

**Isolierung, Charakterisierung und Stabilisierung der
Chloroperoxidase aus *Caldariomyces fumago* für den synthetisch-
technischen Einsatz**

vorgelegt von
Diplom Biologin
Valantina Yazbik
aus Lattakia (Syrien)

Von der Fakultät II -Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

einer Doktorin der Naturwissenschaften
-Dr. rer.nat.-

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Regine v. Klitzing (TU Berlin)
Berichter: Prof. Dr. Marion Ansorge-Schumacher (TU Berlin)
Berichter: Prof. Dr. Udo Kragl (Universität Rostock)

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 10.02.2011

Berlin 2011

D 83

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Marion Ansorge-Schumacher für die Überlassung des interessanten Themas sowie die fachliche Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft im Laufe der letzten Jahre. Bei Herrn Prof Udo Kragl möchte ich mich für die kurzfristige Übernahme des Gutachtens bedanken.

Herrn Prof. Peter Neubauer danke ich für die fachliche Unterstützung im Bereich des „Design of Experiments“.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Juliane Ratzka für die zahlreichen fachlichen Diskussionen und für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Korrektur der Dissertation. Des Weiteren möchte ich mich bei Nora Bieler ganz herzlich für ihre moralische sowie fachliche Unterstützung bedanken. Andy Maraite, Lars Wiemann, René Nieguth, Alexander Scholz und der gesamten Arbeitsgruppe der Enzymtechnologie danke ich ebenfalls für die fachliche Diskussionsbereitschaft sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre. Darüber hinaus möchte ich mich bei Markian Pryshliak, der im Rahmen seines Forschungspraktikums an dieser Arbeit mitgewirkt hat.

Des Weiteren möchte ich der Universität von Aleppo (Syrien) für die Finanzierung dieser Arbeit danken.

Frau A. Müller-Klauke danke ich für ihre gesamte Unterstützung während der letzten Jahre.

Meine Freunde möchte ich herzlich für ihre nicht selbstverständliche Freundschaft und stete Unterstützung danken. Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie insbesondere bei meiner Mutter bedanken, die mich immer in jeder Hinsicht unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Enzyme als Katalysatoren.....	1
1.2	Anforderungen im synthetisch-technischen Einsatz.....	3
1.3	Enzymstabilisierung durch chemische Modifikation	5
1.4	Die Chloroperoxidase aus <i>Caldariomyces fumago</i>	10
1.4.1	Biochemische Eigenschaften.....	10
1.4.2	Reaktionsspektrum und Reaktionszyklus	12
1.4.3	Anwendungsfelder	14
1.4.4	Gründe des begrenzten Einsatzes der CPO in den technischen Prozessen.....	16
1.5	Zielsetzung	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Materialien	20
2.1.1	Chemikalien.....	20
2.1.2	Sonstige Materialien	21
2.1.3	Geräte und Zubehör	22
2.1.4	Medien und Puffer	22
2.2	Bereitstellung des Enzyms.....	23
2.2.1	Kultivierung von <i>C. fumago</i> und Stammhaltung	23
2.2.2	Bestimmung der CPO Produktion.....	23
2.2.3	Bestimmung des Pigments	24
2.2.4	Gewinnung des Rohenzym	24
2.2.5	Proteinaufreinigung mittels wässrigen Zweiphasensystems	24
2.2.6	Chromatographie.....	25
2.2.7	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	26
2.2.8	SDS-PAGE	26
2.2.9	Dialyse	27
2.3	Untersuchung der Enzymaktivitäten	27
2.3.1	Halogenase-Aktivität (Chlorierungsreaktion)	27
2.3.2	Monooxygenase-Aktivität (Sulfoxidation).....	30
2.3.3	Peroxidase-Aktivität (Oxidation von Pyrogallol)	31

2.4	Untersuchung der Lagerungsstabilität der CPO	32
2.4.1	Temperaturstabilität	33
2.4.2	pH-Stabilität	33
2.4.3	Oxidationsmittelstabilität.....	33
2.4.4	Lösungsmittelstabilität.....	34
2.5	Charakterisierungen der Aktivität und Stabilität der CPO mittels Factorial Designs.....	34
2.6	Chemische Modifikation der CPO mit Methoxypolyethylenglykol (mPEG) ...	37
2.6.1	Aktivierung von Methoxypolyethylenglykol	37
2.6.2	Bestimmung des Aktivierungsgrades von p-Nitrophenyl-mPEG-carbonat durch alkalische Hydrolyse	37
2.6.3	Modifizierung des Enzyms.....	38
2.6.4	Aufreinigung des modifizierten Enzyms	38
2.6.5	Charakterisierung des modifizierten Enzyms.....	38
3	Ergebnisse und Diskussion	41
3.1	Optimierung des Aufreinigungsprotokolls.....	41
3.1.1	Isolierung der Chlorperoxidase nach der herkömmlichen Vorschrift	42
3.1.2	Isolierung der Chlorperoxidase mittels wässrigen Zweiphasensystems.....	43
3.1.2.1	Entfernung des Pigments vom Rohextrakt im Polymer/Polymer Zweiphasensystem.....	44
3.1.2.2	Gewinnung der Chlorperoxidase im Polymer/Salz Zweiphasensystem	48
3.1.2.3	Aufreinigung der Chlorperoxidase zur Homogenität	49
3.1.3	Zusammenfassung.....	51
3.2	Charakterisierung der Enzymaktivität in Abhängigkeit von verschiedenen isolierten Einflüssen	53
3.2.1	Halogenase-Aktivität (Chlorierungsreaktion)	53
3.2.2	Monooxygenase-Aktivität (Sulfoxidation).....	58
3.2.3	Peroxidase-Aktivität (Oxidation von Pyrogallol)	62
3.2.4	Zusammenfassung.....	66
3.3	Charakterisierung der CPO-Stabilität in Abhängigkeit von verschiedenen isolierten Einflüssen	68
3.3.1	Monooxygenase-Aktivität (Sulfoxidation).....	68
3.3.2	Peroxidase-Aktivität (Oxidation von Pyrogallol)	73
3.3.3	Zusammenfassung.....	77

3.4	Charakterisierung der Aktivität und Stabilität der CPO unter Berücksichtigung der gegenseitigen Beeinflussung verschiedener Einflussgrößen mittels Factorial Designs	79
3.4.1	Untersuchung der Aktivität und Stabilität der CPO in Citratpuffer	81
3.4.2	Untersuchung der Aktivität und Stabilität der CPO in Anwesenheit wassermischbarer Lösungsmittel	92
3.4.3	Vergleich der Enzymaktivitäten und -stabilitäten und der gegenseitigen Beeinflussung der Parameter in Puffer mit denen wassermischbaren organischen Lösungsmitteln.....	110
3.4.4	Vergleich der maximalen Katalysatorproduktivität [$m_{\text{Produkt}}/m_{\text{Enzym}}$] in Puffer mit der in wassermischbaren organischen Lösungsmitteln	111
3.4.5	Zusammenfassung.....	112
3.5	Stabilisierung der CPO durch chemische Modifikation mit Methoxypolyethylenglykol (mPEG)	115
3.5.1	Aktivierung verschiedener Methoxypolyethylenglykols (mPEGs) und die Bestimmung des Modifizierungsgrades	115
3.5.2	Modifizierung der CPO	116
3.5.3	Untersuchung der Aktivität des modifizierten Enzyms.....	120
3.5.4	Untersuchung der Stabilität des modifizierten Enzyms.....	122
3.5.4.1	Temperaturstabilität	122
3.5.4.2	Toleranz gegenüber wassermischbaren organischen Lösungsmitteln	124
3.5.5	Zusammenfassung.....	126
4	Zusammenfassung	128
5	Literaturverzeichnis	131

Die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Veröffentlichungen

- Yazbik, V.; Ansorge-Schumacher, M. (2010): Fast and efficient purification of chloroperoxidase from *C. fumago*. *Process Biochem* 45: 279-283.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Die dreidimensionale Struktur der CPO nach Sundaramoorthy et al., 1995 (mit freundlichen Genehmigung von Current Biology-Elsevier, License-Nummer: 254653026426).	10
Abbildung 1.2: Die von Chloroperoxidase katalysierte Reaktionen.....	12
Abbildung 1.3: Der katalytische Zyklus der CPO.	13
Abbildung 2.1: Die dreidimensionale Konfiguration eines „Central-Composite-Designs“.....	35
Abbildung 3.1: Fließschema der CPO-Isolierung nach Hallenberg und Hager 1978 mit der nach der Isolierung verbleibenden Aktivität.....	42
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Phasendiagramms eines Zweiphasensystems bestehend aus zwei Polymeren oder einem Polymer und einem Salz.....	43
Abbildung 3.3: Die unterschiedliche Aufteilung des schwarzen Pigments in Polymer/Polymer Zweiphasensystemen. (a) PEG 4000/PPG 1200, (b) PEG 4000/Stärke, (c) PEG 4000/Dextran T500.....	46
Abbildung 3.4: Die Aktivitätsausbeute in den verschiedenen Phasen der Polymer/Polymer Systemen (PEG 4000/PPG 1200, PEG 4000/Stärke, PEG 4000/Dextran T500). Reaktionsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 2,75, 0,1 mM MCD; 2 mM H ₂ O ₂ , 20 mM NaCl, RT.	46
Abbildung 3.5: Die Aktivitätsausbeute nach der Rückextraktion der CPO aus der PEG-Phase in der Salzphase durch die Extraktion im Polymer/Salz Zweiphasensystem (PEG 4000/(NH ₄) ₂ SO ₄ , PEG 4000/Na ₂ SO ₄). Reaktionsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 2,75, 0,1 mM MCD; 2 mM H ₂ O ₂ , 20 mM NaCl, RT.	48
Abbildung 3.6: Reaktionsgleichung der Chlorierung von MCD mittels CPO.	53
Abbildung 3.7: Abhängigkeit der Halogenase-Aktivität der CPO von dem pH-Wert (a) und der Temperatur (b). Reaktionsbedingungen: (a) 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH wie angegeben), 0,1 mM MCD, 2 mM H ₂ O ₂ , 20 mM KCl, RT. (b) 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 2,75, 0,1 mM MCD, 2 mM H ₂ O ₂ , 20 mM KCl, Temperatur wie angegeben.	54
Abbildung 3.8: Abhängigkeit der Halogenase-Aktivität der CPO von der MCD-Konzentration (a) und der KCl-Konzentration (b). Reaktionsbedingungen: (a) 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 2,75, MCD-Konzentration wie angegeben, 2 mM H ₂ O ₂ , 20 mM KCl, RT. (b) 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 2,75, 0,1 mM MCD, KCl-Konzentration wie angegeben, 2 mM H ₂ O ₂ , RT.....	55
Abbildung 3.9: Abhängigkeit der Halogenase-Aktivität der CPO von der H ₂ O ₂ -Konzentration. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 2,75, 0,1 mM MCD, H ₂ O ₂ -Konzentration wie angegeben, 20 mM KCl, RT.	56

Abbildung 3.10: Die Halogenase-Aktivität der CPO in Abhängigkeit von wassermischbaren organischen Lösungsmitteln. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 2,75, 0,1 mM MCD, 2 mM H ₂ O ₂ , 20 mM KCl, RT, die verwendeten Lösungsmittel und ihre Anteile wie angegeben.	58
Abbildung 3.11: Reaktionsgleichung der Sulfoxidation von Thioanisol mittels CPO.	58
Abbildung 3.12: Abhängigkeit der Monooxygenase-Aktivität der CPO von dem pH-Wert (a) und der Temperatur (b). Reaktionsbedingungen: (a) 0,05 M Natriumcitratpuffer (pH wie angegeben), 0,5 mM Thioanisol, 0,5 mM H ₂ O ₂ , RT. (b) 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, 0,5 mM Thioanisol, 0,5 mM H ₂ O ₂ , Temperatur wie angegeben.	59
Abbildung 3.13: Abhängigkeit der Monooxygenase-Aktivität der CPO von der Thioanisol-Konzentration (a) und H ₂ O ₂ -Konzentration (b). Reaktionsbedingungen: (a) 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, Thioanisol-Konzentration wie angegeben, 0,5 mM H ₂ O ₂ , RT. (b) 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, 0,5 mM Thioanisol, H ₂ O ₂ -Konzentration wie angegeben, RT.	60
Abbildung 3.14: Die Monooxygenase-Aktivität der CPO in Abhängigkeit von wassermischbaren organischen Lösungsmitteln. Reaktionsbedingungen: 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, 0,5 mM Thioanisol, 0,5 mM H ₂ O ₂ , RT, die verwendeten Lösungsmittel und ihre Anteile wie angegeben.....	62
Abbildung 3.15: Reaktionsgleichung der Oxidation von Pyrogallol mittels CPO.	62
Abbildung 3.16: Abhängigkeit der Peroxidase-Aktivität der CPO von dem pH-Wert (a) und der Temperatur (b). Reaktionsbedingungen: (a) 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH wie angegeben, 10 mM Pyrogallol, 4 mM H ₂ O ₂ , RT. (b) 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 4, 10 mM Pyrogallol, 4 mM H ₂ O ₂ , Temperatur wie angegeben.....	63
Abbildung 3.17: Abhängigkeit der Peroxidase-Aktivität der CPO von der Pyrogallol-Konzentration (a) und der H ₂ O ₂ -Konzentration (b). Reaktionsbedingungen: (a) 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 4, Pyrogallol-Konzentration wie angegeben, 4 mM H ₂ O ₂ , RT. (b) 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 4, 10 mM Pyrogallol, H ₂ O ₂ -Konzentration wie angegeben, RT.....	65
Abbildung 3.18: Die Peroxidase-Aktivität der CPO in Abhängigkeit von wassermischbaren organischen Lösungsmitteln. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 4, 10 mM Pyrogallol, 4 mM H ₂ O ₂ , RT, die verwendeten Lösungsmittel und ihre Anteile wie angegeben.....	66
Abbildung 3.19: Die Relative Aktivität der CPO bezüglich der Sulfoxidation von Thioanisole nach der Inkubation für 72 Stunden in 0,05 M Natriumcitratpuffer verschiedener pH-Werte (wie angegeben) bei 4 °C. Reaktionsbedingungen: 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, 0,5 mM Thioanisol, 0,5 mM H ₂ O ₂ , bei RT.	69

Abbildung 3.20: Die Inaktivierung der CPO hinsichtlich ihrer Monooxygenase-Aktivität durch verschiedene H_2O_2 -Konzentrationen von Wasserstoffperoxid. Inkubationsbedingungen: 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, H_2O_2 -Konzentration wie angegeben, RT. Reaktionsbedingungen: 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, 0,5 mM Thioanisol, 0,5 mM H_2O_2 , bei RT.	71
Abbildung 3.21: Abhängigkeit der CPO-Stabilität hinsichtlich der Monooxygenase-Aktivität von wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln: Inkubationsbedingungen: 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, die verwendeten Lösungsmittel und ihre Anteile wie angegeben, 4 °C. Reaktionsbedingungen: 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, 0,5 mM Thioanisol, 0,5 mM H_2O_2 , bei RT.....	72
Abbildung 3.22: Die Relative Aktivität der CPO bezüglich der Oxidation von Pyrogallol nach der Inkubation für 72 Stunden in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer verschiedener pH-Werte (wie angegeben) bei 4 °C. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 4, 10 mM Pyrogallol, 4 mM H_2O_2 , RT.....	74
Abbildung 3.23: Die Temperaturstabilität der CPO in Bezug auf die Peroxidase-Aktivität. Inkubationsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 4, Temperatur wie angegeben. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 4, 10 mM Pyrogallol, 4 mM H_2O_2 , RT.	75
Abbildung 3.24: Dreidimensionale Region eines Systems bestehend aus 3 Faktoren (X_1 : 100-200, X_2 : 200-400, X_3 : 100-200).	80
Abbildung 3.25: Schematische Darstellung der Problemformulierung in DOE und der für diese Arbeit ausgewählten Strategie.....	81
Abbildung 3.26: Der vom DOE erhaltene „Replicate Index“ für die Aktivität (links) und die Stabilität (rechts) der CPO in Citratpuffer in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.....	83
Abbildung 3.27: Der „Investigation Plot“ von der Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in Citratpuffer in einem Temperaturbereich von 15-45 °C	84
Abbildung 3.28: Der „Normal Probability Plot of Residuals“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.	84
Abbildung 3.29: Der „Interaction Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.	85
Abbildung 3.30: Auftragung der beobachteten gegen die erwarteten Werte bei der Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in Citratpuffer in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.....	85
Abbildung 3.31: Der „Contour Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in Citratpuffer in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.	86
Abbildung 3.32: Der „Surface Plot“ von der Aktivität und Stabilität der CPO in Citratpuffer in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.	87

Abbildung 3.33: Die „Sweet Spot“-Analyse für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in Citratpuffer in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.	87
Abbildung 3.34: Die „Sweet Spot“-Analyse für die Aktivität und Stabilität der CPO in Citratpuffer mit einem maximalen geforderten Aktivität und Halbwertszeit in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.	88
Abbildung 3.35: Der „Investigation Plot“ der Aktivität der CPO in Citratpuffer bei hohen Temperaturen (45 °C – 65 °C).....	89
Abbildung 3.36: Der „Surface Plot“ der Aktivität der CPO in Citratpuffer bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C).....	90
Abbildung 3.37: Die relative CPO-Produktivität bei den durch das DOE erhaltenen Parameterkombinationen für eine optimale Aktivität, Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen beiden Größen in Citratpuffer.	91
Abbildung 3.38: Der „Investigation Plot“ von der Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % DMSO in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.	92
Abbildung 3.39: Der „Contour Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % DMSO in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.	93
Abbildung 3.40: Der „Surface Plot“ der Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % DMSO in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.	93
Abbildung 3.41: Der „Interaction Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % DMSO in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.	94
Abbildung 3.42: Der „Contour Plot“ und „Surface Plot“ der Aktivität der CPO in 20 % DMSO bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C).....	94
Abbildung 3.43: Die relative CPO-Produktivität bei den durch das DOE erhaltenen Parameterkombinationen für eine optimale Aktivität, Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen beiden Größen in 20 % DSMO.....	96
Abbildung 3.44: Der „Investigation Plot“ der Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Isopropanol in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.....	96
Abbildung 3.45: Der „Contour Plot“ der Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Isopropanol in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.....	97
Abbildung 3.46: Der „Surface Plot“ der Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Isopropanol in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.....	97
Abbildung 3.47: Der „Interaction Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Isopropanol in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.....	98
Abbildung 3.48: Der „Investigation Plot“ von der Aktivität der CPO in 20 % Isopropanol bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C).	98

Abbildung 3.49: Die relative CPO-Produktivität bei den durch das DOE erhaltenen Parameterkombinationen für eine optimale Aktivität und Stabilität der CPO in 20 % Isopropanol.....	99
Abbildung 3.50: Der „Contour Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Dioxan in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.....	100
Abbildung 3.51: Der „Surface Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Dioxan in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.....	101
Abbildung 3.52: Der „Interaction Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Dioxan in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.....	101
Abbildung 3.53: Der „Investigation Plot“ der Aktivität der CPO in 20 % Dioxan bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C).	102
Abbildung 3.54: Der „Contour Plot“ und der „Surface Plot“ der Aktivität der CPO in 20 % Dioxan bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C).....	102
Abbildung 3.55: Die relative CPO-Produktivität bei den durch das DOE erhaltenen Parameterkombinationen für eine optimale Aktivität, Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen beiden Größen in 20 % Dioxan.	104
Abbildung 3.56: Der „Surface Plot“ der Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Acetonitril in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.....	104
Abbildung 3.57: Der „Contour Plot“ der Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Acetonitril in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.....	105
Abbildung 3.58: Der „Interaction Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Acetonitril in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.....	105
Abbildung 3.59: Der „Investigation Plot“ der Aktivität der CPO in 20 % Acetonitril bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C).	106
Abbildung 3.60: Der „Contour Plot“ und der „Surface Plot“ der Aktivität der CPO in 20 % Acetonitril bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C).	106
Abbildung 3.61: Die relative CPO-Produktivität bei den durch das DOE erhaltenen Parameterkombinationen für eine optimale Aktivität, Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen beiden Größen in 20 % Acetonitril.	108
Abbildung 3.62: Der „Surface Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % DMF in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.....	108
Abbildung 3.63: Der „Contour Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % DMF in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.....	109
Abbildung 3.64: Der „Interaction Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % DMF in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.....	109

Abbildung 3.65: Die relative CPO-Produktivität bei den durch das DOE erhaltenen Parameterkombinationen für eine optimale Aktivität und Stabilität der CPO in 20 % DMF. ...	110
Abbildung 3.66: Vergleich der maximalen in Citratpuffer und in wassermischbaren organischen Lösungsmitteln erzielten Enzymproduktivitäten $[m_{\text{Produkt}}/m_{\text{Enzym}}]$ untereinander. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Citratpuffer pH wie angegeben 10 mM Pyrogallol, 4 mM H ₂ O ₂ , Temperatur wie angegeben.....	112
Abbildung 3.67: Reaktionsschema zur Aktivierung von mPEG mit p-Nitrophenylchloroformat.....	116
Abbildung 3.68: Alkalische Hydrolyse von p-Nitrophenyl-mPEG-carbonat durch NaOH.	116
Abbildung 3.69: Reaktionsschema zur Modifizierung von Enzymen mit p-Nitrophenyl-mPEG-carbonat.....	117
Abbildung 3.70: SDS-Gel nach der Modifizierung der CPO mit mPEG 5000 bei pH 6 und bei zwei verschiedenen Enzym:mPEG Verhältnissen (1:2000 und 1:5000). 1: native unmodifizierte CPO, 2-5: CPO-Modifizierung bei einem Verhältnis von 1:2000 nach 1, 2, 3 und 4 Stunden 6: native unmodifizierte CPO, 7-10: CPO-Modifizierung bei einem Verhältnis von 1:2000 nach 1, 2, 3 und 4 Stunden.	118
Abbildung 3.71: SDS-Gel nach der Modifizierung der CPO mit mPEG 5000 bei pH 6,5 und bei zwei verschiedenen Enzym:mPEG Verhältnissen (1:2000 und 1:3000). 1: native unmodifizierte CPO, 2-5: CPO-Modifizierung bei einem Verhältnis von 1:2000 nach 1, 2, 3 und 4 Stunden 6: native unmodifizierte CPO, 7-10: CPO-Modifizierung bei einem Verhältnis von 1:3000 nach 1, 2, 3 und 4 Stunden.	119
Abbildung 3.72: Vergleich der Aktivität der modifizierten CPO mit der der nativen CPO in den verschiedenen Medien bei 45 °C. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Natriumcitratpuffer (pH ändert sich nach jedem Lösungsmittel, siehe Tabelle 2.4), 10 mM Pyrogallol, 4 mM H ₂ O ₂ , 45 °C, Lösungsmittel wie angegeben, Lösungsmittelanteil 20 %.	121

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Die für die chemische Modifizierung geeignete Aminosäuren und ihren funktionellen Gruppen.....	5
Tabelle 2.1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für 12 % SDS-Gele.....	27
Tabelle 2.2: Der nach „Central-Composite-Design“ erhaltene Versuchsplan für zwei Faktoren (Temperatur 15 °C-45 °C, pH-Wert 3-5) mit den Faktorenkombinationen, bei denen die Aktivität und Stabilität der CPO untersucht wurden.....	35
Tabelle 2.3: Der nach „Face-Centered-Central-Composite-Design“ erhaltene Versuchsplan für zwei Faktoren (Temperatur, pH-Wert) mit den Faktorenkombinationen, bei denen die Aktivität der CPO bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C) untersucht wurde.....	36
Tabelle 2.4: Die Reaktionsmedien mit den entsprechenden Temperaturen und pH-Werten, bei denen die Aktivität der mit mPEG modifizierten CPO untersucht wurde (basierend auf die Ergebnisse von DOE).	39
Tabelle 2.5: Die für die Stabilitätsuntersuchung, der mit mPEG modifizierten CPO verwendeten, wassermischbaren organischen Lösungsmittel, mit den entsprechenden pH-Werten (basierend auf die Ergebnisse von DOE).	40
Tabelle 3.1: Die Aktivitätsausbeute und die Reinheit der CPO nach verschiedenen Aufreinigungsschritten.....	50
Tabelle 3.2: Die Halbwertszeiten der CPO bezüglich der Sulfoxidation von Thioanisol bei verschiedenen Temperaturen. Inkubationsbedingungen: 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, Temperatur wie angegeben. Reaktionsbedingungen: 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, 0,5 mM Thioanisol, 0,5 mM H ₂ O ₂ , bei RT.	70
Tabelle 3.3: Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der CPO bezüglich der Sulfoxidation von Thioanisol in Anwesenheit verschiedener wasserlöslicher organischer Lösungsmittel. Inkubationsbedingungen: 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, die verwendeten Lösungsmittel und ihre Anteile wie angegeben, 4 °C.	72
Tabelle 3.4: Die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der CPO bezüglich der Peroxidase-Aktivität bei verschiedenen Temperaturen. Inkubationsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 4, Temperatur wie angegeben.....	75
Tabelle 3.5: Die ermittelten Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der CPO hinsichtlich der Oxidation von Pyrogallol in Anwesenheit verschiedener wasserlöslicher organischer Lösungsmittel. Inkubationsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 4, 4 °C, die verwendeten Lösungsmittel und ihre Anteile wie angegeben.....	77

Tabelle 3.6: Der Versuchsplan nach „Central-Composite-Design“ mit den Messergebnissen in Citratpuffer (Aktivität: [U/mL], Halbwertszeit [Tage]), Aktivitätstest: Oxidation von Pyrogallol; 0,1 M Citratpuffer pH wie angegeben, 10 mM Pyrogallol, 4 mM H ₂ O ₂ , Temperatur wie angegeben.....	82
Tabelle 3.7: Die durch das DOE erhaltene Kombination von Temperatur und pH für eine optimale Aktivität, Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen beiden Größen in Citratpuffer.	90
Tabelle 3.8: Die durch das DOE erhaltene Faktorenkombination für eine optimale Aktivität, Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen beiden Größen in 20 % DMSO.	95
Tabelle 3.9: Die durch das DOE erhaltenen Faktorenkombinationen für eine optimale Aktivität und Stabilität der CPO in 20 % Isopropanol.	99
Tabelle 3.10: Die durch das DOE erhaltene Faktorenkombination für eine optimale Aktivität, Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen beiden Größen in 20 % Dioxan.	103
Tabelle 3.11: Die durch das DOE erhaltene Faktorenkombinationen für eine optimale Aktivität, Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen beiden Größen in 20 % Acetonitril.	107
Tabelle 3.12: Die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der nativen und modifizierten CPO in 20 % wassermischbaren Lösungsmitteln bei 45 °C.....	125

Verzeichnisse

Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>C. fumago</i>	<i>Caldariomyces fumago</i>
CPO	Chloroperoxidase
DCD	Dichlorodimedon
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOE	„Design of Experiments“
EC	„Enzyme class“
EPLC	„Fast Protein Liquid Chromatography“
ee	Enantiomerenüberschuss
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IP	Isoelektrischer Punkt
log P	Dekadische Logarithmus des Verteilungskoeffizienten
kDa	Kilodalton
MCD	Monochlorodimedon
mPEG	Methoxypolyethylenglykol
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PEI	Polyethyleneimin
PEG	Polyethylenglykol
pH	pH-Wert
PPG	Polypropylenglykol
Q ²	„Goodness of prediction“
R ²	„Goodness of fit“
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran

T_m	„Melting Temperatur“
U	Unit
UV	Ultraviolet
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse
wZPS	Wässriges Zweiphasensystem

Formelzeichen

A	CPO-Aktivität in einer der Phasen	U mL^{-1}
A_0	Gesamte Anfangsaktivität	U mL^{-1}
A_v	Volumetrische Aktivität	U mL^{-1}
c	Molare Konzentration	mM
d	Schichtdicke	cm
ε	Molarer Extinktionskoeffizient	$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$
<i>Ext</i>	Extinktion	-
ΔE	Extinktionsdifferenz	-
k	Inaktivierungskonstante	-
R	Aktivitätsausbeute	%
t	Zeit	Min bzw. h
$t_{1/2}$	Halbwertszeit	Min bzw. h
V_E	Volumen des Enzyms	mL
V_{ges}	Gesamtvolumen	mL

1 Einleitung

1.1 Enzyme als Katalysatoren

Enzyme sind katalytisch aktive Proteine und kommen in allen lebenden Zellen vor und bilden damit den Kern jedes biochemischen Prozesses. Sowohl isolierte Enzyme als auch die gesamten Zellen können als Biokatalysatoren für industrielle Aspekte genutzt werden. Sie werden seit Hunderten von Jahren zur Produktion von Getränken und Lebensmitteln eingesetzt. In den letzten Jahrzehnten hat die industrielle Anwendung von Enzymen rasant und stetig zugenommen. Gründe für diese schnelle Entwicklung sind die großen Fortschritte im Bereich der Molekularbiologie und in der Strukturaufklärung von Enzymen im Zusammenhang mit ihrer Funktion [Straathof, *et al.* 2002; Tyler *et al.* 2006; Osterath, *et al.*, 2007, Kirk *et al.*, 2002].

Die technische Anwendung der Enzyme ist so weit entwickelt, dass die biokatalytischen Prozesse heutzutage mit den chemischen Prozessen konkurrieren und sie ergänzen oder die gesamten chemischen Prozessen ersetzen können [Liese, *et al.*, 2000]. Gründe dafür sind die wesentlichen Vorteile, die biokatalytische Prozesse gegenüber klassischen chemischen Prozessen besitzen. Ein herausragender Vorteil von Biokatalysatoren ist ihre sehr hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität. Aufgrund der hohen Regioselektivität und Spezifität von Enzymen im Vergleich zu chemischen Katalysatoren treten die Nebenreaktionen wie Isomerisierungen, Racemisierungen und Epimerisierungen selten bis gar nicht auf. Demzufolge wird die Produktreinheit erhöht und die Aufreinigung des Produkts erleichtert [Faber, 2004; Tyler *et al.*, 2006; Patel, 2001]. Mithilfe von Enzymen können chirale Bausteine mit Enantiomerenüberschüssen (ee) von $\geq 99\%$ synthetisiert werden [Hilterhaus und Liese, 2007]. Dies ist gerade bei der Produktion von Pharmazeutika von großer Bedeutung [Bommarius und Riebel, 2004]. Darüber hinaus arbeiten Enzyme meist bei milden Reaktionsbedingungen (normalerweise im Temperaturbereich zwischen 20 °C und 40 °C, in einem pH-Bereich von 5-8 und unter atmosphärischem Druck), was wiederum zur Reduktion von Nebenreaktionen und gleichzeitig zu einer geringen Energieaufwendung führt [Faber, 2004, Tyler *et al.*, 2006; Bommarius und Riebel, 2004]. Enzyme sind hoch effektive Katalysatoren und beschleunigen die Reaktionsrate um den Faktor von 10^8 - 10^{12} im Vergleich

zu chemischen Katalysatoren. Ursache dafür ist die Herabsetzung der Aktivierungsenergie der Reaktion durch das Enzym. Daher können Enzyme in Konzentrationen von 10^{-3} - 10^{-4} mol % im Reaktionsansatz gute Ausbeuten erzielen, während chemische Katalysatoren normalerweise in Konzentrationen von 0,1-1 mol eingesetzt werden. Zudem können mehrere biokatalytische Reaktionen in einer Kaskade unter Verwendung von multienzymatischen Systemen durchgeführt werden, da Enzyme oft unter gleichen bzw. ähnlichen Bedingungen arbeiten können. Dadurch wird der Reaktionsprozess vereinfacht und die Isolierung des Intermediates erspart. Dies kann von großem Vorteil sein, wenn das Zwischenprodukt instabil ist. Außerdem kann das Reaktionsgleichgewicht in die Produktrichtung verschoben werden [Faber, 2004]. Des Weiteren sind Enzyme umweltfreundlich und katalysieren sowohl ein breites Spektrum von Reaktionen als dass sie ebenso ein weites Spektrum an Substraten besitzen.

