547–558.
- Hasslacher, H., Schall, M., Hayn, M., Bona, R., Rumbold, K., Lückl, J., Griengl, H., Kohlwein, S. D., Schwab, H. (1997)** High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expr. Purif.* 11:61–71.
- Heinemann, U., Kiziak, C., Zibek, S., Layh, N., Schmidt, M., Griengl, H., Stolz, A. (2003)** Conversion of aliphatic 2-acetoxynitriles by nitrile hydrolysing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:274–281.
- Hughes, J., Carvalho, F. J., Hughes, M. A. (1994)** Purification, characterization, and cloning of α -hydroxynitrile lyase from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Arch. Biochem. Biophys.* 311:496–502.
- Johnson, D. V., Zabelinskaja-Mackova, A. A., Griengl, H. (2000)** Oxynitrilases for asymmetric C-C bond formation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:103–109.
- Kaul, P., Banerjee, A., Mayilraj, S., Banerjee, U. C. (2004)** Screening for enantioselective nitrilases: kinetic resolution of racemic mandelonitrile to (*R*)-mandelic acid by new isolates. *Tetrahedron Asym.* 15:207–211.
- Kaul, P., Stolz, A., Banerjee, U. C. (2007)** Cross-linked amorphous nitrilase aggregates for enantioselective nitrile hydrolysis. *Adv. Synth. Catal.* 349:2167–2176.

Kiziak, C., Conradt, D., Stolz, A., Mattes, R., Klein, J. (2005) Nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191; cloning and heterologous expression of the gene and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Microbiology* 151:3639–3648.

Kiziak, C., Klein, J., Stolz, A. (2007) Influence of different carboxy-terminal mutations on the substrate-, reaction-, and enantiospecificity of the arylacetonitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191. *Prot. Engin. Des. Sel.* 20:385–396.

Layh, N., Hirrlinger, B., Stolz, A., Knackmuss, H.-J. (1997) Enrichment strategies for nitrile-hydrolysing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47:668–674

Layh, N., Stolz, A., Förster, S., Effenberger, F., Knackmuss, H.-J. (1992) Enantioselective hydrolysis of O-acetylmandelonitrile to O-acetylmandelic acid by bacterial nitrilases. *Arch. Microbiol.* 158:405–411.

Mateo, C., Chmura, A., Rustler, S., Van Ranwijk, F., Stolz, A., Sheldon, R. A. (2006) Synthesis of enantiomerically pure (*S*)-mandelic acid using an oxynitrilase-nitrilase bienzymatic cascade—a nitrilase surprisingly shows nitrile hydratase activity. *Tetrahedron Asym.* 17:320–323.

Nagasawa, T., Yamada, H. (1990) Large-scale bioconversion of nitriles into useful amides and acids. In: Abramowicz, D. A. (ed) *Biocatalysis*. Van Nostrand Reinhold, New York, pp 277–318.

Nagasawa, T., Yamada, H. (1995) Microbial production of commodity chemicals. *Pure. Appl. Chem.* 67:1241–1256.

Ress-Löschke, M., Friedrich, T., Hauer, B., Mattes, R. (1998) Verfahren zur Herstellung chiraler Carbonsäuren aus Nitrilen mit Hilfe einer Nitrilase oder Mikroorganismen, die ein Gen für eine Nitrilase enthalten. German Patent Application, DE 19848129A1.

Rustler, S., Müller, A., Windeisen, V., Chmura, A., Fernandez, B. C. M., Kiziak, C., Stolz, A. (2007) Conversion of mandelonitrile and phenylglycinenitrile by recombinant *E. coli* cells synthesizing a nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191. *Enzyme Microb. Technol.* 40:598–606.

Rustler, S., Stolz, A. (2007) Isolation and characterization of a nitrile hydrolysing acidotolerant black yeast—*Exophiala oligosperma* R1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:899–908.

Sharma, M., Sharma, N. N., Bhalla, T. C. (2005) Hydroxynitrile lyases: at the interface of biology and chemistry. *Enzyme Microb. Technol.* 37:279–294.

Singh, R., Sharma, R., Tewari, N., Geetanjali, Rawart, D. S. (2006) Nitrilase and its application as a ‘green’ catalyst. *Chem. Biodivers.* 3:1279–1287.

Wajant, H., Pfizenmaier, K. (1996) Identification of potential active-site residues in the hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 271:25830–25834.

Wartenberg, A. (1989) Einführung in die Biotechnologie. Gustav Fischer, Stuttgart.

Wilms, B., Wiese, A., Syldatk, C., Mattes, R., Altenbuchner, J. (2001) Development of an *Escherichia coli* whole cell biocatalyst for the production of L-amino acids. *J. Biotechnol.* 86:19–30.

Yamamoto, K., Fujimatsu, I., Komatsu, K. I. (1992) Purification and characterization of the nitrilase from *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 responsible for enantioselective hydrolysis of mandelonitrile. *J. Ferment. Bioeng.* 73:425–430.

Yamamoto, K., Oishi, K., Fujimatsu, I., Komatsu, K. I. (1991) Production of (*R*)-mandelic acid from mandelonitrile by *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3028–3032.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103–109.

Zhang, Y., Yang, B. (2006) In vivo optimizing of intracellular production of heterologous protein in *Pichia pastoris* by fluorescent scanning. *Anal. Biochem.* 357:232–239.

**Isolation and characterization of a nitrile hydrolysing
acidotolerant black yeast- *Exophiala oligosperma* R1**

S. Rustler, A. Stolz*

Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, Allmandring 31, 70569 Stuttgart, Germany

*** Corresponding author. Tel: +49 (0)711 68565489, Fax: +49 (0)711 68565725**

***E-mail address:* andreas.stolz@imb.uni-stuttgart.de**

ABSTRACT

Different nitriles were used as sole sources of nitrogen in a series of enrichments under acidic conditions to isolate acidotolerant nitriles hydrolysing microorganisms. From an enrichment in Na–citrate–phosphate buffer at pH 4 with glucose as carbon source and phenylacetonitrile as sole source of nitrogen, a black yeast (strain R1) was obtained which was identified by subsequent 18S rRNA gene sequencing as *Exophiala oligosperma*. The growth conditions of the organism were optimized for the production of cell material and the induction of the nitrile converting activity. Resting cell experiments demonstrated that phenylacetonitrile was converted via phenylacetic acid and 2-hydroxyphenylacetic acid. The organism could grow at pH 4 with phenylacetonitrile as sole source of carbon, nitrogen, and energy. The nitriles hydrolysing activity was also detected in cell-free extracts and indications for a nitrilase activity were found. The cell-free extracts converted, in addition to phenylacetonitrile, also different substituted phenylacetonitriles. Whole cells of *E. oligosperma* R1 converted phenylacetonitrile with almost the same reaction rates in the pH range from pH 1.5–pH 9.

INTRODUCTION

Nitriles are important intermediates in the chemical industry for the production of amides, carboxylic acids, and various other products. There is a considerable interest in the utilization of microorganisms or enzymes for the conversion of nitriles because these biological systems offer the possibility of using environmentally friendly (“green”) reaction conditions and potentially also offer the advantages of chemo-, regio-, stereo-, and/or enantioselective reactions (Bunch 1998; Martinková and Křen 2002; Schulze 2002). The enzymatic hydrolysis of nitriles can either proceed by nitrilases which directly hydrolyse nitriles to the corresponding carboxylic acids or nitrile hydratases which convert nitriles to the amides, which in turn might be further hydrolysed by amidases to the corresponding carboxylic acids. One possible application for nitriles hydrolysing organisms or enzymes is the conversion of α -amino- and α -hydroxynitriles because (chiral) amino acids, α -hydroxyamides and α -hydroxycarboxylic acids are interesting products for the chemical industry. The enzymatic conversion of α -amino- and α -hydroxynitriles is hampered by the low stability of these compounds under neutral conditions. In contrast, these substrates are much more stable at acidic pH-values. Therefore, our group is currently investigating the enzymatic conversion of this class of compounds under acidic conditions. Recently, we demonstrated for the model substrate mandelonitrile with whole cell catalysts, cell extracts and immobilised enzymes an efficient conversion at pH values ≥ 5 using a nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191 (Kiziak *et al.* 2005; Mateo *et al.* 2006; Rustler *et al.* 2007). The conversion of especially labile α -amino- and α -hydroxynitriles may require pH values lower than pH 5. Therefore, we attempted in the present study to isolate new acidotolerant organisms from the environment with the ability to hydrolyse nitriles.

MATERIALS AND METHODS

Media. The nitrogen-free mineral media contained per litre: 500 mg $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 25 mg CaCl_2 , 10 mg Fe(III)citrate and 0.5 ml of a trace element solution (SL6) as described by Pfennig and Lippert (1966) but without iron salts and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). For the preparation of solid media, agarose was autoclaved separately from the acid media and was added after autoclaving to a final concentration of 1.6 % (w/v).

Cultivation of *Exophiala oligosperma* R1. *E. oligosperma* R1 was usually cultivated in Na-citrate-phosphate buffer (pH 4). A stock solution of the Na-citrate-phosphate buffer was prepared by titrating 500 mM of citric acid with 500 mM Na_2HPO_4 to pH 4. The routinely used growth medium contained 20 % (v/v) of the stock solution of the Na-citrate-phosphate buffer, the nitrogen-free mineral medium described above, 20 mM glucose, 0.2 % (w/v) casamino acids and 2 mM phenylacetonitrile. The cultures were routinely grown for 72–96 h in 3-l Erlenmeyer flasks with baffles at 30 °C on a rotary shaker (100 rpm).

Growth measurements. Growth of the strain was monitored (spectro)photometrically by measuring the optical density at 600 nm with a Cary 100 Bio spectrophotometer (Varian, Mulgrave, Australia) or by using a Klett photometer (Klett Manufacturing, Brooklyn, NY). An optical density ($\text{OD}_{600 \text{ nm}}$) of 1 corresponded to about 75 Klett units and 0.25 mg of cell dry weight per ml of culture.

Preparation of cell extracts. The cells were harvested by centrifugation (11,000×g, 15 min, 4 °C), washed twice in 100 mM Na-phosphate buffer (pH 6.5) and finally resuspended in 100 mM Na-phosphate buffer (pH 6.5).

The disintegration of small amounts of cells was performed by using a mixer mill (Type MM2, Retsch GmbH, Haan, Germany) filled with glass beads with a diameter of about 0.5–0.75 mm. Approximately 5 ml of a cell suspension (about 10 % v/v) was mixed with 10–12 ml of glass beads. The mixer mill was set to full intensity (=100 %), and the cells disintegrated for 15 min at 4 °C.

Larger amounts of cells were converted to cell extracts by using a Dyno-Mill Type KDL (Willy Bachofen AG, Basel, Switzerland). The cell suspensions (about 80 ml with a cell content of 30 % v/v) were mixed with about 150 ml of glass beads (diameter 0.5–0.75 mm). The sample chamber was cooled throughout the process by a brine solution cooled to –18 °C. The Dyno Mill was set to maximal intensity. The disintegration was performed for 45 min and the sample

finally centrifuged ($6,000\times g$, 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). The liquid phase was removed with a glass pipette and further clarified by ultracentrifugation ($100,000\times g$, 60 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Protein content of the cell extracts was determined by the method of Bradford (1976) with bovine serum albumin as a standard.

Enzyme assays. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that converts 1 μmol of substrate per minute.

For the determination of nitrile hydrolysis with resting cells, the cells were harvested by centrifugation ($11,000\times g$, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), washed $2\times$ in Na-citrate-phosphate buffer (pH 4) and finally transferred to Na-citrate-phosphate buffer (pH 4). The nitrile hydrolysis was routinely determined in reaction mixtures (1.5–2 ml) containing Na-citrate-phosphate (pH 4), 1–3 mM of the respective nitrile and an appropriate amount of cells ($\text{OD}_{600\text{ nm}}\approx 10\text{--}15$). The stock solutions of the nitriles (1 M) were routinely prepared in methanol. The reaction mixtures were incubated at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in an Eppendorf shaker at 1,400 rpm. After different time intervals, samples (50–100 μl each) were taken and the reactions were stopped by the addition of 1 M HCl (5–10 μl). The samples were centrifuged in an Eppendorf centrifuge at $21,000\times g$ for 10 min, and the supernatants were analysed using high-pressure liquid chromatography (HPLC).

The enzyme assays with cell extracts contained in a final volume of 1 ml 100 mM Na-phosphate buffer (pH 6.5), 2 mM of the respective nitriles and cell extracts. The reaction mixtures were shaken in an Eppendorf shaker at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ and aliquots removed at different time intervals. The reactions were terminated by the addition of 10 % 1 M HCl. The precipitated proteins were removed by centrifugation (5 min, $21,000\times g$) in an Eppendorf centrifuge. The concentrations of the individual compounds were then determined by HPLC.

Analytical methods. The concentrations of the nitriles and their corresponding amides and acids were analysed by HPLC (ChemStation LC3D, equipped with an autosampler G1329A, a diode array detector G1315B, and a Quat-HPLC pump G1311A; Agilent Technologies, Santa Barbara, CA). A reversed-phase column [125 by 4 mm (internal diameter); Trentec, Gerlingen, Germany] filled with 5- μm -diameter particles of Lichrospher RP8 (E. Merck AG, Darmstadt, Germany) was used to identify individual compounds which were detected spectrophotometrically at 210 nm. The solvent systems contained 30–50 % methanol (v/v) or acetonitrile and H_3PO_4 (0.1–0.3 % v/v) in H_2O as mobile phases.

Sampling of the inoculum from “Restsee 111”. The sample of surface water (with a pH of about 3) and sediment (with a pH of about 2.7) was taken in June 2004. The geochemical key features of “Restsee 111” (ML111 Mine Plessa) been described by Meier *et al.* (2004).

Chemicals. All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Germany) or E. Merck AG (Darmstadt, Germany).

RESULTS

Enrichment of acidotolerant nitriles hydrolysing microorganisms. The sources of the inocula for the enrichments were taken from a high moor in the Black Forest (Wildseemoor, Baden-Württemberg, Germany), a lake in a former browncoal mining area in eastern Germany ("Restsee 111", Brandenburg) and acid mine drainage in Wales (Parys Mountain, North Wales). Enrichments were performed in diluted sulfuric acid (pH 2.5 and 3.5), 100 mM K-phthalate buffer (pH 4), 100 mM Na-citrate-phosphate buffer (pH 4), or 100 mM Na-phosphate buffer (pH 5.0) using a basic mineral medium without an included nitrogen source. In most enrichments glucose (20 mM) or glucose (10 mM) plus succinate (10 mM) were used as sources of carbon and energy. Glycerol (20 mM) or a mixture of glycerol (10 mM) plus glucose (10 mM) were used for the enrichments at pH 2.5 and pH 3.5. Phenylacetonitrile or 2-phenylpropionitrile (1 mM each) was added as sole source of nitrogen. The enrichment cultures (10 ml each) were incubated at 30 °C in 100 ml Erlenmeyer flasks with baffles on an orbital shaker (100 rpm). The enrichment cultures were repeatedly transferred to fresh cultures with the same composition. The growth of the cultures was determined spectrophotometrically at 600 nm ($OD_{600\text{ nm}}$). Thus, it was found that in the enrichments with Na-citrate-phosphate buffer (pH 3 and pH 4), glucose (20 mM) and phenylacetonitrile (1 mM) microbial growth occurred. (Only much slower growth was observed in the enrichments with 2-phenylpropionitrile). Therefore, the enrichment cultures were plated on solid media with the same composition which was solidified with agarose (1.6 % w/v). Single colonies were further purified on a medium containing Na-citrate-phosphate buffer (pH 4), 20 mM glucose, 0.2 % (w/v) casamino acids, 2 mg/l dichloran (2,6-dichloro-4-nitroaniline) and 5 mg/l tetracycline (Bragulat *et al.* 1991; Hocking and Pitt 1980). This resulted in the isolation of an organism (strain R1) which formed conspicuous black colonies on the isolation medium and also on various other media (Fig. 1a).