Dank der positiven Eigenschaften von Enzymen gegenüber klassischen Katalysatoren, die für die Prozessökonomie und -ökologie von großem Vorteil sind, haben sich Enzyme heutzutage einen festen Platz in der chemischen Industrie erobert. Demzufolge finden Biokatalysatoren gegenwärtig Verwendung in der Pharma-, Lebensmittel-, Textil-, Futter-, Papier-, und Waschmittelindustrie [Ruttloff, 1994; Aehle, 2007; Tyler, *et al.* 2006; Straathof *et al.*, 2002; Schulze und Wubbolts, 1999; Bommarius und Riebel, 2004].

Der Einsatz der Enzyme in der pharmazeutischen Industrie hat sich in den letzten Jahren stetig entwickelt, da meist reine Enantiomere durch die enzymatische Katalyse gebildet werden können und gleichzeitig Racemate selektiv aufgetrennt werden können [Hilterhaus und Liese, 2007]. Dies ist von großer Bedeutung, da Enantiomere unterschiedliche Auswirkungen haben können. Aus diesem Grund wurden biokatalytische Prozesse für die Herstellung von vielen wichtigen chiralen Intermediaten verwendet, die für die Synthese von antikrebs, antiviralen, antiinfektischen, blutdrucksenkenden und cholesterinsenkenden Wirkstoffen erforderlich sind [Patel, 2001a, 2001b, 2002; Zacks, 2001].

Enzyme wurden auch für die Synthese von vielen anderen chiralen Produkten wie z.B. L-Aminosäuren genutzt und haben damit viele chemische Prozesse in diesem Bereich etabliert. Im Bereich achiraler Bulkchemikalien dominieren dennoch die chemischen Prozesse.

Trotzdem werden einige solcher Chemikalien im großen Maßstab enzymatisch produziert. Dazu gehört z.B. die Herstellung von Acrylamid mittels der Nitrilhydratase [Zacks, 2001; Hilterhaus und Liese, 2007; Liese und Filho, 1999].

1.2 Anforderungen im synthetisch-technischen Einsatz

Enzyme zeichnen sich von Natur aus durch ihre hohe Aktivität, Spezifität und Selektivität aus. Jedoch genügen diese Eigenschaften den ökonomischen Anforderungen für den synthetisch-technischen Einsatz nur selten. Für die Anwendung in industriellen Prozessen werden häufig Enzyme benötigt, die hohe Ausbeuten erzielen können sowie eine hohe Effizienz besitzen und gleichzeitig preiswert und in ausreichenden Mengen verfügbar sind. Darüber hinaus wird eine hohe Stabilität der Enzyme unter Prozessbedingungen wie z.B. hohe Temperaturen, extreme pH-Werte und die Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln, Detergentien und Oxidantien gefordert [Illanes, 1999].

Jedoch stellen diese Anforderungen häufig Beschränkungen für den Einsatz der Biokatalysatoren in technischen Verfahren dar. Viele Enzyme lassen sich nur sehr schwer isolieren. Sehr häufig ist eine Vielzahl an Aufreinigungsschritten notwendig, was die Isolierung eines Enzyms sehr aufwendig gestaltet und einen starken Aktivitätsverlust des Enzyms verursacht. Dies führt häufig zu hohen Kosten von Enzymen. Es besteht daher eine große Anforderung an einfachen und verbesserten Reinigungsoperationen mit einem verringerten Aufwand, in denen eine hohe Reinheit des Enzyms erzielt werden kann, was ihren Einsatz in technischen Prozessen dann ermöglicht.

Eine hohe Temperaturstabilität eines Biokatalysators ist von großem Vorteil, da die Reaktionsrate bei hohen Temperaturen bis zu hundertfach erhöht werden kann. Darüber hinaus wird die Löslichkeit der Reaktanden erhöht und dagegen die Viskosität und die Möglichkeit einer mikrobiellen Kontamination verringert [Lyer und Ananthanarayan, 2008]. Jedoch zeigen viele Enzyme bei hohen Temperaturen aufgrund der Entfaltung der Tertiärstruktur eine geringe Stabilität, was ihre Anwendungen in technischen Prozessen begrenzt.

Zudem weisen viele Enzyme bei extremen pH-Werten eine geringe Stabilität auf, da sich diese pH-Werte in erster Linie auf den Protonierungszustand der titrierbaren Gruppen innerhalb eines Proteins auswirken. Außerdem kann der pH-Wert den Einsatz von Enzymen in der Biotransformation ebenso begrenzen, wenn das pH-Optimum für die Enzymaktivität dem pH-Optimum für die Stabilität nicht entspricht.

Der Einsatz organischer Lösungsmittel in enzymkatalysierten Reaktionen dient vor allem zur Erhöhung der Löslichkeit organischer Substrate, die nur in geringen Konzentrationen in wässrigen Medien löslich sind, was die Umsetzung dieser Substrate verbessert und somit die Biotransformation effizienter macht [Koeller und Wong, 2001; Klibanov, 2001; Carrea und Riva 2000; Dordick, 1989]. Aus diesem Grund stellt die hohe Stabilität der Biokatalysatoren in Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln eine große Herausforderung für ihre synthetisch-technische Anwendung dar. Dabei entsteht das Problem, dass viele Enzyme in Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln inaktiviert werden. Dabei ist zwischen der molekularen Toxizität und der Grenzflächentoxizität zu unterscheiden [Carrea und Riva, 2008]. Eine molekulare Toxizität tritt im Einphasensystem auf, wobei die in der wässrigen Phase gelösten Lösungsmittelmoleküle toxisch auf das Enzym wirken. Dieser toxische Einfluss umfasst die Dehydratisierung des Enzymmoleküls, bei der die Wassermoleküle an der Proteinoberfläche gegen Lösungsmittelmoleküle ausgetauscht werden. Dies führt zu einer Änderung in der dreidimensionalen Struktur bzw. Inaktivierung des Enzyms [Lyer und Ananthanarayan, 2008; Khmelnitsky, *et al* 1991a; 1991b; Faber, 2004]. Dieser Einfluss hängt zudem von der Polarität des Lösungsmittels ab. Je polarer das Lösungsmittel ist, desto größer ist sein Einfluss [Lyer und Ananthanarayan, 2008, Laane, *et al.* 1987]. Dieses Prinzip ist dennoch nicht auf alle Reaktionssysteme übertragbar. Im Zweiphasensystem erfolgt die Inaktivierung dagegen an der Phasengrenzfläche, wo das Enzym mit den Lösungsmittelmolekülen in Kontakt tritt.

Für die Anwendung von Enzymen in industriellen Prozessen ist es daher von großem Vorteil, die Enzyme an die beschriebenen Anforderungen eines technischen Einsatzes anzupassen.

1.3 Enzymstabilisierung durch chemische Modifikation

Die Erhöhung der Stabilität von Enzymen kann durch die Optimierung des Reaktionsmediums durch die Zugabe von Additiven [Lyer und Ananthanarayan, 2008; Fágáin, 1995; Klivanov, 1983; Schmid, 1979] oder durch die Stabilisierung der Enzyme selbst erreicht werden [Lyer und Ananthanarayan, 2008; Fágáin, 1995]. Die Stabilisierung von Biokatalysatoren kann durch genetische Manipulation [Eijsink, *et al.*, 2004; Bornscheuer und Pohl, 2001; Adamczak und Krishna, 2004; Sylvestre, *et al.*, 2006; Arnold, 1996], chemische Modifikation [Davis, 2003; DeSantis und Jones, 1999] oder durch Immobilisierung [Klivanov, 1979; Hartmeier, 1986; Cao, 2005; Sheldon, 2007] erzielt werden.

Die chemische Modifizierung bietet eine interessante und vielseitige Methode zur Veränderung der Proteineigenschaften. Sie erlaubt die Bindung einer unbeschränkten Vielfalt von verschiedenen Funktionalitäten an die Aminosäureseitenketten des Enzyms. Ursprünglich wurde die chemische Modifizierung zur Aufklärung von Struktur-Funktions-Beziehungen von Enzymen und dabei zur Identifizierung von Aminosäureseitenketten, die für die katalytische Aktivität essentiell sind, eingesetzt [Means und Feeney, 1990]. Gegenwärtig konzentriert sich die praktische Anwendung hingegen vor allem auf die Stabilisierung von Enzymen und die Erhöhung ihrer Löslichkeit in nicht wässrigen Medien [DeSantis und Jones, 1999].

Prinzipiell können alle freien Aminosäurereste modifiziert werden. Jedoch sind nur zehn Aminosäureseitenketten ausreichend reaktiv, um unter milden Reaktionsbedingungen kovalente Bindungen mit spezifischen Reagenzien einzugehen [Fágáin, 1995]. Diese sind in Tabelle 1.1 zusammengestellt.

Tabelle 1.1: Die für die chemische Modifizierung geeignete Aminosäuren und ihren funktionellen Gruppen.

Aminosäure	Funktionelle Gruppe
Lysin	ϵ -Amiogruppe
Cystein	Sulphydrylgruppe
Asparagin- und Glutaminsäure	β - und γ -Carboxylgruppe
Tyrosin	phenolische Hydroxylgruppe
Arginin	Guanidylgruppe
Histidin	Imidazolgruppe
Methionin	Thioethergruppe
Serin	Hydroxylgruppe
Tryptophan	Indolgruppe

Diese Aminosäurereste reagieren unterschiedlich stark. Die Stärke ihrer Reaktivität beruht im Wesentlichen auf ihrer Nukleophilie und wird sowohl durch ihre Position und die Mikroumgebung in dem Protein als auch durch die Zusammensetzung des Reaktionsmediums sowie die Reaktionsbedingungen beeinflusst [Means und Feeney, 1990]. Insbesondere spielt dabei der pH-Wert eine entscheidende Rolle, da der Protonierungsgrad der einzelnen Aminosäuren von diesem abhängig ist.

Im Unterschied zur gerichteten Mutagenese, bei der nur die 20 proteinogenen Aminosäuren als funktionelle Gruppen in Frage kommen, ist die Anzahl der für die chemische Modifizierung von Proteinen zur Verfügung stehenden Reagenzien sehr groß. Gemäß der Anzahl der funktionellen Gruppen wird zwischen monofunktionalen und bi- bzw. multifunktionalen Reagenzien unterschieden. Die letzteren lassen sich nach dem Typ ihrer reaktiven Gruppen, ihrer Seitenkettenreaktivität, ihrer Hydrophobizität oder Hydrophilie, dem Abstand zwischen den reaktiven Gruppen und ob diese Gruppen gleich oder verschieden sind einordnen. Wenn das bifunktionale Reagenz die gleichen Gruppen besitzt, ist die Rede von einem homobifunktionalen Reagenz wie z.B. Glutardialdehyd. Ein Beispiel für ein heterobifunktionales Reagenz bietet m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS), der mit einer reaktiven Aminogruppe und einer reaktiven Thiolgruppe reagiert [Means und Feeney, 1990].

Die bi- bzw. multifunktionalen Reagenzien führen zur intra- und/oder intermolekularen Quervernetzung von Proteinen. Die Rigidität des Proteins wird dadurch erhöht, was seine Stabilität gegenüber verschiedenen denaturierenden Faktoren verbessert [Gianfreda und Scarfi, 1991]. Die Quervernetzung von Enzymen ist jedoch häufig der Immobilisierung zugeordnet, da durch die Quervernetzung feste Proteinaggregate gebildet werden können.

Die reaktiven Gruppen der monofunktionalen Reagenzien reagieren unter definierten Bedingungen mit bestimmten Aminosäureresten. Aus diesem Grund werden die monofunktionalen Reagenzien entweder nach dem Aminosäurerest, mit dem sie spezifisch reagieren, oder nach der Art der durchgeführten Reaktion eingeteilt. Jedoch existiert für die unterschiedlichen Aminosäureseitenketten, je nach ihrer Reaktivität, eine verschiedene Anzahl an modifizierenden Reagenzien. Während es zum Beispiel für Lysinseitenketten

zahlreiche spezifische Reagenzien gibt, nimmt die Anzahl und Selektivität der Reagenzien für andere Aminosäuren deutlich ab.

Die ϵ -Aminogruppen von Lysinresten sind mäßig basisch und dementsprechend sind sie sehr reaktive Nukleophile gegenüber vielen modifizierenden Reagenzien. Demzufolge kommen zahlreiche Reagenzien für diese chemische Modifizierung in Frage, die entweder spezifisch oder unspezifisch mit den Aminogruppen reagieren. Aldehyde sowie Ketone können spezifisch durch eine reduktive Alkylierung mit den Aminogruppen von Proteinen reagieren. Dabei wird die positive Ladung der ϵ -Aminogruppe erhalten und keine Konformationsänderung resultiert. Des Weiteren sind andere Aminosäurereste von dieser Reaktion nicht betroffen. Imidoester stellen ebenso spezifische Reagenzien dar, die mit den Aminogruppen in einer Amidinierungsreaktion reagieren. Sie bieten die gleichen Vorteile wie Aldehyde und Ketone. Dagegen stellen Anhydride unspezifische Reagenzien für die Modifizierung von Aminogruppen dar, da andere Aminosäurereste wie z.B. Tyrosin, Cystein, Histidin, Serin und Threonin dabei modifiziert werden können. Zudem wird die positive Ladung des Lysinrests eliminiert, was möglicherweise die Funktion des Proteins beeinflussen kann [Means und Feeney, 1990; Glazer, 1970].

Die Thiolgruppe von Cysteinen ist aufgrund ihrer starken Nukleophilie ebenso sehr reaktiv und bietet die Möglichkeit, das Protein zu modifizieren. Historisch gesehen stellt die Reaktion der Thiolgruppe von Cysteinen mit Halogen-Acetaten und Halogen-Acetamiden die bekannteste Methode für die spezifische Alkylierung von Cystein unter bestimmten Bedingungen dar. N-Ethylmaleinimid ist sehr reaktiv gegenüber der Thiolgruppe und wird im Allgemeinen eingesetzt, um die Thiolgruppe von Cysteinen in Proteinen zu modifizieren. Sein Nachteil besteht in der Neigung, mit den Aminogruppen und Histidin bei hohen pH-Werten zu reagieren [Crankshaw und Grant, 1996; Chalker, *et al.*, 2009].

Eine andere Möglichkeit für die Modifizierung von Proteinen bieten die Carboxylgruppen von Asparaginsäure und Glutaminsäure. Diese Gruppen können durch die Behandlung mit Methanol, Ethanol und Diazoverbindungen unter Säurekatalyse verestert werden. Des Weiteren können sie mit nukleophilen Reagenzien (z.B. Aminen) und wasserlöslichem

Carbodimid reagieren. Dabei können auch Nebenreaktionen mit Tyrosin- und Cysteinresten auftreten, wobei sich die Ladung verändern kann.

Alle anderen reaktiven Aminosäurereste können durch viele Reagenzien modifiziert werden. Das Problem entsteht dabei durch die geringe Selektivität der modifizierenden Verbindungen. Diese geringe Selektivität stellt im Allgemeinen einen Nachteil bei der chemischen Modifizierung von Proteinen dar, da meist neben der Zielgruppe auch andere funktionelle Gruppen mit den modifizierenden Substanzen reagieren können. Die Selektivität der Reagenzien lässt sich durch die Wahl der Reaktionsbedingungen, insbesondere der Wahl des pH-Werts, verbessern, indem die Nebenreaktionen unterdrückt werden [Means und Feeney, 1990; Glazer, 1970].

Die selektive Modifizierung an einer bestimmten Aminosäureseitenkette wurde zunächst eingesetzt, um die Aminosäuren, die für die biologische Aktivität erforderlich und essentiell sind, zu identifizieren. Somit stellt die Rückhaltung der Aktivität nach der Modifizierung von einer bestimmten Aminosäure einen Nachweis dar, dass diese Aminosäure keine entscheidende Rolle bei der Aktivität spielt. Dagegen deutet der Verlust der Aktivität darauf hin, dass entweder der Aminosäurerest für die Aktivität essentiell ist oder andere Änderungen während der Modifizierung aufgetreten sein können wie z.B. die Modifizierung von anderen Seitenketten oder Änderungen in der Ladung bzw. in der dreidimensionalen Struktur des Proteins [Means und Feeney, 1990].

Derzeit ist die praktische Anwendung der chemischen Modifizierung weit verbreitet. Es wird zwischen Modifikationen von Seitenketten zur Verbesserung der Löslichkeit und der Stabilisierung von Proteinen und Modifikationen, die zur Veränderung der Aktivität führen, unterschieden. Eine Erhöhung der Löslichkeit und Stabilität kann erzielt werden, indem das Enzym kovalent an aktivierte Polymere wie z.B. PEG oder Dextran gebunden wird. Die kovalente Modifizierung mit dem amphiphilen PEG verbessert die Löslichkeit verschiedener Proteine sowohl in wässrigen Medien wie z.B. Interleukin-2 (IL-2), Interferon (IFN)- β und Immunglobulin G als auch in organischen Medien wie z.B. Catalase, Peroxidase, Lipase, Papain, Chymotrypsin und Cholesterinoxidase [Katre, 1993; Inada, *et al.* 1990]. Die mit PEG modifizierten Enzyme weisen häufig erhöhte Stabilitäten auf wie zum Beispiel die Peroxidase

von Rübenwurzeln [Quintanilla-Guerrero, 2008], α -Chymotrypsin [Rodriguez-Martinez, *et al.* 2008], Subtilisin Carlsberg [Yang, *et al.* 1996], Phospholipase D aus *Streptomyces* sp. AA586, PLDP [Matsuyama, *et al.* 1991], Trypsin [Gaertner und Puigserver, 1992], Asparaginase [Veronese, *et al.* 1996] und die Lipase aus *Candida rugosa* [Hernáiz, *et al.* 1999]. Des Weiteren wurde eine Erhöhung der Aktivität von PEG-modifizierten Enzymen beispielsweise für die Laccase aus *Coriolopsis gallica* [Vandertol-Vanier, *et al.* 2002], Cytochrom C [Tinoco und Vazquez-Duhalt, 1998] und Trypsin [Gaertner und Puigserver, 1992] beschrieben.

Eine kovalente Modifizierung mit Anhydriden kann ebenso die Enzymstabilitäten verbessern. α -Amylase aus *Bacillus amylolquefaciens* [Khajeh, *et al.* 2001] und Papain aus *Carica papaya* [Sangeetha und Abraham, 2006] weisen erhöhte Temperaturstabilitäten auf, wenn sie mit Anhydriden chemisch modifiziert werden. Zudem werden sowohl die Stabilitäten der Chloroperoxidase aus *Caldariomyces fumago* und horseradisch Peroxidase (HRP) als auch ihre Effizienz bei der Entfernung und Oxidation von Phenolen deutlich gesteigert [Liu und Wang, 2007; Liu, *et al.* 2002; ÓBrien *et al.* 2003].

Die Erhöhung der Stabilität konnte auch durch die chemische Modifizierung mit anderen Reagenzien wie Aldehyden [Vinogradov, *et al.*, 2001] und Imidoestern [Basri. *et al.*, 1992; Ryan, *et al.*, 1994] erzielt werden. Polysaccharide können ebenso kovalent an Proteine gebunden werden, mit der Absicht ihre Stabilität und ihre Löslichkeit zu verbessern, da die meisten Glykoproteine eine gute Wasserlöslichkeit und erhöhte Stabilität gegenüber der Proteolyse, hohen Temperaturen und chemischen Denaturierungsstoffen besitzen [Lyer und Ananthanarayan, 2008; Shmid, 1979]. Auf diese Weise konnte die Stabilisierung einer Vielzahl verschiedener Proteine erzielt werden [Shmid, 1979; Villalonga, *et al.*, 2003; Villalonga, *et al.*, 2006; Fernández, *et al.*, 2005]. Obwohl sich die meisten Untersuchungen der chemischen Modifizierung auf die Erhöhung der Temperaturstabilität konzentrierten, wurde für einige Proteine auch eine Stabilisierung in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln nachgewiesen [Quintanilla-Guerrero, 2008; Gaetner und Puigserver, 1992].

1.4 Die Chloroperoxidase aus *Caldariomyces fumago*

1.4.1 Biochemische Eigenschaften

Die Chloroperoxidase aus dem Schimmelpilz *Caldariomyces fumago* (CPO, EC.1.11.1.10) wurde erstmals 1965 von Hager *et al.* isoliert und aufgereinigt. Die CPO gehört zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen und ist unter der Subklasse der Peroxidasen einzuordnen, da sie Peroxide als Oxidationsmittel benötigt. Die CPO ist ein extrazelluläres und monomeres Glykoprotein. In der Regel liegt der Anteil der Zuckerbausteine zwischen 25 bis 30 %, was zur Schwankung in der relativen Molekularmasse führt, die ungefähr bei 42 kDa liegt. Der isoelektrische Punkt des Enzyms liegt im sauren Bereich bei ca. pH 4, da es reich an sauren Aminosäuren ist.

Die CPO ist das vielseitigste Enzym unter den Peroxidasen, da sie ein breites Spektrum an Reaktionen katalysiert. Diese Reaktionen schließen neben den Reaktionen der Halogenasen ebenso die typischen Reaktionen der Peroxidasen, Cytochrom P450 Monooxygenase und der Katalase ein. Dies ist auf die räumliche Struktur der CPO zurückzuführen, die erst dreißig Jahre nach der Enzymisolierung aufgeklärt werden konnte (Abbildung 1.1). Die Strukturaufklärung der CPO zeigt, dass ihre Struktur Gemeinsamkeiten sowohl mit der von Peroxidasen als auch von Cytochrom P450 Monooxygenase besitzt [Sundaramoorthy, *et al.* 1995; Sundaramoorthy, *et al.* 1998].

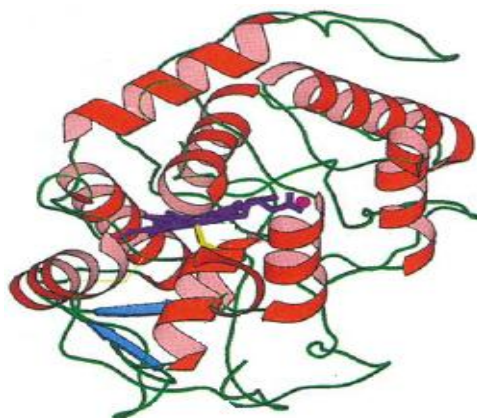


Abbildung 1.1: Die dreidimensionale Struktur der CPO nach Sundaramoorthy *et al.*, 1995 (mit freundlichen Genehmigung von Current Biology-Elsevier, License-Nummer: 254653026426).

Die Tertiärstruktur der CPO besteht hauptsächlich aus acht Helices und zwei β -Faltblättern. Wie andere Häm-Peroxidasen enthält die CPO ein Eisenprotoporphyrin IX (Häm) als prosthetische Gruppe. Das Eisenion mit der Oxidationsstufe +3 im Häm ist fünffach koordiniert. In der äquatorialen Ebene ist das Eisenion mit den vier Pyrrolstickstoffatomen des Porphyrinringes koordiniert. An der axialen fünften Koordinationsstelle wird das Eisenatom mit dem Protein über eine Aminosäureseitenkette verbunden, was als proximaler oder axialer Ligand bezeichnet wird. Sowohl die CPO als auch Cytochrom P450 Monooxygenase besitzen Cystein als proximalen Liganden im Gegensatz zu anderen Peroxidasen, bei denen das Protein mit dem Häm durch einen Histidinrest komplexiert ist. Die distale Umgebung des Häms in CPO ist polar wie in anderen Peroxidasen im Gegensatz zu der unpolaren Umgebung in Cytochrom P450 Monooxygenase. Diese distale Umgebung bildet die Peroxidbindungsstelle.

Für die Spaltung des Peroxids und somit die Bildung des CPO aktiven Intermediates, Compound 1, ist ein Säure-Base katalysierter Mechanismus nötig. Dieser Mechanismus wird von der Seitenkette der Glutaminsäure 183 katalysiert, die sich direkt neben der Peroxidbindungsstelle befindet. Diese Rolle übernimmt der Histidinrest bei den Peroxidasen sowie bei der Katalase, wobei Histidin bei der CPO nur indirekt an dem Mechanismus beteiligt ist. Die wahrscheinliche Rolle des Histidins 105 ist, die Glutaminsäure richtig zu orientieren und ebenso ionische Wechselwirkungen zu schaffen.

Eine bemerkenswerte strukturelle Besonderheit von den Peroxidasen und Cytochrom P450 Monooxygenase, die ihre biologische Aktivität bestimmt, ist die Zugänglichkeit zum katalytischen Zentrum, da sie das gleiche oxidierende Zentrum, $\text{Fe}^{+4}=\text{O}$, besitzen. Bei den Peroxidasen gibt es keinen direkten Zugang zu diesem Zentrum, sondern das Substrat tritt über Elektronentransferreaktionen unter Bildung von Radikalen mit dem Eisenatom in Wechselwirkung. Bei der Cytochrom P450 Monooxygenase liegt dagegen die Substratbindungsstelle direkt neben dem $\text{Fe}^{+4}=\text{O}$ Zentrum, was die stereo- und regioselektiven Reaktionen ermöglicht. Die Substratbindungsstelle bei der CPO ist eine freie Stelle oberhalb des Häms, was den Zugang zum katalytischen Zentrum erlaubt und selektive Reaktionen zur Folge hat. Zudem können Substrate ebenso Wechselwirkungen mit der CPO

im aktivem Zentrum eingehen [Sundaramoorthy, *et al.* 1995]. Demzufolge kann die CPO die typischen Reaktionen von Peroxidasen sowie von Cytochrom P450 Monooxygenase katalysieren.

1.4.2 Reaktionsspektrum und Reaktionszyklus

Die CPO zeichnet sich vor allem durch ihr breites Reaktions- und Substratspektrum aus. Sie katalysiert die folgenden Reaktionen (Abbildung 1.2) [Thomas, 1970]:

1. Halogenierungsreaktion: Bei der Anwesenheit der Halogenid-Ionen katalysiert die CPO die Einführung von Halogenatomen in organische Substrate. Daher katalysiert sie die unspezifische Chlorierung, Bromierung und Iodierung einer Reihe von elektrophilen organischen Substraten.
2. Oxidative Dehydrierung: Die CPO weist Peroxidase-Aktivität auf und oxidiert eine Vielzahl von Substraten über Ein- bzw. Zwei- Elektronen- Transfer-Reaktionen.
3. Sauerstoffübertragungsreaktion: Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit Cytochrom P450 Monooxygenase kann die CPO die selektive Einführung eines Sauerstoffmoleküls in ein organisches Substrat katalysieren, was für ihren Einsatz in der organischen Synthese von großer Bedeutung ist.
4. Zersetzung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2): Neben den anderen Reaktionen katalysiert die CPO ebenso typische Reaktionen wie eine Katalase-typische Reaktion und somit die Spaltung des Wasserstoffperoxides zu Wasser und Sauerstoff.

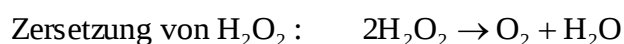
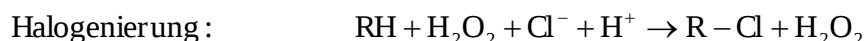


Abbildung 1.2: Die von Chloroperoxidase katalysierte Reaktionen.

All diese Reaktionen laufen nach einem bestimmten katalytischen Zyklus ab, wobei der erste Schritt bei allen Reaktionen gleich ist (Abbildung 1.3). Zuerst wird der sechste Ligand des

Eisenatoms, das Wasser, durch Wasserstoffperoxid verdrängt. Dabei wird zunächst ein Eisen(III)hydroperoxid-Intermediat gebildet, welches durch Eliminierung von Wasser eine Eisen(V)oxoverbindung bildet. Diese Verbindung ist instabil und wird durch eine Elektronenübertragung vom Porphyrinring auf das Eisen in ein Eisen(IV)oxoporphyrinradikalkation überführt (Reaktion 1). Diese Verbindung wird als Compound 1 bezeichnet. Compound 1 ist sehr reaktiv und kann auf verschiedenen Wegen zum Ruhezustand zurückreagieren. In einer Katalasereaktion reagiert Compound 1 erneut mit Wasserstoffperoxid und kehrt in seinen Ausgangszustand zurück (Reaktion 2). Ein weiterer Reaktionsweg ist die oxidative Dehydrierung, bei der Compound 1 dem Substrat ein Elektron entzieht, wobei Compound II gebildet wird. Ein weiterer Ein-Elektronen-Transfer überführt das Enzym wieder in seine Ausgangsform (Reaktion 3). Dieser Weg entspricht der unselektiven Oxidation von Substraten, da die Reaktion unter Bildung von Substratradikalen abläuft. Bei der selektiven Oxidation wird das Sauerstoffatom von Compound 1 meistens direkt auf das Substrat übertragen (Reaktion 4) [Van Rantwijk und Sheldon, 2000; Valderrama, *et al.*, 2002]. Eine andere für die CPO typische Reaktion ist die oxidative Halogenierung, bei der Compound 1 das Halogenid-Ion zum Hypohalogenit oxidiert. Die weitere Einführung des Halogens in ein organisches Substrat durch das gebildete Hypohalogenit ist unspezifisch und erfolgt vermutlich nicht enzymatisch vermittelt (Reaktion 5) [Murphy, 2003; Hofrichter und Ullrich, 2006; Littlechild, 1999].