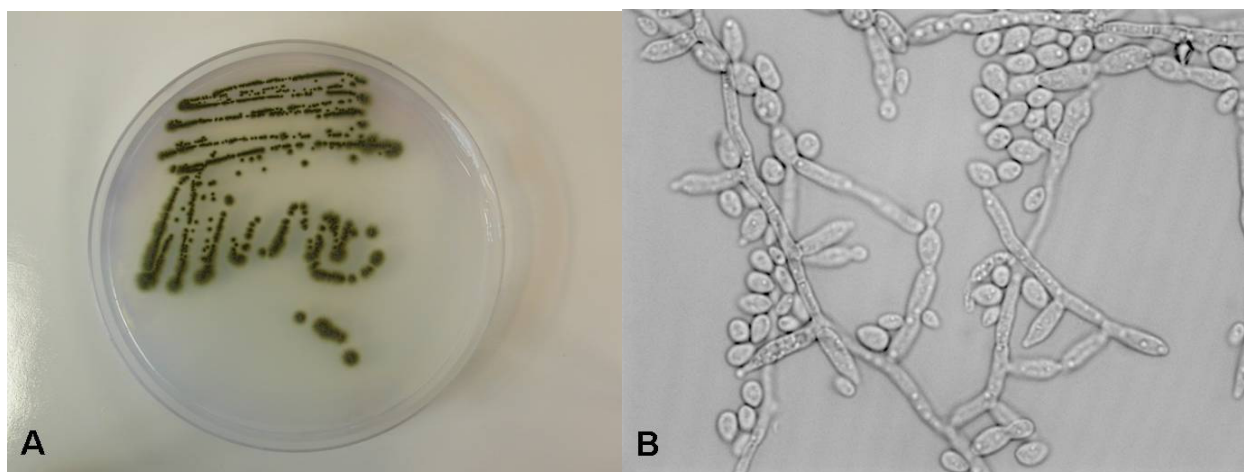


Fig. 1. Growth of strain R1 (A) on an agar plate with casamino acids (0.2 % w/v). (B) Microscopic image of a liquid culture of strain R1 grown for 72 h in a liquid medium with glucose (20 mM), casamino acids (0.2 %), and 2 mM phenylacetonitrile. The picture was taken at a magnification of 1250 \times .

Characterization and identification of *E. oligosperma* R1. The microscopic analysis of liquid cultures of strain R1 demonstrated yeast-like cells with sizes of 3 \times 5 μm . Furthermore, some hyphae-like structures could also be observed (Fig. 1b). These results suggested that the isolate belongs to the so-called “black yeasts” which enclose, e.g., the (anamorphic) genera *Cladosporium*, *Cladophialaphora*, *Exophiala*, *Fonsecaea*, *Hortaea*, *Phialophora*, *Ramichloridium* and *Rhinochadiella* (Untereiner *et al.* 1995, 1999; Hölker *et al.* 2004). These genera comprise some facultatively pathogenic strains but are isolated with increasing frequency from extreme acidic and oligotrophic environments. Furthermore, some recent reports described the presence of black yeasts in air biofilters and their ability to degrade organic compounds, such as toluene or styrene (Hölker *et al.* 2004; Gunsch *et al.* 2005; Prenafeta-Boldu *et al.* 2006). The isolate was subsequently identified by 18S rDNA sequencing at the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) in Utrecht (The Netherlands) as *E. oligosperma* and has been deposited at the CBS as strain No 120260.

Growth characteristics of *E. oligosperma* R1. The growth of the new isolate was compared in Na–citrate–phosphate buffer at pH 3 or pH 4 in the nitrogen-free basic mineral medium with 20 mM glucose as carbon source and either 1 mM ammonium sulfate or 2 mM phenylacetonitrile (thus resembling the conditions used for the enrichments) or 0.2 % (w/v) casamino acids as nitrogen sources. The experiments demonstrated that the isolate indeed grew at pH 3 and pH 4 (Fig. 2a). The fastest growth was observed in the presence of casamino acids. The strain reached in this system significant optical densities ($\text{OD}_{600 \text{ nm}} \sim 6$). In contrast, only very faint growth (final $\text{OD}_{600 \text{ nm}} \leq 1.5$) could be detected in the nitrogen-limited mineral media with ammonia or

phenylacetonitrile as sole sources of nitrogen. The phenylacetonitrile completely disappeared within 10 days in the cultures containing *E. oligosperma* R1. In contrast, almost no change in the phenylacetonitrile concentration was observed in cell-free control experiments (Fig. 2b).

It was subsequently attempted to increase the cell yields in the mineral media by increasing the concentrations of ammonium sulfate in the medium. The organism was cultivated in Na-citrate-phosphate buffer (pH 4) in the nitrogen-free basic mineral medium with 20 mM glucose as carbon source and 1–10 mM ammonium sulfate. The growth was followed by using a Klett-photometer. Surprisingly, it was found that an increase in the ammonia concentration did not result in increased cell yields. Thus, the cells reached in all growth experiments about 230 Klett Units. Under these conditions doubling times (t_D) of about 15 h were determined. In contrast, in the presence of casamino acids, the doubling times decreased to about $t_D=8$ h.

The effect of the pH value on the growth of *E. oligosperma* was assayed between pH 1.5 and pH 9 in media containing 20 mM glucose and 0.2 % casamino acids. Thus, it was found that the organism grew with very similar growth rates between pH 1.5 and pH 8.

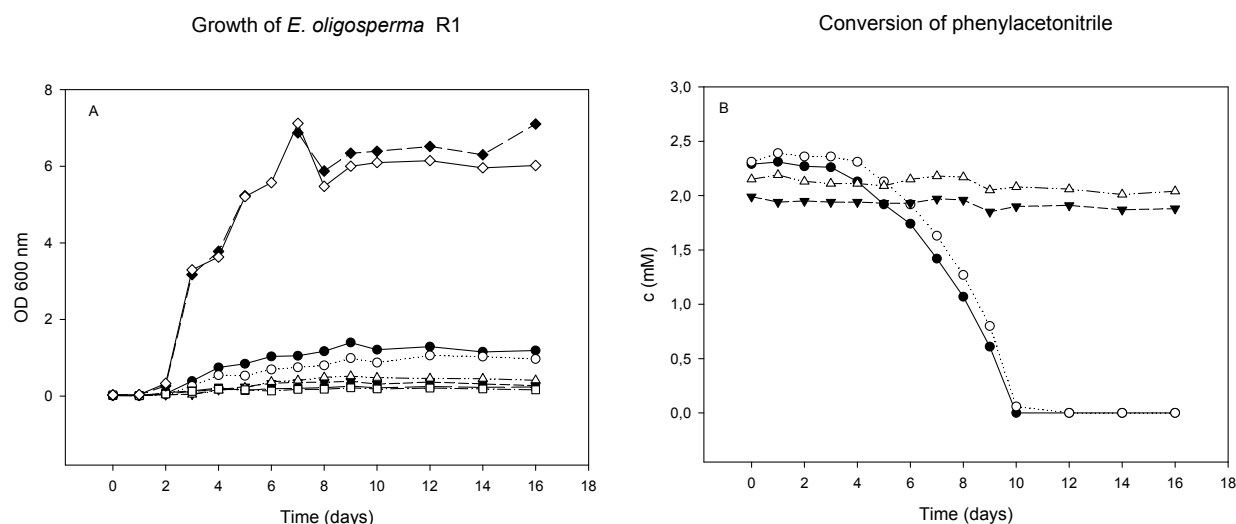


Fig. 2. Growth of *Exophiala oligosperma* R1 at pH 3 and pH 4 with different nitrogen sources (A) and turn-over of phenylacetonitrile (B). (A) The strain was cultivated in a nitrogen-free mineral medium with glucose (20 mM) plus 1 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at pH 3 (●) or pH 4 (○), or 2 mM phenylacetonitrile at pH 3 (▼) or pH 4 (Δ) or 0.2 % (w/v) casamino acids at pH 3 (◆) or pH 4 (◇). The controls at pH 3 (■) and pH 4 (□) contained no additional nitrogen source. (B) The turn-over of phenylacetonitrile by *E. oligosperma* R1 was analysed at pH 3 (●) and pH 4 (○) in comparison to cell-free controls at pH 3 (▼) and pH 4 (Δ).

Formation of phenylacetic acid and 2-hydroxyphenylacetic acid from phenylacetonitrile by resting cells. In the following experiments, the strain was grown in the Na-citrate-phosphate medium (pH 4) with phenylacetonitrile (2 mM), glucose (20 mM), and casamino acids (0.2 % w/v). The cells were transferred into a medium containing Na-citrate-phosphate (pH 4), 20 mM glucose and 2 mM phenylacetonitrile and the nitrile converting activity assayed by HPLC. The HPLC-analysis (solvent system 30 % acetonitrile, 69.7 % water, 0.3 % H₃PO₄) demonstrated that the cells converted phenylacetonitrile [retention time (R_t)=7.1 min] and excreted a product (R_t=3.5 min). This metabolite was identified in comparison to an authentic standard by its retention time as phenylacetic acid (Fig. 3). In contrast, only traces (<0.016 mM) of phenylacetamide (R_t=1.9 min) were found. The cells further metabolized the phenylacetic acid to a new product with an even shorter retention time as phenylacetic acid (R_t=2.1 min). This metabolite was identified by comparison with an authentic standard by its retention time and in situ spectrum as 2-hydroxyphenylacetic acid. 4-Hydroxyphenylacetic acid showed in the same chromatography system a retention time of R_t= 1.7 min.

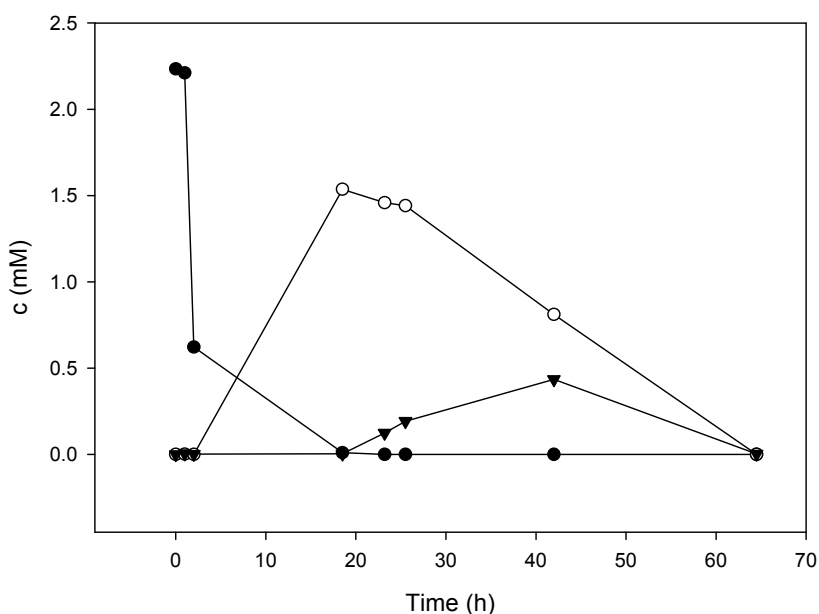


Fig. 3. Conversion of phenylacetonitrile to phenylacetic acid and 2-hydroxyphenylacetic acid by resting cells of *E. oligosperma R1*. The cells were grown in a 100 ml Erlenmeyer flask with baffles in 20 ml of a medium consisting of Na-citrate-phosphate (pH 4), 20 mM glucose, 0.2 % (w/v) casamino acids and 2 mM phenylacetonitrile. The culture was grown on a shaker (100 rpm) at 30 °C for 96 h till it reached an OD_{600nm} ~6.2. The cells were harvested by centrifugation (6,000×g, 4 °C, 15 min), washed in Na-citrate-phosphate buffer (pH 4) and finally transferred in a medium consisting of Na-citrate-phosphate (pH 4), 20 mM glucose, and 2 mM phenylacetonitrile to an OD_{600nm} of about 10. The resting cells were incubated on an Eppendorf shaker (1,400 rpm) at 30 °C. The concentrations of phenylacetonitrile (●), phenylacetic acid (○) and 2-hydroxyphenylacetic acid (▼) were determined in the culture supernatants by HPLC.

Growth of *E. oligosperma* R1 with phenylacetonitrile and phenylacetic acid. The effect of phenylacetonitrile on growth was tested in the nitrogen-free basic mineral medium in the Na-citrate-phosphate buffer (pH 4) with glucose (20 mM), casamino acids (0.2 %) and 0–6 mM phenylacetonitrile. Thus, pronounced inhibitory effects of phenylacetonitrile on the length of the lag-phase, the growth rate and the cell yield were observed (Fig. 4).

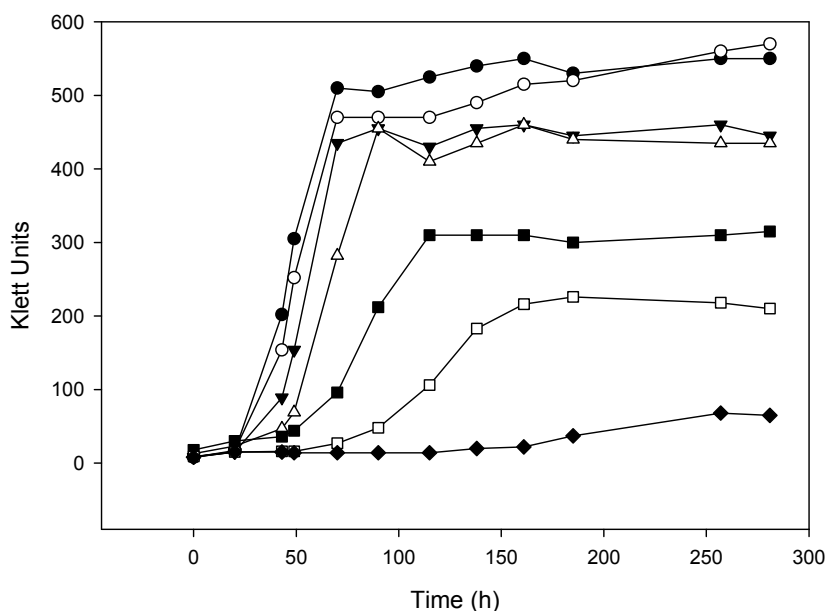


Fig. 4. Inhibitory effect of phenylacetonitrile on the growth of *Exophiala oligosperma* R1. The strain was cultivated in Na-citrate-phosphate buffer (pH 4) with glucose (20 mM), casamino acids (0.2 %) and 0 mM (●), 1 mM (○), 2 mM (▼), 3 mM (△), 4 mM (■), 5 mM (□), or 6 mM (◆) phenylacetonitrile. The cultures were shaken (100 rpm) at 30 °C and the growth determined by using a Klett photometer.

The ability of *E. oligosperma* R1 to convert phenylacetonitrile to phenylacetic acid and to further degrade phenylacetic acid could allow the organism to use these compounds as carbon and energy sources. Therefore, the organism was incubated in the nitrogen-free basic mineral medium in Na-citrate-phosphate buffer (pH 4) with ammonium sulphate (10 mM) and 1, 3, 5 or 10 mM phenylacetonitrile or the same concentrations of phenylacetic acid. These experiments indicated some growth of the organism with 1–5 mM phenylacetonitrile (optimal with 3 mM phenylacetonitrile) and very scarce growth with 1 mM phenylacetic acid (but no growth at higher concentrations). Subsequent experiments demonstrated that *E. oligosperma* R1 could indeed grow with phenylacetonitrile (3 mM) as sole source of carbon, energy and nitrogen (Fig. 5).