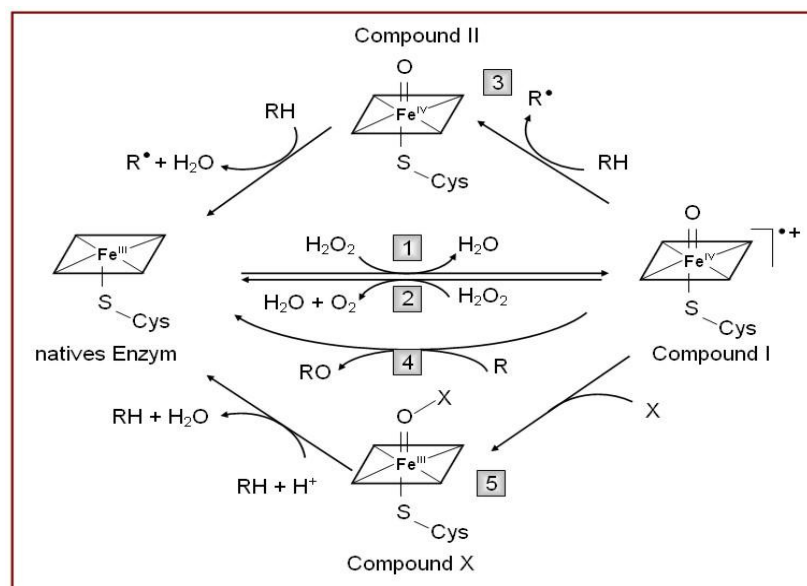


Abbildung 1.3: Der katalytische Zyklus der CPO.

1.4.3 Anwendungsfelder

Für die Anwendung der CPO als Biokatalysator in der organischen Synthese ist die selektive Einführung eines Sauerstoffatoms in ein organisches Substrat die interessanteste Reaktion. Solche Reaktionen wurden normalerweise von der Cytochrom P450 Monooxygenase mit hoher Selektivität katalysiert. Jedoch zeigt Cytochrom P450 Monooxygenase mehrere Nachteile wie z.B. der geringe Umsatz sowie der erforderliche teure Cofaktor NAD(P)H [Van Rantwijk und Sheldon, 2000]. Im Gegensatz dazu kann die CPO ebenso den selektiven Sauerstoff-Transfer katalysieren und benötigt dazu keinen Cofaktor. Demzufolge umfassen die potenziellen Anwendungen der CPO mehrere synthetische Sauerstofftransfer-Reaktionen wie z.B. die Epoxidierung [Manoj, *et al.* 1999, Manoj, *et al.* 2000; Santhanam und Dordick, 2002; Dexter, *et al.* 1995; Hager, *et al.*, 1998; Lakner und Hager, 1996, 1997]. Ein breites Spektrum kurzkettiger Olefine kann durch die CPO enantioselektiv epoxidiert werden. Industriell ist dies von großem Vorteil, da optisch aktive Epoxide wesentliche Bausteine für die asymmetrische Synthese von natürlichen Produkten darstellen, sowie biologisch aktive Verbindungen sind [Adam, *et al.* 1999].

Optisch aktive Sulfoxide spielen als chirale Bausteine ebenso eine wichtige Rolle in der asymmetrischen Synthese [Adam, *et al.* 1999]. Die CPO katalysiert die enantioselektive Sulfoxidation und stellt deswegen einen effektiven Biokatalysator für die Synthese von chiralen Sulfoxiden dar [Colonna, *et al.* 1990; Colonna, *et al.* 1997; Colonna, *et al.* 1992; Kobayashi, *et al.* 1987]. Eine Vielzahl organischer Sulfide wurde somit mittels der CPO zu den entsprechenden chiralen Sulfoxiden mit einem hohen Enantiomerenüberschuss (ee-Wert bis 99 %) oxidiert [Fu, *et al.* 1992, Vargas, *et al.* 1999; Allenmark und Andersson 1996].

Neben der Schwefeloxidation katalysiert die CPO ebenfalls die Stickstoffoxidation verschiedener Arylamine zu den entsprechenden Nitrosoderivaten [Doerge und Corbett 1991]. Zudem katalysiert die CPO die selektive Hydroxylierung an der Alkylseitenkette aromatischer Systeme, jedoch nicht direkt am aromatischen Ring [Miller, *et al.* 1995; Hu und Hager 1999]. Indol wird auch durch die CPO in Oxindol oxidiert [Van Deurzen, *et al.* 1996]. Eine weitere von der CPO katalysierte Reaktion ist die selektive Oxidation von primären Alkoholen zu den entsprechenden Aldehyden [Kiljunen und Kanerva 2000]. Die CPO ist auch in der Lage,

Phenole und aromatische Amine zu oxidieren. Die dabei gebildeten Radikale reagieren mit den aromatischen Substraten und bilden somit dimere, oligomere und polymere Produkte, die entweder aktiv sind oder an der Synthese biologisch aktiver Verbindungen beteiligt sind [Adam, *et al.* 1999].

Dank diesem breiten Spektrum an Reaktionen stellt die CPO industriell ein sehr interessantes und vielseitiges Enzym dar und findet Anwendungen in verschiedenen Feldern. Infolge der selektiven Sauerstoff-Transfer-Reaktionen wurden chirale Verbindungen mit hohem Enantiomerenüberschuss synthetisiert, die selbst biologisch aktiv sind oder an der Synthese von Arzneimitteln und vielen anderen aktiven Chemikalien beteiligt sein können.

Die CPO kann ebenfalls im Bereich des Umweltschutzes eingesetzt werden, da sie die Oxidation einiger Umweltschadstoffe wie z.B. Phenolen und chlorierten Phenolen katalysiert. Das reduziert die Giftigkeit dieser Schadstoffe und ermöglicht ihre Entfernung aus dem Abwasser [La Rotta Hernandez, *et al.* 2007; Torres, *et al.* 2003]. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) breiten sich weit in der Umwelt aus und stellen ein Gesundheitsrisiko dar, da sie mutagen und krebserzeugend sind. Mithilfe der CPO kann die Genotoxizität der PAK ermittelt werden, da die CPO die Bildung vom PAK-DNA Addukt vermittelt [Marquez-Rocha, *et al.* 1997].

Eine andere potentielle Anwendung der CPO findet sich in der Petroleum-Industrie. Petroleum ist ein kompliziertes Gemisch einer Vielzahl verschiedener organischer Verbindungen wie z.B. Petroporphyrin und Asphalten, die Schwermetalle wie Nickel und Vanadium enthalten. Die CPO ist in der Lage, effektiv diese Schwermetalle von Petroporphyrin und Asphalten zu entfernen [Mogollo'n, *et al.* 1998]. Des Weiteren enthält der Rohdiesel Organosulfide (organische Schwefelverbindungen), wobei der Anteil des Schwefels 1,6 % (w/v) beträgt. Nach der Behandlung des Diesels mit der CPO gefolgt von einer Destillation konnte dieser Wert auf 0,27 % reduziert werden. Dagegen wurde mit ausschließlicher Destillation nur ein Wert von 1,27 % erhalten [Ayala, *et al.* 2000; Terrès, *et al.* 2007]. Zusätzlich wurde ein großer Teil der Ligninstruktur durch die CPO chloriert und gespalten [Ortiz-Bermúdez, *et al.* 2003].

1.4.4 Gründe des begrenzten Einsatzes der CPO in den technischen Prozessen

Trotz der potenziellen industriellen Anwendung der CPO ist ihr Einsatz in technischen Prozessen weiterhin begrenzt. Gründe dafür stellen die geringe Stabilität des Enzyms, die hohen Kosten des ausreichend gereinigten Enzympräparates und die geringe Wasserlöslichkeit verschiedener organischer Substrate, die für synthetische Aspekte von Bedeutung sind, dar.

Die hohen Kosten des gereinigten CPO-Präparates, die die Folge der mühsamen Isolierung des Enzyms sind, stellen einen wesentlichen Grund für den begrenzten technischen Einsatz der CPO dar. Während der Fermentation des Pilzes *Caldariomyces fumago* wird nicht nur die CPO sondern auch ein schwarzes gelatinöses Pigment in das Nährmedium sekretiert [Morris und Hager, 1966; Pickard, 1981]. Dieses Pigment macht die anschließende Aufreinigung der Enzymlösung sehr mühsam und zeitaufwendig, was hohe Kosten des Enzyms verursacht [Morris und Hager, 1966; Hallenberg und Hager, 1978; Gonzalez-Vergara, *et al.*, 1985]. Aus diesem Grund ist der Bedarf an der Entwicklung einer neuen Isolierungsmethode, die eine hohe Reinheit des Enzyms liefert und gleichzeitig schnell durchführbar ist, sehr groß.

Des Weiteren zeigt die CPO eine geringe Stabilität bei hohen Temperaturen, in Gegenwart von Oxidationsmitteln sowie in Anwesenheit von organischen Lösemitteln. Viele Strategien wurden eingesetzt, um die Stabilität der CPO unter Prozessbedingungen zu verbessern.

In Bezug auf die Inaktivierung des Enzyms durch Wasserstoffperoxid haben sich verschiedene Verfahren etabliert, um H_2O_2 konstant bei niedrigen Konzentrationen zu halten. Dies kann durch eine kontinuierliche und kontrollierte Zugabe des Oxidationsmittels zum Reaktionsmedium erreicht werden [Colonna, *et al.*, 1992; Seelbach, *et al.*, 1997]. Eine weitere Möglichkeit bietet die in-situ Generation von H_2O_2 z.B. durch die Glucoseoxidase katalysierte Oxidation von Glucose zu Gluconsäure, bei der Wasserstoffperoxid als Nebenprodukt entsteht [Van de Velde, *et al.* 2000], durch die Reduktion von Sauerstoff [Van de Velde, *et al.* 1999] oder durch die elektrochemische in-situ Produktion von H_2O_2 , die hingegen ohne Nebenprodukt verläuft [Lütz, *et al.*, 2004]. Durch die Verwendung anderer Peroxide wie *tert*-Butylhydroperoxid (*t*-BHP) kann die Inaktivierung ebenso verringert werden, da die Katalaseaktivität vermieden wird [Van Deurzen, *et al.*, 1997; Manoj und Hager, 2001]. Eine

weitere Möglichkeit, die Inaktivierung des aktiven Zentrums des Enzyms zu minimieren, stellt die Zugabe verschiedener Additive dar. Durch die Zugabe von Polymeren wie PEG [Spreti, *et al.* 2004] und Polyethylenimin (PEI) [Andersson, *et al.*, 2000], Cosolventien wie *tert*-Butylalkohol [Van Deurzen, *et al.*, 1997] und α -Tocopherol (Vitamin E) [Van de Velde, *et al.* 2001] sowie Antioxidantien wie z.B. Kaffesäure und Ferulasäure [Grey, *et al.*, 2008] konnte ebenso eine Stabilisierung der CPO gegenüber der Inaktivierung durch H_2O_2 erzielt werden. Ein anderer Vorteil der Hinzugabe von amphiphilen Polymeren und Cosolventien besteht in der Erhöhung der Löslichkeit vieler Reaktanden.

Die Löslichkeit verschiedener organischer Substrate konnte verbessert werden, indem die Reaktion in einem Gemisch aus Puffer und wassermischbaren organischen Lösungsmitteln wie *tert*-Butylalkohol [Santhanam und Dordick, 2002; Van Deurzen, *et al.*, 1997; Van de Velde, *et al.* 2000] oder in Zweiphasensystemen im Fall nicht mischbarer Lösemittel durchgeführt wurde. Dabei ergibt sich jedoch das Problem in der Unverträglichkeit zwischen dem Enzym und den organischen Lösungsmitteln. Darüber hinaus ist eine Stabilisierung der CPO unerlässlich.

Aus diesen Gründen wurde es durch verschiedene Verfahren wie z.B. die Immobilisierung oder die chemische Modifizierung des Enzyms versucht, die Stabilität der CPO gegenüber der Temperatur und die Anwesenheit von wassermischbaren Lösungsmitteln zu erhöhen. Zum Beispiel wurde die CPO adsorptiv auf Talk [Aoun, *et al.*, 1998] und Celite [Andersson, *et al.*, 1999] immobilisiert. Auf der anderen Seite wurde CPO kovalent an verschiedene Materialien gebunden wie z.B. Chitosanmembranen [Zhang, *et al.*, 2009], magnetische Perlen [Bayramoglu, *et al.*, 2008], Polyurethanschaum [Bakker, *et al.*, 2000; Van de Velde, *et al.*, 2000], poröses Sol-Gel-Glas [Borole, *et al.* 2004], poröse Organosilane [Hudson, *et al.*, 2007], SBA-16 poröse Materialien [Aburto, *et al.*, 2005] und Aminopropyl-Glas [Kadima und Pickard, 1990]. Die native CPO wurde außerdem mit Polystyrenen, die sich an der Grenzfläche zwischen Wasser und Öl versammeln, konjugiert [Narayanan, *et al.*, 2007; Zhu und Wang, 2005]. Des Weiteren wurde die CPO mit Anhydriden [Liu und Wang, 2007], Glutardialdehyd, Carbodiimiden und 9-Anthaldehyd chemisch modifiziert [La Rotte Hernandez, *et al.*, 2005].

1.5 Zielsetzung

Die Chloroperoxidase aus *Caldariomyces fumago* (CPO) ist industriell ein sehr interessantes und vielseitiges Enzym dank ihres breiten Spektrums an Reaktionen, die für eine technische Nutzung von Bedeutung sind. Jedoch ist der technische Einsatz der CPO weiterhin begrenzt, was zum einen auf die hohen Kosten des gereinigten Enzymspräparats, die die Folge der aufwendigen und zeitintensiven Isolierung aufgrund des schwer zu entfernenden Pilzpigments sind, und zum anderen auf die geringe Stabilität der CPO zurückzuführen ist. Zudem zeigen viele Substrate, die für synthetische Aspekte von Bedeutung sind, eine geringe Löslichkeit in wässrigen Reaktionsmedien, was den Einsatz der CPO in organischen Lösungsmitteln erforderlich macht. Demzufolge ist die Anforderung an einer neuen schnell durchführbaren Isolierungsmethode mit einer ausreichenden Enzymreinheit sehr groß. Darüber hinaus ist eine Stabilisierung der CPO gegenüber hohen Temperaturen und der Gegenwart wassermischbarer Lösungsmittel unerlässlich.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst eine neue Methode für die Isolierung der CPO entwickelt werden, die die Entfernung des gelatinösen und schwarzen Pilzpigments einfach und schnell ermöglicht und zudem eine ausreichende Reinheit für den Einsatz des Enzyms in technischen Anwendungen liefert. Dies sollte anhand der Extraktion im wässrigen Zweiphasensystem erreicht werden.

Zudem sollte im Rahmen dieser Arbeit die CPO hinsichtlich der Halogenase-, Monooxygenase- und Peroxidase-Aktivität in Abhängigkeit von verschiedenen isolierten Einflüssen umfangreich charakterisiert werden, da nur wenig Literaturdaten vorhanden sind, die die verschiedenen Aktivitäten der CPO hinsichtlich dieser Einflussgrößen umfassend beschreiben. Diese Charakterisierung sollte zum einen die Reproduktion der Abhängigkeit der verschiedenen CPO-Aktivitäten von Reaktionsparametern wie z.B. pH-Wert und Substratkonzentrationen und den Vergleich mit den in der Literatur angegebenen Daten umfassen. Zum anderen sollte der Einfluss weiterer Faktoren, die in der Literatur bislang keine Beachtung fanden, untersucht werden wie z.B. die Anwesenheit von verschiedenen wassermischbaren Lösungsmitteln und die Temperatur.

Neben der Aktivität sollte auch die Stabilität der CPO in Abhängigkeit von verschiedenen isolierten Einflussgrößen wie Temperatur, pH-Wert und der Gegenwart wassermischbarer organischer Lösungsmittel untersucht werden.

Darüber hinaus sollte die gegenseitige Beeinflussung des pH-Werts, der Temperatur und der Anwesenheit von wassermischbaren organischen Lösungsmitteln bezogen auf die Aktivität und Stabilität der CPO mittels des „Design of Experiments“ untersucht werden und die optimalen Bedingungen für eine maximale Aktivität, eine maximale Stabilität und eine Balance zwischen den beiden Größen ermittelt werden. Anschließend sollte anhand der durchgeführten Messungen die Katalysatorproduktivität in allen untersuchten Medien unter diesen Bedingungen bestimmt und verglichen werden. Schlussendlich sollte ein optimales Lösungsmittel für eine maximale Katalysatorproduktivität ausgewählt werden.

Anschließend sollte die CPO gegenüber hohen Temperaturen und der Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln stabilisiert werden. Dies sollte durch die chemische Modifizierung der CPO mit mPEG erfolgen.

Durch die chemische Modifizierung mit mPEG sollte die Enzymoberfläche verändert werden, sodass eine Stabilisierung der CPO gegenüber hohen Temperaturen und der Anwesenheit von wassermischbaren organischen Lösungsmitteln erfolgt. Dazu sollten zunächst die optimalen Modifizierungsbedingungen (das Molekulargewicht des mPEGs, der pH-Wert während der Modifizierung und das Enzym:PEG-Verhältnis) unter Erhalt der maximalen Aktivität ermittelt werden. Letztendlich sollten sowohl die Aktivität als auch die Stabilität der modifizierten CPO in reinem Citratpuffer sowie in 20 % wassermischbaren organischen Lösungsmitteln untersucht und mit dem nativen Enzym verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Acetonitril	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat	Fluka (Steinheim)
Ammoniumsulfat	Merck (Darmstadt)
Biorad Protein Assay	Biorad (München)
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid (TBHP)	Sigma Aldrich (Steinheim)
Citronensäure	Merck (Darmstadt)
Dextran T500	Roth (Karlsruhe)
Diethylether	Merck (Darmstadt)
Dimedon	Sigma Aldrich (Steinheim)
Dimethylsulfoxid	Roth (Karlsruhe)
N,N-Dimethylformamid	Roth (Karlsruhe)
Dioxan	Merck (Darmstadt)
Eisen(II)-sulfat Heptahydrat	Sigma Aldrich (Steinheim)
Fructose	Roth (Karlsruhe)
Glucose	Merck (Darmstadt)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Fluka (Steinheim)
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka (Steinheim)
di-Kaliumhydrogenphosphat	Fluka (Steinheim)
Malzextrakt	Fluka (Steinheim)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Fluka (Steinheim)
Natriumnitrat	Merck (Darmstadt)
Natriumsulfat	Merck (Darmstadt)
<i>tri</i> -Natriumcitrat Dihydrat	Fluka (Steinheim)
Natriumhypochlorit-Lösung	Fluka (Steinheim)
4-Nitophenol	Merck (Darmstadt)

4-Nitophenylchloroformat	Sigma Aldrich (Steinheim)
Polyethylenglykol (PEG) 4000	Sigma Aldrich (Steinheim)
Polypropylenglykol (PPG)1200	Fluka (Steinheim)
Pyrogallol	Fluka (Steinheim)
2-Propanol	Roth (Karlsruhe)
Rotiphorese® Gel 40	Roth (Karlsruhe)
Stärke	Fluka (Steinheim)
Salzsäure	Sigma Aldrich (Steinheim)
Tetrahydrofuran	Roth (Karlsruhe)
Thioanisol	Fluka (Steinheim)
Trizma® Base	Fluka (Steinheim)
TEMET	Fluka (Steinheim)
Wasserstoffperoxid 35 %	Evonik Degussa GmbH (Essen)

2.1.2 Sonstige Materialien

<i>Caldariomyces fumago</i> ATCC: 16373	DSMS (Braunschweig)
Chloroperoxidase aus <i>C.fumago</i>	Sigma Aldrich (Steinheim)
Dialyseschlauch aus regenerierter Zellulose (10000 MWCO)	Roth (Karlsruhe)
HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75	GE Healthcare (München)
HiTrap™ 5 ml DEAE FF	GE Healthcare (München)
Glaswolle	Merck (Darmstadt)
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas (Leon-Rot)
Page Ruler™ Protein Staining Solution	Fermentas (Leon-Rot)
Quarzglasküvette	Hellma (Mühlheim)
Roti®-Load (4 x)	Roth (Karlsruhe)
Scheidetrichter	
Vivaspin 20 Zentrifugentube	

2.1.3 Geräte und Zubehör

Elektrophorese (SDS- PAGE)	Xcell SureLock™ Mini-Cell, Invitrogen (Karlsruhe)
FPLC	Amersham BioscienceEuropa GmbH (Freiburg)
Geldokumentation	Alpha Innotech (Hessisch Oldendorf)
Inkubator	Memmert (Schwabach)
Inkubationsschüttler	Infors AG (Bottmingen, Schweiz)
Laboklav	HSP Steriltechnik AG (Magdeburg)
Magnetrührer	VWR (Darmstadt)
pH-Meter	Metrohm (Filderstadt, Plattenhardt)
Rotationsverdampfer	Büchi (Essen)
Thermoblock	Peqlab (Erlangen)
Thermoschränke	Aqualytic (Dortmond)
UV-Vis- Spektrometer	Cary 50, Varian GmbH (Darmstadt)
UV-Vis- Spektrometer	Kontron, (Münschen)
Vortex	Ika (Staufen)
Vivaflow 50	Sartorius (Göttingen)
Waage	Sartorius (Göttingen)

2.1.4 Medien und Puffer

Fructose-Salz Medium

Zusammensetzung pro Liter: 40 g Fructose; 2 g NaNO₃; 2 g KCl; 2 g KH₂PO₄; 1 g MgSO₄·7H₂O; 0,02 g FeSO₄·7H₂O.

Fructose-Malzextrakt Medium

Zusammensetzung pro Liter: 40 g Fructose; 20 g Malzextrakt; 2 g NaNO₃; 2 g KCl; 2 g KH₂PO₄; 1 g MgSO₄·7H₂O; 0,02 FeSO₄·7H₂O.

Kartoffel-Dextrose Agar

Zusammensetzung pro Liter: 20 g Glucose; 15 g Agar; 1 L Infusion aus 200 g Kartoffeln.

Laufpuffer für SDS-Gel (pH 8,3)

Zusammensetzung pro Liter: 14,4 g Glycerin; 3 g Tris; 1 g SDS.

2.2 Bereitstellung des Enzyms

2.2.1 Kultivierung von *C. fumago* und Stammhaltung

Zur Kultivierung von *C. fumago* wurde in einem 100 mL Schüttelkolben 50 mL Fructose-Malzextrakt Medium vorgelegt. Daraufhin wurde ein 1 cm² Stück des Myzels aus der Kartoffel-Dextrose Agarplatte herausgeschnitten und in das Medium gegeben. Die Vorkultur wurde anschließend homogenisiert und bei 25 °C unter ständigem Schütteln (100 rpm) inkubiert. Nach 6 bis 7 Tagen Inkubationszeit wurden die Myzelien mit einem sterilisierten Rührfisch homogenisiert und als Inokulum (2 %) für die Hauptkultur benutzt. Für die Produktion der CPO wurde ein Fructose-Salz Medium eingesetzt. In einem 1 L Schüttelkolben wurden je 400 mL mit 8 mL Vorkultur beimpft und bei 25 °C unter ständigem Schütteln (200 rpm) 10 bis 12 Tage inkubiert [Pickard, 1981; Carmichael, *et al.*, 1986]. Der Stamm wurde bei 4 °C auf Kartoffel-Dextrose Agarplatten als Lebendkultur gehalten und alle 2 bis 3 Monaten transferiert.

2.2.2 Bestimmung der CPO Produktion

Während der Kultivierung wurde die Produktion der CPO beobachtet, indem jeden Tag Proben genommen und auf Proteinmenge und Enzymaktivität analysiert wurden. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach der Halogenase-Reaktion, dem Standardaktivitätstest der CPO.

2.2.3 Bestimmung des Pigments

Die Menge des Pigments im Nährmedium wurde durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 575 nm, ermittelt. Als Blank und Verdünnungsmittel wurde Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH 5,5) genutzt [Carmichael und Pickard, 1989].

2.2.4 Gewinnung des Rohenzym

Nach 10 bis 12 Tagen Kultivierungszeit wurde das Enzym abgeerntet, indem die Myzelien mittels Filtration durch Glaswolle vom Medium abgetrennt wurden. Die Myzelien wurden verworfen und das Enzym enthaltende Filtrat wurde über Ultrafiltration (Vivaflow 50) mittels einer Polyethersulfonmembran (PES Membran, 10000 MWCO) auf bis zu fünffach höhere Enzymkonzentration aufkonzentriert. Dieser Schritt diente nur zur Konzentrierung des Rohextraktes vor der Aufreinigung in wässrigen Zweiphasensystemen, um den Verbrauch der Polymere zu reduzieren.

2.2.5 Proteinaufreinigung mittels wässrigen Zweiphasensystems

Die wässrigen Zweiphasensysteme wurden auf (w/w) % Basis vorbereitet, indem die benötigten Mengen von Polymeren, die die Phasen bilden, mit der Rohenzymlösung gemischt wurden. Die Lösung wurde in einem Becherglas bei Raumtemperatur (RT) gemischt und dann in einen Scheidetrichter überführt. Innerhalb von 15 Minuten erfolgte die Abtrennung der Phasen. Die erhaltenen Phasen wurden dann separat gesammelt und auf Enzymaktivität getestet. Folgend wird die konkrete Durchführung der Aufreinigung mittels des wässrigen Zweiphasensystems beschrieben:

- **PEG 4000/PPG1200 (7,5 %, 25 % w/w):**

7,5 g PEG 4000, 25 g PPG 1200 und 2 g NaCl wurden in 65 mL Rohenzymextrakt gelöst (Endvolumen 95 mL). Nach dem Absetzen wurde die Unterphase (PEG-Phase) gesammelt. Dazu wurden 2 % NaCl und 15 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ beziehungsweise 15 % (w/v) Na_2SO_4 zugegeben, um das zweite Zweiphasensystem zu bilden.

- **PEG 4000/Stärke (8,29 %, 7,05 % w/w):**

10 g PEG 4000, 8,5 g Stärke und 2 g NaCl wurden zu 100 mL Rohenzymextrakt zugegeben (Endvolumen 120,5 mL). Nach der Phasentrennung wurden die Phasen gesammelt. Für die Bildung des weiteren Zweiphasensystems wurden zu der Oberphase (PEG-Phase) 2 % NaCl und 15 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ beziehungsweise 15 % (w/v) Na_2SO_4 zugegeben.

- **PEG 4000/Dextran T500 (9 %, 8,5 % w/v):**

4,5 g PEG 4000, 4,25 g Dextran T500 und 1 g NaCl wurden in 25 mL dest. Wasser gemischt und erhitzt, bis die Polymere sich lösen. Nach der Abkühlung wurden 25 mL Rohextrakt dazu gegeben (Endvolumen 50 mL). Nachdem die Phasen sich getrennt hatten, wurde die Oberphase (PEG-Phase) gesammelt. Dazu wurden 2 % NaCl und 15 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bzw. 15 % (w/v) Na_2SO_4 zugegeben, um das zweite Zweiphasensystem zu bilden.

2.2.6 Chromatographie

Ionenaustauschchromatographie

Die vom zweiten Zweiphasensystem erhaltene Unterphase (Salzphase), die die CPO enthält, wurde gesammelt und gegen dest. Wasser dialysiert. Nach der Dialyse wurde der pH-Wert mit 1 M K_2HPO_4 auf 5,8 eingestellt. Die weitere Aufreinigung des Enzyms erfolgte unter Verwendung eines FPLC-Systems. Dabei lief die Kationenaustauschchromatographie mittels einer HiTrapTM DEAE FF Säule mit einem Säulenvolumen (SV) von 5 mL ab. Die Säule wurde mit 5-fachem SV Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH 5,8) äquilibriert. Nachfolgend wurde die Enzymlösung über einen SuperloopTM (50 mL) auf die Säule aufgetragen. Die Flussrate betrug 1 mL/min. Die ungebundenen Proteine wurden dann über zwei Säulendurchläufe gewaschen. Die Elution des Enzyms erfolgte durch einen linearen Gradienten von 20-200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5,8). Die erhaltenen Fraktionen wurden auf Enzymaktivität untersucht, wobei die aktiven Fraktionen vereinigt und unter Verwendung von „Vivaspin 20“ Zentrifugentuben mit Ausschlussgröße von 10,000 Da aufkonzentriert wurden.

Gelfiltration

Die Gelfiltration diente zur Entsalzung der Enzymlösung nach der Kationenaustauschchromatographie und erfolgte über SuperdexTM 75 Säule. Die Säule wurde mit 5-fachem SV Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 4,1) äquilibriert. Danach wurde die Enzymlösung auf die Säule aufgetragen und die CPO enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und bei 4 °C gelagert. Alle Chromatographieschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.7 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen wurden nach Bradford bestimmt. Der gesamte Proteingehalt wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm ermittelt, da das Absorptionsmaximum des Coomassie Brilliant Blau-G-250 Reagenzes durch die Bindung an Proteine von 465 nm nach 595 nm verschoben wird. Die Absorption ist proportional zur vorhandenen Proteinmenge. Die Ermittlung der Proteinkonzentrationen erfolgte anhand einer Kalbrierung mit Rinderserumalbumin (BSA) bei Konzentrationen zwischen 0 bis 25 µg/mL. Jeweils 800 µL der entsprechende Probe wurden mit 200 µL Bradfordreagenz versetzt und nach 10-minütiger Inkubation bei RT bei 595 nm vermessen.

2.2.8 SDS-PAGE

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) wurde zur Analyse des Molekulargewichts von Proteinen eingesetzt. Die Zusammensetzung des Sammel- bzw. Trenngels ist in Tabelle 2.1 zusammengestellt.

Die zu analysierenden Proben wurden 1:1 mit dem Probenpuffer Roti®-Load (4x) versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Nach der Abkühlung der Proben wurden jeweils 20 µL in die Probetaschen aufgetragen. Als Standard zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine wurden 5 µL Protein Marker (Page RulerTM Prestained Protein Ladder) mitlaufen lassen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 180 Volt für 1-1,5 Stunden. Im Anschluss wurde das Gel 30 Minuten mit dest. Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel über Nacht in Page RulerTM Protein Staining Solution angefärbt. Abschließend wurde das Gel mit dest. Wasser entfärbt.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für 12 % SDS-Gele.

Komponenten	12 % Trenngel [mL]	5 % Sammelgel [mL]
dest. Wasser	6,45	4,35
Tris/HCl Puffer (1,5 M, pH 8,8)	3,75	-
Tris/HCl Puffer (1 M, pH 6,8)	-	0,75
Acrylamidlösung (40 %)	4,5	0,75
SDS 10 % (w/v)	0,15	0,6
APS 10 % (w/v)	0,15	0,6
TEMED	0,006	0,006

2.2.9 Dialyse

Zur Entfernung der Salze von der Proteinlösung wurde eine Dialyse durchgeführt. Dazu wurde ein Dialyseschlauch aus regenerierter Zellulose mit Ausschlussgrößen von 10 kDa genutzt. Die Dialyse erfolgte über Nacht gegen niedrig konzentrierten Kaliumphosphatpuffer bzw. dest. Wasser (100 Faches Volumen) unter ständigem Rühren bei 4 °C. Während der Dialyse wurde der Puffer einmal ausgetauscht.