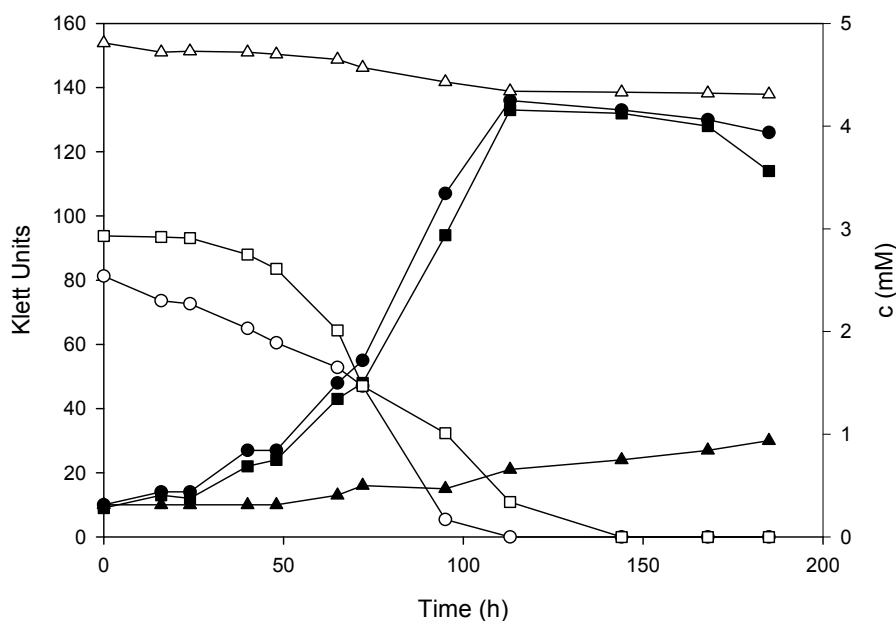


Fig. 5. Growth of *E. oligosperma* R1 on phenylacetonitrile as sole source of carbon, energy (and nitrogen). The precultures of *E. oligosperma* R1 were grown in Na-citrate-phosphate buffer (pH 4), 20 mM glucose, 0.2 % (*w/v*) casamino acids, and 2 mM phenylacetonitrile till the cultures reached the stationary growth phase. The experiments were started by the addition of 10 % (*v/v*) of these precultures to 100 ml Na-citrate-phosphate buffer (pH 4) containing the nitrogen-free mineral medium (plus the indicated substrates) in 500 ml Erlenmeyer flasks with baffles. The growth of the cultures with 3 mM phenylacetonitrile (■), 3 mM phenylacetonitrile plus 3 mM ammonia sulphate (●), or without phenylacetonitrile (▲) was determined using a Klett photometer. The conversion of phenylacetonitrile in the cultures with only 3 mM phenylacetonitrile (□), 3 mM phenylacetonitrile plus 3 mM ammonia sulphate (○), or in a control without cells (Δ) was determined by HPLC.

Detection of the nitrile hydrolysing activity in cell extracts. The strain was grown in Na-citrate-phosphate buffer (pH 4) with the basic mineral medium plus glucose (20 mM) and either casamino acids (0.2 % *w/v*) or casamino acids (0.2 % *w/v*) plus phenylacetonitrile (1 mM). The cells were harvested in the late exponential growth phase and cell extracts prepared by using a mixer mill (see Materials and methods section). The cell extracts were incubated in 100 mM Na-phosphate buffer (pH 6.5), and the conversion of phenylacetonitrile was analysed by HPLC. These experiments clearly demonstrated that also cell extracts were able to convert phenylacetonitrile to phenylacetic acid (Fig. 6). Furthermore, it became evident that also cell extracts from casamino acids grown cells were able to convert phenylacetonitrile (although with lower enzymatic activities than those prepared from cells previously grown in the presence of phenylacetonitrile). In both systems only very low nitrile converting activities were detected (<0.01 U/mg of protein).

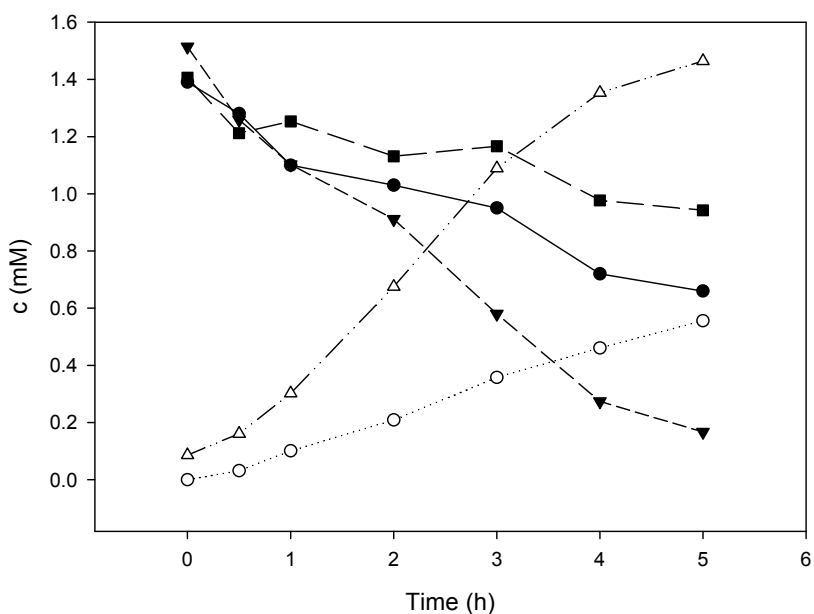


Fig. 6. Hydrolysis of phenylacetoneitrile by cell extracts from *E. oligosperma* R1. The cells were cultivated in two 3l Erlenmeyer flask with baffles in 1 l of a medium containing Na-citrate-phosphate buffer (pH 4) plus 20 mM glucose and either 0.2 % (w/v) casamino acids or 0.2 % (w/v) casamino acids plus 2.5 mM phenylacetoneitrile. The cultures were grown on a shaker (100 rpm) at 30 °C for 72 h till they reached an OD_{600nm} of 4.7 (with casamino acids) or 4.0 (with casamino acids plus phenylacetoneitrile). The cells were harvested by centrifugation (11,000×g, 20 min, 4 °C), washed twice in 100 mM Na-phosphate buffer (pH 6.5), resuspended in 100 mM Na-phosphate buffer (pH 6.5) and disintegrated using a mixer mill (see materials and methods). The reaction mixtures contained in a final volume of 1 ml 100 mM Na-phosphat buffer (pH 7.0), 2 mM phenylacetoneitrile (from a 1 M stock solution in methanol) and cell extracts (final concentration 3 mg of protein/ml). The reaction mixtures were shaken in an Eppendorf shaker at 30 °C and aliquots removed at the indicated time intervals. The reactions were terminated by the addition of 10 % 1 M HCl and the precipated proteins removed by centrifugation (5 min, 21,000×g) in an Eppendorf centrifuge. The concentrations of phenylacetoneitrile (▼ induced cells; ● non-induced cells) and phenylacetic acid (△ induced cells; ○ uninduced cells) were determined by HPLC. The control experiment contained phenylacetoneitrile (■) without cell extract.

Indications for a nitrilase activity. The experiments with resting cells and cell extracts indicated that a nitrilase activity was present because in both systems only very low amounts of phenylacetamide were detected. To further differentiate between a nitrilase and a nitrile hydratase plus amidase activity, aliquots of a cell extract were incubated either with phenylacetoneitrile or phenylacetamide. Surprisingly, it was found that the cell extracts were able to convert phenylacetamide to phenylacetic acid. The comparison of the reaction rates with phenylacetoneitrile and phenylacetamide demonstrated that the nitrile hydrolysing activity was more than three times higher than the amide hydrolysing activity (Fig. 7). This indicated, together with the observation that during the conversion of phenylacetoneitrile no amide was formed, that phenylacetoneitrile was converted by strain R1 by a nitrilase, and that in addition, a low amidase activity was present.

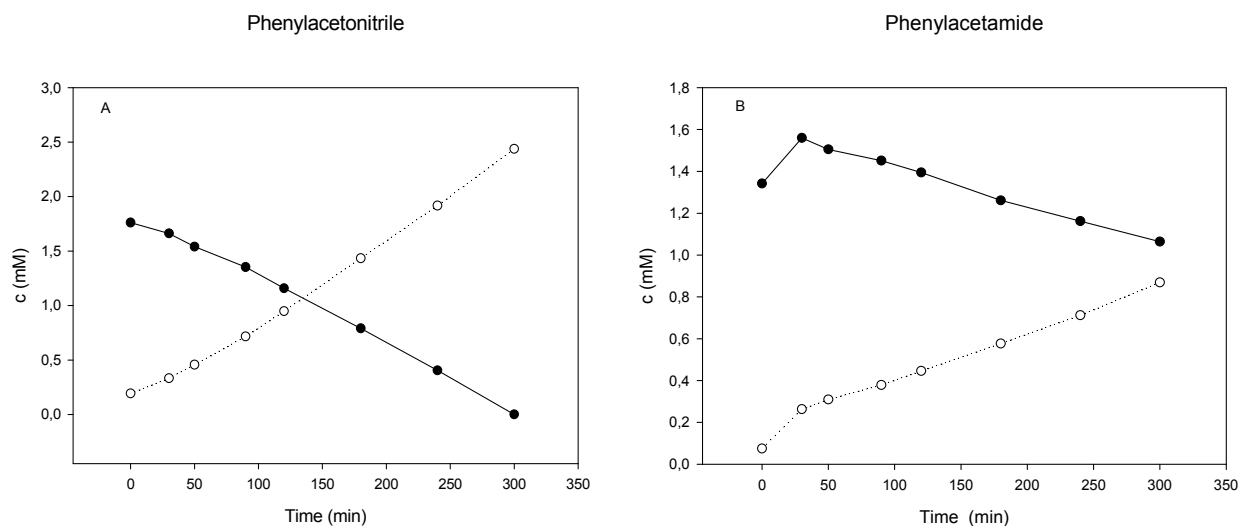


Fig. 7. Conversion of phenylacetoneitrile (A) and phenylacetamide (B) by cell extracts of *E. oligosperma* R1. The cells were grown in Na-citrate-phosphate buffer containing the basic mineral salts medium plus glucose (20 mM), casamino acids (0.2 %), and phenylacetoneitrile (2 mM) at 30 °C on a rotary shaker for 120 h till they reached an optical density of about $OD_{600nm}=8$. The cells were harvested by centrifugation (11,000×g, 20 min, 4 °C) and washed twice in 100 mM Na-phosphate-buffer (pH 6.5). The cell suspension was then disintegrated by using a Dyno-Mill (Bachofen AG, Basel, Switzerland). The reaction mixtures contained 2.8 mg of protein/ml in 100 mM Na-phosphate buffer (pH 6.5). The reactions were started by the addition of 10 µl of a phenylacetoneitrile stock solution (200 mM in methanol) or 10 µl of a phenylacetamide stock solution (200 mM in water), respectively. Aliquots (100 µl each) were taken at the indicated time intervals and the reactions terminated by the addition of 10 % 1 M HCl and immediate transfer to liquid nitrogen. The concentrations of phenylacetoneitrile, phenylacetamide, and phenylacetic acid in the supernatants were subsequently determined by HPLC.

Substrate range of the nitrile hydrolysing activity. To obtain a first overview about the substrate specificity of the nitriles hydrolysing activity, a cell extract was incubated with different nitriles. This demonstrated that the extract also converted, in addition to phenylacetonitrile, different ring-substituted derivatives of phenylacetonitrile and indole-3-acetonitrile (Table 1). The extract converted benzonitrile with a much lower activity than phenylacetonitrile. This suggested that the nitrile converting enzyme presumably is different from the previously studied nitrilases of fungal origin because the nitrilases from *Aspergillus nidulans* and *Fusarium solanii* both converted benzonitrile with much higher activities than phenylacetonitrile (Harper 1977; Kaplan *et al.* 2006c).

Table 1. Conversion of different aromatic nitriles by cell-free extracts of *E. oligosperma* R1.

Compound	Relative activity
Phenylacetonitrile	100
2-Chlorophenylacetonitrile	44
3-Chlorophenylacetonitrile	154
4-Chlorophenylacetonitrile	70
2,6-Dichlorophenylacetonitrile	6
4-Hydroxyphenylacetonitrile	69
Indole-3-acetonitrile	45
Benzonitrile	<5
Naphthalenecarbonitrile	<5

The organism was cultivated in a 3 l Erlenmeyer flask with baffles in 1 l of a medium containing Na-citrate-phosphate buffer (pH 4), 20 mM glucose, 0.2 % (*w/v*) casamino acids, 1 mM (NH₄)₂SO₄, and 1.5 mM phenylacetonitrile. The cells were harvested after 120 h by centrifugation (15 min, 11,000×*g*, 4 °C) and resuspended in 100 mM Na-phosphate buffer (pH 6.5). The cell-free extract was prepared by using a Dyno-Mill (see materials and methods). The reaction mixtures contained in 1 ml 100 mM Na-phosphate buffer (pH 6.5), and 2.8 mg of protein. The reactions were started by the addition of 2 mM of the respective nitriles. The reaction mixtures were incubated in 2 ml Eppendorf tubes at 1,400 rpm at 30 °C in an Eppendorf shaker. Aliquots were taken each 30 min and the reaction rates were calculated from the rates of the disappearance of the substrates. The specific activity with 2-phenylacetonitrile (= 100 %) was 0.005 U/mg of protein.

Enzymatic conversion of nitriles at low-pH-values. The whole cell experiments demonstrated that cells of *E. oligosperma* R1 could convert phenylacetoneitrile at a pH of the medium of 4, which was significantly lower than the previously determined threshold value for *E. coli* cells (Rustler *et al.* 2007). To test the acid tolerance of the process, resting cells of *E. oligosperma* were incubated at pH values of 1.5–9 with phenylacetoneitrile, and the reactions were analysed. These experiments demonstrated that the cells indeed converted phenylacetoneitrile in the whole pH range analysed (Fig. 8). No spontaneous hydrolysis of phenylacetoneitrile was observed under the acidic reaction conditions in control experiments without cells.

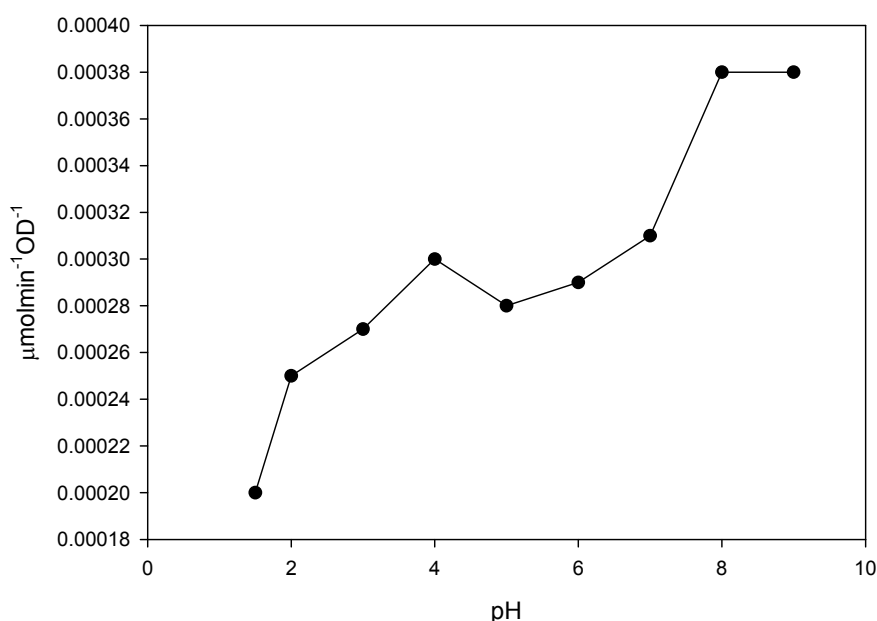


Fig. 8. Conversion of phenylacetoneitrile by resting cells of *E. oligosperma* R1 at different pH values. The cells were cultivated in a 3 l Erlenmeyer flask with baffles in 1000 ml of a medium consisting of Na-citrate-phosphate (pH 4), 20 mM glucose, 0.2 % (w/v) casamino acids and 2 mM phenylacetoneitrile. The yeasts were cultivated for 96 h at 30 °C and 100 rpm. The cells were harvested by centrifugation (15 min, 11,000×g, 4 °C) and resuspended in 100 mM KCl/HCl-buffer (pH 1.5), Na-citrate-phosphate (pH 2-6) or Tris/HCl (pH 7-9) to an optical density (OD_{600nm}) of 15. The cell suspensions (1.5 ml each in 2 ml Eppendorf vials) were incubated in an Eppendorf shaker at 1,400 rpm and 30 °C. The reactions were started by the addition of phenylacetoneitrile (2 mM) and 15 aliquots each taken within 3 h. The reactions were terminated by the addition of 10 % 1 M HCl. The cells were removed by centrifugation in an Eppendorf centrifuge (5 min, 21,000×g) and the supernatants analysed by HPLC. The reaction rates were quantified by analysing the turn-over of the nitrile.