2.3 Untersuchung der Enzymaktivitäten

2.3.1 Halogenase-Aktivität (Chlorierungsreaktion)

Für die Untersuchung der Halogenase-Aktivität der CPO diene die Chlorierung von Monochlorodimedon (MCD) zum Dichlorodimedon (DCD) als Modellreaktion. Diese Reaktion stellt den Standardtest für die Bestimmung der katalytischen Aktivität der CPO dar [Morris und Hager, 1966; Hallenberg und Hager, 1978]. Die Aktivität wurde spektrophotometrisch anhand des Verbrauchs von MCD ermittelt. Dabei wurde die Abnahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 278 nm verfolgt, wobei das MCD sein Absorptionsmaximum besitzt. Das Reaktionsvolumen betrug 1 mL und setzte sich folgendermaßen zusammen:

Puffer	100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,75
MCD	0,1 mM

H ₂ O ₂	2 mM
NaCl	20 mM

Die Reaktionslösung wurde in eine 1 mL Quarzglasküvette überführt und mittels eines langen Rührfisches durchmischt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1-10 µL Enzymlösung gestartet und die Abnahme der Absorption für 1 Minute bei RT verfolgt, wobei das Messintervall auf 1 Sekunde festgelegt wurde. Die Absorptionsabnahme war linear für mindestens 1 Minute. Die molare Konzentration von MCD wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten aus der gemessenen Extinktion unter Verwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes (Gleichung 2.1) berechnet.

$$Ext = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (\text{Gleichung 2.1})$$

wobei *Ext* die Extinktion, *c* die molare Konzentration, ε der Extinktionskoeffizient und *d* die Schichtdicke darstellt. Die Berechnung der volumetrischen Aktivität erfolgt demzufolge nach folgender Gleichung:

$$A_v = \frac{\Delta E \cdot V_{ges}}{V_E \cdot \varepsilon \cdot d} \quad (\text{Gleichung 2.2})$$

wobei A_v die volumetrische Aktivität [U ml^{-1}], ΔE die Extinktionsdifferenz über die Zeit [min^{-1}], V_{ges} das Gesamtvolumen [mL], V_E das Volumen des eingesetzten Enzyms [mL], *d* die Schichtdicke der Küvette [cm] und ε der Extinktionskoeffizient von MCD bei 278 nm [$\varepsilon_{278} = 1,22 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$] ist. Die Schichtdicke der Küvette liegt bei 1 cm. Eine Unit der CPO ist definiert als die Enzymmenge, die die Chlorierung von 1 µmol MCD pro Minute katalysiert. Das Substrat MCD wurde, wie in der Arbeit von Hager 1978 beschrieben, synthetisiert. Aus diesem Grund wird der Extinktionskoeffizient experimentell ermittelt und mit dem Literaturwert verglichen. Dazu wurde die Absorption von MCD bei unterschiedlichen Konzentrationen von 0,005 mM bis 0,25 mM (bei einer Wellenlänge von 278 nm) untersucht. Eine Auftragung der gemessenen Werte für die Absorption gegen die Konzentration ergibt eine Gerade, deren Anstieg dem Extinktionskoeffizienten entspricht.

Die Halogenase-Aktivität wurde hinsichtlich des Einflusses von pH-Wert, Temperatur, Konzentration der Reaktanden und der Anwesenheit organischer Lösungsmittel untersucht.

pH- und Temperaturoptimum

Die Ermittlung des pH-Optimums erfolgte über den Aktivitätstest bei verschiedenen pH-Werten. Dazu wurden 100 mM Kaliumphosphatpuffer mit verschiedenen pH-Werten (2, 2,75, 4 und 5) hergestellt. Der Aktivitätstest wurde dann bei RT mit den entsprechenden Puffern durchgeführt. Bei der Bestimmung der optimalen Temperatur, hinsichtlich der maximalen Halogenase-Aktivität der nativen CPO, wurden die Reaktionsansätze (Zusammensetzung siehe Halogenase-Aktivitätstest) in Mikroreaktionsgefäßen auf die erwünschte Temperatur erhitzt und umgehend in die Küvette, die sich in dem entsprechend temperierten Küvettenhalter befand, umpipettiert und dann die Reaktion gestartet. Die Messung erfolgte zwischen 20 und 60 °C in 5 °C Schritten.

Einfluss der MCD- und NaCl- Konzentrationen

Bei der Untersuchung des Einflusses der MCD- und NaCl-Konzentrationen auf die Halogenase-Aktivität wurde die Reaktion in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,75 bei RT und einer H₂O₂-Konzentration von 2 mM durchgeführt. Der Einfluss von MCD wurde im Konzentrationsbereich zwischen 0,01 und 0,3 mM variiert, wobei eine konstante NaCl-Konzentration von 20 mM beibehalten wurde, untersucht. Zur Ermittlung des Einflusses des NaCl wurden die entsprechenden Konzentrationen zwischen 0 und 150 mM variiert, während die Konzentration von MCD konstant bei 0,1 mM gehalten wurde.

Einfluss von Wasserstoffperoxid

Der Einfluss des Wasserstoffperoxids auf die Halogenase-Aktivität wurde über die Variation der H₂O₂-Konzentration in dem Reaktionsansatz zwischen 0,1 und 5 mM untersucht. Die Reaktion erfolgte ebenso bei RT und alle anderen Parameter wurden konstant gehalten.

Einfluss von organischen Lösungsmitteln

Für die Untersuchung der Halogenase-Aktivität unter Einfluss verschiedener organischer Lösungsmittel wurden wassermischbare Lösungsmittel ausgewählt. Dabei handelte es sich um Dioxan, Tetrahydrofuran (THF) und Acetonitril, die zu einem Anteil von 10 und 25 % dem Reaktionssystem zugesetzt wurden. Die Messungen erfolgten bei folgenden Bedingungen:

Puffer	100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,75
MCD	0,1 mM
H ₂ O ₂	2 mM
NaCl	20 mM

2.3.2 Monooxygenase-Aktivität (Sulfoxidation)

Für die Untersuchung der Monooxygenase-Aktivität der CPO diente die Sulfoxidation von Thioanisol als Modellreaktion, bei der Thioanisol zu dem entsprechenden Sulfoxid umgesetzt wird. Die Aktivität wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 250 nm ermittelt, gemessen wurde dabei der Verbrauch von Thioanisol. Die Abnahme der Absorption wurde für eine Minute mit einem Messintervall von einer Sekunde bei RT verfolgt. Das Reaktionsvolumen betrug 1 mL und setzte sich folgendermaßen zusammen:

Puffer	50 mM Citratpuffer pH 5
Thioanisol	0,5 mM
H ₂ O ₂	0,5 mM

990 µl der Reaktionslösung wurden in eine 1 mL Quarzglasküvette überführt und mittels eines langen Rührfisches durchmischt. Gestartet wurde die Reaktion mit 10 µL Enzymlösung. Die molare Konzentration von Thioanisol wurde analog zu Gleichung 2.1 und die Enzymaktivität analog der Chlorierungsreaktion berechnet (Gleichung 2.2), wobei der molare Extinktionskoeffizient von Thioanisol bei 250 nm $9700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ beträgt [Spreti, *et al.*, 2004; Liu und Wang, 2007]. Eine Unit wurde dabei definiert als die Enzymmenge, die 1 µmol Thioanisol pro Minute unter den gegebenen Bedingungen umsetzt.

pH- und Temperaturoptimum

Um das pH-Optimum der Oxidation von Thioanisol zu ermitteln, wurde die Reaktion in 50 mM Citratpuffer bei verschiedenen pH-Werten (3, 4, 5, 6 und 7) durchgeführt. Dabei erfolgte die Reaktion bei RT. Bei der Ermittlung des Temperaturoptimums erfolgte die Reaktion in 50 mM Citratpuffer pH 5 bei verschiedenen Temperaturen, die von 20 - 80 °C variiert wurden.

Einfluss der Konzentrationen von Thioanisol und H₂O₂

Die katalytische Aktivität wurde als Funktion der Konzentration von Thioanisol und H₂O₂ untersucht, indem die Thioanisolkonzentration von 0,05 - 0,65 mM und die H₂O₂-Konzentration von 0,05 - 4 mM variiert wurden. Die Reaktion erfolgte ebenfalls in Citratpuffer (50 mM, pH 5) bei RT.

Einfluss von organischen Lösungsmitteln

Der Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Monooxygenase-Aktivität wurde untersucht, indem die Oxidation von Thioanisol in der Anwesenheit von verschiedenen wassermischbaren organischen Lösungsmitteln durchgeführt wurde. Dabei handelte es sich um Dioxan, Tetrahydrofuran, Acetonitril, Isopropanol und 1-Butanol, die zu einem Anteil von 5, 10 und 25 % dem Reaktionssystem zugesetzt wurden. Die Messungen erfolgten mittels des anfangs definierten Aktivitätstests.

2.3.3 Peroxidase-Aktivität (Oxidation von Pyrogallol)

Als Modellreaktion für die Untersuchung der Peroxidase-Aktivität der CPO diene der Standardaktivitätstest von Peroxidasen und zwar die Oxidation von Pyrogallol zu Purpurogallin. Die Ermittlung der Aktivität erfolgte spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm. Beobachtet wurde dabei die Zunahme der Absorption beruhend auf der Produktbildung. Die Reaktionsdauer betrug eine Minute mit einem Messintervall von einer Sekunde. Die Zusammensetzung der Reaktion war folgendermaßen: 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 4, 10 mM Pyrogallol und 4 mM H₂O₂. 990 µL Substratlösung wurden in eine 1 mL Quarzglasküvette überführt und die Reaktion mit 10 µL Enzymlösung unter Rühren gestartet. Die volumetrische Aktivität wurde nach Gleichung (2.2) berechnet. Nach dem Einsatz der bekannten Werte in Gleichung (2.2) ergibt sich die folgende Gleichung:

$$A_v = \frac{\Delta E}{V_E \cdot 12} \quad (\text{Gleichung 2.3})$$

wobei 12 der Extinktionskoeffizient von 1 mg/mL Purpurogallin ist. Demzufolge wurde eine Unit in diesem Fall als die Enzymmenge definiert, die unter den angegebenen Bedingungen ein mg Purpurogallin pro Minute bildet.

pH-und Temperaturoptimum

Der Einfluss des pH-Werts auf die Peroxidase-Aktivität der CPO wurde untersucht, indem die Oxidation von Pyrogallol in 100 mM Kaliumphosphatpuffer bei verschiedene pH-Werten (2,75, 4, 5 und 6) bestimmt wurde. Um das Temperaturoptimum zu bestimmen, wurde die Reaktion bei Temperaturen zwischen 25 und 70 °C in 5 °C Schritten durchgeführt.

Einfluss der Substratkonzentrationen

Der Einfluss der Substratkonzentration auf die Peroxidase-Aktivität der CPO wurde über die Variation der Konzentration zwischen 0,5 – 40 mM bei Pyrogallol bzw. zwischen 0,25 – 20 mM bei H₂O₂ untersucht. Die Reaktion erfolgte in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 4 bei RT.

Einfluss der organischen Lösungsmittel

Die Peroxidase-Aktivität der CPO wurde unter dem Einsatz von wassermischbaren Lösungsmitteln wie Dioxan, Tetrahydrofuran und Acetonitril untersucht. Die organischen Lösungsmittel wurden zu einem Anteil von 10 und 25 % dem Reaktionssystem zugesetzt.

2.4 Untersuchung der Lagerungsstabilität der CPO

Die Lagerungsstabilität wurde untersucht, indem das Enzym bei bestimmten Bedingungen inkubiert und die Restaktivität mittels des entsprechenden Aktivitätstests in regelmäßigen Abständen gemessen wurde. Die Halbwertszeit des Biokatalysators lässt sich über die Inaktivierungskonstante bestimmen, die sich aus Gleichung (2.4) ergibt.

$$\text{relative Aktivität} = e^{-kt} \quad (\text{Gleichung 2.4})$$

wobei k die Inaktivierungskonstante und t die Zeit ist. Durch die Auftragung des natürlichen Logarithmus der relativen Aktivität gegen die Zeit erhält man die Inaktivierungskonstante als Steigung (Gleichung 2.5).

$$-\ln(\text{relative Aktivität}) = k \cdot t \quad (\text{Gleichung 2.5})$$

Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ lässt sich nach der Gleichung (2.6) berechnen

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (\text{Gleichung 2.6})$$

Die Lagerungsstabilität der CPO wurde für zwei Reaktionstypen bestimmt. Zum einen wurde sie für die Peroxidase-Reaktion und zum anderen für die Monooxygenase-Reaktion untersucht.

2.4.1 Temperaturstabilität

Bei der Bestimmung der Temperaturstabilität wurde die CPO in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 4 für die Oxidation von Pyrogallol und in 50 mM Citratpuffer pH 5 für die Sulfoxidation von Thioanisol eingesetzt. Die Enzymlösungen wurden dann bei verschiedenen Temperaturen in einem Bereich von 25 °C - 60 °C inkubiert. Es wurden nach verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen und die Aktivität bestimmt. Mittels der Abnahme der Aktivität über die Zeit wurde die Halbwertszeit bei den jeweiligen Temperaturen ermittelt.

2.4.2 pH-Stabilität

Zur Bestimmung der Stabilität gegenüber dem pH-Wert wurde das Enzym in 100 mM Kaliumphosphatpuffer für die Oxidation von Pyrogallol und in 50 mM Citratpuffer für die Sulfoxidation von Thioanisol bei verschiedenen pH-Werten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Restaktivität nach verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

2.4.3 Oxidationsmittelstabilität

Zur Ermittlung der Stabilität gegenüber dem Oxidationsmittel bei der Oxidation von Pyrogallol wurde das Enzym bei 2 mM H_2O_2 in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 4 bei RT inkubiert. Nach 15, 30, 60 und 120 Minuten Inkubation wurde die Restaktivität des Enzyms durch die Zugabe von weiteren 4 mM H_2O_2 und der Zugabe vom Substrat gemessen. Als

Ausgangaktivität diente die Aktivität des Enzyms bei 4 mM H_2O_2 , da die 2 mM H_2O_2 während der ersten 15 Minuten durch die Katalase-Aktivität des Enzyms konsumiert wurden [Park und Clark, 2006]. Bei der Sulfoxidation von Thioanisol wurde das Enzym in 50 mM Citratpuffer pH 5 bei verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen (0,5, 1 und 2 mM) inkubiert. Die Restaktivität wurde durch die Zugabe von Thioanisol und 0,5 mM H_2O_2 nach verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Dabei diente die bei 0,5 mM H_2O_2 gemessene Aktivität als Ausgangspunkt.

2.4.4 Lösungsmittelstabilität

Sowohl bei der Pyrogallol-Oxidation als auch bei der Sulfoxidation von Thioanisol wurde die Lagerungsstabilität des Enzyms in Gegenwart von organischen wassermischbaren Lösungsmitteln ermittelt. Dabei wurde das Enzym in den entsprechenden Puffern mit einem Lösungsmittelanteil von 30 % bzw. 50 % bei 4 °C inkubiert. Die Inkubation erfolgte in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 4 bzw. 50 mM Citratpuffer pH 5 bei der Oxidation von Pyrogallol bzw. Thioanisol. Die Stabilität des Enzyms wurde in Anwesenheit von Dioxan, Acetonitril und Tetrahydrofuran bei der Oxidation von Pyrogallol und zusätzlich zu Isopropanol bei der Thioanisoloxidation bestimmt. Aus der Abnahme der Aktivität über die Zeit wurden die Inaktivierungskonstanten bestimmt und darüber die Halbwertszeiten.

2.5 Charakterisierungen der Aktivität und Stabilität der CPO mittels Factorial Designs

Mittels Factorial Designs (Statistische Versuchsplanung) können die Wechselwirkungen zwischen den Einflussgrößen auf die Zielgrößen im Gegensatz zu klassischen Methoden bestimmt werden, da über statistische Zusammenhänge alle Faktoren gleichzeitig variiert werden können. Hierbei wurde der Einfluss von Temperatur, pH-Wert und organischen wassermischbaren Lösungsmitteln auf die Aktivität und Stabilität der CPO untersucht. Die Temperatur und der pH-Wert stellen quantitative Faktoren dar und können einfach variiert werden. Die Anwesenheit eines organischen Lösungsmittels stellt hingegen einen qualitativen Faktor dar, wobei in diesem Zusammenhang fünf organische Lösungsmittel untersucht wurden. Dabei handelte es sich um DMSO, Dioxan, Isopropanol, Acetonitril und DMF. Die

erhaltenen Versuche wurden demnach in reinem Citratpuffer sowie in der Anwesenheit von 20 % Lösungsmittel durchgeführt. Die beiden Einflussgrößen wurden in 2 Stufen festgelegt (15 °C - 45 °C für die Temperatur, 3-5 für den pH-Wert). Der Versuchsplan wurde nach dem „Central-Composite-Design“ erstellt, das aus einem Würfel und einem Stern besteht. Der Würfel ist ein zweistufiger Versuchsplan, wobei der Stern durch Variation der einzelnen Faktoren entsteht (Abbildung 2.1). Sein Stufenabstand übersteigt dabei den des Würfels, also wird letztendlich jeder Faktor auf 5 Stufen getestet. Demzufolge bietet das „Central-Composite-Design“ die Möglichkeit, auch nichtlineare Zusammenhänge zu untersuchen.

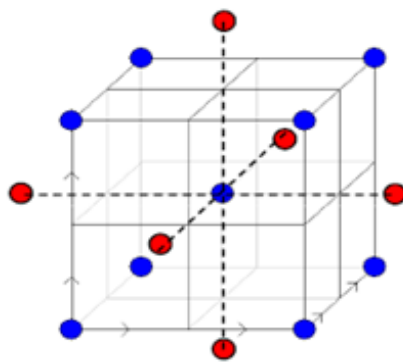


Abbildung 2.1: Die dreidimensionale Konfiguration eines „Central-Composite-Designs“.

Die Zahl der Versuche und die Faktorkombinationen des einzelnen Versuchs können dem Versuchsplan, wie in der Tabelle 2.2 dargestellt, entnommen werden.

Tabelle 2.2: Der nach „Central-Composite-Design“ erhaltene Versuchsplan für zwei Faktoren (Temperatur 15 °C-45 °C, pH-Wert 3-5) mit den Faktorkombinationen, bei denen die Aktivität und Stabilität der CPO untersucht wurden.

Worksheet								
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	Temperatur	pH-Wert	Aktivität	Halbwertszeit
2	1	N1	5	Incl	15	3		
3	2	N2	8	Incl	45	3		
4	3	N3	6	Incl	15	5		
5	4	N4	3	Incl	45	5		
6	5	N5	11	Incl	8,79	4		
7	6	N6	1	Incl	51,21	4		
8	7	N7	9	Incl	30	2,586		
9	8	N8	10	Incl	30	5,414		
10	9	N9	7	Incl	30	4		
11	10	N10	2	Incl	30	4		
12	11	N11	4	Incl	30	4		

Das letzte System diente zur Untersuchung der Stabilität sowie der Aktivität des Enzyms in einem Temperaturbereich, in dem das Enzym eine messbare Stabilität zeigt. Daher wurde auch eine andere Versuchsplanung für die Untersuchung der Aktivität bei höheren Temperaturen (45 °C - 65 °C) mittels „Face-Centered-Composite-Design“ durchgeführt, wobei die zusätzlichen Sternversuche nicht über den Würfel hinausragen. Tabelle 2.3 stellt die Versuchsplanung mit den Faktorkombinationen jedes einzelnen Versuchs dar.

Tabelle 2.3: Der nach „Face-Centered-Central-Composite-Design“ erhaltene Versuchsplan für zwei Faktoren (Temperatur, pH-Wert) mit den Faktorkombinationen, bei denen die Aktivität der CPO bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C) untersucht wurde.

Worksheet							
	1	2	3	4	5	6	7
1	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	Temperatur	pH-Wert	Aktivität
2	1	N1	11	Incl	45	3	
3	2	N2	6	Incl	65	3	
4	3	N3	7	Incl	45	5	
5	4	N4	5	Incl	65	5	
6	5	N5	4	Incl	45	4	
7	6	N6	8	Incl	65	4	
8	7	N7	10	Incl	55	3	
9	8	N8	3	Incl	55	5	
10	9	N9	9	Incl	55	4	
11	10	N10	1	Incl	55	4	
12	11	N11	2	Incl	55	4	

Bei der Charakterisierung der Aktivität und Stabilität mittels Design of Experiments wurde die Oxidation von Pyrogallol als Modellreaktion eingesetzt. Der Aktivitätstest wurde aber in 100 mM Citratpuffer mit dem entsprechenden pH-Wert anstatt von Kaliumphosphatpuffer und bei der angegebenen Temperatur durchgeführt. Bei den Stabilitätsuntersuchungen wurde das Enzym je nach der Versuchskombination inkubiert und die Abnahme der Aktivität über die Zeit bestimmt, woraus die Halbwertszeit ermittelt werden konnte. Die Inkubation erfolgte ebenso in 100 mM Citratpuffer.

2.6 Chemische Modifikation der CPO mit Methoxypolyethylenglykol (mPEG)

2.6.1 Aktivierung von Methoxypolyethylenglykol

Für die chemische Modifizierung der CPO wurde mPEG 2000 und mPEG 5000 verwendet, deren Aktivierung mit *p*-Nitrophenylchloroformat erfolgte. Dazu wurden 5 g mPEG 2000 in 10 mL bzw. 10 g mPEG 5000 in 20 mL wasserfreiem Acetonitril gelöst. Eine Lösung bestehend aus 0,7 mL Triethylamin und 1 g bzw. 0,5 g *p*-Nitrophenylchloroformat wurde anschließend zu der mPEG 5000 bzw. der mPEG 2000 Lösung gegeben. Unter Stickstoff-Schutzgasatmosphäre wurde das Gemisch über Nacht gerührt, wobei sich ein weißer Niederschlag bestehend aus mPEG und Triethylaminchlorid bildete. Der Niederschlag wurde filtriert, mit 200 mL (mPEG 5000) bzw. 100 mL (mPEG 2000) wasserfreiem Diethylether versetzt und auf 4 °C abgekühlt. Dabei entstand erneut ein weißer Niederschlag aus dem Produkt und dem nicht aktivierten mPEG. Dieser Niederschlag wurde abfiltriert, getrocknet und in 10 mL Acetonitril resolviert, um das Produkt aufzureinigen. Diese Lösung wurde erneut mit Diethylether versetzt und auf 4 °C gekühlt. Anschließend wurde der entstehende Niederschlag abfiltriert und getrocknet. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt und Proben wurden anschließend mittels ¹H-NMR analysiert.

¹H-NMR *p*-Nitrophenyl-mPEG-carbonat:

(δ , 200 MHz, 20 °C, CDCl₃): 8,3 (m, 4H), 7,4 (m, 4H), 4,4 (s, 4H), 3,5 (m, XH), 2,1 (s, 1H), 1,45 (m, 8H)

2.6.2 Bestimmung des Aktivierungsgrades von *p*-Nitrophenyl-mPEG-carbonat durch alkalische Hydrolyse

Der Aktivierungsgrad kann durch die Esterhydrolyse von *p*-Nitrophenyl-mPEG-carbonat bestimmt werden, indem die Konzentration des freigesetzten *p*-Nitrophenols spektrophotometrisch ermittelt wird, da diese Menge der Menge der aktivierten Hydroxylgruppen entspricht. Dazu wurde das aktivierte mPEG in einer Konzentrationen von 0,16 g/L in dest. Wasser gelöst. Die Hydrolyse erfolgte unter Rühren bei RT und wurde durch

Zugabe von 1 M NaOH (1,2 μ L/mL) gestartet. Die Zunahme der Absorption wurde bei 400 nm für 40 Minuten verfolgt. Anhand einer Kalibrierungsgeraden (0- 0,15 mM) wurde die Konzentration an freigesetztem *p*-Nitrophenol ermittelt.

2.6.3 Modifizierung des Enzyms

Für die Modifizierung des Enzyms wurden Enzymlösungen in 100 mM Kaliumphosphatpuffer in verschiedenen Konzentrationen (0,1 - 1 mg/mL) bei unterschiedlichen pH-Werten (6, 6,5 und 7) hergestellt. Zu diesen Lösungen wurde aktiviertes mPEG 2000 bzw. mPEG 5000 in unterschiedlichem molarem Überschuss (1000-5000-fach) gegeben. Die Modifizierungsreaktion erfolgte bei RT unter leichtem Rühren für 1 bis 4 Stunden. Nach verschiedenen Zeitpunkten der Modifizierungsreaktion wurden zum Teil Proben aus dem Reaktionsansatz genommen, in einem SDS-PAGE analysiert und hinsichtlich der Enzymaktivität untersucht. Als Aktivitätstest diente die Oxidation von Pyrogallol zu Purpurogallin. Die Reaktion erfolgte in 100 mM Citratpuffer pH 4,5 bei RT.

2.6.4 Aufreinigung des modifizierten Enzyms

Zur Entfernung des freigesetzten *p*-Nitrophenols und des nicht gebundenen mPEGs von der modifizierten Enzymlösung wurde eine Dialyse durchgeführt. Hierzu wurden die Ansätze in einem Dialysemembranschlauch mit Ausschlussgrößen von 10 kDa überführt und anschließend für 24 Stunden bei 4 °C gegen 300-fach 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 5 dialysiert. Im Anschluss wurden Proben aus den Dialysaten entnommen und auf Proteinkonzentration und Enzymaktivität untersucht. Abschließend wurden die aufgereinigten Enzymlösungen bei 4 °C gelagert.

2.6.5 Charakterisierung des modifizierten Enzyms

Als Modellreaktion für die Untersuchung der Aktivität und der Stabilität des modifizierten Enzyms diente die Oxidation von Pyrogallol. Die Enzymaktivität wurde in 100 mM Citratpuffer sowie in organischen wassermischbaren Lösungsmitteln untersucht. Die Lösemittel wurden in 20 % Anteilen des gesamten Volumens eingesetzt. Die Reaktion

erfolgte in 1 mL Volumen bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen, je nach Lösungsmittel (basierend auf die Ergebnisse von DOE).

Tabelle 2.4 listet die untersuchten Reaktionsmedien mit den entsprechenden pH-Werten und den angemessenen Temperaturen. Die Stabilität des modifizierten Enzyms wurde sowohl in Citratpuffer als auch in organischen wassermischbaren Lösungsmitteln untersucht. Dazu wurde das Enzym in 100 mM Citratpuffer bzw. 20 % igen Lösungsmittelanteilen bei 45 °C inkubiert und die Restaktivität über die Zeit ermittelt. Der Aktivitätstest erfolgte in 100 mM Citratpuffer in einem Gesamtvolumen von 1 mL bei RT. Der pH-Wert, bei dem die Inkubation und der Aktivitätstest erfolgte, ist vom Lösungsmittel abhängig (basierend auf die Ergebnisse von DOE) (Tabelle 2.5).

Um das modifizierte Enzym mit dem Nativen zu vergleichen, wurden ebenso die Aktivität und die Stabilität des nativen Enzyms parallel bei den gleichen Bedingungen untersucht.

Tabelle 2.4: Die Reaktionsmedien mit den entsprechenden Temperaturen und pH-Werten, bei denen die Aktivität der mit mPEG modifizierten CPO untersucht wurde (basierend auf die Ergebnisse von DOE).

Reaktionsmedium	Temperatur [°C]	pH-Wert
Citratpuffer	45	4,5
	59	4
	RT	4,5
DMSO	45	4,8
	65	3,8
Isopropanol	45	4,8
	56	4,2
Dioxan	45	4,2
	58	4
Acetonitril	45	3,3
	57	4
DMF	45	4,2
	RT	4,2

Tabelle 2.5: Die für die Stabilitätsuntersuchung, der mit mPEG modifizierten CPO verwendeten, wassermischbaren organischen Lösungsmittel, mit den entsprechenden pH-Werten (basierend auf die Ergebnisse von DOE).

Inkubationsmedium	pH-Wert
100 mM Citratpuffer	4,5
20 % DMSO	4,8
20 % Isopropanol	4,8
20 % Dioxan	4,2
20 % Acetonitril	3,3
20 % DMF	4,2

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Optimierung des Aufreinigungsprotokolls

Die Produktion der CPO umfasst eine 20 tägig andauernde zwei-Schritte Batch-Fermentation des marinen filamentösen Pilzes *Caldariomyces fumago*. Während des Prozesses wird die CPO zusammen mit einem schwarzen gelatinösen Pigment in das Nährmedium sekretiert [Morris und Hager, 1966; Pickard, 1981]. Dieses Pigment; welches der Pilz produziert, macht die anschließende Verarbeitung der Enzymlösung sehr mühsam und zeitaufwendig. Zuerst wurde die Isolierung der CPO von Hager beschrieben. Hierbei erfolgte die Isolierung nach mehreren essentiellen wie folgt beschriebenen zeitintensiven Schritten:

- 4-5 Tage Dialyse
- Einfrieren bei -20 C für 3-4 Wochen. Dieser Schritt dient vor allem zur Entfernung des Pigments.
- Ethanolfällung
- Ionenaustauschchromatographie
- Ammoniumsulfatfällung

Insgesamt umfasst die Aufreinigung eines Enzymbatches mindestens 5 Wochen mit maximalem Erhalt von 38 % der Ausgangsaktivität. Dabei erreicht die spezifische Aktivität einen maximalen Wert von 2200 U/mg in Bezug auf die Halogenierung von MCD [Hallenberg und Hager, 1978]. Eine Verbesserung dieses Aufreinigungsprotokolls wurde von Gonzalez-Vergara *et al.* und Pikard *et al.* beschrieben. Bei der Aufreinigung der CPO nach Gonzalez-Vergara erfolgte die Entfernung des Pigments durch eine PEG-Ausfällung, gefolgt von mehreren Filtrationsschritten. Die nachfolgenden Aufreinigungsschritte bestehen aus einer Ionenaustauschchromatographie, einer Ammoniumsulfatfällung und einer extensiven Dialyse [Gonzalez-Vergara, *et al.*, 1985]. Pikard *et al.* entfernte das Pigment von der Enzymlösung mittels zwei aufeinander folgenden Gefrier- und Auftauschritten der CPO-Pigment-Lösung, gefolgt von Filtration, Zentrifugation und einer PEG-Fällung. Die weitere Aufreinigung des Enzyms wird mittels Dialyse und Chromatographie erreicht [Pikard, *et al.*, 1991]. Mit diesen zwei verbesserten Aufreinigungsprotokollen konnte die Restaktivität bis zu 70 % erhöht werden. Dennoch bleibt ein erforderlicher hoher zeitlicher Aufwand, um eine

angemessene Aufreinigung des Enzyms zu erreichen. Aus diesen Gründen sind die Kosten des gereinigten Enzympräparates sehr hoch, was den Einsatz der CPO in technischen Anwendungen begrenzt. Deswegen besteht der Bedarf an der Entwicklung einer neuen Isolierungsmethode, um eine anwendbare Durchführung und Reinheit des Enzyms zu erreichen, um den Einsatz der CPO in technischen Prozessen zu ermöglichen.

3.1.1 Isolierung der Chlorperoxidase nach der herkömmlichen Vorschrift

Zu Beginn wurde versucht, die CPO nach Hallenberg und Hager 1978 zu isolieren. Die Isolierung erfolgte nach dem Fließschema in der Abbildung 3.1. Am Ende dieser Isolierungsmethode konnten lediglich 11 % der ursprünglichen Aktivität verglichen mit 38 % bei Hallenberg und Hager erhalten werden. Zusammengefasst wurde unter hohem Arbeitsaufwand nur eine sehr geringe Aktivitätsausbeute erreicht. Auf diesen Ergebnissen basierend wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit versucht die Isolierung der CPO mittels einer flüssig-flüssigen Extraktion in wässrigen Zweiphasensystemen zu erzielen.

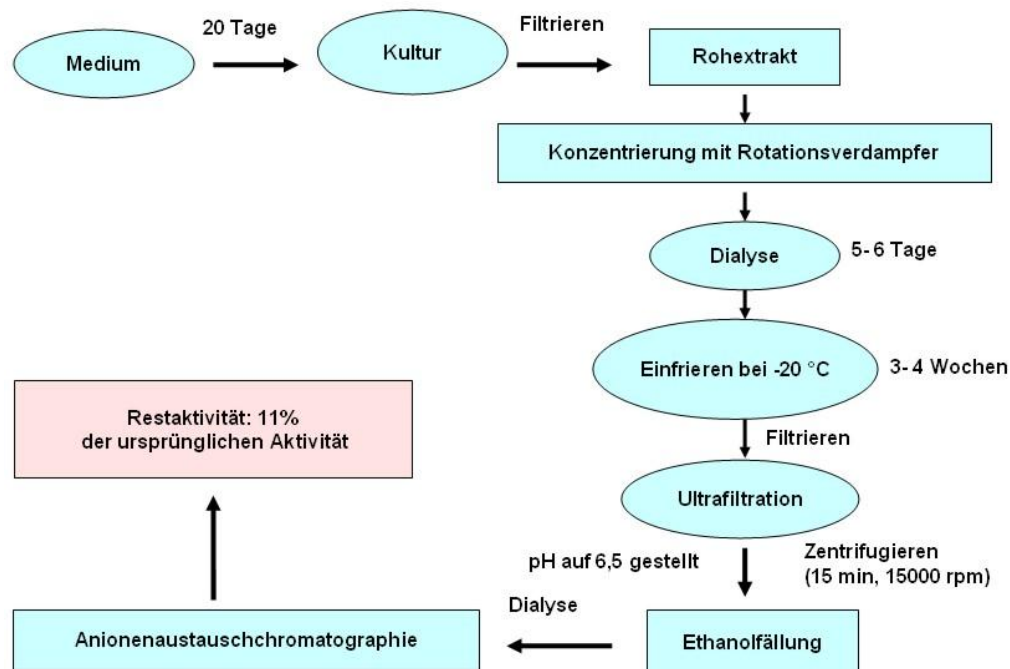


Abbildung 3.1: Fließschema der CPO-Isolierung nach Hallenberg und Hager 1978 mit der nach der Isolierung verbleibenden Aktivität.

3.1.2 Isolierung der Chlorperoxidase mittels wässrigen Zweiphasensystems

Die flüssig-flüssig Extraktion in wässrigen Zweiphasensystemen (wZPS) ist ein Verfahren, welches zur Aufarbeitung biologischer Moleküle wie zum Beispiel Proteine eingesetzt werden kann [Albertsson, *et al.*, 1987; Mattiasson, 1983; Mazzola, *et al.*, 2008; Diamond und Hsn, 1992; Diamond und Hsu, 1990; Hatti-Kaul, 2001]. Im Allgemeinen werden wZPS gebildet, indem man zwei hydrophile aber inkompatible Polymere (z.B. Polyethylenglykol und Dextran) oder ein hydrophiles Polymer und ein Salz (z.B. Polyethylenglykol und Ammoniumsulfat) oberhalb einer gewissen Konzentrationen in Wasser löst. Es entstehen dadurch zwei Phasen, die überwiegend Wasser enthalten und die eine der phasenbildenden Komponenten jeweils anreichern. Ein wichtiges Hilfsmittel bei der Untersuchung eines Phasensystems bildet das dazugehörige Phasendiagramm, das durch zwei verschiedene Kennlinien, der Binodale und der Konode, charakterisiert wird (Abbildung 3.2) [Schindler und Nothwang, 2006; Rahimpour und Baharvand, 2009; Diamond und Hsu, 1990].

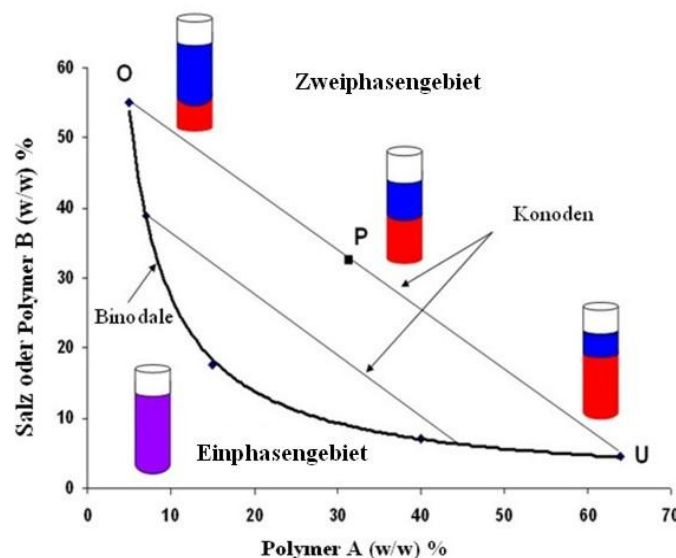


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Phasendiagramms eines Zweiphasensystems bestehend aus zwei Polymeren oder einem Polymer und einem Salz.

Das Trennprinzip im wässrigen Zweiphasensystem beruht auf der Tatsache, dass sich verschiedene Biomoleküle unterschiedlich in den zwei Phasen verteilen, wodurch eine Trennung erfolgen kann. Das wZPS weist viele entscheidende Vorteile auf. Das

Extraktionssystem besteht zum großen Teil aus Wasser, was eine milde Umgebung für Proteine darstellt [Luanghiran, *et al.*, 2004; Ribeiro, *et al.*, 2007]. Dies ist von großem Vorteil für den Erhalt der aktiven Struktur und demzufolge der biologischen Aktivität des Zielproteins. Andere Vorteile liegen in der hohen Kapazität des gesamten Systems, im geringen Zeit- und Energieverbrauch und in einem einfachen Scale-up. Des Weiteren ist der Prozess ökonomisch und einfach durchführbar [Luanghiran, *et al.*, 2004; Klomklao, *et al.*, 2005; Miranda und Cascone, 1997]. Daher bildet die Extraktion im wZPS eine effiziente Methode für die Isolierung von Proteinen und wurde erfolgreich für die Aufreinigung von verschiedenen Enzymen eingesetzt wie z.B. die *Potato* Polyphenoloxidase [Bhalchandra, *et al.*, 2006], die Phospholipase D [Teotia und Gupta, 2004], die *Ipomoea* Peroxidase [Srinivas, *et al.*, 2002], die *Mulberry*(*Morus rotundiloba*) Peroxidase [Luanghiran, *et al.*, 2004], die *Horseradisch* Peroxidase [Miranda und Cascone, 1997], die *Tuna spleen* Proteinasen [Klomklao, *et al.*, 2005] und Pektinasen [Antov, *et al.*, 2004; Lima, *et al.*, 2002].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal bewiesen, dass das wässrige Zweiphasensystem ebenso erfolgreich für die Aufreinigung der CPO aus *C. fumago* eingesetzt werden kann, da es effektiv die Separation der CPO von dem herkömmlich schwer zu entfernenden Pigment ermöglicht. Die Aufreinigung der CPO mittels des wässrigen Zweiphasensystems benötigte zwei sequenzielle Extraktionsschritte, welche die Entfernung des Pigments und die Rückgewinnung des Enzyms umfassten. Die Pigmententfernung von dem Rohenzym erfolgte in einem Polymer/Polymer System, während die Rückgewinnung des Enzyms in einem Polymer/Salz System durchgeführt wurde. Mit einem anschließenden Chromatographieschritt konnte die spezifische Aktivität des Enzyms verbessert werden.

3.1.2.1 Entfernung des Pigments vom Rohextrakt im Polymer/Polymer Zweiphasensystem

Ziel dieses Extraktionsschritts war es, die Partition vom Enzym und Pigment in den unterschiedlichen Phasen zu erreichen. Dazu wurden verschiedene Kombinationen von unmischtbaren wässrigen Polymerlösungen untersucht. Alle diese Kombinationen enthielten PEG 4000 als grundsätzliches Polymer, was auf den Stabilisierungseinfluss des PEGs auf die CPO zurückzuführen ist [Spreti, *et al.*, 2004]. Die Vielseitigkeit des PEGs in den

Zweiphasensystemen spielte dabei ebenso eine entscheidende Rolle [Antov, *et al.*, 2004; Da Silva und Franco, 2000]. Dazu kommt, dass das PEG preiswert und in verschiedenen Molekulargewichten verfügbar ist. Als zweites phasenbildendes Polymer dienten jeweils folgende Polymere:

- Polypropylenglykol 1200 (PPG 1200)
- Stärke
- Dextran T500

mit der Absicht, die Funktionalität und die Hydrophobizität des zweiten Polymers zu verändern.

PEG 4000/PPG 1200 System

Bei der Verwendung vom PEG 4000/PPG 1200 System (7,5 %, 25 %) bildeten sich nach der Phasentrennung eine PPG angereicherte Oberphase und eine PEG-reiche Unterphase. Das Volumenverhältnis wurde prinzipiell anhand Gleichung 3.1 berechnet.

$$\text{Volumenverhältnis} = \frac{\text{Volumen der Oberphase (mL)}}{\text{Volumen der Unterphase (mL)}} \quad (\text{Gleichung 3.1})$$

Hierbei betrug das Volumenverhältnis 25/70. Dieser Wert stellt einen Durchschnitt eines Sets von Wiederholungen dar.

Nach der Phasenabtrennung war unmittelbar zu sehen, dass sich das schwarze Pigment in einer der beiden Phasen und zwar in der PPG-reichen Oberphase ansammelte (Abbildung 3.3a), was von großem Vorteil sein kann, wenn sich das Enzym in der anderen Phase befindet. Die Untersuchung der Enzymaktivität in den beiden Phasen zeigte, dass sich das aktive Enzym mit 100 % Ausbeute in der PEG-angereicherten Phase befand, während keine Aktivität in der PPG-reichen Oberphase festgestellt werden konnte (Abbildung 3.4). Die Aktivitätsausbeute wurde nach der Gleichung 3.2 ermittelt.

$$R(\%) = \left(\frac{A}{A_0} \right) \times 100 \quad (\text{Gleichung 3.2})$$

A und A₀ stellen die Aktivität der CPO in einer der beiden Phasen nach der Phasenabtrennung bzw. die gesamte Anfangsaktivität dar, während R die prozentuale Ausbeute der Aktivität bezeichnet.

Eine Gesamtabtrennung des Enzyms vom Pigment konnte durch die Extraktion im PEG 4000/PPG 1200 erzielt werden. Diese Abtrennung fand nicht statt, wenn PPG 1200 durch PPG 400 ersetzt wurde. Das deutet darauf hin, dass die Fähigkeit des Pigments zum Eindringen in die PPG Phase mit zunehmender Hydrophobizität dieser Phase steigt, was durch die hydrophoben Eigenschaften des Pigments erklärt werden kann.

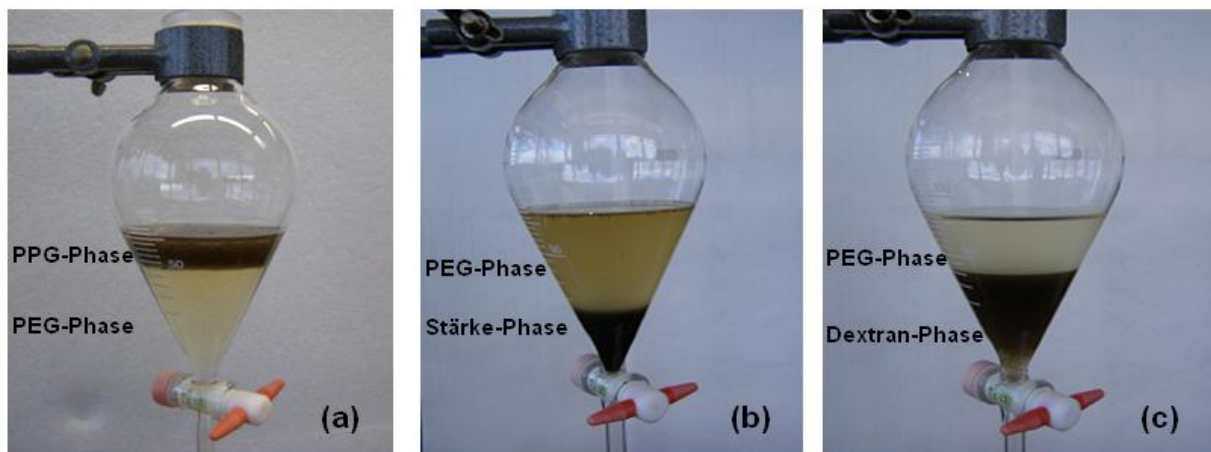


Abbildung 3.3: Die unterschiedliche Aufteilung des schwarzen Pigments in Polymer/Polymer Zweiphasensystemen. (a) PEG 4000/PPG 1200, (b) PEG 4000/Stärke, (c) PEG 4000/Dextran T500.

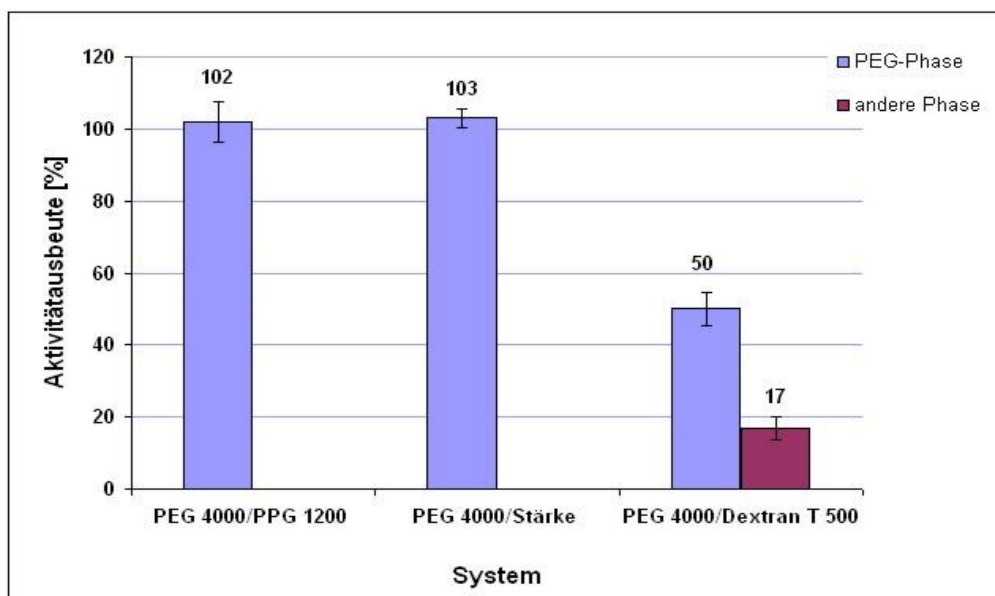


Abbildung 3.4: Die Aktivitätsausbeute in den verschiedenen Phasen der Polymer/Polymer Systemen (PEG 4000/PPG 1200, PEG 4000/Stärke, PEG 4000/Dextran T500). Reaktionsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 2,75, 0,1 mM MCD; 2 mM H₂O₂, 20 mM NaCl, RT.

PEG 4000/Stärke System

Nach der Phasenabtrennung im PEG 4000/Stärke System (8,29 %, 7,05 %) wurden eine mit PEG angereicherte Oberphase und eine stärkereiche Unterphase mit einem Volumenverhältnis von 100/10 erhalten. In diesem System konnte wiederum eine komplette Abtrennung des Enzyms von dem schwarzen Pigment erzielt werden. In diesem Fall erfolgte die Extraktion des Pigments in die stärkereiche Unterphase (Abbildung 3.3b). Im Gegensatz zum Pigment konzentrierte sich das Enzym erneut in der mit PEG angereicherten Phase. Die Aktivitätsausbeute in dieser Phase war in allen Experimenten 100 % (Abbildung 3.4).

PEG 4000/Dextran T500 System

Beim Einsatz des PEG 4000/Dextran T500 Systems (9 %, 8,5 %) bildten sich zwei Phasen mit einem Volumenverhältnis von 30/10. Die Oberphase war dabei mit PEG angereichert, während die Unterphase hauptsächlich aus Dextran bestand. Die Ansammlung des Pigments in der dextranreichen Unterphase kann durch die geringe Löslichkeit des Pigments in PEG erklärt werden (Abbildung 3.3c). Allerdings verteilte sich die Enzymaktivität auf die beiden Polymerphasen. Nur 50 % der Anfangsaktivität konnten in der PEG-reichen Phase zurückgewonnen werden. Ebenso wurde eindeutig Enzymaktivität in der Unterphase ermittelt (Abbildung 3.4). Beachtenswert ist, dass die Summe der ermittelten Aktivitäten in den beiden Phasen deutlich weniger als 100 % der Ausgangsaktivität ausmacht. Das deutet darauf hin, dass die CPO durch Dextran inaktiviert wurde. Um das zu bestätigen, wurde der Aktivitätstest in der Gegenwart von 10 % Dextran T500 durchgeführt, was zu einem Aktivitätsverlust von etwa 22 % im Vergleich zu der unter Standardbedingungen erhaltenen Aktivität führte. Zudem war die erhaltene Standardabweichung für die Aktivität in der Dextran-Phase innerhalb jedes einzelnen Sets von Experimenten groß, was die Abweichung der Aktivität begründen kann. Die hohe Standardabweichung in der Dextran-Phase kann anhand der inhomogenen Verteilung der CPO aufgrund der hohen Viskosität dieser Phase in Folge der Ansammlung des gelantiösen Pigments erklärt werden.

In allen untersuchten Polymer/Polymer Systemen sammelte sich das schwarze gelatinöse Pigment in der Phase, die kein PEG 4000 enthielt. Das weist auf die sehr geringe Löslichkeit des Pigments in Anwesenheit dieses Polymers hin, was mit den Literaturangaben von

Gonzales-Vergara *et al.* übereinstimmt, welche das Pigment durch PEG-Fällung vom *C. fumago* Rohextrakt entfernt haben [Gonzalez-Vergara, *et al.*, 1985].

3.1.2.2 Gewinnung der Chloroperoxidase im Polymer/Salz Zweiphasensystem

Die Rückgewinnung der CPO aus den PEG 4000-Phasen, die aus den Polymer/Polymer Zweiphasensystemen erhalten wurden, erfolgte durch die Bildung eines zweiten Zweiphasensystems, bestehend aus dem PEG Polymer und einem Salz. Zu diesem Zweck wurden die PEG-Phasen von der PPG- bzw. Stärke-Phase abgetrennt und dazu Ammoniumsulfat bzw. Natriumsulfat mit einer Gesamtkonzentration von 15 % (w/v) gegeben. Dabei entstand ein neues Zweiphasensystem, das aus einer PEG angereicherten Oberphase und einer salzreichen Unterphase bestand. In den beiden Polymer/Salz Systemen konzentrierte sich die CPO in der salzreichen Unterphase (Abbildung 3.5). Die Zugabe des Ammoniumsulfates bzw. Natriumsulfates zu der aus dem PEG/PPG System erhaltenen PEG-Phase führte zu einer insgesamt 102 % bzw. 96 % igen Enzymextraktion in die Salzphase. 105 % bzw. 91 % der Anfangsaktivität wurden erhalten, wenn die PEG-Phase aus dem PEG/Stärke System stammte. Die Rückextraktion der CPO aus dem PEG/Dextran T500 System wurde aufgrund der ungünstigen Verteilung des Enzyms zwischen den beiden Phasen des Systems nicht untersucht.

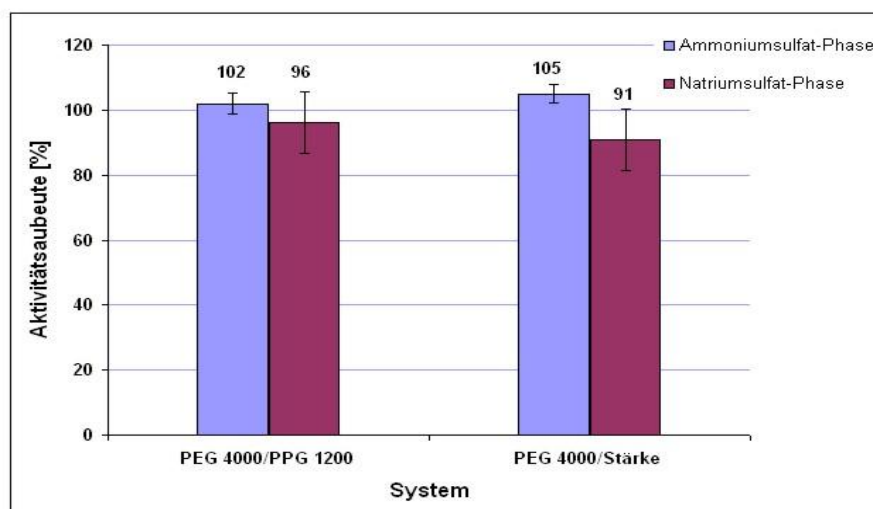


Abbildung 3.5: Die Aktivitätsausbeute nach der Rückextraktion der CPO aus der PEG-Phase in der Salzphase durch die Extraktion im Polymer/Salz Zweiphasensystem (PEG 4000/(NH₄)₂SO₄, PEG 4000/Na₂SO₄). Reaktionsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 2,75, 0,1 mM MCD; 2 mM H₂O₂, 20 mM NaCl, RT.

Die beobachtete nahezu komplette Extraktion des Enzyms aus der PEG-Phase in die Salzphase in allen untersuchten Polymer/Salz Systemen stimmt mit der beschriebenen Tendenz überein, dass Proteine aus Lösungen mit hochmolekularem PEG in die höher konzentrierten salzhaltigen Phasen übergehen [Ribeiro, *et al.*, 2007; Bhalchandra, *et al.*, 2006; Lima, *et al.*, 2002]. Die bessere Ausbeute der Enzymaktivität bei der Verwendung von Ammoniumsulfat im Vergleich zum Natriumsulfat kann mittels eines schützenden Einflusses bei Konzentrationen von mehr als 0,5 M auf die biologische Aktivität der Enzyme erklärt werden [Lottspeich und Zorbas, 1998]. Die Bestimmung des pH-Wertes im Rohextrakt und in jeder Phase zeigte, dass der pH-Wert in der Natriumsulfat-Phase etwas niedriger (0,3) ist als der pH-Wert in der Ammoniumsulfat- und in der PEG-Phase. Dieser Unterschied führte zu einem Aktivitätsverlust von 5 % und kann demzufolge ebenso ein Grund für den Unterschied in der Aktivitätsausbeute sein. Bei einer Reduzierung der Natriumsulfatkonzentrationen auf 10,5 % wurden lediglich 32 – 47 % der Ausgangsaktivität erhalten.

Das Enzym wurde durch die Zugabe von Ammonium- bzw. Natriumsulfat unter der Bildung eines zweiten Zweiphasensystems aus den PEG-Phasen, die aus PEG/PPG bzw. PEG/Stärke Systemen gesammelt wurden, extrahiert. Die Aktivitätsausbeute war geringfügig höher bei der Verwendung von Ammoniumsulfat, während die Natur des Polymer/Polymer Systems nur eine geringe Rolle spielte. Die Kombination von PEG/PPG und PEG/Ammoniumsulfat ist auf Grund der einfachen Gewinnung des Enzyms aus der Unterphase des Polymer/Polymer Systems vorteilhafter als die Kombination PEG/Stärke und PEG/Ammoniumsulfat. Eine andere Schwierigkeit, die während der Extraktion im PEG/Stärke System entstand, ist die Ausfällung der verbleibenden Stärke nach der Rückextraktion des Enzyms im PEG/Ammoniumsulfat System bei niedrigen Temperaturen (4 °C). Demzufolge wurde das PEG 4000/PPG 1200 System mit dem PEG 4000/Ammoniumsulfat System für die weitere Aufreinigung des Enzyms gekoppelt.

3.1.2.3 Aufreinigung der Chloroperoxidase zur Homogenität

Nach der Extraktion im Zweiphasensystem erfolgte die weitere Aufreinigung des Enzyms. Dabei wurden die Aktivitätsausbeute und der Reinigungsfaktor des Enzyms nach jedem Isolierungsschritt bestimmt. Die Reinheit des Enzyms wurde bezüglich der spezifischen

Aktivität ($\text{U/mg}_{\text{protein}}$) bestimmt. Das Reaktionssystem war dabei die Chlorierung von MCD zu DCD. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Die Aktivitätsausbeute und die Reinheit der CPO nach verschiedenen Aufreinigungsschritten.

Fraktion	Gesamtaktivität [U]	Proteinmenge [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Reinigungs-Faktor
Rohextrakt	10316,	10,3	1002	100	1,0
Ultrafiltration	10005	9,7	1029	97	1,0
PEG-Phase	10772	4,8	2226	104	2,2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Phase	10844	5,1	2141	105	2,1
Dialyse	10466	4,5	2304	102	2,3
DEAE-Cellulose	7261	2,5	2900	70	2,9

Nach der Filtration der Myzelien durch Glaswolle wurde ein Rohenzym mit einer spezifischen Aktivität von 1002 U/mg erhalten. Dieser Wert nimmt nur geringfügig nach der Ultrafiltration zu. Die Entfernung des Pigments mittels der Extraktion im PEG 4000/PPG 1200 System führte zur Verdopplung der spezifischen Aktivität mit dem Erhalt der gesamten Anfangsaktivität. Die spezifische Aktivität des Enzyms (2200 U/mg) wurde somit im Vergleich zu den gegebenen erreichten spezifischen Aktivitäten in der Literatur [Hallenberg und Hager, 1978] schon nach den ersten Aufreinigungsschritten erreicht. Nach der Rückextraktion des Enzyms von der PEG-Phase in die Ammoniumsulfat-Phase blieb die Aktivität ebenfalls vollkommen erhalten. Eine Dialyse der Ammoniumsulfat-Phase mit anschließender Aufreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie führte zur Erhöhung der spezifischen Aktivität auf bis zu 2900 U/mg. Am Ende konnte ein Reinigungsfaktor von 2,9 erzielt werden. Dieser wurde nach der Gleichung 3.3 ermittelt.

$$\text{Reinigungsfaktor} = \frac{\text{die spezifische Aktivität des gereinigten Enzyms}}{\text{die spezifische Aktivität des Rohextrakts}} \quad (\text{Gleichung 3.3})$$

Die nach der Isolierung erhaltene Aktivität beträgt 70 % der Ausgangsaktivität und liegt somit im Bereich der Literaturwerte. Dennoch wurde gleichzeitig ein wesentlich reineres Enzympräparat geschaffen.

Der Reinheitsgrad der CPO nach der Extraktion im Zweiphasensystem ist für den Einsatz in technischen Anwendungen ausreichend, da das störende Pigment und andere Proteine vollständig entfernt wurden. Des Weiteren wurden 100 % der Ausgangsaktivität nach diesem Schritt erhalten. Zudem beträgt der Zeitaufwand bei diesem Prozess lediglich 30 Minuten, wohingegen die etablierten Prozesse Tage bis Wochen in Anspruch nehmen, um vergleichbare Enzymreinheiten zu erzielen, dabei jedoch gleichzeitig mit einem erheblichen Aktivitätsverlust einhergehen.

3.1.3 Zusammenfassung

Die Aufreinigung der CPO konnte mittels der Extraktion im Zweiphasensystem erzielt werden, wobei das Pilzpigment sehr einfach und schnell entfernt wurde. Die Extraktion erfolgte dabei in zwei Schritten. Das Pigment wurde in einem ersten Schritt durch die Extraktion in einem Polymer/Polymer System entfernt, während der zweite Schritt für die Rückextraktion des Enzyms aus der Polymer-Phase mit einem Polymer/Salz System verwirklicht wurde.

Unterschiedliche Aufteilungen der CPO und des Pigments vom *C. fumago* Rohextrakt konnten in wässrigen Polymer/Polymer Zweiphasensystemen, die PEG als ein phasenbildendes Polymer und PPG 1200 oder Stärke als zweites Polymer enthielten, erzielt werden. In allen drei untersuchten Polymer/Polymer Systemen konzentrierte sich das schwarze Pigment in der Phase, die kein PEG 4000 enthielt. Dagegen erfolgte die Extraktion der CPO zu 100 % in die PEG-Phase, wenn die Extraktion in den Systemen PEG 4000/PPG 1200 und PEG 4000/Stärke durchgeführt wurde.

Die Rückextraktion des Enzyms aus den PEG-Phasen konnte durch die Zugabe von 15 % (w/v) Sulfaten und somit die Bildung eines zweiten Zweiphasensystems erzielt werden. Bei der Verwendung von Ammoniumsulfat als das phasenbildende Salz konnte eine bessere Aktivitätsausbeute (102-105 %) im Vergleich zu Natriumsulfat (91-96 %) erreicht werden. Der Ursprung der PEG-Phase spielte dabei keine Rolle. Dennoch war die Extraktion im PEG 4000/PPG 1200 System gefolgt mit der Rückextraktion des Enzyms im PEG 4000/Ammoniumsulfat System günstiger als die Kombination von PEG/Stärke und

PEG/Ammoniumsulfat. Demzufolge wurde das PEG 4000/PPG 1200 System gekoppelt mit PEG 4000/Ammoniumsulfat für die weitere Aufreinigung des Enzyms gewählt. Nach diesen Extraktionsschritten erreicht die spezifische Aktivität des Enzyms unter Erhalt von 100 % der Ausgangsaktivität den besten Wert (2200 U/mg), der in der Literatur angegeben wurde. Hierbei ist der Reinheitsgrad des Enzyms für den Einsatz in technischen Prozessen hinreichend hoch. Eine anschließende Anionenaustauschchromatographie kann die spezifische Aktivität bis zu 2900 U/mg erhöhen, die vorher in etablierten Prozessen nicht erreicht wurde.

Zusammenfassend konnte die Aufreinigung der CPO mittels der Extraktion im Zweiphasensystem ohne großen Aufwand und unter Erhalt von 100 % der Aktivität innerhalb von ungefähr 30 Minuten erreicht werden. Dabei wurde ebenso ein Reinheitsgrad erreicht, der für den Einsatz der CPO in technischen Anwendungen ausreichend ist.