DISCUSSION

Members of the genus *Exophiala* (and also other “black yeasts”) are found in nature in many different habitats. They have been repeatedly isolated from various plant materials, but also from extremely dry and oligotrophic environments (*e.g.*, sandstone surfaces) (Prenafeta-Boldu *et al.* 2006; Sterflinger and Prillinger 2001). Furthermore, they have been found quite often in biofilters used for waste gas treatment, and culture independent molecular studies suggested that *Exophiala* strains are present in creosote containing soils, which are often found near railway ties (Cox *et al.* 1996; Estevez *et al.* 2005a, b; Stach and Burns 2002). There are also several reports about the isolation of *Exophiala* strains from clinical material (Bossler *et al.* 2003; De Hoog *et al.* 2003).

The detection of *Exophiala* strains in biofilters used for off-gas treatments and other habitats rich in aromatic organic compounds can be easily explained by the ability of these organisms to degrade several aliphatic and aromatic compounds. Thus, certain isolates of *E. lecanii-corni* degrade volatile organic compounds (*e.g.*, ethylbenzene, toluene, benzene, some aliphatic ketones and esters) (Qi *et al.* 2002) and also isolates of *E. oligosperma* were previously shown to degrade styrene and toluene (Estevez *et al.* 2005; Cox *et al.* 1996, CBS strain collection). The resting cell experiments which were performed in the present study demonstrated that *E. oligosperma* R1 converted phenylacetonitrile via phenylacetic acid to 2-hydroxyphenylacetic acid. The formation of phenylacetic acid and 2-hydroxyphenylacetic acid as intermediates has previously also been described for the metabolism of styrene by *E. jeanselmei* (nowadays *E. oligosperma*; Cox *et al.* 1996; CBS). This suggests that in *Exophiala* strains, phenylacetate is an important intermediate in the degradation of aromatic compounds. 2-Hydroxyphenylacetic acid is very probably converted in these strains to 2,5-dihydroxyphenylacetic acid and maleylacetoacetate (Cox *et al.* 1996; Gunsch *et al.* 2005).

To the best of our knowledge this is the first report, which describes the ability of black yeasts to convert organic nitriles. Nevertheless, there are already several examples known from the literature, which describe the metabolism of nitriles by yeasts and filamentous fungi. Thus, the utilization of simple aliphatic and aromatic nitriles, such as acetonitrile, propionitrile or benzonitrile, as nitrogen sources has been shown for some yeasts which were (tentatively) identified as *Cryptococcus*, *Torulopsis* or *Candida* strains (Brewis *et al.* 1995; Fukuda *et al.* 1973; Kuwahara *et al.* 1980; Linardi *et al.* 1996; Rezende *et al.* 1999, 2000; Van der Walt *et al.* 1993; Dias *et al.* 2000). In most of these studies, it was suggested that the yeasts converted the substrates by using a nitrile hydratase/ amidase system. In contrast, it has been shown with purified enzyme preparations that filamentous fungi synthesize true nitrilases. Thus, Harper

(1977) and Goldlust and Bohak (1989) purified benzonitrile-converting nitrilases from *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*, and more recently, a nitrilase has been purified from *Aspergillus niger* (Kaplan *et al.* 2006c). The nitrile converting enzyme from *E. oligosperma* R1 seems to be different from the previously described fungal nitrilases because the *Exophiala* enzyme showed a clear preference for phenylacetonitrile and converted benzonitrile only with less than 5 % of the activity found with phenylacetonitrile. In contrast, the nitrilases from *Fusarium* and *Aspergillus* strains clearly preferred benzonitrile as substrate (Harper 1977; Kaplan *et al.* 2006c). Significant differences between the enzyme from *E. oligosperma* and the previously studied fungal enzymes might also be deduced from the different taxonomic positions of the relevant organisms. Thus, the genus *Exophiala* belongs to the *Ascomycota* in the class *Chaetothriomycetes* and the family *Herpotrichiellaceae*. In contrast, the previously studied *Aspergillus* strains belong to the *Ascomycota* in the class *Eurotiomycetes*, and the genus *Fusarium* is a member of the class *Sordariomycetes* (NCBI taxonomy browser).

In summary, it can be concluded that *E. oligosperma* R1 harbours a nitrile-hydrolysing activity, which might be biotechnologically interesting because of its acid tolerance, significant stability during prolonged reaction times and differences in the substrate specificity compared to previously described fungal nitrile hydrolysing enzymes. Unfortunately, the currently observed specific activities are rather low and do not allow a more detailed analysis of the enzyme. Recently, it has been shown that the induction of fungal nitrilases can be impressively increased by the addition of certain nitriles as inducers, such as valeronitrile and 2-cyanopyridine (Kaplan *et al.* 2006b). We are therefore currently trying to find better inducers (and also more suitable substrates) to allow a better analysis of the system.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Katrin Wendt-Potthof and Dr. Mathias Koschorreck (UFZ, Leipzig/Halle, Germany) for the sample from “Restsee 111” and B. Jones (Bangor Wales) for a sample of acid mine drainage from Parys Mountain, NorthWales. Furthermore, we are grateful to P. Hoffmann (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Braunschweig, Germany) and G.S. de Hoog (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands) for their help in identification of *E. oligospermum*.

The work was supported in the framework of the CERC3 program.

REFERENCES

- Bossler, A.D. , Richter, S. S. , Chavez, A. J., Vogelgesang, S. A., Sutton, D.A., Grooters, A. M., Rinaldi, M. G., de Hoog, G. S., Pfaller, M. A. (2003)** *Exophiala oligosperma* causing olecranon bursitis. *J. Clin. Microbiol.* 41:4779–4782.
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
- Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Bruguera, M. T., Cabanes, F. J. (1991)** Dyes as fungal inhibitors: effect on colony diameter. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2777–2780.
- Brewis, E., Van der Walt, J. P., Prior, B. A. (1995)** The utilization of aromatic, cyclic and heterocyclic nitriles by yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* 18:338–342.
- Bunch, A. W. (1998)** Nitriles. In: Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnology*, Vol 8a, *Biotransformations I*, Chap. 6. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 277–324.
- Cox, H. H., Faber, B. W., Van Heiningen, W. N., Radhoe, H., Doddema, H. J., Harder, W. (1996)** Styrene metabolism in *Exophiala jeanselmei* and involvement of a cytochrome P-450-dependent styrene monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1471–1474.
- De Hoog, G. S., Vicente, V., Caligiorne, R. B., Kantarcioglu, S., Tintelnot, K., Gerrits van den Ende, A. H., Haase, G. (2003)** Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. *J. Clin. Microbiol.* 41:4767–4778.
- De Hoog, G. S., Zeng, J. S., HARRAK, M. J., Sutton, D. A. (2006)** *Exophiala xenobiotica* sp. nov., an opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. *Antonie van Leeuwenhoek* 90:257–268.
- Dias, J. C. T., Rezende, R. P., Rosa, C. A., Lachanche, M.-A., Linardi, V. R. (2000)** Enzymatic degradation of nitriles by a *Candida guilliermodii* UFMG-Y65. *Can. J. Microbiol.* 46:525–531.
- Estevez, E., Veiga, M. C., Kennes, C. (2005a)** Biodegradation of toluene by the new fungal isolates *Paecilomyces variotii* and *Exophiala oligosperma*. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 32:33–37.
- Estevez, E., Veiga, M. C., Kennes, C. (2005b)** Biofiltration of waste gases with the fungi *Exophiala oligosperma* and *Paecilomyces variotii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:563–568.
- Fukuda, Y., Harada, T., Izumi, Y. (1973)** Formation of L- α -hydroxyacids from DL- α -hydroxynitriles by *Torulopsis candida* GN405. *J Ferment Technol* 51:393–397.
- Goldlust, A., Bohak, Z. (1989)** Induction, purification and characterization of the nitrilase of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Biotech. Appl. Biochem.* 11:581–601.
- Gunsch, C. K., Cheng, Q., Kinney, K. A., Szaniszló, P. J., Whitman, C. P. (2005)** Identification of a homogentisate-1,2-dioxygenase gene in the fungus *Exophiala lecanii-corni*: analysis and implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:405–411.
- Harper, D. B. (1977)** Fungal degradation of aromatic nitriles. Enzymology of C-N cleavage by *Fusarium solani*. *Biochem. J.* 167:685–692.

- Hasegawa, Y., Nakai, Y., Tokuyama, T., Iwaki, H. (2000)** Purification and characterization of cyclohexanone 1,2-monooxygenase from *Exophiala jeanselmei* strain KUF1-6N. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64:2696–2698.
- Hocking, A. D., Pitt, J. I. (1980)** Dichloran–glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:488–492.
- Hölker, U., Bend, J., Pracht, R., Tetsch, L., Müller, T., Höfer, M., de Hoog, G. S. (2004)** *Hortaea acidophila*, a new acid-tolerant black yeast from lignite. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:287–294.
- Kaplan, O., Nikolaou, K., Pišvejková, A., Martínková, L. (2006a)** Hydrolysis of nitriles and amides by filamentous fungi. *Enzyme. Microb. Technol.* 38:260–264.
- Kaplan, O., Vejvoda, V., Charvatova-Pišvejková, A., Martínková, L. (2006b)** Hyperinduction of nitrilases in filamentous fungi. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 33:891–896.
- Kaplan, O., Vejvoda, V., Plíhal, O., Pompach, P., Kavan, D., Fialová, P., Bezouška, K., Macková, M., Cantarella, M., Jirků, V., Křen, V., Martínková, L. (2006c)** Purification and characterization of a nitrilase from *Aspergillus niger* K10. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73:567–575.
- Kiziak, C., Conradt, D., Stolz, A., Mattes, R., Klein, J. (2005)** Nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191: cloning and heterologous expression of the gene and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Microbiology* 151:3639–3648.
- Kuwahara, M., Yanase, H., Ishida, Y., Kikuchi, Y. (1980)** Metabolism of aliphatic nitriles in *Fusarium solani*. *J. Ferment. Technol.* 58:573–577.
- Linardi, V. R., Dias, J. C. T., Rosa, C. A. (1996)** Utilisation of acetonitrile and other aliphatic nitriles by a *Candida famata* strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 44:67–71.
- Martínková, L., Křen, V. (2002)** Nitrile- and amide-converting microbial enzymes: stereo-, regio- and chemoselectivity. *Biocatal. Biotransform.* 20:73–93.
- Mateo, C., Chmura, A., Rustler, S., van Rantwijk, F., Stolz, A., Sheldon, R. A. (2006)** Synthesis of enantiomerically pure (*S*)-mandelic acid using an oxynitrilase-nitrilase bienzymatic cascade. A nitrilase surprisingly shows nitrile hydratase activity. *Tetrahedron Asymmetry* 17:320–323.
- Meier, J., Babenzien, H.-D., Wendt-Potthoff, K. (2004)** Microbial cycling of iron and sulfur in sediments of acidic and pH-neutral mining lakes in Lusatia (Brandenburg, Germany). *Biogeochemistry* 67:135–156.
- Pfennig, M., Lippert, K. D. (1966)** Über das Vitamin B12-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Arch. Mikrobiol.* 55:245–256.
- Prenafeta-Boldu, F. X., Summerbell, R., de Hoog, G. S. (2006)** Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? *FEMS Microbiol. Rev.* 30:109–130.

- Qi, B., Moe, W. M., Kinney, K. A. (2002)** Biodegradation of volatile organic compounds by five fungal species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58:684–689.
- Rezende, R. P., Dias, J. C. T., Rosa, C. A., Carazza, F., Linardi, V. R. (1999)** Utilisation of nitriles by yeasts strains isolated from a Brazilian gold mine. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45:185–192.
- Rezende, R. P., Dias, J. C. T., Ferraz, V., Linardi, V. R. (2000)** Metabolism of benzonitrile by *Cryptococcus* sp. UFMG-Y28. *J. Basic Microbiol.* 40:389–392.
- Rustler, S., Müller, A., Windeisen, V., Chmura, A., Fernandes, B., Kiziak, C., Stolz, A. (2007)** Conversion of mandelonitrile and phenylglycinonitrile by recombinant *E. coli* cells synthesizing a nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191. *Enzyme Microb. Technol.* 40:598–606.
- Schulze, B. (2002)** Hydrolysis and formation of C-N bonds. Chapter 12. In: Drauz, K, Waldmann, H (ed) *Enzyme catalysis in organic synthesis vol. II.* Wiley-VCH, Weinheim, pp. 699–715.
- Stach, J. E., Burns, R. G. (2002)** Enrichment versus biofilm culture: a functional and phylogenetic comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial communities. *Environ. Microbiol.* 4:169–182.
- Sterflinger, K., Prillinger, H. (2001)** Molecular taxonomy and biodiversity of rock fungal communities in an urban environment (Vienna, Austria). *Antonie van Leeuwenhoek* 80:275–286.
- Untereiner, W. A., Naveau, F. A. (1999)** Molecular systematics of the *Herpotrichiellaceae* with an assessment of the phylogenetic positions of *Exophiala dermatitidis* and *Phialophora americana*. *Mycologia.* 91:67–83.
- Untereiner, W. A., Straus, N. A., Malloch, D. (1995)** A molecular-morphotaxonomic approach to the systematics of the *Herpotrichiellaceae* and allied black yeasts. *Mycol. Res.* 99:897–913.
- Van der Walt, J. P., Brewis, E. A., Prior, B. A. (1993)** A note on the utilization of aliphatic nitriles by yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* 16:330–332.
- Woertz, J. R., Kinney, K. A., McIntosh, N. D., Szanislo, P. J. (2001)** Removal of toluene in a vapor-phase bioreactor containing a strain of the dimorphic black yeast *Exophiala lecanii-corni*. *Biotechnol. Bioeng.* 75:550–558.

**Characterization of the substrate specificity of the nitrile
hydrolysing system of the acidotolerant black yeast
Exophiala oligosperma R1**

S. Rustler^a, A. Chmura^b, R. A. Sheldon^b, A. Stolz^{a*}

^a*Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart, Allmandring 31, 70569 Stuttgart, Germany*

^b*Laboratory of Biocatalysis and Organic Chemistry, Delft University of Technology, Julianalaan
136, 2628 BL Delft, The Netherlands*

*** Corresponding author. Tel: +49 (0)711 68565489, Fax: +49 (0)711 68565725**

***E-mail address:* andreas.stolz@imb.uni-stuttgart.de**

ABSTRACT

The 'black yeast' *Exophiala oligosperma* R1 can utilise various organic nitriles under acidic conditions as nitrogen sources. The induction of a phenylacetonitrile converting activity was optimised by growing the strain in the presence of different nitriles and/or complex or inorganic nitrogen sources. The highest nitrile hydrolysing activity was observed with cells grown with 2-cyanopyridine and NaNO₃. The cells metabolised the inducer and grew with 2-cyanopyridine as sole source of nitrogen. Cell extracts converted various (substituted) benzonitriles and phenylacetonitriles. They usually converted the isomers carrying a substituent in the *meta*-position with higher relative activities than the corresponding *para*- or *ortho*-substituted isomers. Aliphatic substrates such as acrylonitrile and 2-hydroxy-3-butenitrile were also hydrolysed. The highest specific activity was detected with 4-cyanopyridine. Most nitriles were almost exclusively converted to the corresponding acids and no or only low amounts of the corresponding amides were formed. The cells hydrolysed amides only with extremely low activities. It was therefore concluded that the cells harboured a nitrilase activity. The specific activities of whole cells and cell extracts were compared for different nitriles and evidence obtained for limitation in the substrate-uptake by whole cells. The conversion of 2-hydroxy-3-butenitrile to 2-hydroxy-3-butenic acid at pH 4 demonstrated the unique ability of cells of *E. oligosperma* R1 to hydrolyse aliphatic α -hydroxynitriles under acidic conditions. The organism could grow with phenylacetonitrile as sole source of carbon, energy and nitrogen. The degradation of phenylacetonitrile presumably proceeds via phenylacetic acid, 2-hydroxyphenylacetic acid, 2,5-dihydroxyphenylacetic acid (homogentisate), maleylacetoacetate and fumarylacetoacetate.