3.2 Charakterisierung der Enzymaktivität in Abhängigkeit von verschiedenen isolierten Einflüssen

Um ein Enzym in industriellen Prozessen nutzen zu können, müssen seine prozessrelevanten Parameter hinreichend bekannt sein, um das Verfahren daran anpassen zu können. Wichtige Einflussgrößen stellen der optimale pH-Wert und die optimale Temperatur dar. Zudem spielt der Einfluss der Substratkonzentration sowie die Anwesenheit von unkonventionellen Reaktionsmedien auf die katalytische Aktivität ebenso eine entscheidende Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CPO hinsichtlich der Halogenase-, Monooxygenase- und Peroxidase-Aktivität in Abhängigkeit von verschiedenen isolierten Einflüssen umfangreich charakterisiert. Diese Charakterisierung schließt neben der Reproduktion der Abhängigkeit der CPO-Aktivitäten von einigen Reaktionsparametern wie z.B. pH-Wert und Substratkonzentrationen die Untersuchung des Einflusses anderer Faktoren, die in der Literatur bislang keine Beachtung fanden wie z.B. die Temperatur und die Anwesenheit von wassermischbaren organischen Lösungsmitteln, ein. Bei der Reproduktion ging es in der ersten Linie darum, die Ergebnisse mit den Literaturangaben zu vergleichen und gleichzeitig diese Angaben zu bestätigen.

3.2.1 Halogenase-Aktivität (Chlorierungsreaktion)

Für die Bestimmung bzw. die Untersuchung der Halogenase-Aktivität der CPO wurde der Standard-Aktivitätstest des Enzyms verwendet, bei dem Monochlorodimedon (MCD) zum Dichlorodimedon (DCD) umgesetzt wird (Abbildung, 3.6) [Morris und Hager, 1966].

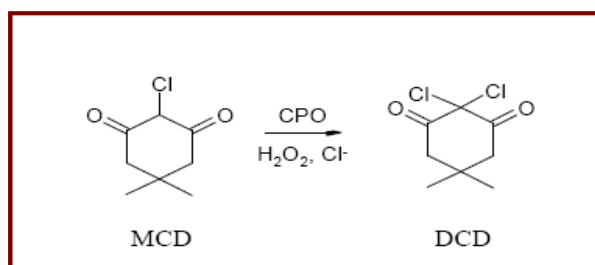


Abbildung 3.6: Reaktionsgleichung der Chlorierung von MCD mittels CPO.

Anhand dieser Reaktion wurde die Halogenase-Aktivität der CPO hinsichtlich des Einflusses des pH-Werts, der Temperatur, der Konzentration der Substrate sowie der Anwesenheit wassermischbarer organischer Lösungsmittel untersucht.

Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums der Halogenase-Aktivität der CPO

Die Untersuchung der Halogenase-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert zeigte, dass die maximale Aktivität bei pH 2,75 liegt (Abbildung 3.7a). Das ermittelte pH-Optimum stimmt demnach mit Literaturdaten überein, in denen ebenfalls eine maximale Halogenase-Aktivität bei pH 2,75 angegeben wird [Morris und Hager, 1966; Thomas, *et al.*, 1970].

Bezüglich des Temperaturoptimums konnte mit steigender Temperatur eine Zunahme der Halogenase-Aktivität beobachtet werden, die ihr Maximum bei 40 °C erreichte (Abbildung 3.7b). Somit ist das hier erhaltene Temperaturoptimum (40 °C) um 5 °C höher als der in der Literatur angegebene Wert (35 °C) [Bayramogla, *et al.*, 2008]. Diese Abweichung kann auf den Messfehler zurückgeführt werden.

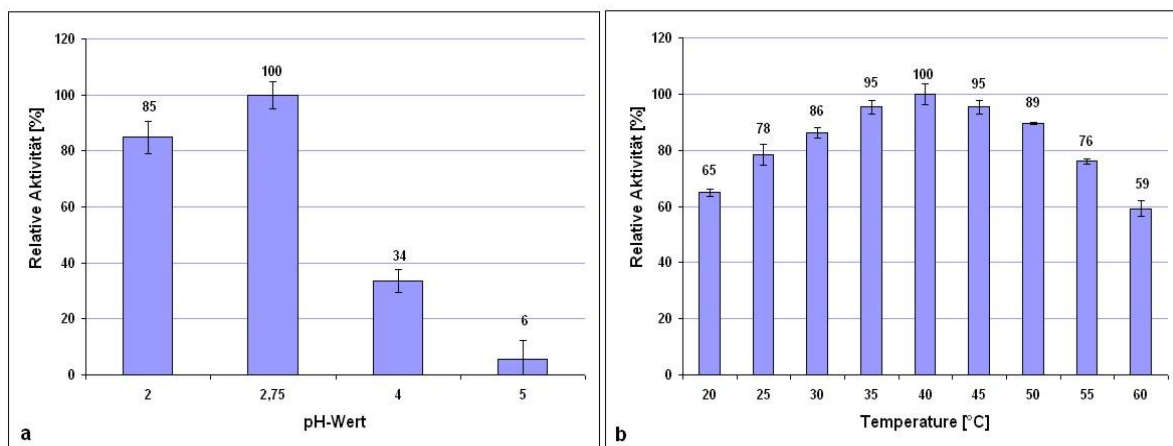


Abbildung 3.7: Abhängigkeit der Halogenase-Aktivität der CPO von dem pH-Wert (a) und der Temperatur (b). Reaktionsbedingungen: (a) 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH wie angegeben), 0,1 mM MCD, 2 mM H₂O₂, 20 mM KCl, RT. (b) 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 2,75, 0,1 mM MCD, 2 mM H₂O₂, 20 mM KCl, Temperatur wie angegeben.

Einfluss der MCD- und Kaliumchloridkonzentration auf die Halogenase-Aktivität der CPO

Zunächst wurde die Halogenase-Aktivität der CPO als Funktion der MCD-Konzentration untersucht (Abbildung 3.8a).

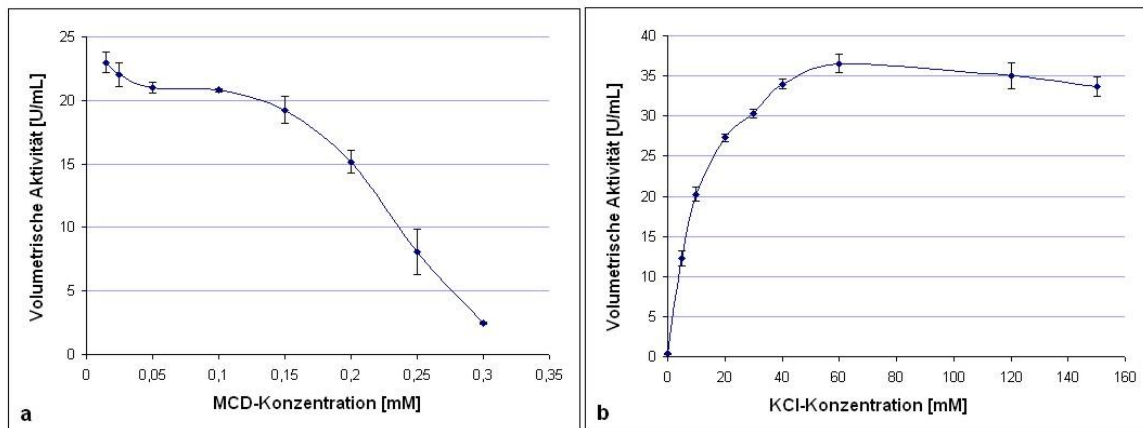


Abbildung 3.8: Abhängigkeit der Halogenase-Aktivität der CPO von der MCD-Konzentration (a) und der KCl-Konzentration (b). Reaktionsbedingungen: (a) 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 2,75, MCD-Konzentration wie angegeben, 2 mM H_2O_2 , 20 mM KCl, RT. (b) 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 2,75, 0,1 mM MCD, KCl-Konzentration wie angegeben, 2 mM H_2O_2 , RT.

Bei einer MCD-Konzentration von 0,015 mM zeigt die CPO ihre maximale Aktivität von 23 U/mL, die sich bis zu einer Konzentration von 0,1 mM nur geringfügig änderte. Bei der weiteren Erhöhung der Konzentration begann die Aktivität stark abzunehmen und erreichte lediglich 2,5 U/mL bei einer MCD-Konzentration von 0,3 mM. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass MCD bei hohen Konzentrationen einen stark inhibierenden Einfluss auf das Enzym hat, was mit den Literaturangaben übereinstimmt, in denen eine Inhibierung des Enzyms bei hohen MCD-Konzentrationen beschrieben wurde [Loughlin und Hawkes, 2000; Hueter und Cooney 1974].

Im Gegensatz zum MCD ist das Chlorid-Ion ein Substrat der CPO, da die Bildung des Hypohalogenits enzymatisch abläuft. Die Halogenase-Aktivität der CPO stieg mit zunehmender KCl-Konzentration und erreichte ihr Maximum (36 U/mL) bei einer Konzentration von 60 mM. Jedoch war eine Inhibierung des Enzyms bei der weiteren

Erhöhung der Halogenid-Konzentration zu erkennen (Abbildung 3.8b), was wiederum den Literaturdaten entspricht [Loughlin und Hawkes, 2000].

Einfluss des Wasserstoffperoxids (H_2O_2) auf die Halogenase-Aktivität der CPO

Die Bildung des reaktiven Intermediates der CPO, Compound 1, erfolgt unter der Spaltung von Wasserstoffperoxid oder anderen organischen Peroxiden wie z.B. *tert*-Butylhydroperoxid [Manoj und Hager, 2001]. Jedoch stellt Wasserstoffperoxid das am häufigsten benutzte Oxidationsmittel dar, da die Reaktionen unter Verwendung anderer Peroxide nur sehr langsam ablaufen. Zudem ist Wasserstoffperoxid umweltfreundlicher im Vergleich zu anderen Peroxiden. Die Halogenase-Aktivität der CPO wurde in Abhängigkeit von der H_2O_2 -Konzentration untersucht. Die Aktivität stieg mit zunehmender H_2O_2 -Konzentration und erreichte ihr Maximum bei einer Konzentration von 2 mM. Die weitere Erhöhung der Konzentration führte zu einer Enzyminaktivierung, was Literaturdaten entspricht, die eine CPO-Inaktivierung bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen beschreiben [Van Deurzen, *et al.*, 1997; Park und Clark, 2006; Valderrama, *et al.*, 2002; Grey, *et al.*, 2008] (Abbildung 3.9).

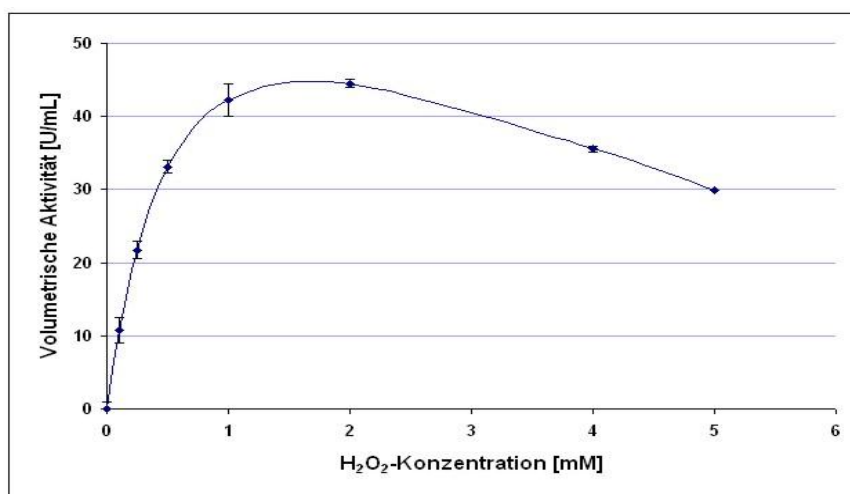


Abbildung 3.9: Abhängigkeit der Halogenase-Aktivität der CPO von der H_2O_2 -Konzentration. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 2,75, 0,1 mM MCD, H_2O_2 -Konzentration wie angegeben, 20 mM KCl, RT.

Diese Inaktivierung des Enzyms ist auf die Oxidation des Porphyrinringes durch das Peroxid und durch die stark reaktiven freien Radikale wie Hyperoxid- und Hydroxyradikale, die während des katalytischen Zyklus entstehen können, zurückzuführen. Diese Oxidation führt

zur irreversiblen Zerstörung des Häms und letztendlich zur Freisetzung des Häm-Eisens [Van Deurzen, *et al.*, 1997; Park und Clark, 2006]. Ein anderer Grund für die Inaktivierung des Enzyms durch Wasserstoffperoxid kann die Bildung der inaktiven Compound III (Fe III –O–O) sein, welche bei einer hohen Konzentration des Wasserstoffperoxides entsteht.

Die Halogenase-Aktivität der CPO in Abhängigkeit von wassermischbaren organischen Lösungsmitteln

Der Einfluss von wassermischbaren organischen Lösungsmitteln auf die Halogenase-Aktivität der CPO wurde in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Chlorierung von MCD untersucht. MCD ist in vielen organischen Lösungsmitteln sowie in Wasser löslich. Die untersuchten Lösungsmittel wurden so ausgewählt, dass ihre Eigenabsorption bei der Messung der Aktivität bei der angegebenen Wellenlänge (278 nm) nicht störte. Die Halogenase-Aktivität wurde in Anwesenheit von Dioxan (log P -0,27), Tetrahydrofuran (THF) (log P 0,4) und Acetonitril (log P-0,33) untersucht, die zu einem Anteil von 10 % bzw. 25 % dem gesamten Reaktionsvolumen zugesetzt wurden.

Bezogen auf die Halogenase-Aktivität, die ohne den Einsatz eines Co-Solvents ermittelt wurde, setzten die verwendeten Lösungsmittel die Enzymaktivität stark herab (Abbildung 3.10). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Polarität des Lösungsmittels und dem Einfluss auf die Enzymaktivität war nicht zu erkennen. THF und Acetonitril führten zu einer erheblichen Inaktivierung der CPO unter Erhalt von lediglich 5 % der nativen Aktivität. Dioxan zeigte dagegen einen geringeren inaktivierenden Einfluss auf die Enzymaktivität. In 10 % bzw. 25 % Dioxan erhielt das Enzym 32 % bzw. 13 % seiner Aktivität.

Loughlin und Hawkes untersuchten den Einfluss anderer wassermischbarer Lösungsmittel auf die Chlorierungsreaktion von MCD mittels der CPO und bewiesen, dass einige wassermischbare Lösungsmittel an das Enzym binden und zu unterschiedlich starken Konformationsänderungen führen, was zum Verlust der Enzymaktivität führt [Loughlin und Hawkes 2008].

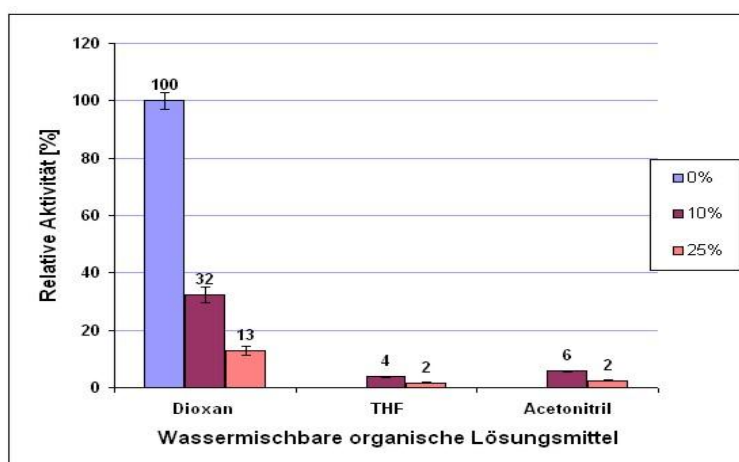


Abbildung 3.10: Die Halogenase-Aktivität der CPO in Abhängigkeit von wassermischbaren organischen Lösungsmitteln. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 2,75, 0,1 mM MCD, 2 mM H_2O_2 , 20 mM KCl, RT, die verwendeten Lösungsmittel und ihre Anteile wie angegeben.

3.2.2 Monooxygenase-Aktivität (Sulfoxidation)

Für die Untersuchung der Monooxygenase-Aktivität der CPO wurde Thioanisol als Modells substrat ausgewählt, was zum Methylphenylsulfoxid umgesetzt wird (Abbildung 3.11). Die enzymkatalysierte Sulfoxidation wurde in Abhängigkeit vom pH-Wert, der Temperatur, der Substratkonzentration und der Anwesenheit von wassermischbaren Lösungsmitteln untersucht und eingehend charakterisiert. Hierbei handelte es sich jeweils um Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten.

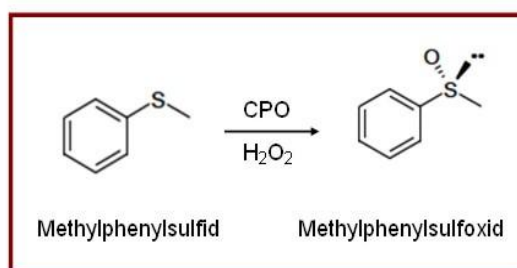


Abbildung 3.11: Reaktionsgleichung der Sulfoxidation von Thioanisol mittels CPO.

Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums der Monooxygenase-Aktivität der CPO

Die CPO besaß bei der Umsetzung von Thioanisol in einem pH-Bereich zwischen 4 und 7 eine Restaktivität von mehr als 90 %, wobei die maximale Enzymaktivität bei einem pH-Wert

von 5 erreicht wurde (Abbildung 3.12a). Dieses pH-Optimum stimmt mit Literaturdaten überein, bei denen die Oxidation von Thioanisol bei einem pH-Wert von 5 durchgeführt wurde [Van de Velde, *et al.*, 2001; Spreti, *et al.*, 2004]. Bei einem pH-Wert von 3 zeigte das Enzym 63 % seiner maximalen Aktivität. Daher ist die CPO hinsichtlich der Monooxygenase-Aktivität über einen breiten pH-Bereich aktiv. Demzufolge zeigt die CPO hinsichtlich des pH-Werts eine zweifache Reaktivität. Die eine (z.B. die Monooxygenase-Aktivität) erfolgt bei der neutralen bzw. leicht negativen Form des Enzyms, wohingegen die andere (die Halogenase-Aktivität) bei einem pH-Wert, der unterhalb des isoelektrischen Punktes liegt, erfolgt.

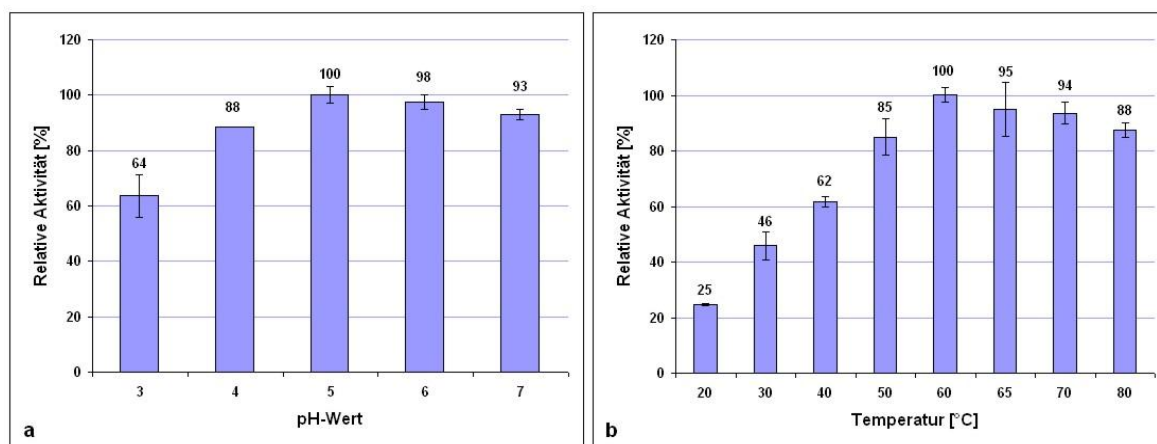


Abbildung 3.12: Abhängigkeit der Monooxygenase-Aktivität der CPO von dem pH-Wert (a) und der Temperatur (b). Reaktionsbedingungen: (a) 0,05 M Natriumcitratpuffer (pH wie angegeben), 0,5 mM Thioanisol, 0,5 mM H₂O₂, RT. (b) 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, 0,5 mM Thioanisol, 0,5 mM H₂O₂, Temperatur wie angegeben.

Angaben zum Temperaturoptimum der CPO bezüglich der Monooxygenase-Aktivität konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Die Aktivität der CPO während der Sulfoxidation stieg mit zunehmender Temperatur und erreichte ihr Maximum bei einer Temperatur von 60 °C. Ab diesem Optimum nahm die Aktivität mit zunehmender Temperatur ab (Abbildung 3.12b). Grund dafür kann die Veränderung der räumlichen Struktur des Enzyms sein, die bei hohen Temperaturen hervorgerufen wird.

Das Temperaturoptimum der Monooxygenase-Aktivität (60 °C) unterschied sich von dem der Halogenase-Aktivität (40 °C), was darauf hindeutet, dass die Substrate an unterschiedlichen Stellen des aktiven Zentrums des Enzyms umgesetzt werden.

Einfluss der Thioanisol- und H_2O_2 -Konzentration auf die CPO-katalysierte Sulfoxidation

Die CPO-katalysierte Sulfoxidation wurde als Funktion der Thioanisol- und H_2O_2 -Konzentration untersucht. Die volumetrische Aktivität stieg mit zunehmender Thioanisol-Konzentration und näherte sich einem Optimum bei einer Konzentration von 0,6 mM an (Abbildung, 3.13a). Der gemessene Fehler bei einer Thioanisol-Konzentration über 0,5 mM war sehr groß. Ursache dafür kann die geringe Löslichkeit von Thioanisol in wässrigen Medien sein, was mit Pezzotti und Therisod übereinstimmt, die eine maximale Löslichkeit von Thioanisol in reinem Phosphatpuffer bei einer Konzentration von 0,5 mM bestimmt haben [Pezzotti und Therisod, 2007].

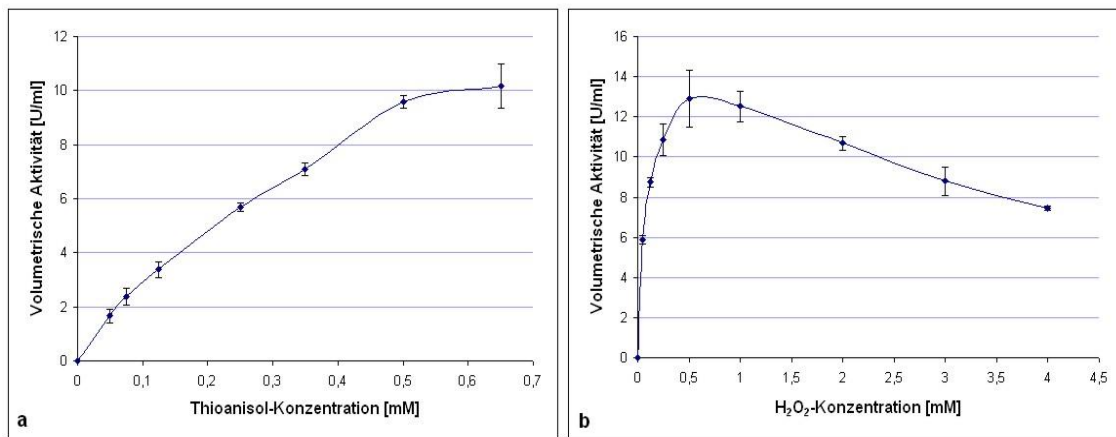


Abbildung 3.13: Abhängigkeit der Monooxygenase-Aktivität der CPO von der Thioanisol-Konzentration (a) und H_2O_2 -Konzentration (b). Reaktionsbedingungen: (a) 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, Thioanisol-Konzentration wie angegeben, 0,5 mM H_2O_2 , RT. (b) 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, 0,5 mM Thioanisol, H_2O_2 -Konzentration wie angegeben, RT.

Die Aktivität der CPO während der Sulfoxidation stieg mit zunehmender H_2O_2 -Konzentration bis zu einer Konzentration von 0,5 mM und nahm dann mit der weiteren Erhöhung der Konzentration ab (Abbildung, 3.13b). Der Grund dafür ist wie vorher beschrieben wurde, die Inaktivierung der CPO bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen. Ein weiterer möglicher Grund für die Abnahme der Sulfoxidation bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen ist, dass die Reaktion bei einem Überschuss an H_2O_2 wahrscheinlich in Richtung der Katalase-Aktivität abläuft.

Die Abhängigkeit der Monooxygenase-Aktivität der CPO von der Anwesenheit wassermischbarer organischer Lösungsmittel

Bei Thioanisol, dem Modellsubstrat dieser Reaktion, handelt es sich um ein Substrat, das in Wasser nur in geringer Konzentration löslich ist [Pezzotti und Therisod, 2007]. Zur Verbesserung der Löslichkeit von Thioanisol wurden verschiedene wassermischbare Lösungsmittel zu einem Anteil von 5 %, 10 % und 25 % dem Reaktionssystem zugesetzt. Dabei handelte es sich um Dioxan (log P: -0,27), Isopropanol (log P: 0,05), THF (log P: 0,49), Acetonitril (log P: -0,33) und 1-Butanol (log P: 0,88).

In Bezug auf die ohne Zusatz eines Co-Solvents erhaltene Enzymaktivität setzten alle verwendeten Lösungsmittel die Enzymaktivität herab (Abbildung 3.14). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Polarität des Lösungsmittels und dem Einfluss auf die Enzymaktivität war auch bei diesen Messungen nicht zu erkennen. Dioxan und Isopropanol erzielten die höchsten Restaktivitäten, da bei einem Lösungsmittelanteil von 5 % bzw. 10 % mehr als 80 % bzw. 60 % der Aktivität erhalten wurde. Im Unterschied dazu zeigte die CPO in 5 % bzw. 10 % 1-Butanol 63 bzw. 46 % ihrer Aktivität. Etwa 30 % der Aktivität wurden bei der Erhöhung des Anteils von Isopropanol und 1-Butanol auf 25 % erhalten. In 25 % Dioxan zeigte die CPO 16 % der Aktivität, wohingegen keine Aktivität in 25 % THF gemessen werden konnte.

Die Monooxygenase-Aktivität der CPO wurde deutlich weniger von den untersuchten wassermischbaren organischen Lösungsmitteln beeinflusst als die Halogenase-Aktivität. Dies kann mit der Verbesserung der Löslichkeit von Thioanisol in der Anwesenheit von diesen organischen Lösungsmitteln erklärt werden.

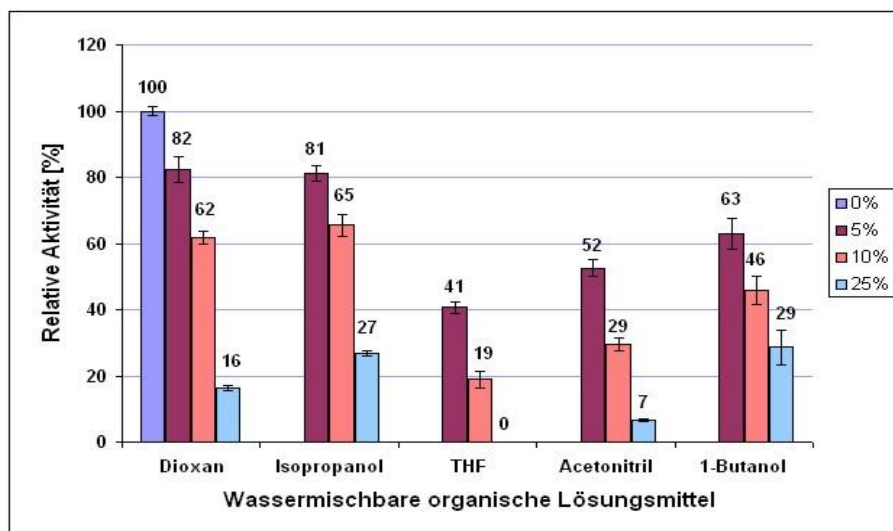


Abbildung 3.14: Die Monooxygenase-Aktivität der CPO in Abhängigkeit von wassermischbaren organischen Lösungsmitteln. Reaktionsbedingungen: 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, 0,5 mM Thioanisol, 0,5 mM H₂O₂, RT, die verwendeten Lösungsmittel und ihre Anteile wie angegeben.

3.2.3 Peroxidase-Aktivität (Oxidation von Pyrogallol)

Als Modells substrat für die Untersuchung der Peroxidase-Aktivität wurde Pyrogallol verwendet, das zu Purpurogallin umgesetzt wird (Abbildung 3.15). Diese Reaktion wurde in der Literatur nur selten beschrieben.

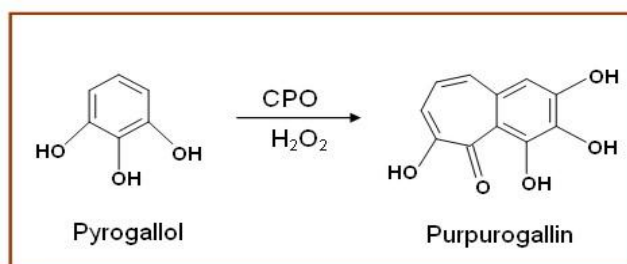


Abbildung 3.15: Reaktionsgleichung der Oxidation von Pyrogallol mittels CPO.

Die enzymkatalysierte Oxidation von Pyrogallol wurde ebenso hinsichtlich des pH-Werts, der Temperatur, der Substratkonzentration sowie der Anwesenheit von wassermischbaren organischen Lösungsmitteln untersucht und charakterisiert. Hierbei handelt es sich wiederholt um Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten.

Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums der Peroxidase-Aktivität der CPO

Wie bei der Sulfoxidation von Thioanisol erfolgte die Oxidation von Pyrogallol zu Purpurogallin in wirksamer Weise über einen breiten pH-Bereich, wobei die Enzymaktivität ihr Maximum bei einem pH-Wert von 4 erreichte (Abbildung 3.16a). Somit entspricht das pH-Optimum dem isoelektrischen Punkt des Enzyms. Bei pH 5 und 6 zeigte das Enzym 94 % bzw. 90 % seiner maximalen Aktivität, was mit Literaturdaten übereinstimmt, die die Oxidation von Pyrogallol über einen breiten pH-Bereich und ein pH-Maximum bei 4 beschreiben [Manoj und Hager, 2008; Thomas, *et al.*, 1970]

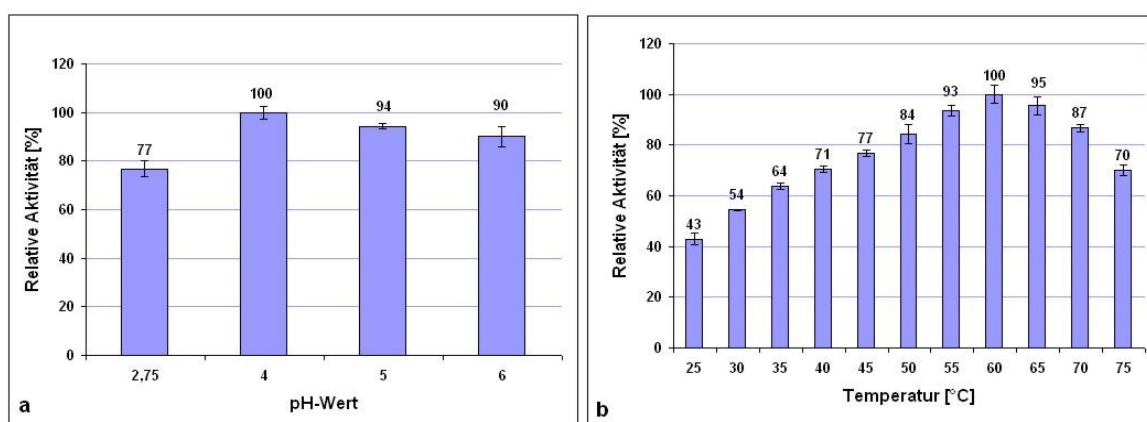


Abbildung 3.16: Abhängigkeit der Peroxidase-Aktivität der CPO von dem pH-Wert (a) und der Temperatur (b). Reaktionsbedingungen: (a) 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH wie angegeben, 10 mM Pyrogallol, 4 mM H₂O₂, RT. (b) 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 4, 10 mM Pyrogallol, 4 mM H₂O₂, Temperatur wie angegeben.

Bezüglich der Abhängigkeit der Peroxidase-Aktivität der CPO von der Temperatur wurden in der Literatur keine Angaben gefunden. Die Untersuchung der Oxidation von Pyrogallol hinsichtlich der Temperatur zeigte, dass die Peroxidase-Aktivität der CPO mit steigenden Temperaturen zunimmt und ihre Maximum bei 60 °C erreicht (Abbildung 3.16b). Bei einer Temperatur von 75 °C erhielt die CPO 70 % ihrer maximalen Peroxidase-Aktivität. Das Temperaturoptimum der Peroxidase-Aktivität entspricht somit dem Temperaturoptimum, das für die Sulfoxidation von Thioanisol erhalten wurde. Demzufolge führt die Umfaltung der dreidimensionalen Struktur des Enzyms, die bei 60 °C eingeleitet wird, gleichzeitig zur Herabsetzung der Monooxygenase- und Peroxidase-Aktivität des Enzyms.

Einfluss der Substratkonzentration auf die CPO-katalysierte Oxidation von Pyrogallol

Die Peroxidase-Aktivität wurde als Funktion der Pyrogallol-Konzentration untersucht. Diese Funktion entspricht dem typischen Verlauf einer Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration, da die Enzymaktivität mit steigender Pyrogallol-Konzentration zunahm, bis sie ihr Maximum bzw. den Sättigungsbereich erreichte (Abbildung 3.17a).

Die Peroxidase-Aktivität stieg ebenso bei der Erhöhung der H_2O_2 -Konzentration und erreichte ihr Maximum bei einer Konzentration von 8 mM. Danach begann die Aktivität mit weiterer Erhöhung der Konzentration langsam abzunehmen (Abbildung 3.17b). Der Grund dafür ist die Inaktivierung des Enzyms bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen. Diese Inaktivierung ist weniger stark ausgeprägt als bei der Halogenase- und Monooxygenase-Aktivität der CPO, was auf den Mechanismus der katalysierten Reaktionen zurückgeführt werden kann. Der Grund für die Inaktivierung des Enzyms bei der Halogenase- und Monooxygenase-Aktivität bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen ist die Bildung von Radikalen, die zur Oxidation des Porphyrinringes bzw. der Bildung der inaktiven Compound III führen.

Bei der Peroxidase-Aktivität erfolgt die Oxidation der Substrate im Gegensatz zu anderen Aktivitäten unter Bildung von Radikalen. Deshalb besteht die Möglichkeit, dass die gebildeten Radikale an der Oxidation des Substrats beteiligt sind, was die Verringerung der Enzymoxidation zur Folge hat. Somit bleibt das Enzym gewissermaßen aktiv und die Bildung des Produkts erfolgt ebenfalls durch eine Autooxidation, was die höhere Aktivität bei hohen Konzentrationen von H_2O_2 begründen kann. Die Autooxidation von Pyrogallol konnte mittels der Durchführung der Reaktion bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen in der Abwesenheit des Enzyms bewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

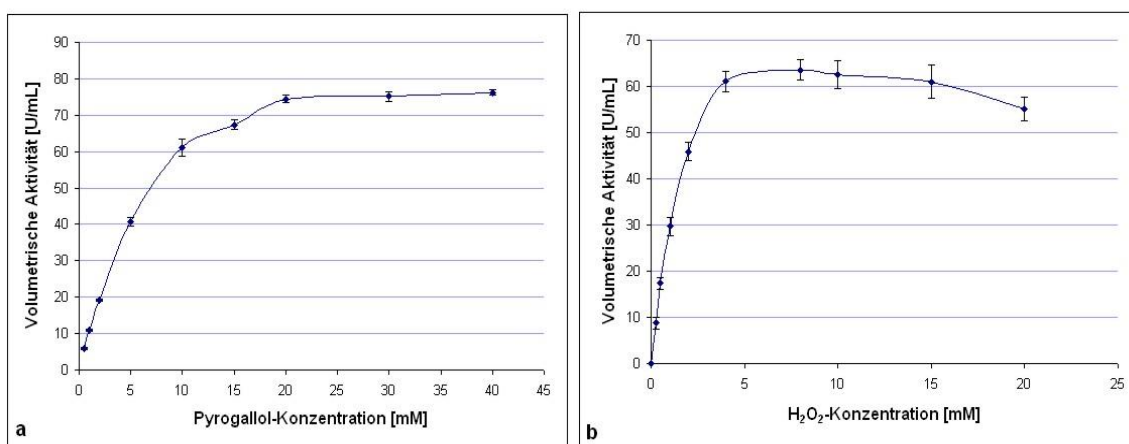


Abbildung 3.17: Abhängigkeit der Peroxidase-Aktivität der CPO von der Pyrogallol-Konzentration (a) und der H₂O₂-Konzentration (b). Reaktionsbedingungen: (a) 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 4, Pyrogallol-Konzentration wie angegeben, 4 mM H₂O₂, RT. (b) 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 4, 10 mM Pyrogallol, H₂O₂-Konzentration wie angegeben, RT.

Die Abhängigkeit der Peroxidase-Aktivität der CPO von der Anwesenheit wassermischbarer organischer Lösungsmittel

Die CPO-katalysierte Oxidation von Pyrogallol wurde in Abhängigkeit von wassermischbaren organischen Lösungsmitteln untersucht. Dabei handelt es sich um Dioxan (log P: -0,27), THF (log P: 0,49) und Acetonitril (log P: -0,33).

Bezogen auf die Enzymaktivität, die ohne den Einsatz eines Co-Solvents erhalten wurde, setzten die verwendeten Lösungsmittel die Enzymaktivität stark herab. Die höchste Aktivität wurde beim Einsatz von Dioxan erzielt. Bei einem Dioxananteil von 10 % zeigte das Enzym 52 % der Aktivität, die ohne den Einsatz von Lösungsmittel erhalten wurde. Dieser Wert nahm auf 13 % ab, wenn der Anteil von Dioxan auf 25 % des Reaktionsmediums erhöht wurde. In 10 % THF bzw. Acetonitril zeigte die CPO nur 13 % bzw. 9 % ihrer Aktivität. Bei der Erhöhung der THF- und Acetonitrilanteile auf 25 % konnte keine Aktivität mehr gemessen werden (Abbildung 3.18).

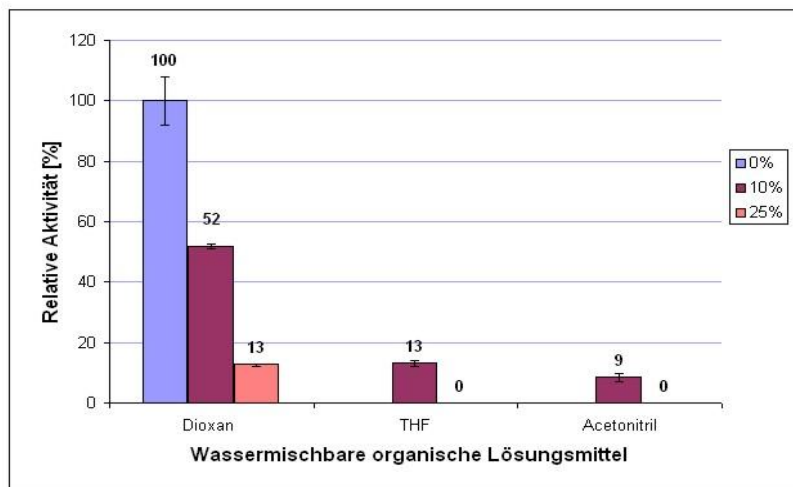


Abbildung 3.18: Die Peroxidase-Aktivität der CPO in Abhängigkeit von wassermischbaren organischen Lösungsmitteln. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 4, 10 mM Pyrogallol, 4 mM H₂O₂, RT, die verwendeten Lösungsmittel und ihre Anteile wie angegeben.

3.2.4 Zusammenfassung

Die Abhängigkeit der Halogenase-, Monooxygenase- und Peroxidase-Aktivitäten der CPO von verschiedenen isolierten Einflussgrößen, wie pH-Wert und Substratkonzentration konnte reproduziert werden. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Temperatur sowie der Einfluss von wassermischbaren organischen Lösungsmitteln auf die CPO-Aktivitäten untersucht.

In Bezug auf den pH-Wert besitzt die CPO eine zweifache Reaktivität. Die eine erfolgt unterhalb des isoelektrischen Punktes des Enzyms ($IP \approx 4$), während die andere bei einem neutralen bzw. basischen pH-Wert abläuft. Die Halogenase-Aktivität der CPO tritt lediglich auf, wenn das Enzym in der sauren Form vorliegt. Im Gegensatz dazu ist das Enzym hinsichtlich der Monooxygenase- und Peroxidase-Aktivität über einen breiten pH-Bereich aktiv. Die Aktivitäten des Enzyms zeigten ebenso unterschiedliche Temperaturoptima. Die CPO besitzt ihre maximale Halogenase-Aktivität bei einer Temperatur von 40 °C, während sie ihre maximale Monooxygenase- und Peroxidase-Aktivität bei einer Temperatur von 60 °C zeigt.

Die Halogenid-Ionen inhibieren die CPO bei der Halogenase-Aktivität, wenn sie in hohen Konzentrationen vorliegen. Hohe MCD-Konzentrationen führen ebenso zu einer Inhibierung des Enzyms. Dieser inhibierende Einfluss wurde bei Thioanisol und Pyrogallol hingegen nicht beobachtet. In allen untersuchten Reaktionen wurde das Enzym ebenso durch H_2O_2 aufgrund der Oxidation des Porphyrinringes bzw. der Bildung der inaktiven Compound III inaktiviert. Diese Inaktivierung war bei der Peroxidase-Aktivität weniger stark ausgeprägt als bei der Monooxygenase- und Halogenase-Aktivität.

Die wassermischbaren organischen Lösungsmittel zeigten ebenso unterschiedliche Einflüsse auf die verschiedenen Enzymaktivitäten. Dabei wurde die Sulfoxidation von Thioanisol weniger beeinflusst als die Halogenierungsreaktion und die Oxidation von Pyrogallol. Bei allen untersuchten Reaktionen ließen sich in Dioxan und Isopropanol die höheren Aktivitäten erzielen. Bezogen auf die ohne die Zugabe von Co-Solventien erhaltenden CPO-Aktivitäten wurden 60, 50 und lediglich 30 % dieser Aktivität bei einem Einsatz von 10 % Dioxananteil bei der Sulfoxidation, Oxidation von Pyrogallol bzw. die Halogenierungsreaktion erhalten.

3.3 Charakterisierung der CPO-Stabilität in Abhängigkeit von verschiedenen isolierten Einflüssen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Lagerungsstabilität der CPO in Abhängigkeit von verschiedenen isolierten Faktoren untersucht, in dem das Enzym bei den entsprechenden Bedingungen inkubiert und die Restaktivität über die Zeit verfolgt wurde. Da in der Literatur zahlreiche Angaben zur CPO-Stabilität bezüglich der Halogenase-Aktivität existieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Lagerungsstabilität der CPO hinsichtlich der Monooxygenase- und Peroxidase-Aktivität untersucht und untereinander verglichen. Dieser Vergleich der CPO-Stabilität bezüglich ihrer unterschiedlichen Aktivitäten wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.

3.3.1 Monooxygenase-Aktivität (Sulfoxidation)

Im Folgenden wurde die Lagerungsstabilität der CPO bezüglich der Monooxygenase-Aktivität in Abhängigkeit von pH-Wert, Temperatur, H_2O_2 -Konzentration und wassermischbaren organischen Lösungsmitteln untersucht.

pH-Stabilität

Unter Verwendung von Thioanisol als Substrat wurde die pH-Stabilität der CPO hinsichtlich der Monooxygenase-Aktivität untersucht. Dazu wurde das Enzym in 0,05 mM Citratpuffer mit verschiedenen pH-Werten für 72 Stunden inkubiert und die jeweilige Restaktivität ermittelt. Das Enzym war über einen breiten pH-Bereich (pH-Wert von 2 bis 7) stabil und erhielt bei allen pH-Werten mehr als 85 % seiner Ausgangsaktivität (Abbildung 3.19). Das stimmt mit Kadima und Pickard überein, die eine sehr hohe Stabilität der CPO über einen breiten pH-Bereich bei der Oxidation von *N, N, N', N'*-Tetramethyl-p-phenylenediamin (TMPD) beschrieben [Kadima und Pickard, 1990]. Die höchste Stabilität wurde bei einem pH-Wert von 5 erzielt, bei dem das Enzym nahezu keine Aktivität verliert. Demzufolge besitzt die CPO bezüglich der Sulfoxidation von Thioanisol ihre maximale Aktivität und Stabilität bei dem gleichen pH-Wert von 5, was für ihren Einsatz in technischen Anwendungen von Vorteil ist.

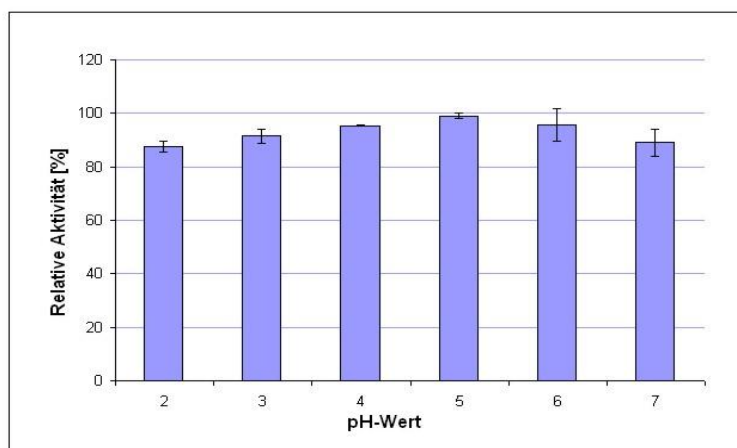


Abbildung 3.19: Die Relative Aktivität der CPO bezüglich der Sulfoxidation von Thioanisole nach der Inkubation für 72 Stunden in 0,05 M Natriumcitratpuffer verschiedener pH-Werte (wie angegeben) bei 4 °C. Reaktionsbedingungen: 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, 0,5 mM Thioanisol, 0,5 mM H₂O₂, bei RT.

Temperaturstabilität

Zur Untersuchung der Stabilität der CPO in Abhängigkeit von der Temperatur wurde das Enzym in 50 mM Citratpuffer pH 5 bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und der Verlust der Aktivität über die Zeit verfolgt. Tabelle 3.2 zeigt die erhaltenen Halbwertszeiten der CPO bezüglich der Sulfoxidation von Thioanisol bei verschiedenen Temperaturen. Bei Temperaturen von 22 °C und 30 °C wies die CPO eine sehr hohe Stabilität auf. Die Halbwertszeiten lagen hier bei 26 bzw. 22 Tagen. Mit der Erhöhung der Temperatur auf 40 °C sank die Halbwertszeit auf 17 Tage. Nahm die Temperatur weiter um 10 °C auf 50 °C zu, verringerte sich die Stabilität sehr stark und führte zu einer Halbwertszeit der CPO von lediglich 2 Tagen. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den Daten von Liu und Wang, die beschrieben, dass die CPO ungefähr 80 % seiner Aktivität nach der Inkubation bei 50 °C für 6 Stunden verliert [Liu und Wang, 2007]. Die weitere Erhöhung der Temperatur auf das Temperaturoptimum der Sulfoxidation (60 °C) führte zu einer starken Abnahme der Stabilität, wobei das Enzym dabei lediglich eine Halbwertszeit von 3 Stunden besaß. Auch diese Resultate stimmen nicht mit Literaturdaten überein, da Ayala et al. beschrieben, dass die CPO ungefähr 90 % ihrer Aktivität verliert, wenn sie bei 60 °C für eine Stunde inkubiert wird [Ayala, et al., 2002]. Demzufolge zeigt die CPO eine geringe Stabilität bei ihrem

Temperaturoptimum. Im Allgemeinen nahm die Stabilität der CPO, wie erwartet, mit steigender Temperatur ab.

Tabelle 3.2: Die Halbwertszeiten der CPO bezüglich der Sulfoxidation von Thioanisol bei verschiedenen Temperaturen. Inkubationsbedingungen: 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, Temperatur wie angegeben. Reaktionsbedingungen: 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, 0,5 mM Thioanisol, 0,5 mM H₂O₂, bei RT.

Temperatur [°C]	t _{1/2} [h]
22	630
30	533
40	408
50	49
60	3

Einfluss der Wasserstoffperoxidkonzentration auf die Stabilität der CPO

Die CPO und viele andere Hämperoxidasen werden im Allgemeinen durch Wasserstoffperoxid inaktiviert. Grund dafür ist die Oxidation des Porphyrinrings, die durch die während des katalytischen Zyklus gebildeten Radikale oder durch die Bildung der inaktiven Compound III hervorgerufen werden. Abbildung 3.20 zeigt die Inaktivierung der CPO während der Inkubation bei verschiedenen Konzentrationen von H₂O₂. Bei allen untersuchten Konzentrationen nahm die Aktivität der CPO während der ersten 60 Minuten stark ab. In dieser Zeit verlor das Enzym 11, 18 bzw. 43 % seiner Aktivität, wenn es bei einer Wasserstoffperoxidkonzentration von 0,5, 1 bzw. 2 mM inkubiert wurde. Innerhalb der darauffolgenden 48 Stunden nahm die Aktivität deutlich langsamer ab und blieb dann schließlich konstant. Dieser Verlauf der Aktivitätsabnahme entspricht dem Verlauf der Inaktivierung des Enzyms durch H₂O₂ bei der Oxidation von Thioanisol bzw. der Chlorierung von MCD, der ebenso bei Untersuchungen von Spreti bzw. Zhang und Bai erhalten wurde [Spreti, *et al.*, 2004; Zhang und Bai, 2009]. Die hier durchgeführten Messungen zeigten, dass das Enzym 63 %, 61 % sowie lediglich 37 % seiner Ausgangsaktivität nach der Inkubation bei 0,5, 1 bzw. 2 mM für eine Woche behält. Die Inaktivierung des Enzyms durch 2 mM H₂O₂ ist ungefähr doppelt so stark ausgeprägt verglichen mit der durch 1 mM. Demzufolge ist die Inaktivierung der CPO von der H₂O₂-Konzentration abhängig. Der starke Abfall der Aktivität zu Beginn der Inkubation deutet darauf hin, dass die Geschwindigkeit der Oxidation

des Poryphyrinrings bzw. der Bildung von Compound III zuerst sehr hoch ist, dann jedoch mit der Zeit abnimmt, da die Konzentration des Wasserstoffperoxides ebenso mit der Zeit geringer wird. Diese Ergebnisse stimmen mit den Literaturdaten überein, in denen auf eine Inaktivierung des Enzyms durch H_2O_2 hingewiesen wird [Van Deurzen, *et al.*, 1997; Park und Clark, 2006; Valderrama, *et al.*, 2002; Grey, *et al.*, 2008].

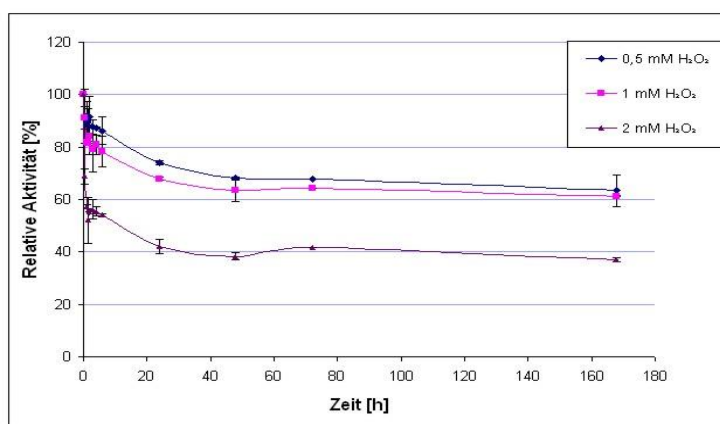


Abbildung 3.20: Die Inaktivierung der CPO hinsichtlich ihrer Monooxygenase-Aktivität durch verschiedene H_2O_2 -Konzentrationen von Wasserstoffperoxid. Inkubationsbedingungen: 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, H_2O_2 -Konzentration wie angegeben, RT. Reaktionsbedingungen: 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, 0,5 mM Thioanisol, 0,5 mM H_2O_2 , bei RT.

Stabilität der CPO in wassermischbaren organischen Lösungsmitteln

Viele CPO-Substrate sind nur schwer in Wasser löslich. Bei Thioanisol handelt es sich um eine in Wasser geringlösliche Substanz, weshalb die Stabilität der CPO hinsichtlich ihrer Monooxygenase-Aktivität in Gegenwart von Dioxan, Isopropanol, THF und Acetonitril untersucht wurde. Die Abhängigkeit der CPO-Stabilität von diesen Lösungsmitteln wurde hier zum ersten Mal beschrieben. Zunächst wurde die CPO bei einem Lösungsmittelanteil von 30 % inkubiert und die Aktivität über die Zeit verfolgt. Der Verlauf der Stabilität über die Zeit ist in der Abbildung 3.21 dargestellt. In 30 % Isopropanol und 30 % Dioxan wurde über eine Inkubationszeit von einer Woche kein Aktivitätsverlust ermittelt. THF führte dagegen zu einem nahezu totalen Verlust der Enzymaktivität innerhalb von sechs Stunden. Die Halbwertszeit des Enzyms in Gegenwart von 30 % Acetonitril betrug 8,8 Stunden und sank auf 1,4 Stunden, wenn der Lösungsmittelanteil auf 50 % erhöht wurde. Da das Enzym in 30 % Isopropanol sowie in 30 % Dioxan stabil war, wurde die Stabilität des Enzyms ebenso

in einem Inkubationsansatz mit 50 % Lösungsmittelanteil untersucht. Dabei besaß das Enzym in 50 % Isopropanol bzw. 50 % Dioxan eine Halbwertszeit von 6,4 bzw. 0,05 h [Tabelle 3.3].

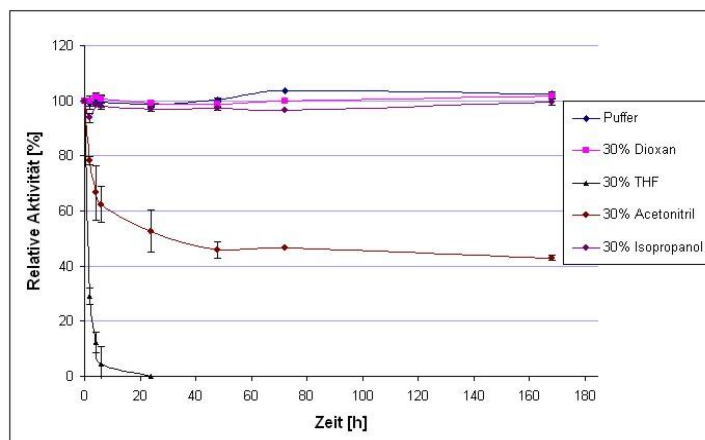


Abbildung 3.21: Abhängigkeit der CPO-Stabilität hinsichtlich der Monooxygenase-Aktivität von wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln: Inkubationsbedingungen: 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, die verwendeten Lösungsmittel und ihre Anteile wie angegeben, 4 °C. Reaktionsbedingungen: 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, 0,5 mM Thioanisol, 0,5 mM H₂O₂, bei RT.

Es zeigte sich, dass die verschiedenen Lösungsmittel unterschiedliche Inaktivierungseinflüsse auf das Enzym besitzen, was sich auf Veränderungen der CPO-Konformation und der lokalen Umgebung des aktiven Zentrums, die durch organische Lösungsmittel hervorgerufen werden, zurückführen lässt [Loughlin und Hawkes, 2000].

Tabelle 3.3: Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der CPO bezüglich der Sulfoxidation von Thioanisol in Anwesenheit verschiedener wasserlöslicher organischer Lösungsmittel. Inkubationsbedingungen: 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 5, die verwendeten Lösungsmittel und ihre Anteile wie angegeben, 4 °C.

Organische Lösungsmittel	$t_{1/2}$ [h]
30 % THF	1,4
30 % Acetonitril	8,8
50 % Isopropanol	6,4
50 % Acetonitril	1,4
50 % Dioxan	0,05

3.3.2 Peroxidase-Aktivität (Oxidation von Pyrogallol)

Hierbei wurde die Stabilität der CPO in Abhängigkeit vom pH-Wert, der Temperatur, dem Wasserstoffperoxid und der Anwesenheit wassermischbarer organischer Lösungsmittel in Bezug auf die Oxidation von Pyrogallol ermittelt. Die erhaltenen Halbwertszeiten beziehen sich dabei auf die Lagerungsstabilität des Enzyms.

pH-Stabilität

Die Stabilität der CPO in Abhängigkeit vom pH-Wert wurde untersucht, indem das Enzym in 100 mM Kaliumphosphatpuffer verschiedener pH-Werte inkubiert und die Restaktivität nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen ermittelt wurde. Die CPO besaß eine hohe Stabilität in einem pH-Bereich zwischen 2,75 und 6 und zeigte in diesem pH-Bereich mehr als 80 % ihrer Anfangsaktivität. Im Gegensatz dazu verlor das Enzym mehr als 80 % seiner Aktivität, wenn es bei noch stärker sauren (pH 2) oder alkalischen Bedingungen (pH 7) inkubiert wurde (Abbildung 3.22).

Im Vergleich zur Stabilität des Enzyms hinsichtlich seiner Monooxygenase-Aktivität ist das Enzym bezüglich seiner Peroxidase-Aktivität weniger stabil bei allen untersuchten pH-Werten. Es besteht hierbei die Möglichkeit, dass die Konzentration des Puffers eine Rolle bei der Stabilität der CPO spielt, da das Enzym bei der Sulfoxidation in 50 mM Citratpuffer inkubiert wurde, wohingegen die Inkubation der CPO bei der Untersuchung der Stabilität hinsichtlich der Oxidation von Pyrogallol in 100 mM Kaliumphosphatpuffer erfolgte. Des Weiteren sind die Mechanismen der Oxidation von Thioanisol und Pyrogallol unterschiedlich, was ebenso ein Grund für die unterschiedlichen erhaltenen Stabilitäten sein kann.

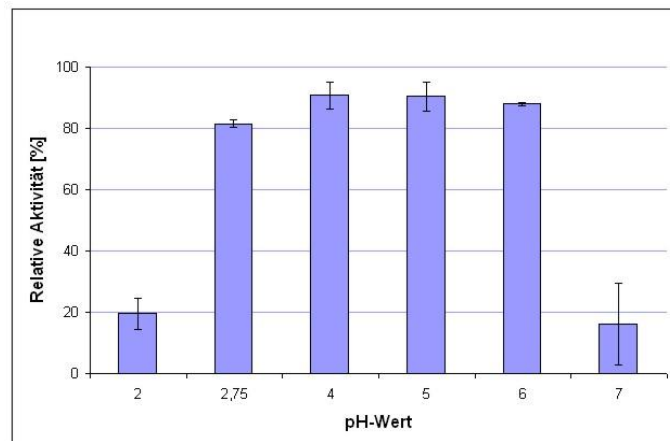


Abbildung 3.22: Die Relative Aktivität der CPO bezüglich der Oxidation von Pyrogallol nach der Inkubation für 72 Stunden in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer verschiedener pH-Werte (wie angegeben) bei 4 °C. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 4, 10 mM Pyrogallol, 4 mM H₂O₂, RT.

Temperaturstabilität:

Hinsichtlich der Temperaturstabilität der CPO bezüglich der Oxidation von Pyrogallol konnten in der Literatur keine Angaben gefunden werden. Die Inkubation des Enzyms bei 28 °C und 35 °C für eine Woche führte zu keinem Aktivitätsverlust. Erst bei einer Temperatur von 40 °C konnte eine Inaktivierung des Enzyms beobachtet werden (Abbildung 3.23). Bei dieser Temperatur lag die Halbwertszeit bei 210 h. Eine Erhöhung der Temperatur auf 50 °C bzw. 60 °C führte zur Reduzierung der Halbwertszeit auf 48 bzw. 3 h (Tabelle 3.4). Demzufolge zeigte die CPO eine sehr geringe Stabilität in ihrem Temperaturoptimum. Verglichen mit der CPO-Stabilität bezogen auf die Monooxygenase-Aktivität war das Enzym bei diesen Messungen bei 28 °C und 35 °C stabiler, da bei diesen Temperaturen bereits eine Inaktivierung des Enzyms bei der Monooxygenase-Aktivität zu beobachten war. Im Gegensatz dazu wies das Enzym bezüglich seiner Monooxygenase-Aktivität bei 40 °C eine höhere Stabilität als bei der Peroxidase-Aktivität auf. Bei 50 °C und 60 °C konnten für die CPO ungefähr die gleichen Halbwertszeiten für die zwei Aktivitäten ermittelt werden.