INTRUCTION

Organic nitriles (R-CN) are widely used in organic chemistry as intermediates for the synthesis of various compounds such as carboxylic acids and amides (Banerjee *et al.* 2002). Since several years there is an increasing interest in identifying and using nitrile converting biocatalysts in order to replace the traditional chemical synthetic reactions for the production of acids and amides which require rather harsh acidic or alkaline conditions (Singh *et al.* 2006). Furthermore, several examples have been described that demonstrate that nitrile-converting biocatalysts allow chemo-, regio-, or enantioselective reactions that are difficult to achieve by purely chemical reactions (Bunch 1998a, Martínková & Křen 2001, Schulze 2002, Brady *et al.* 2004). These investigations resulted in the isolation of several nitriles converting Gram-positive and Gram-negative bacteria (often *Rhodococcus* or *Pseudomonas* strains) and some yeasts and fungi (Banerjee *et al.* 2002, Bunch 1998b, Kaplan *et al.* 2006a, b, Kaul *et al.* 2004, Kiziak *et al.* 2005, Rezende *et al.* 1999). These organisms converted nitriles either to the acids by using nitrilases or to the amides by using nitrile hydratases.

An interesting application for nitrile hydrolysing organisms or enzymes is the conversion of α -hydroxynitriles, because (chiral) α -hydroxycarboxylic acids and amides are interesting products for the chemical industry (Gröger 2001). Unfortunately, the biotransformation of α -hydroxynitriles in aqueous systems is hampered by the low stability of the substrates under neutral conditions. In contrast, these substrates are generally more stable under acidic conditions (Rustler *et al.* 2007). However, most of the known nitrilases are unstable at acidic pH values (Banerjee *et al.* 2002). Therefore, we are trying to find whole cell catalysts which are able to catalyse these biotransformations under acidic conditions.

We have recently isolated after an enrichment at pH 4 with phenylacetone nitrile as sole source of nitrogen an acidotolerant black yeast which was subsequently identified as a new strain of *Exophiala oligosperma* (Rustler & Stolz 2007). This strain (R1) was the first 'black yeast' for which the ability to convert organic nitriles was described and it was found that the organism could grow at pH 4 with phenylacetone nitrile as sole source of carbon, nitrogen and energy. Although this nitrile converting system showed some biotechnological potential because of the unique taxonomic position of the producing organism and the acid-resistance of the process, the observed activities were not sufficient for a detailed analysis of the reaction and any possible application. Therefore, in the present communication we further optimised the induction conditions for the production of the nitrile converting activity and subsequently analysed the responsible enzymatic activity.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms and culture conditions. *Exophiala oligosperma* R1 [deposited at the Centraalbureau voor Schimmelcultures in Utrecht (The Netherlands) as strain CBS 120260] was routinely grown in Na-citrate-phosphate mineral media consisting of 20 % (v/v) 0.5 M Na-citrate-phosphate buffer (pH 4) and the nitrogen-free mineral medium described previously (Rustler & Stolz 2007) plus 0.2 % (w/v) casamino acids and 20 mM glucose as sources of nitrogen, carbon and energy. The cultures were usually grown for 72–120 h in 3 L Erlenmeyer flasks with baffles at 30 °C on a rotary shaker (100 rpm).

Growth measurements. The growth of the strain was monitored spectrophotometrically by measuring the optical density at 600 nm (OD_{600nm}) with a Cary 100 Bio spectrophotometer (Varian Inc., Mulgrave, Australia) or by using a Klett photometer (Klett Manufacturing Co. Inc., Brooklyn, NY). An OD_{600nm} of 1 corresponded to about 75 Klett units and 0.25 mg of cell dry weight per mL of culture.

Preparation of cell extracts. The cells were harvested at the beginning of the stationary growth phase by centrifugation ($11,000\times g$, 15 min, 4 °C) and washed twice in 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 6.5). The cells were then resuspended in 0.1 M Tris/HCl buffer (pH 7) to an OD_{600nm} of about 300 and disintegrated by using a French Press (Aminco, Silver Springs, Md., U.S.A.). The cells were disintegrated seven times at 4 °C by using the miniature pressure cell (Aminco, Silver Springs, Md., U.S.A.) with a cell pressure of about 16,000 psi. The samples were centrifuged ($6,000\times g$, 10 min, 4 °C) and the liquid phase was finally clarified by ultracentrifugation ($100,000\times g$, 60 min, 4 °C). The supernatant was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –70 °C. The protein content of the cell extract was determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

Enzyme assays. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that converted 1 μ mol of substrate per minute.

For the determination of nitrile hydrolysis with resting cells, the cells were harvested at the beginning of the stationary phase by centrifugation ($11,000\times g$, 15 min, 4 °C), washed twice in 0.1 M Na-citrate-phosphate buffer (pH 4) and finally resuspended in 0.1 M Na-citrate-phosphate buffer (pH 4). The standard assay usually contained 1.5–2 mL 0.1 M Na-citrate-phosphate buffer (pH 4), 1–10 mM substrate and cells corresponding to an OD_{600nm} of 2–15. The reactions were started by the addition of the substrates and performed in Eppendorf cups incubated in a

thermoshaker at 30 °C and 1,400 rpm (Thermomixer Comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The stock solutions (1 M) of the nitriles (or amides) were routinely prepared in methanol (or a 1:1 mixture of methanol and water for some amides). After different time intervals, samples (50–100 µL each) were taken and the reactions were stopped by adding 1 M HCl (5–10 µL). The cells were removed by centrifugation (21,000×g, 10 min, 4 °C) and the supernatants finally analysed by using high pressure liquid chromatography (HPLC).

The nitrile hydrolysing activity of cell extracts was determined in reaction mixtures (0.75–1 mL) containing 0.1 M Tris/HCl (pH 7), 0.15–0.2 mg/mL of protein and 1–5 mM of the substrate. The reactions were then performed as described for the resting cell experiments. The reactions were usually terminated by the addition of 10 % (v/v) 1 M HCl and the precipitated proteins were removed by centrifugation (21,000×g, 10 min, 4 °C). The concentrations of the substrates and products in the supernatants were determined by HPLC.

The activities were usually calculated from the turn-over of the substrate and correlated to the dry weight of the cells or the amount of protein applied.

Comparison of the conversion of different nitriles by resting cells and cell extracts.

Exophiala oligosperma R1 was cultivated in 3 L Erlenmeyer flasks with baffles in 1 L of the Na-citrate-phosphate mineral medium (pH 4) containing glucose (20 mM), NaNO₃ (4 mM), and 2-cyanopyridine (15 mM). The cultures were incubated at 30 °C on a rotary shaker (100 rpm). At the end of the exponential growth phase (after 72 h of cultivation; OD_{600nm} ≈ 3.5) the cells were harvested by centrifugation (11,000×g, 15 min, 4 °C) and washed in 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 6). An aliquot of the cells was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –70 °C. The other aliquot was resuspended in 0.1 M Tris/HCl (pH 7) and used for the preparation of cell extracts as described above. For the experiments cells and cell extracts were thawed and resuspended or diluted, respectively, in 0.1 M Tris/HCl (pH 7). The reaction mixtures finally contained in 0.1 M Tris/HCl (pH 7) resting cells with an OD_{600nm} of 2 or a protein concentration of 0.2 mg/mL in case of the cell extracts.

Analytical methods. The concentrations of the nitriles and their corresponding amides and acids were analysed by HPLC (ChemStation LC3D, Autosampler G1329A, Thermostat 1330B, Diode Array Detector G1315B, Quat-HPLC pump G1311A; Agilent Technologies, Santa Barbara, CA). The individual compounds were usually detected spectrophotometrically at 210 nm.

A reversed-phase column [125 by 4 mm (internal diameter); Trentec, Gerlingen, Germany] filled with 5-µm-diameter particles of Lichrospher-RP8 endcapped (E. Merck AG, Darmstadt, Germany) was used in most experiments for separation of individual compounds. The

conversion of cyanopyridines, acrylonitrile and 2-hydroxy-3-butenitrile was analysed by using a column [size 250 by 4 mm (internal diameter) Trentec, Gerlingen, Germany] filled with 5 μm particles of Nucleosil-100 C18 (Macherey & Nagel, Düren, Germany). The columns were incubated at 21 °C in a column heater /chiller (Jones Chromatography Model 7956, Alltech Associates Inc., Hesperia, CA) and the samples were cooled at 4 °C.

The solvent systems for the analysis of the turn-over experiments with benzonitrile, 2-, 3-, and 4-tolunitrile, 2-, 3-, and 4-chlorobenzonitrile, 2-, 3-, and 4-hydroxybenzonitrile, phenylacetoneitrile, 2-phenylpropionitrile and 2-, 3-, and 4-chlorophenylacetoneitrile contained 30–50 % (v/v) acetonitrile and 0.3 % H_3PO_4 (v/v) in H_2O as mobile phases. The conversion of mandelonitrile was analysed by using a solvent system which consisted of 40 % (v/v) methanol, 0.3 % (v/v) H_3PO_4 and water.

Acrylonitrile, 2-hydroxy-3-butenitrile and their potential products were analysed by using a solvent system consisting of 0.5 % (v/v) acetonitrile, 0.1 % (v/v) H_3PO_4 and 99.4 % (v/v) H_2O . The detection of these aliphatic substances was performed at 195 nm.

2-, 3-, and 4-cyanopyridine were analysed by using a solvent system which contained 20 % (v/v) acetonitrile and 0.3 % (v/v) H_3PO_4 in water by using a Lichrospher-RP8 column. The products formed from 3- and 4-cyanopyridine were detected by using a solvent system consisting of 10 % (v/v) acetonitrile plus 90 % (v/v) 30 mM Na- PO_4 -buffer (pH 7) and 5 mM of the ion-pair reagent TBAHS (tetrabutylammoniumhydrogensulfate) and by using a Nucleosil-100 C18 column as the stationary phase (Dazzi *et al.* 2001).

Products formed from 2-cyanopyridine were analysed with a Nucleosil-100 C18 column using a solvent system composed of 99 % (v/v) 30 mM Tris/HCl (pH 9.0) plus 1 % (v/v) acetonitrile and 5 mM TBAHS. The detection of substances which were separated in solvent systems with TBAHS was performed at 265 nm. The average flow rate was 1 mL/ min.

Synthesis of 2-hydroxy-3-butenitrile. Into a 250 mL round bottom flask 0.09 mol (5 g) acrolein, 0.1 mol (9.9 g) trimethylsilyl cyanide and 0.01 mol (3.19 g) zinc iodide were added, followed by addition of 200 mL dichloromethane. The reaction was stirred overnight at RT. Then, the solvent was evaporated under reduced pressure, giving the silyl protected cyanohydrin. The latter was hydrolyzed at 40 °C to 2-hydroxy-3-butenitrile by reacting it with 150 mL 3 M HCl. The reaction was completed after 2 h. The pure product (dark brown liquid) was isolated from the reaction mixture by triple extraction with diethyl ether (3 x 150 mL), drying on MgSO_4 and concentrating the product using a rotary evaporator (Gassman and Talley 1978). Proton NMR analysis confirmed the product formation. ^1H NMR (300 Mhz, CDCl_3): δ = 5.9 (ddd, 2H, J '=16.2 J '=11.1, J '=6.3 Hz), 5.6 (d, 3 H, J =17.1), 5.4 (d, 3 H, J =10.2), 5.0 (d, 1 H, J =5.1).

Synthesis of 2-hydroxy-3-butenic amide. Into a 10 mL glass reactor, 12 mmol (1 g) 2-hydroxy-3-butenitrile and 3.2 mL 37 % HCl were added. The reaction was shaken for 3.5 h at 10 °C until the cyanohydrin was completely converted into the corresponding 2-hydroxy-3-butenic amide. The latter product was extracted to ethyl acetate, dried on Na₂SO₄ and the resulting clear solution was concentrated using a rotary evaporator (van Langen *et al.* 2004). The formation of the product was confirmed by proton NMR. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.9 (bs, CONH₂), 6.2 (ddd, 2H, *J*'=16.8, *J*'=11.4, *J*'=6.6 Hz), 5.5 (d, 3 H, *J*=16.5), 5.3 (d, 3 H, *J*=10.5), 4.7 (d, 1H, *J*=5.7 Hz).

Synthesis of 2-hydroxy-3-butenic acid. Into a 10 mL round bottom flask, 6 mmol (0.5 g) 2-hydroxy-3-butenic amide and 3.0 mL 37 % HCl were added. The reaction was refluxed at 125 °C for 1.5 h. 2-hydroxy-3-butenic acid was extracted to ethyl acetate, dried on Na₂SO₄ and the product was concentrated *in vacuo* (van Langen *et al.* 2004). The formation of the product was confirmed by proton NMR. ¹H NMR (300 Mhz, CDCl₃): δ = 6.0 (ddd, 2H, *J*'=15.4, *J*'=11.4, *J*'=6.6 Hz), 5.5 (d, 3H, *J*=17.4), 5.3 (d, 3H, *J*=10.5), 4.8 (m, 1H).

Chemicals. Trimethylsilyl cyanide and zinc iodide (98+ %) were obtained from Acros Organics BVBA (Geel, Belgium). All other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Germany) or E. Merck AG (Darmstadt, Germany). All the chemicals were used as supplied, without further purification.

RESULTS

Induction of the nitriles converting activity after addition of different possible inducers.

There are several examples found in the literature which demonstrate that the addition of certain nitriles may have pronounced inducing effects on nitriles converting enzymes. Thus, the addition of ϵ -caprolactam or isovaleronitrile resulted in *Rhodococcus rhodochrous* J1 and *R. rhodochrous* K22 in the formation of relatively large amounts of the respective nitrilases which corresponded to 20–30 % of the total soluble protein (Nagasawa *et al.* 1990, Kobayashi *et al.* 1991). Recently, 2-cyanopyridine and valeronitrile have been described as especially potent inducers of the nitrilase from *Aspergillus niger* K10 (Kaplan *et al.* 2006b). Therefore, the influence of these and structural similar compounds was assayed on the induction of the nitrile converting activity of *E. oligosperma* R1. The strain was grown in Na-citrate-phosphate medium (pH 4) with glucose (20 mM), casamino acids (0.2 % w/v) and different potential inducers: phenylacetoneitrile, 2-, 3-, and 4-chlorophenylacetoneitrile, indole-3-acetoneitrile, 4-hydroxyphenylacetoneitrile, 2-, 3-, and 4-cyanopyridine, isovaleronitrile, or benzonitrile (2 mM each). Furthermore, also ϵ -caprolactam (45 mM) was analysed.

Exophiala oligosperma R1 did not grow in the presence of the indicated concentrations of 2-, 3-, and 4-chlorophenylacetoneitrile and indole-3-acetoneitrile. In contrast, no inhibitory effects of the other compounds were observed on growth. The cells were harvested at the beginning of the stationary growth phase by centrifugation (11,000 \times g, 15 min, 4 °C), washed, and resuspended in 0.1 M Na-citrate-phosphate buffer (pH 4) to an OD_{600nm} of 11. Finally, phenylacetoneitrile (2 mM) was added and the conversion of the nitrile analysed by HPLC.

The experiments demonstrated that the addition of 2-cyanopyridine, ϵ -caprolactam, and isovaleronitrile increased the nitrile converting activity compared to the constitutive level 4.4-, 2.9-, and 2-fold, respectively. In contrast, the previously used inducer phenylacetoneitrile resulted only in a 1.5-fold increase in enzyme activity. Also the other tested putative inducers only resulted in a less than 1.5-fold increase in the nitrile converting activity.

Influence of different nitrogen sources on induction and optimisation of the inducer concentrations. In the following experiment the influence of different nitrogen sources on the induction of the nitriles converting activity was assayed. The cells were grown in Na-citrate-phosphate medium (pH 4) with glucose (20 mM) plus casamino acids (0.2 % w/v), NaNO₃ (3 mM) or (NH₄)₂SO₄ (1.5 mM) with or without phenylacetoneitrile (2 mM), 2-cyanopyridine (2 mM), ε-caprolactam (45 mM), or a mixture of 2-cyanopyridine plus isovaleronitrile (2 mM each). In these experiments the highest activities were obtained in a growth medium containing (NH₄)₂SO₄ plus ε-caprolactam (45 mM), followed by a growth medium which contained NaNO₃ plus 2-cyanopyridine.

In the previous experiments fixed concentrations of the inducers (2 mM of the nitriles or 45 mM ε-caprolactam) were used. In the following experiments the concentrations of the previously identified best inducers (ε-caprolactam and 2-cyanopyridine) were varied (2–45 mM). The cells were grown in 300 mL Klett-flasks with baffles in 50 mL of a medium which contained Na-citrate-phosphate buffer (pH 4), nitrogen-free mineral medium, 20 mM glucose. Furthermore, casamino acids (0.2 % w/v), (NH₄)₂SO₄ (2 mM), or NaNO₃ (4 mM) were offered as nitrogen sources. The cells were harvested at the end of the exponential growth phase (after 96 h with casamino acids or after 112 h with inorganic nitrogen sources). The cells reached in the presence of the casamino acids significantly higher final cell densities than after growth with the inorganic nitrogen sources (OD_{600nm} of about 6.5 or 3.5, respectively). In both systems (inorganic or organic nitrogen sources) the addition of ε-caprolactam and 2-cyanopyridine did not result in significant decreases in the finally reached optically densities. The results demonstrated that with ε-caprolactam the highest nitrile hydrolysing activities were found with 7.5 mM ε-caprolactam and (NH₄)₂SO₄. In these experiments 2-cyanopyridine was a better inducer than ε-caprolactam. Almost twice as much activity could be detected in samples that had been grown with NaNO₃ and 10 mM 2-cyanopyridine (Fig. 1).

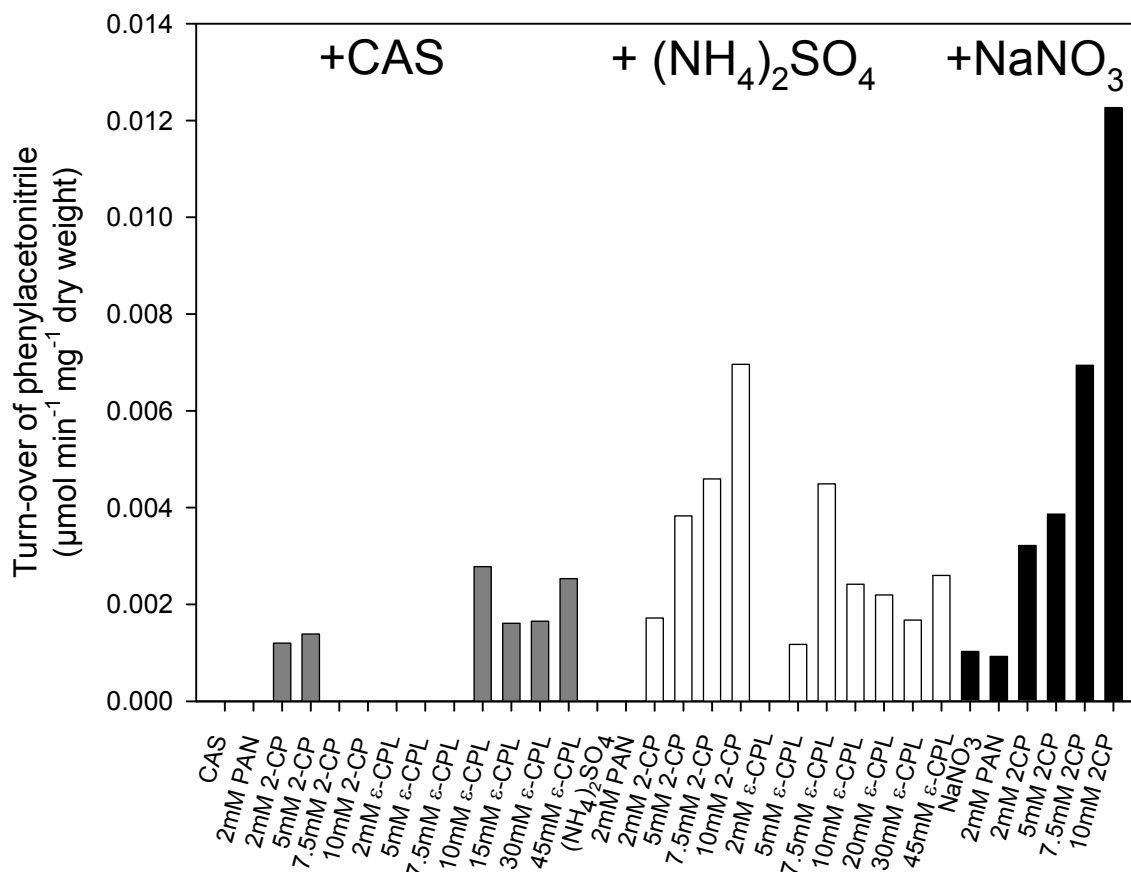


Fig. 1. Nitrile hydrolyzing activity of resting cells of *E. oligosperma* R1 after growth in the presence of different nitrogen sources and different concentrations of ϵ -caprolactam or 2-cyanopyridine. The cells were cultivated as described in the text in media containing Na-citrate buffer (pH 4), glucose (20 mM) and 0.2 % (w/v) casamino acids (CAS; ■), 4 mM NaNO₃ (■), or 2 mM (NH₄)₂SO₄ (□). The cells were harvested by centrifugation (11,000×g, 15 min, 4 °C), washed in 0.1 M Na-citrate-phosphate buffer (pH 4), and finally resuspended in 0.1 M Na-citrate-phosphate buffer (pH 4) to an OD_{600nm} of approximately 15. The conversion of phenylacetone nitrile (2 mM) by the resting cells was analysed using a thermoshaker (30 °C, 1,400 rpm) as described in the materials and methods section.

Conversion of 2-cyanopyridine by the cells. The analysis of further induction experiments with 2-cyanopyridine demonstrated that the cells metabolised the inducer. Thus, in the presence of 4 mM NaNO₃ an (almost) complete disappearance of 2-CP (10–15 mM) was observed within 96–144 h. The analysis of these reactions by HPLC [solvent system: 1 % (v/v) acetonitrile and 99 % (v/v) 30 mM Tris/HCl, pH 9.0, plus 5 mM TBAHS, see materials and methods] demonstrated the turn-over of 2-CP (R_t = 19.4 min) and the formation of two metabolites. These metabolites were according to their retention times and *in situ* spectra identified as picolinic acid (pyridine-2-carboxylic acid) (R_t = 11.2 min) and picolinic amide (2-pyridinecarboxamide) (R_t = 10.5 min) (Fig. 2). The strain also grew in the absence of NaNO₃ with 10–15 mM 2-CP as sole source of nitrogen and also under these conditions almost completely converted the nitrile with similar

specific activities. Further, resting cell experiments with cells grown with 2-cyanopyridine (12.5 mM) in the absence or presence of NaNO₃ (4 mM) did not show any significant differences in the ability to convert phenylacetonitrile.

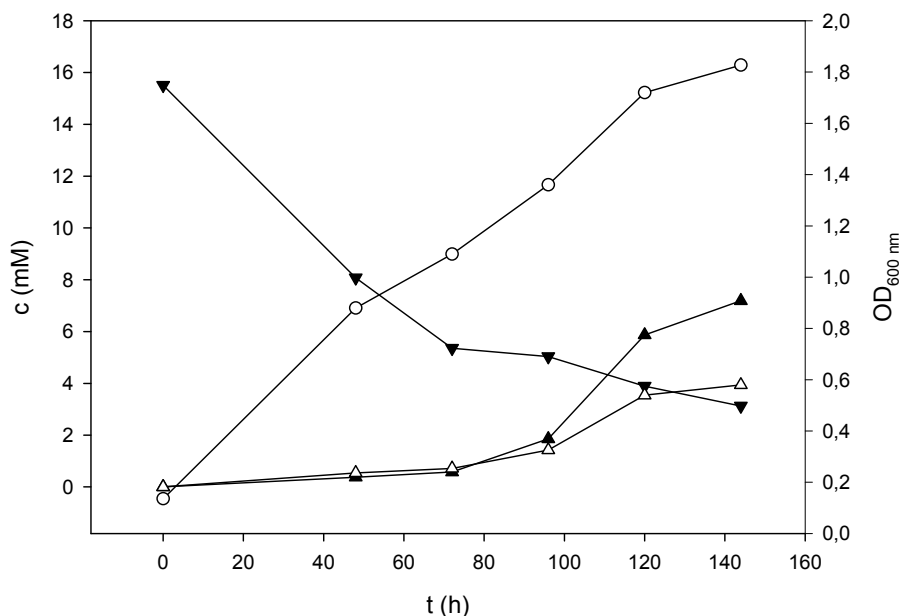


Fig. 2. Turn-over of 2-cyanopyridine by growing cells of *E. oligosperma* R1. The cells were grown in Na-citrate-phosphate medium (pH 4) with glucose (20 mM), NaNO₃ (4 mM), and 2-cyanopyridine (15 mM). The cells were incubated in Erlenmeyer flasks on a rotary shaker (100 rpm) at 30 °C. The growth of the culture was monitored by measuring the optical density at 600 nm (O). After different time intervals samples were taken and the reactions terminated by adding 10 % (v/v) 1 M HCl. Cells were removed by centrifugation (21,000×g, 10 min, 4 °C) and the concentration of 2-cyanopyridine (▼), picolinic acid (▲), and picolinic amide (△) in the supernatants determined by HPLC.

Identification of better substrates for the nitrile converting enzyme. The optimisation of the induction conditions described above resulted in an approximately 20-fold increase of the nitrile-converting activity compared to the initially found values (for cells grown with phenylacetonitrile and casamino acids) (Rustler & Stolz 2007). Nevertheless, even these ‘optimised’ cells (grown in Na-citrate-phosphate medium with 4 mM NaNO₃ and 15 mM 2-cyanopyridine) demonstrated with phenylacetonitrile as substrate only activities of about 0.021 U per mg of dry weight. It was therefore tested if nitriles which had been previously identified as good substrates for fungal nitrilases (Kaplan *et al.* 2006a, Goldlust & Bohak 1989) were converted with higher specific activities. Therefore, whole resting cells were incubated with benzonitrile, 3-, and 4-cyanopyridine (2 mM each) and acrylonitrile (1.5 mM) (Fig. 3A).

The experiments demonstrated that the resting cells converted 3- and 4-cyanopyridine about 7 and 13-times faster, respectively, than phenylacetonitrile (Table 1). The resting cells converted 4-

cyanopyridine after induction with 2-cyanopyridine with specific activities of 0.27 U/mg of dry weight. This represented an approximately 270-fold increase compared to the specific activity previously reported for the conversion of phenylacetonitrile by cells grown with casamino acids plus phenylacetonitrile (Rustler & Stolz 2007). The experiments further showed that benzonitrile and acrylonitrile were also converted with higher activities than phenylacetonitrile.

Comparison of the nitrile hydrolysing activity of whole cells and cell extracts. In the following experiments it was tested if the uptake of the substrates could be a limiting factor for the conversion of nitriles by *E. oligosperma* R1. Therefore, cell extracts were prepared and the conversion of benzonitrile, phenylacetonitrile, 3-, and 4-cyanopyridine and acrylonitrile compared between resting cells and cell extracts (Fig. 3). The experiments demonstrated that the cell extracts exhibited significant activities for the transformation of the cyanopyridines and specific activities of cell extracts for the conversion of 4-cyanopyridine up to 2.5 U/mg of protein were calculated (Table 1). In the literature generally protein contents of 39–56 % (expressed as % of dry weight) have been described for different yeast species (Verduyn 1991). An average of 50 % protein content (related to the dry weight) was used for the comparison of the turn-over-rates of cell extracts and resting cells. Thus, it was calculated that the cell extracts converted 3-, and 4-cyanopyridine as well as acrylonitrile with up to 5-times higher specific activities than the resting cells. This suggested that at least in the case of rapidly converted substrates the uptake of the nitriles has a limiting effect on the *in vivo* metabolism of organic nitriles by the yeast cells. Furthermore, also the comparison of the relative activities of the whole cells and the cell extracts with different nitriles suggested a significant influence of the cell membrane on the nitrile metabolism because the whole cells converted the cyanopyridines and acrylonitrile in comparison to benzonitrile with decreased relative activities (Table 1). This was especially evident for the substrates benzonitrile and acrylonitrile, because crude extracts converted acrylonitrile faster than benzonitrile, while this was the opposite in the whole cell system.

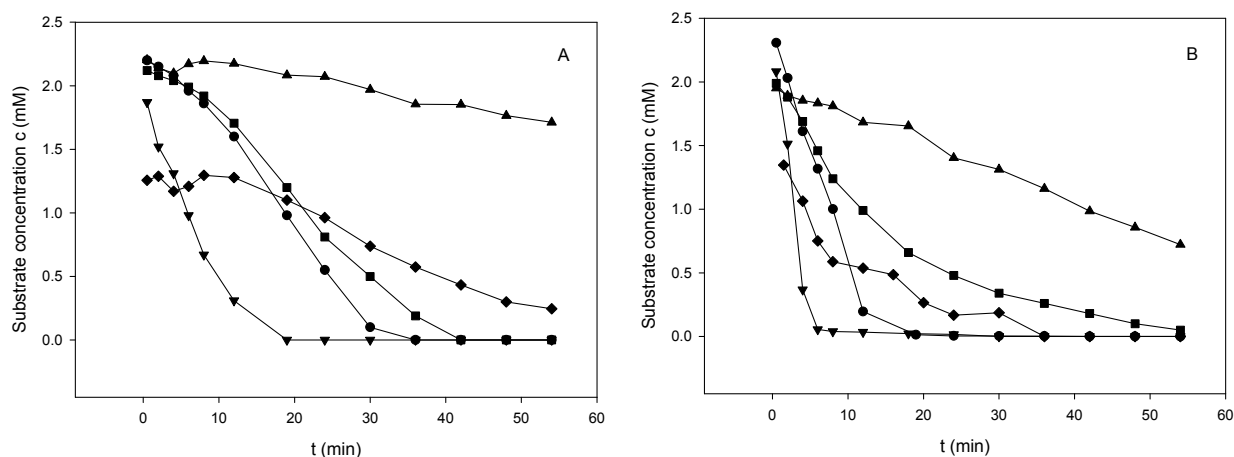


Fig. 3. Turn-over of different nitriles by whole cells (A) and cell extracts (B) of *E. oligosperma* R1. The resting cells and cell extracts were prepared as described in the materials and methods section. The reaction mixtures (750 μ L each) were incubated in 1.5 mL cups in a thermoshaker (1 400 rpm, 30 $^{\circ}$ C). The reactions were started by the addition of 4-cyanopyridine (\blacktriangledown), 3-cyanopyridine (\bullet), benzonitrile (\blacksquare), phenylacetoneitrile (\blacktriangle) (2 mM each), or acrylonitrile (\blacklozenge ; 1.5 mM). After different time intervals samples were taken and the reactions terminated by adding 20 % (v/v) 1 M HCl. The samples were clarified by centrifugation (21,000 \times g, 10 min, 4 $^{\circ}$ C), and the supernatants analysed by HPLC (see material and methods). The specific activities were calculated from the experiments shown in Fig. 3 based on the decrease of the nitrile concentrations and related to the dry weight of the cells or the protein concentration in the experiments with cell extracts, respectively.

Table 1. Conversion of different nitriles by whole cells and cell extracts of *E. oligosperma* R1

Compound	Activity of whole cells		Activity of cell extracts	
	U/mg of dry weight	Relative activity	U/mg of total protein	Relative Activity
Benzonitrile	0.115	100	0.48	100
Phenylacetoneitrile	0.021	18	0.11	22
3-Cyanopyridine	0.14	124	1	208
4-Cyanopyridine	0.27	232	2.46	512
Acrylonitrile	0.058	50	0.58	121

The specific activities were calculated from the experiments shown in Fig. 3 based on the decrease of the nitrile concentrations and related to the dry weight of the cells or the protein concentration in the experiments with cell extracts, respectively.

Conversion of different nitriles by cell extracts. The substrate specificity of the nitrile hydrolysing activity was determined with cell extracts and compared to other fungal nitrile converting enzymes (Table 2). These experiments demonstrated that cell extracts from *E. oligosperma* R1 converted in addition to benzonitrile and the cyanopyridines various methyl-, chloro-, and hydroxy-substituted benzonitriles and phenylacetonitriles. The cell extracts converted in general all isomers of a given substituted benzonitrile or phenylacetonitrile. Nevertheless, it became evident that in most cases the *meta*-substituted isomers were converted with the highest relative activities. In most cases the *meta*-substituted benzonitriles were even faster converted than benzonitrile. In contrast, the *ortho*-substituted isomers were generally converted with the lowest relative activities.

Phenylacetonitriles which carried a larger substituent at the α -position than a hydrogen atom (such as mandelonitrile and 2-phenylpropionitrile) were converted with significantly reduced conversion rates. The aliphatic substrate acrylonitrile was converted with high relative activities (121 % compared to benzonitrile).

The conversion of the nitriles resulted in almost all experiments (with the exceptions of 2-chlorobenzonitrile, 4-cyanopyridine, and acrylonitrile as substrates) in the formation of one clearly prominent product which represented (according to its signal intensity during the HPLC analysis) more than 95 % of the products formed (Table 2). These products were identified by the comparison with authentic standards by their retention times and *in situ* UV/VIS spectra as the corresponding acids. In the cases of 4-cyanopyridine and acrylonitrile two products were formed in a ratio of about 9:1. The conversion of 2-chlorobenzonitrile resulted in two signals in a ratio of 7:3. However, also for these substrates it was shown by using authentic standards that the prominent products were the corresponding acids. The minor products were identified according to their retention times as the corresponding amides.

The conversion of 2-cyanopyridine and 2-hydroxybenzonitrile did not result in the formation of detectable amounts of products. However, in the case of 2-cyanopyridine the conversion of the substrate to picolinic acid and picolinic amide had already been observed in the growth experiment described before (see Fig. 2).

The cell extracts were also incubated with several amides, which would be intermediately formed if the cells would harbour a nitrile hydratase. The experiments showed that picolinic amide and nicotinic amide were not converted and isonicotinic amide only with extremely low activities to the corresponding acid. This indicated only a rudimentary amidase activity and gave strong evidence that the nitriles were indeed converted by a nitrilase activity.

Table 2. Comparison of the relative nitrile hydrolysing activities of cell extracts from *Exophiala oligosperma* R1, *Fusarium solani* O1, *Penicillium multicolor* CCF 2244 and the purified nitrilase from *Aspergillus niger* K10.

Substrate	<i>E. oligosperma</i> R1		<i>P. multicolor</i> CCF 2244 ¹ (whole cells)	<i>F. solani</i> O1 ² (purified enzyme)	<i>A. niger</i> K10 ³ (purified enzyme)
	Relative activity (%)	Formation of amide (% of total products)	Relative activity (%)	Relative activity (%)	Relative activity (%)
Benzonitrile	100	nd	100	100	100
2-Tolunitrile	≤5	nd	nd	nd _m	nd
3-Tolunitrile	154	nd	11.3	33	5.5
4-Tolunitrile	16	nd	nd	16	3.4
2-Hydroxybenzonitrile	≤5	nd	nd	nd _m	nd
3-Hydroxybenzonitrile	140	nd	0.8	80	5.8
4-Hydroxybenzonitrile	10	nd	nd	3	nd
2-Chlorobenzonitrile	<10	29	nd	nd _m	nd
3-Chlorobenzonitrile	100	<5	14.3	87	41
4-Chlorobenzonitrile	49	nd	2.8	40	29.8
2-Cyanopyridine	<10	nd	40	nd _m	14.2
Picolinic amide	nd	-	nd	nd _m	-
3-Cyanopyridine	208	nd	15	28	32.4
Nicotinic amide	nd	-	18	nd _m	-
4-Cyanopyridine	566	<10	72	130	410.7
Isonicotinic amide	<5	-	nd	nd _m	-
Phenylacetoneitrile	19	nd	2.3	nd _m	10.8
2-Chlorophenylacetoneitrile	11	nd	nd _m	nd _m	nd _m
3-Chlorophenylacetoneitrile	35	nd	nd _m	nd _m	nd _m
4-Chlorophenylacetoneitrile	22	nd	nd _m	nd _m	nd _m
Mandelonitrile	<5	Traces	nd _m	nd _m	nd _m
2-Phenylpropionitrile	<10	nd	nd	nd	1
Acrylonitrile	121	<10	nd _m	nd _m	nd _m

Cell extracts of *E. oligosperma* R1 were produced as described in Fig.3. The reaction mixtures (750 µl each) contained 0.1 M Tris/HCl (pH 7) and 0.2 mg/ml of protein and were incubated in 1.5ml cups in a thermoshaker (30 °C, 1,400 rpm). The reactions were started by the addition of the respective substrates (2 mM each). At different time intervals samples were taken, and the reactions terminated by the addition of 20 % (v/v) 1 M HCl. The reaction mixtures were centrifuged (21,000×g, 10 min, 4 °C) and the supernatants analysed by HPLC according to the procedures described in the material and method section. The reaction rates were calculated from the turn-over of the substrates. The activity of benzonitrile was taken as 100 % (0.48 U/mg of protein).^{1,3} The data for the *Penicillium* and the *Aspergillus* strains were adapted from Kaplan *et al.* (2006a, c) and² those for the *Fusarium* strain from Vejvoda *et al.*, 2008, nd: not detected; nd_m: not determined.

Conversion of 2-hydroxy-3-butenitrile by whole cells of *E. oligosperma* R1. It was previously shown that resting cells of *E. oligosperma* R1 were able to convert nitriles at pH values ≥ 1.5 (Rustler & Stolz 2007). This could allow the conversion of α -hydroxynitriles, which are unstable at neutral pH-values but stabilised under acidic conditions by resting cells of *E. oligosperma* R1. The conversion of acrylonitrile by whole cells and cell extracts demonstrated the general ability of *E. oligosperma* R1 to convert aliphatic nitriles with high relative reaction rates. Therefore, 2-hydroxy-3-butenitrile was synthesised as substrate (see material and method section) and incubated in a reaction mixture containing 0.1 M Na-citrate-phosphate buffer (pH 4) and resting cells of *E. oligosperma* R1. The analysis of the reaction mixture demonstrated a disappearance of almost 50 % of the initial amount of 2-hydroxy-3-butenitrile within the first 80 min of the reaction and the formation of one product (Fig. 4).

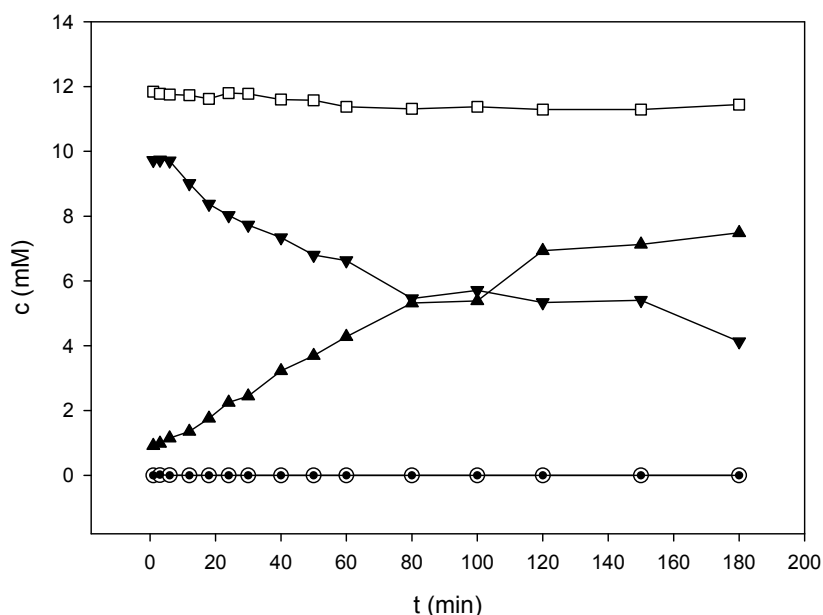


Fig. 4. Turn-over of 2-hydroxy-3-butenitrile by resting cells of *E. oligosperma* R1 at pH 4. The resting cells were prepared as described in Fig. 3. The reaction mixture contained 0.1 M Na-citrate-phosphate-buffer (pH 4) and resting cells corresponding to an OD_{600nm} of 100. The control experiment contained 2 mL of the 0.1 M Na-citrate-phosphate-buffer (pH 4) without cells. The reaction mixtures were incubated in Eppendorf cups (2 mL at 30 °C in a thermoshaker (1,400 rpm). The reactions were started by the addition of 2-hydroxy-3-butenitrile (10 mM). After different time intervals, samples (100 μ L each) were taken, and the reactions terminated by the addition of 10 % (v/v) 1 M HCl. Cells were removed by centrifugation (21,000 $\times g$, 10 min, 4 °C) and the supernatants analysed by HPLC as described in the material and method section. The concentrations of 2-hydroxy-3-butenitrile (▼), acroleine (●), and 2-hydroxy-3-butenic acid (▲) in the experiment with cells as well as the concentrations of 2-hydroxy-3-butenitrile (□) and acroleine (○) in the control experiment were calculated based on their signal intensities during the HPLC analysis.

In contrast, no significant decrease of 2-hydroxy-3-butenitrile was observed in a control experiment without cells. Only traces of acroleine (2-propenal, acrylaldehyde) which would be formed by the chemical decomposition of 2-hydroxy-3-butenitrile were detected in the reaction mixtures with and without cells. Thus, it was concluded that 2-hydroxy-3-butenitrile was almost completely stabilised by the acidic reaction buffer and that the resting cells indeed converted the nitrile. The product formed from 2-hydroxy-3-butenitrile by the cells was identified according to its retention time ($R_t=3.45$ min) and UV/VIS spectrum in comparison with a chemically synthesised authentic standard as 2-hydroxy-3-butenoic acid.

Degradation of aromatic compounds by *E. oligosperma* R1. It was previously demonstrated that *E. oligosperma* R1 could grow with phenylacetonitrile as sole source of carbon, energy, and nitrogen and that resting cells converted phenylacetonitrile via phenylacetate to 2-hydroxyphenylacetate, which finally also disappeared from the culture supernatants. This suggested that *E. oligosperma* R1 could further metabolise 2-hydroxyphenylacetate and finally cleave the aromatic ring (Rustler & Stolz 2007). Therefore, *E. oligosperma* R1 was grown with phenylacetonitrile as sole source of carbon and energy, the cells harvested by centrifugation and resting cells (OD_{546nm} 200) incubated with 2 mM 2-hydroxyphenylacetate and different inhibitors of Fe(II)-ions containing ring-fission dioxygenases (ortho-phenanthroline, 8-hydroxyquinoline, or 2,2'-bipyridyl, 1 mM each). The reactions were analysed by HPLC (40 % methanol, 0.3 % H_3PO_4 in water, flow rate 0.6 mL/min) and it was found that the cells converted 2-hydroxyphenylacetate ($R_t= 5.0$ min) in the presence of all three inhibitors to a product which was identified in comparison with an authentic standard according to its retention time ($R_t= 2.8$ min) and *in situ* spectrum ($\lambda_{max}= 222$ nm, 292 nm) as 2,5-dihydroxyphenylacetate (homogentisate). In order to analyse the further metabolism of homogentisate, cell extracts were prepared from cells of *E. oligosperma* R1 grown with phenylacetonitrile as sole source of carbon and energy. The cell extracts were incubated in 25 mM Tris/HCl (pH 7.4) with 0.1 mM homogentisate and the reactions analysed spectrophotometrically using overlay-spectra. This demonstrated that the cell extracts rather slowly converted homogentisate causing a batho- and hyperchromic shift. Homogentisate-1,2-dioxygenases are known to contain ferrous iron ions in their catalytical center (Adachi *et al.* 1966). Therefore, the cell extracts were incubated for 30 min with 2 mM $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ prior to the enzyme assays. This resulted in a pronounced increase in the enzyme activity and it could be demonstrated that homogentisate was converted to a product with an absorption maximum at $\lambda_{max}= 317$ nm. This suggested that homogentisate was converted by a homogentisate-1,2- dioxygenase to maleylacetoacetate (Knox & Edwards 1955). The specific activity was calculated from the known molar extinction coefficient of

maleylacetoacetate ($\epsilon_{330\text{nm}} = 14 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Adachi *et al.* 1966) as 0.11 U mg^{-1} of protein. The reaction terminated when the initial concentration of homogentisate was converted and the calculated almost stoichiometric amounts of maleylacetoacetate were formed. The maleylacetoacetate was stable in the cuvettes for more than an hour. In most organisms maleylacetoacetate is converted by glutathione-dependent maleylacetoacetate isomerases (Fernández-Canón & Penalva 1998). Therefore, glutathione (2 mM) was added to the cuvettes and an immediate decrease in the absorbance at $\lambda_{\text{max}} = 317 \text{ nm}$ observed. This suggested that homogentisate is metabolised by *E. oligosperma* R1 via maleylacetoacetate and fumarylacetoacetate to fumarate and acetoacetate (Fig. 5). Thus, it appears that homogentisate is an important ring-fission substrate in “black yeasts”, because it has already been suggested that *E. jeanselmei* (nowadays *Phialophora sessilis*) and *E. lecanii-corni* degrade compounds such as styrene and ethylbenzene via homogentisate (Cox *et al.* 1996; Gunsch *et al.* 2005; Prenafeta-Boldú *et al.* 2006).

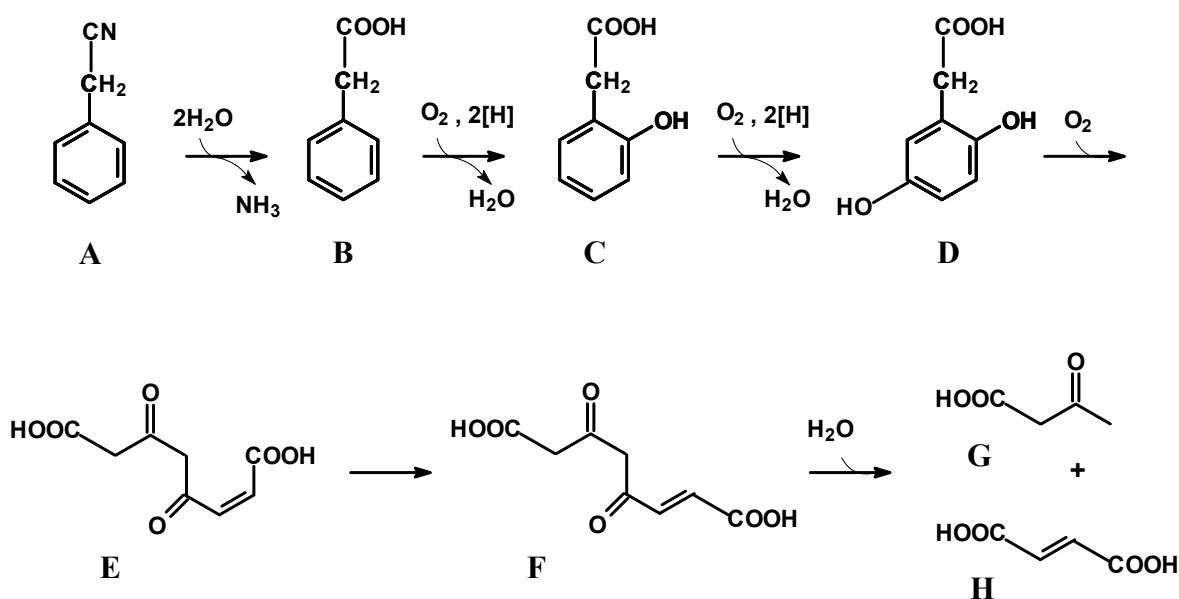


Fig. 5. Proposed pathway for the degradation of phenylacetoneitrile by *E. oligosperma* R1. Key to compounds: A phenylacetoneitrile, B phenylacetic acid, C 2-hydroxyphenylacetic acid, D 2,5-dihydroxyphenylacetic acid (homogentisic acid), E maleylacetoacetic acid, F fumarylacetoacetic acid, G acetoacetic acid, H fumaric acid.

DISCUSSION

The main aim of the present study was to obtain sufficient amounts of active biomass in order to allow a comparison of the nitrile converting system of *E. oligosperma* R1 with other (fungal) nitrile hydrolysing systems. The initial induction experiments demonstrated that the highest nitrile hydrolysing activities were achieved after growth of *E. oligosperma* R1 in the presence of 2-cyanopyridine. This compound had already been previously identified as a powerful inducer for the nitrile hydrolysing systems of different filamentous fungi such as *A. niger* K10, *Fusarium oxysporum* CCF 1414, *F. oxysporum* CCF 483, *F. solani* O1, and *P. multicolor* CCF 244 (Kaplan *et al.* 2006b). 2-Cyanopyridine did not only serve as inducer of the nitrile converting activity of *E. oligosperma* R1 but was also metabolised and utilised as sole source of nitrogen as has been previously reported for *F. solani* O1 (Kaplan *et al.* 2006b).

The experiments with whole cells and cell extracts demonstrated that *E. oligosperma* R1 converted nitriles primarily to the corresponding acids and that the organism formed only from very few substrates low amounts of the corresponding amides. In addition, the cell extracts exhibited only a rudimentary amidase activity. Thus, it can be concluded that the nitriles were converted by a nitrilase. It therefore appears that most fungi convert organic nitriles using nitrilases and that nitrile hydratases are not common among fungi.

The extracts prepared from cells of *E. oligosperma* which had been grown in the presence of 2-cyanopyridine converted all available isomers of methyl-, hydroxy-, or chloro-substituted benzonitriles and phenylacetoneitriles as well as phenylpropionitrile, 2-, 3- and 4-cyanopyridine. These cell extracts exhibited for these substrates compared to benzonitrile as substrate significantly higher relative activities than cell extracts or purified nitrilase fractions from *F. solani* O1, *P. multicolor* CCF 2244, or *A. niger* K10 (see Table 2). This was especially evident for the *meta*-substituted benzonitriles, because cell extracts of *E. oligosperma* R1 in general converted these substrates with higher specific activities than benzonitrile. In contrast, the opposite was reported for cell extracts from *F. solani* O1, *P. multicolor* CCF 2244, and the purified nitrilase of *A. niger* K10 (Kaplan *et al.* 2006a, c). The enzyme from *E. oligosperma* R1 also converted different *ortho*- substituted benzonitriles (*e.g.* 2-tolunitrile, 2-hydroxy- and 2-chlorobenzonitrile) which, probably due to sterical hindrances, could not be converted by the other strains (Kaplan *et al.* 2006a, c). In addition to the (substituted) benzonitrile(s) and phenylacetoneitrile(s), the cell extracts from *E. oligosperma* R1 also converted aliphatic substrates such as acrylonitrile and 2-hydroxy-3-butenitrile. The turn-over of acrylonitrile had not been analysed in the studies by Kaplan *et al.* (2006a, c) but had been previously described for another fungal nitrilase from *F. oxysporum* f. *sp melonis* (Goldlust & Bohak 1989). However, the enzyme of *F. oxysporum* f. *sp melonis* converted acrylonitrile (in comparison to benzonitrile as substrate)

with significantly lower relative activities. Thus it can be concluded that the nitrile converting activity from *E. oligosperma* R1 appears to accept a slightly wider range of substrates than other fungal nitrilases.

The formation of amides as by-products of nitrilase catalyzed reactions had already been observed with various nitrilases from bacteria, plants, and fungi, e.g. from *Rhodococcus* ATCC 39484, *Pseudomonas fluorescens* EBC191, *Arabidopsis thaliana*, and *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, and *A. niger* K10 (Goldlust & Bohak 1989, Stevenson *et al.* 1992, Effenberger & Osswald 2001, Osswald *et al.* 2002, Šnajdrová *et al.* 2004, Kiziak *et al.* 2005, Mateo *et al.* 2006, Fernandes *et al.* 2006, Kaplan *et al.* 2006b, c, Rustler *et al.* 2007). It was proposed that the formation of these by-products is based on an atypical cleavage of the tetrahedral intermediate formed during the reaction which might be triggered by electron withdrawing effects of different substituents (Fernandes *et al.* 2006). The nitrilase activity from *E. oligosperma* R1 produced the largest relative amounts of amides during the induction experiments from 2-cyanopyridine (Fig. 2; ratio acid: amide about 7:4) and during the experiments with cell extracts (Table 2) from 2-chlorobenzonitrile (ratio acid: amide about 7:3). Furthermore some amides (< 10 molar % of total products) were also formed during the turn-over of 4-cyanopyridine and 3-chlorobenzonitrile. These results follow the emerging trend for the relationship between substrate structure and the degree of amide formation for fungal nitrilases. Thus, also *P. multicolor* CCF 2244 and the purified nitrilase from *A. niger* K10 produced relatively large amounts of amides from chlorobenzonitriles and cyanopyridines (Kaplan *et al.* 2006b, c). From the available data it appears that the nitrilase from *E. oligosperma* R1 is regarding to its tendency for amide formation situated somehow intermediate between the enzymes from *F. solani* O1 (less amide formation) and those from *P. multicolor* CCF 2244 and *A. niger* K10 (stronger tendency for amide formation).

In conclusion it might be summarised that the recent work in the group of L. Martinková (Kaplan *et al.* 2006a,b,c; Vejvoda *et al.* 2008) about the nitrile converting systems of filamentous fungi together with our study about the black yeast *E. oligosperma* R1 (Rustler & Stolz, 2007, this manuscript) suggest that evolutionary rather different fungi synthesise nitrilases which clearly resemble each other regarding their induction system and substrate specificity. These fungal systems might be of some relevance because of the high specific activities that can be obtained under optimal induction conditions and also the high specific activities of the purified enzymes with their preferred substrates. In addition, it was shown in the present study that the acid tolerance of fungi allows their utilisation as whole cell catalysts for the conversion of nitriles that are stabilised under acidic conditions. This observation might significantly enhance the importance of fungal nitrilases for biotransformation reactions.

REFERENCES

- Adachi, K., Iwayama, Y., Tanioka, H., Takeda, Y. (1966)** Purification and properties of homogentisate oxygenase from *Pseudomonas fluorescens*. *Biochim. Biophys. Acta* . 118: 88–97.
- Banerjee, A., Sharma, R., Banerjee, U. C. (2002)** The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:33–44.
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Brady, D., Beeton, A., Zeevaart, J., Kgaje, C., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. (2004)** Characterisation of nitrilase and nitrile hydratase biocatalytic systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 76–85.
- Bunch, A. W. (1998a)** Nitriles. In *Biotechnology* Vol. 8a, Biotransformations I, Chap. 6 (Rehm HJ, Reed G, eds.) Wiley-VCH, Weinheim: 277–324.
- Bunch, A. W. (1998b)** Biotransformation of nitriles by rhodococci. *Antonie van Leeuwenhoek* 74: 89–97.
- Cox, H. H. J., Faber, B. W., van Heiningen, W. N. M., Radhoe, H., Doddema, H. J., Harder, W. (1996)** Styrene metabolism in *Exophiala jeanselmei* and involvement of a cytochrome P-450 dependent styrene monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1471–1474.
- Dazzi, C., Candiano, G., Massazza, S., Ponzetto, A., Varesio, L. (2001)** New high performance liquid chromatographic method for the detection of picolinic acid in biological fluids. *J. Chromatogr. B* 751: 61–68.
- Dias, J. C. T. , Rezende, R. P., Rosa, C. A., Lachance, M.-A., Linardi, V. R. (2000)** Enzymatic degradation of nitriles by a *Candida guilliermondii* UFMG-Y65. *Can. J. Microbiol.* 46: 525–531.
- Effenberger, F., Osswald, S. (2001)** Enantioselective hydrolysis of (*R,S*)-2-fluoroarylacetonitriles using nitrilase from *Arabidopsis thaliana*. *Tetrahedron Asymmetry* 12: 279–285.
- Fernández-Canón, J. M., Penalva, M. A. (1998)** Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *J. Biol. Chem.* 273: 329–337.
- Gassman, P. G., Talley, J. J. (1978)** Cyanohydrins-a general synthesis. *Tetrahedron Lett.* 19: 3773–3776.
- Goldlust, A., Bohak, Z. (1989)** Induction, purification, and characterization of the nitrilase of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 11: 581–601.
- Gröger, H. (2001)** Enzymatic routes to enantiomerically pure aromatic α -hydroxy carboxylic acids: a further example for the diversity of biocatalysis. *Adv. Synth. Catal.* 343: 547–558.
- Gunsch, C. K., Cheng, Q., Kinney, K. A., Szaniszló, P. J., Whitman, K. A. (2005)** Identification of a homogentisate-1,2-dioxygenase gene in the fungus *Exophiala lecanii-corni*: analysis and implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:405–411.

- Kaplan, O., Nikolaou, K., Pišvejcová, A., Martínková, L. (2006a)** Hydrolysis of nitriles and amides by filamentous fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 38: 260–264.
- Kaplan, O., Vejvoda, V., Charvátová-Pišvejcová, A., Martínková, L. (2006b)** Hyperinduction of nitrilases in filamentous fungi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 22: 891–896.
- Kaplan, O., Vejvoda, V., Plíhal, O., Pompach, P., Kavan, D., Fialová, P., Bezouška, K., Macková, M., Cantarella, M., Jirků, V., Křen, V., Martínková, L. (2006c)** Purification and characterization of a nitrilase from *Aspergillus niger* K10. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 567–575.
- Kaul, P., Banerjee, A., Mayilraj, S., Banerjee, U. C. (2004)** Screening for enantioselective nitrilases: kinetic resolution of racemic mandelonitrile to (*R*)-(-)-mandelic acid by new bacterial isolates. *Tetrahedron Asymmetry* 15: 207–211.
- Kiziak, C., Conradt, D., Stolz, A., Mattes, R., Klein, J. (2005)** Nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC 191: Cloning and heterologous expression of the gene and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Microbiology* 151:3639–3648.
- Knox, W. E., Edwards, S. W. (1955)** The properties of maleylacetoacetate, the initial product of homogentisate oxidation in liver. *J. Biol. Chem.* 216: 489–498.
- Kobayashi, M., Yanaka, N., Nagasawa, T., Yamada, H. (1991)** Hyperinduction of an aliphatic nitrilase by *Rhodococcus rhodochrous* K22. *FEMS Microbiol. Lett.* 77: 121–124.
- van Langen, L. M., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. (2004)** Enzymatic hydrocyanation of a sterically hindered aldehyde. Optimization of a chemoenzymatic procedure for (*R*)-2-chloromandelic acid. *Org. Process Res. Dev.* 7:828–831.
- Martínková, L., Křen, V. (2001)** Nitrile- and amide-converting microbial enzymes: stereo-, regio- and chemoselectivity. *Biocatal. Biotransform.* 20:73–93.
- Mateo, C., Chmura, A., Rustler, S., van Rantwijk, F., Stolz, A., Sheldon, R. A. (2006)** Synthesis of enantiomerically pure (*S*)-mandelic acid using an oxynitrilase-nitrilase bienzymatic cascade- A nitrilase surprisingly shows nitrile hydratase activity. *Tetrahedron Asymmetry* 7: 320–323.
- Nagasawa, T., Nakamura, H., Yamada, H. (1990)** ϵ -Caprolactam, a new powerful inducer for the formation of *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilase. *Arch. Microbiol.* 155: 13–17.
- Osswald, S., Wajant, H., Effenberger, F. (2002)** Characterization and synthetic applications of recombinant AtNIT1 from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* 269: 680–687.
- Prenafeta-Boldú, F. X., Summerbell, R., de Hoog, G. S. (2006)** Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 109–130.
- Rezende, R. P., Dias, J. C. T., Rosa, C. A., Carazza, F., Linardi, V. R. (1999)** Utilisation of nitriles by yeasts isolated from a Brazilian gold mine. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45:185–192.
- Rustler, S., Stolz, A. (2007)** Isolation and characterization of a nitrile hydrolysing acidotolerant black yeast- *Exophiala oligosperma* R1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 899–908.

Rustler, S., Müller, A., Windeisen, V., Chmura, A., Fernandes, B., Kiziak, C., Stolz, A. (2007) Conversion of mandelonitrile and phenylglycinenitrile by recombinant *E. coli* cells synthesizing a nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* EBC191. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 598–606.

Schulze, B. (2002) Hydrolysis and formation of C-N bonds. In: *Enzyme catalysis in organic synthesis* Vol. II. (Drautz, K., Waldmann, H., eds). Wiley-VCH, Weinheim: 699–715.

Singh, R., Sharma, R., Tewari, N., Geetanjali,, Rawart, D. S. (2006) Nitrilase and its application as a 'green' catalyst. *Chem. Biodivers.* 3: 1279–1287.

Šnajdrová, R., Kristová-Mylerová, V., Crestia, D., Nikolaou, K., Kuzma, M., Lemaire, M., Gallienne, E., Bolte, J., Bezouška, K., Křen, V., Martínková, L. (2004) Nitrile biotransformation by *Aspergillus niger*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 29: 227–232.

Stevenson, D. E., Feng, R., Dumas, F., Groleau, D., Mihoc, A., Storer, A.C. (1992) Mechanistic and structural studies on *Rhodococcus* ATCC39484 nitrilase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 15: 283–302.

Vejvoda, V., Kaplan, O., Bezouška, K., Pompach, P., Šulc, M., Cantarella, M., Benada, O., Uhnáková, B., Rinágelová, A., Lutz-Wahl, S., Fischer, L., Křen, V., Martínková, L. (2008) Purification and characterization of a nitrilase from *Fusarium solani* O1. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 50: 99–106.

Verduyn, C. (1991) Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Antonie van Leeuwenhoek* 60: 325–353.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Andreas Stolz möchte ich mich für die Überlassung des Themas, sein stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit, die zahlreichen Ratschläge und wertvollen Hinweise sowie seine ständige Diskussionsbereitschaft und die sehr gute Betreuung bedanken. Dies hat alles maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. G. Sprenger danke ich für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten zu dieser Arbeit an seinem Institut anfertigen zu können.

Bei Herrn Prof. Dr. D. Jendrossek möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Meiner Kooperationsgruppe am Institut für Biokatalyse und organische Chemie an der Technischen Universität in Delft (Die Niederlande) danke ich für die ausgesprochen gute wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Zusammenarbeit im Rahmen des Projekts „A sustainable, two-enzyme, one pot procedure for the synthesis of enantiomerically pure α -hydroxyacids“.

Andrzej, Cesar, Sander, Fred, Prof. Dr. Roger Sheldon and all the people around you in the labs – it was an honour and pleasure to me to work with you.

Prof. Dr. David Barrie Johnson (School of Biological Science, University of Wales, Bangor, Großbritannien) und Dr. Katrin Wendt-Potthoff und Dr. Mathias Koschorreck (Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung, Department Seen-Mikrobiologie, Leipzig / Halle) danke ich für die sauren Proben die letztendlich zur Anreicherung von *E. oligosperma* R1 führten.

Bei Herrn Dr. Hassan Mottejadded und Herrn Dr. Josef Altenbacher (Institut für industrielle Genetik, Universität Stuttgart) möchte ich mich für die genetische Konstruktion der *Pichia* Stämme bedanken, die die angestrebte Synthese letztendlich ermöglichten.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie danke ich herzlichst für die freundliche Aufnahme, die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre und die fachlichen und nicht-fachlichen Gespräche.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und meinem Großvater, die mich stets in jeglicher Hinsicht unterstützt und mir sowohl mein Studium als auch meine Promotion ermöglicht haben. Meinem Bruder Jens möchte ich unter anderem von ganzem Herzen für die gemeinsame Zeit in Gerlingen danken. Nicht vergessen möchte ich auch Jenny und meine ganzen Freunde, die immer ein offenes Ohr für mich hatten.