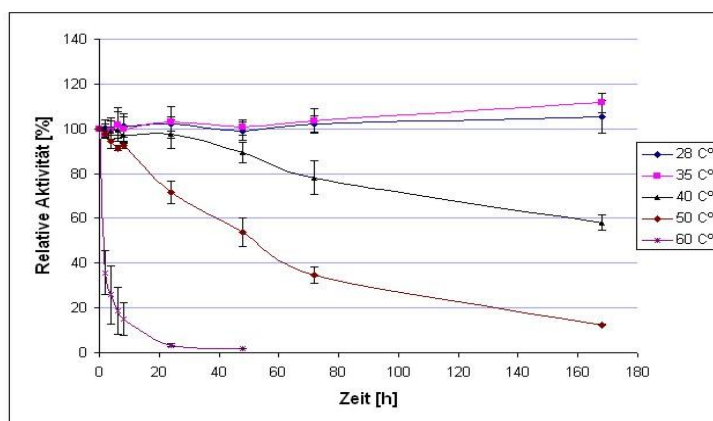


Abbildung 3.23: Die Temperaturstabilität der CPO in Bezug auf die Peroxidase-Aktivität. Inkubationsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 4, Temperatur wie angegeben. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 4, 10 mM Pyrogallol, 4 mM H₂O₂, RT.

Tabelle 3.4: Die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der CPO bezüglich der Peroxidase-Aktivität bei verschiedenen Temperaturen. Inkubationsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 4, Temperatur wie angegeben.

Temperatur [°C]	$t_{1/2}$ [h]
40	210
50	48
60	3

Einfluss des Wasserstoffperoxids auf die Stabilität der CPO

Die Inkubation der CPO in einem Kaliumphosphatpuffer pH 4 mit einer H₂O₂-Konzentration von 2 mM führte zu einem schnellen Verlust der Enzymaktivität. Das Enzym besaß dabei eine Halbwertszeit von lediglich 14,7 Minuten. Dieser Wert stellt einen Mittelwert von 3 Sätzen von Experimenten dar, wobei jeder Satz wiederum aus 3 verschiedenen Experimenten bestand. Park und Clark haben ebenso die Stabilität der CPO in einem Kaliumphosphatpuffer pH 4,1 mit 2 mM H₂O₂ in Bezug auf die Oxidation von Pyrogallol untersucht und beschrieben, dass das Enzym seine gesamte Aktivität nach 15 Minuten Inkubation verliert. Diese Abweichung von den erhaltenen Ergebnissen kann lediglich auf Messungenauigkeiten oder eine abweichende Durchführung der Messungen zurückgeführt werden. Im Vergleich zur CPO-Stabilität hinsichtlich der Monooxygenase-Aktivität wies die CPO bei der Peroxidase-Aktivität eine geringere Stabilität gegenüber H₂O₂ auf, was sich anhand des pH-Werts des

Puffers erklären lässt, da die Inkubation des Enzyms bei der Sulfoxidation in einem Citratpuffer pH 5 erfolgte. Park und Clark haben ebenso den Einfluss des pH-Werts vom Inkubationspuffer auf die Stabilität des Enzyms untersucht. Sie beschrieben, dass das Enzym eine erhöhte Stabilität gegenüber der H_2O_2 -Inaktivierung in einem pH-Bereich zwischen 5 und 6 mit einem Stabilitätsoptimum bei pH 5,5 aufweist. Die Stabilität der CPO bei pH 5,5 ist die unmittelbare Folge des Einflusses des pH-Werts auf die Peroxidase-Aktivität der CPO und der fehlenden Produktion der inaktivierenden Radikale. Daher ist die Inaktivierung des Enzyms während der Inkubation in einem Kaliumphosphatpuffer pH 4 die Folge der Radikalbildung durch die Peroxidase-Aktivität des Enzyms, da die Zugabe von Radikalfängern diese Inaktivierung stark verringert [Park und Clark, 2006]. Im Gegensatz dazu wird die Stabilität des Enzyms gegenüber der H_2O_2 -Inaktivierung durch die Zugabe von Radikalfängern bei pH 6 nicht beeinflusst [Park und Clark, 2006].

Stabilität der CPO in wassermischbaren organischen Lösungsmitteln

Die Stabilität der CPO hinsichtlich der Peroxidase-Aktivität in Anwesenheit von wassermischbaren organischen Lösungsmitteln wurde zum ersten Mal im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Bei den untersuchten Lösungsmitteln handelte es sich um Dioxan, THF und Acetonitril, die in einem Anteil von 30 % bzw. 50 % dem Inkubationssystem zugesetzt wurden. Die dabei ermittelten Halbwertszeiten des Enzyms sind in der Tabelle 3.5 aufgelistet. Am stabilsten war das Enzym in Gegenwart von 30 % Dioxan, wobei das Enzym eine Halbwertszeit von 630 h besaß. Die Erhöhung des Dioxananteils auf 50 % reduzierte die Halbwertszeit des Enzyms auf 0,5 h. Im Unterschied zu Dioxan führte die Inkubation des Enzyms bereits in 30 % THF zu einer starken Inaktivierung des Enzyms mit einer Halbwertszeit von 0,3 h. Bei 30 % bzw. 50 % Acetonitril wies das Enzym eine Halbwertszeit von 13,4 bzw. 2,1 h auf.

Im Vergleich zur Stabilität des Enzyms hinsichtlich der Monooxygenase-Aktivität zeigt das Enzym hier eine höhere Stabilität in Acetonitril und eine geringere Stabilität in THF. Bei beiden Aktivitäten zeigte das Enzym in 30 % Dioxan eine sehr hohe Stabilität, dennoch war eine erhöhte Stabilität bezüglich seiner Monooxygenase-Aktivität zu beobachten. Eine umgekehrte Tendenz war bei einer Erhöhung des Dioxananteils auf 50 % zu beobachten. In diesem Fall zeigte die CPO eine höhere Stabilität bezüglich der Peroxidase-Aktivität. Es ist

kein Zusammenhang zwischen der Polarität des Lösungsmittels und seinem Inaktivierungseinfluss auf das Enzym zu erkennen.

Tabelle 3.5: Die ermittelten Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der CPO hinsichtlich der Oxidation von Pyrogallol in Anwesenheit verschiedener wasserlöslicher organischer Lösungsmittel. Inkubationsbedingungen: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 4, 4 °C, die verwendeten Lösungsmittel und ihre Anteile wie angegeben.

Organische Lösungsmittel	Halbwertszeit [h]
30 % Dioxan	630
30 % THF	0,3
30 % Acetonitril	13,4
50 % Acetonitril	2,1
50 % Dioxan	0,5

3.3.3 Zusammenfassung

Die Stabilität der CPO wurde hinsichtlich ihrer Monooxygenase- und Peroxidase-Aktivität in Abhängigkeit von verschiedenen isolierten Einflussgrößen untersucht. Bei diesen Einflussgrößen handelte es sich um den pH-Wert, die Temperatur, die Wasserstoffperoxidkonzentration sowie die Anwesenheit verschiedener wassermischbarer organischer Lösungsmittel. Bei beiden CPO-Aktivitäten war das Enzym über einen breiten pH-Bereich stabil. Dennoch wies es bei allen untersuchten pH-Werten bessere Stabilitäten bei der Monooxygenase-Aktivität als bei der Peroxidase-Aktivität auf. Bei Temperaturen bis zu 40 °C zeigte das Enzym eine sehr hohe Stabilität. Erst bei einer Temperatur von 40 °C konnte eine Inaktivierung des Enzyms ermittelt werden.

Die Inaktivierung der CPO durch Wasserstoffperoxid war von seiner Konzentrationen abhängig. Bei der Monooxygenase-Aktivität zeigte das Enzym eine bessere Stabilität gegenüber H_2O_2 als bei der Peroxidase-Aktivität und das konnte auf den pH-Wert des Inkubationspuffers zurückgeführt werden.

Die verschiedenen wassermischbaren Lösungsmittel übten unterschiedliche Einflüsse auf die Enzymstabilität aus. Im Allgemein gab es keinen Zusammenhang zwischen der Polarität des

Lösungsmittels und seinem Inaktivierungseinfluss. Am stabilsten war das Enzym in 30 % Dioxan bzw. 30 % Isopropanol. THF führte dagegen zu einer starken Inaktivierung der CPO.

3.4 Charakterisierung der Aktivität und Stabilität der CPO unter Berücksichtigung der gegenseitigen Beeinflussung verschiedener Einflussgrößen mittels Factorial Designs

Bei der Planung von Experimenten, in welchen der Einfluss verschiedener Parameter auf ein System untersucht werden soll, wird oft die klassische Methode empfohlen, bei der nur ein Faktor variiert wird und alle anderen Parameter konstant gehalten werden „One-factor-at-time“, um anschließend die Veränderung eines Ergebnisses leicht zuordnen zu können. Diese Methode hat jedoch verschiedene Nachteile. Bei mehr als zwei oder drei Faktoren kann sich die Zahl der notwendigen Experimente drastisch erhöhen, was viel Material, Zeit und Personalaufwand kostet. Außerdem werden diese Faktoren oftmals einer nach dem anderen charakterisiert. Unter diesen Umständen lassen sich optimale Bedingungen nicht effizient finden. Darüber hinaus werden die gegenseitigen Einflüsse von Parametern nicht berücksichtigt, die die Voraussetzung für die Feststellung des realen Optimums wären. Eine herausragende Alternative für diese Methode stellt das mathematische Verfahren der Versuchsplanung dar, welches unter dem Begriff „Design of Experiments (DOE)“ zusammengefasst wird. Das DOE eignet sich ideal für die Optimierung komplexer Systeme, da es die Nachteile der klassischen Methode bewältigen kann. Dabei werden alle möglichen Parameter gleichzeitig variiert. Das erlaubt, die gegenseitigen Einflüsse der Parameter zu untersuchen. Zudem kann man bei weniger Einzelversuchen als mit der „One-factor-at-time“ Methode mehr Information über das System erhalten. Des Weiteren lassen sich mittels des DOEs zuverlässige Karten, die so genannten „Contour Plot“ und „Surface Plot“ erhalten, die die Messergebnisse präsentieren, was sehr wertvoll ist, um das untersuchte System besser zu verstehen [Eriksson, *et al.*, 2000].

Das allgemeine Vorgehen des DOEs beruht auf der Festlegung interessanter Standardexperimente, die als so genannte Nullpunkte „Center-Points“ bezeichnet werden. Anschließend werden neue Experimente um die Nullpunkte herum in symmetrischer Weise ausgeführt [Eriksson, *et al.*, 2000]. Für eine dreidimensionale Untersuchung (drei Parameter X_1 , X_2 , X_3), ergibt sich das in Abbildung 3.24 dargestellte geometrische Design.

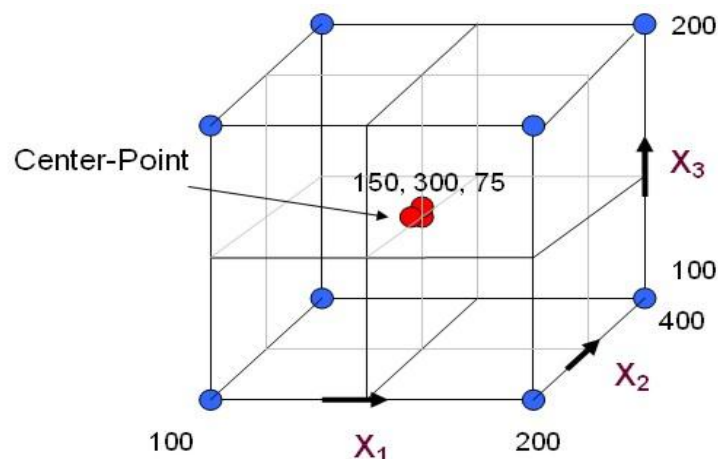


Abbildung 3.24: Dreidimensionale Region eines Systems bestehend aus 3 Faktoren (X_1 : 100-200, X_2 : 200-400, X_3 : 100-200).

Der Verlauf des DOEs beginnt mit dem bedeutenden Schritt der Formulierung des Problems. Diese besteht aus sechs Schritten, die in der Abbildung 3.25 dargestellt werden. Die Abbildung 3.25 erläutert sowohl die Auswahlmöglichkeit sowie die für diese Arbeit ausgewählte Strategie (Zielsetzung, Faktoren, Zielgrößen etc.). Nach der Erzeugung des Versuchsplans werden die Experimente anhand der Kombinationen, die in dem Versuchsplan erhalten wurden (Tabelle 3.6), durchgeführt. In einem letzten Schritt werden die Messergebnisse mittels des DOEs analysiert [Eriksson, *et al.*, 2000].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die gegenseitigen Beeinflussungen vom pH-Wert, der Temperatur und der Anwesenheit wassermischbarer Lösungsmittel sowohl auf die Aktivität als auch auf die Stabilität der CPO mittels des DOEs zum ersten Mal untersucht. Bei den wassermischbaren organischen Lösungsmitteln handelte es sich um DMSO, Isopropanol, Dioxan, Acetonitril und DMF. Das organische Lösungsmittel stellt einen qualitativen Faktor dar, was die Versuchsplanung mit 5 Lösungsmitteln sehr kompliziert macht. Aus diesem Grund wurde die Versuchsplanung nur aus Temperatur und pH-Wert erstellt und die erhaltenen Versuche jeweils in jedem Lösungsmittel sowie in reinem Citratpuffer durchgeführt.

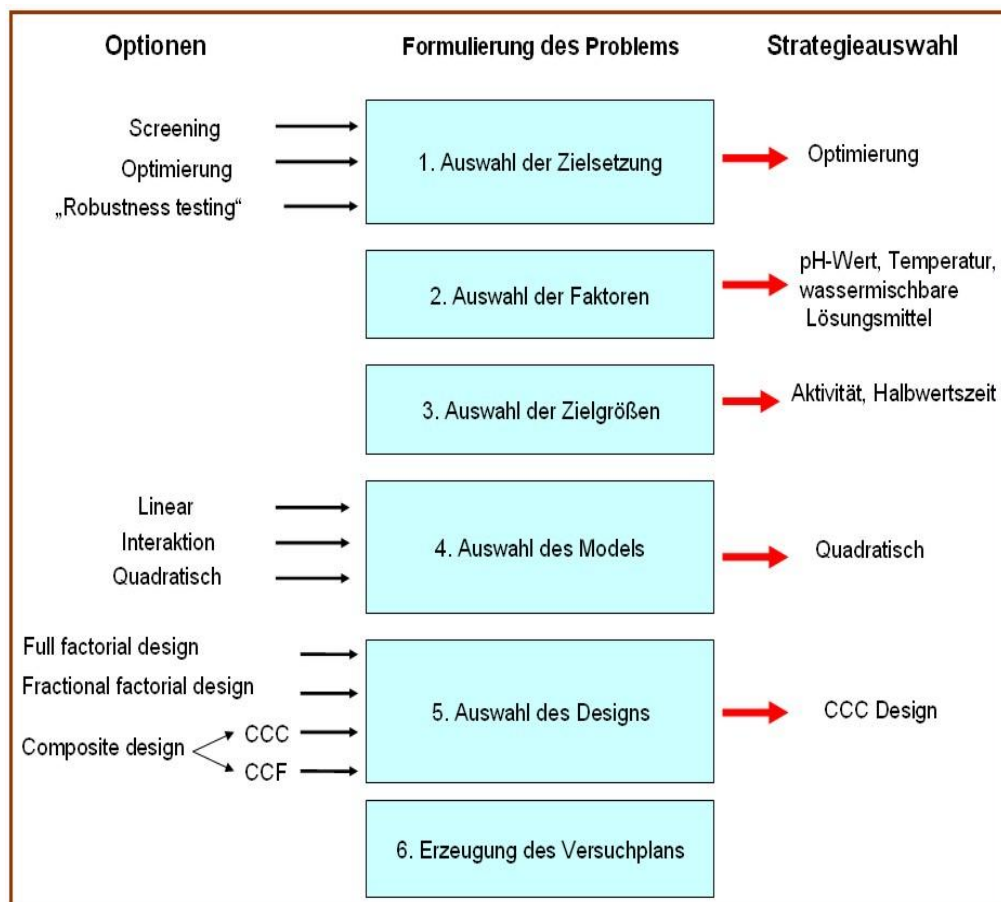


Abbildung 3.25: Schematische Darstellung der Problemformulierung in DOE und der für diese Arbeit ausgewählten Strategie.

3.4.1 Untersuchung der Aktivität und Stabilität der CPO in Citratpuffer

Zur Untersuchung der Aktivität und der Stabilität der CPO mittels des DOEs wurde die Oxidation von Pyrogallol als Modellreaktion verwendet. Die Reaktion wurde in 100 mM Natriumcitratpuffer verschiedener pH-Werte durchgeführt, da der Citratpuffer im Vergleich zum Kaliumphosphatpuffer in dem untersuchten pH-Bereich (3-5) eine höhere Kapazität besitzt, weshalb der Aktivitätstest in Citratpuffer durchgeführt wurde.

Untersuchung der Aktivität und der Stabilität der CPO mittels des DOEs in einem Temperaturbereich zwischen 15 °C und 45 °C

Da die CPO bei dem Temperaturoptimum der Peroxidase-Aktivität (60 °C) instabil ist, wurden zunächst die Aktivität und die Stabilität des Enzyms in einem Temperaturbereich von

15 °C bis 45 °C untersucht, in dem das Enzym eine bessere Stabilität aufweist. Der Versuchsplan mit den erhaltenen Messergebnissen ist in Tabelle 3.6 zu sehen. Im Rahmen der Experimente des Versuchsplans wurde die maximale Aktivität von 13,6 U/mL bei einer Temperatur von 51 °C und einem pH-Wert von 4 ermittelt, wohingegen die geringste Aktivität von 5,8 U/mL bei einer Temperatur von 15 °C und einem pH-Wert von 3 erhalten wurde. Die CPO zeigte ihre maximale Stabilität bei einer Temperatur von 8,8 °C und einem pH-Wert von 4.

Tabelle 3.6: Der Versuchsplan nach „Central-Composite-Design“ mit den Messergebnissen in Citratpuffer (Aktivität: [U/mL], Halbwertszeit [Tage]), Aktivitätstest: Oxidation von Pyrogallol; 0,1 M Citratpuffer pH wie angegeben, 10 mM Pyrogallol, 4 mM H₂O₂, Temperatur wie angegeben.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	Temperatur	pH-Wert	Aktivität	Halbwertszeit
2	1	N1	7	Incl	15	3	5,8	78,8
3	2	N2	5	Incl	45	3	11	0,19
4	3	N3	6	Incl	15	5	8,5	144
5	4	N4	2	Incl	45	5	12,5	32,7
6	5	N5	4	Incl	8,79	4	7,8	239
7	6	N6	11	Incl	51,21	4	13,6	0,22
8	7	N7	3	Incl	30	2,586	8,3	1,3
9	8	N8	10	Incl	30	5,414	9,7	120
10	9	N9	1	Incl	30	4	9,6	210
11	10	N10	9	Incl	30	4	9,7	165
12	11	N11	8	Incl	30	4	9,8	169

Datenanalyse

Für die Analyse der Daten stehen verschiedene Methoden zu Verfügung, um die Qualität und Aussagekraft der Ergebnisse einzuschätzen sowie die Aussagekraft der statistischen Berechnungen zu bewerten.

Den ersten Schritt der Datenanalyse stellt die Evaluation der Rohdaten in Form vom „Replicate Index“ dar, der einen Überblick über die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse gibt (Abbildung 3.26) [Eriksson, *et al.*, 2000]. Der „Replicate Index“ der Aktivität zeigt, dass die Werte der „Center-Points“ (Proben: 9, 10 und 11) sehr dicht beieinander liegen. Das bedeutet, dass die Reproduzierbarkeit der Daten sehr gut ist. Dagegen weicht die Probe 9 bei dem „Replicate Index“ der Stabilität von den anderen zwei „Center-Points“ ab.

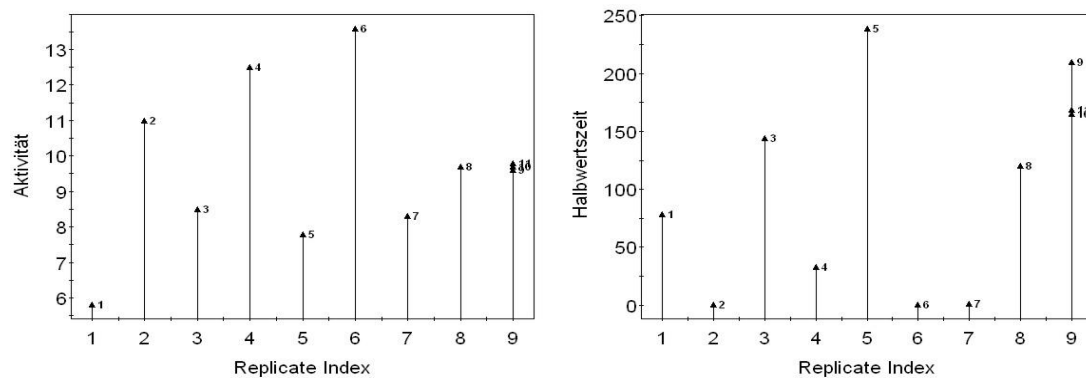


Abbildung 3.26: Der vom DOE erhaltene „Replicate Index“ für die Aktivität (links) und die Stabilität (rechts) der CPO in Citratpuffer in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

Einen zusammenfassenden Überblick über die Güte der Experimente und der statistischen Methoden ermöglicht der „Investigation Plot“. Dieser gibt in Form eines Balkendiagramms einen Überblick über die wesentlichen Kriterien zur Anwendbarkeit des Modells. Der „Investigation Plot“ besteht aus vier Indikatoren (Abbildung 3.27). Die Anpassungsgüte R^2 „Goodness of fit“ ist ein Maß für die Anpassbarkeit des Regressionsmodells für die betrachteten Rohdaten. Jedoch wird dieser Indikator nicht allein, sondern zusammen mit der Güte der Vorhersage Q^2 „Goodness of prediction“ betrachtet. Dabei geht es um die Fragestellung, inwieweit das Modell zuverlässige Vorhersagen für spätere Experimente trifft. Darüber hinaus trifft die Modellgültigkeit „Model validity“ eine Aussage darüber, ob das ausgewählte Modell geeignet oder ungeeignet ist, um die Daten anzupassen. Die Reproduzierbarkeit „Reproducibility“ fasst die Qualität der experimentellen Ergebnisse zusammen. Um das Modell als gut und zuverlässig auszuweisen, müssen diese Indikatoren den folgenden Referenzwerten entsprechen.

Die Differenz $R^2 - Q^2$	< 0,2-0,3
Q^2	> 0,5
„Model validity“	> 0,25
„Reproducibility“	> 0,5

Bei dem „Investigation Plot“ der Aktivität ist der Wert der Güte der Vorhersage (Q^2) sehr hoch 0,98 und die Differenz zwischen R^2 und Q^2 ist weniger als 0,2 (Abbildung 3.27). Das bedeutet, dass das System sehr hohe Vorhersagekraft besitzt. Zwar ist der Wert von Q^2 bei dem Stabilitätssystem größer als 0,5, aber die Differenz $R^2 - Q^2$ (0,39) liegt leicht über dem

Referenzwert. Demzufolge ist die Güte der Vorhersage bei der Stabilität geringer als bei der Aktivität [Eriksson, *et al.*, 2000].

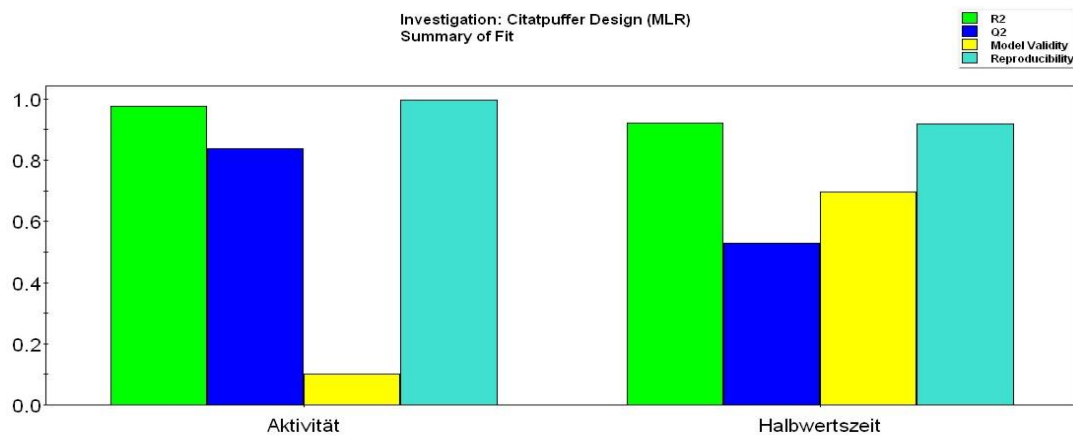


Abbildung 3.27: Der „Investigation Plot“ von der Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in Citratpuffer in einem Temperaturbereich von 15-45 °C .

Sowohl bei der Aktivität als auch bei der Stabilität war die Reproduzierbarkeit der Experimente sehr hoch. Mit einem Wert von 0,1 lag die „Model validity“ der Aktivität jedoch unter den mindestens geforderten 0,25, was darauf hindeutet, dass das quadratische Modell hier nicht ausreichend geeignet ist, um die Daten anzupassen, was später bei dem „Surface Plot“ zu sehen ist. Dagegen lag die „Model validity“ der Stabilität mit einem Wert von 0,7 weit über den mindestens geforderten 0,25.

Betrachtet man die Messergebnisse in Bezug auf mögliche Datenausreißer, so belegt der „Normal Probability Plot of Residuals“, dass sich die Stabilitätsdaten innerhalb der statistischen Bandbreite bewegten. Im Gegensatz dazu konnten bei der Aktivität zwei Proben (1 und 7) als Ausreißer ermittelt werden (Abbildung 3.28) [Eriksson, *et al.*, 2000].

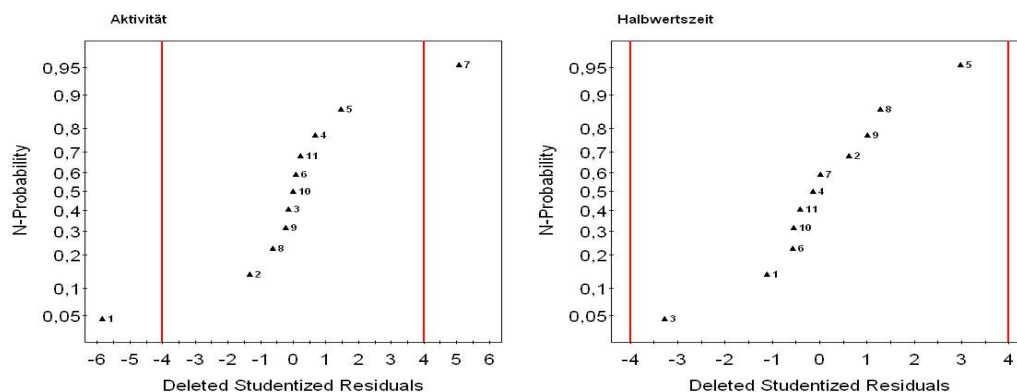


Abbildung 3.28: Der „Normal Probability Plot of Residuals“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

Einen Überblick der gegenseitigen Beeinflussung der Parameter (Temperatur, pH-Wert) gibt der „Interaction Plot“ (Abbildung 3.29) [Eriksson, *et al.*, 2000].

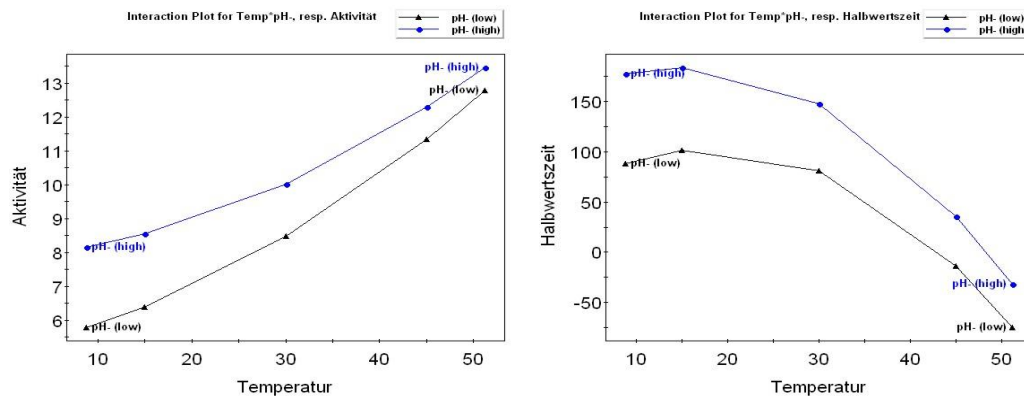


Abbildung 3.29: Der „Interaction Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

Der Einfluss des pH-Werts sowohl auf die Aktivität als auch auf die Halbwertszeit ist größer bei niedrigen als bei hohen Temperaturen. Das bedeutet, dass bei niedrigen Temperaturen der pH-Wert eine entscheidende Rolle spielt, die dann bei der Erhöhung der Temperatur an Bedeutung verliert.

Ein anderer Plot für die Beurteilung der Messergebnisse bietet die Auftragung der beobachteten „observed“ gegen die erwarteten „predicted“ Werte (Abbildung 3.30), was einen alternativen Weg für die Bewertung der Güte der Vorhersagekraft des Systems darstellt. Befinden sich die Proben auf einer Linie, wie bei der Aktivität zu sehen ist, bedeutet das, dass das System eine gute Vorhersagekraft besitzt. Weichen die Proben hingegen von der Linie ab, ist das System weniger vorhersagekräftig [Eriksson, *et al.*, 2000].

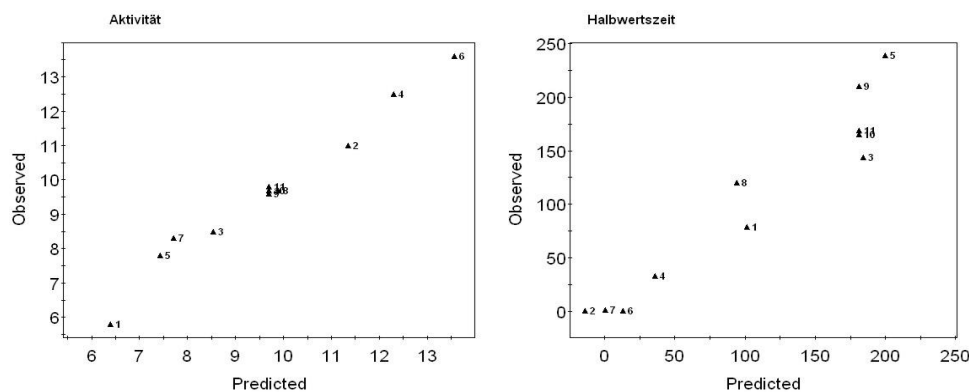


Abbildung 3.30: Auftragung der beobachteten gegen die erwarteten Werte bei der Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in Citratpuffer in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

Sehr gute Methoden für ein besseres Verständnis des gesamten Systems bieten die zwei- bzw. dreidimensionalen Darstellungen („Contour Plot“ bzw. „Surface Plot“) der experimentellen Messwerte in Abhängigkeit von den gewählten Parametern. Diese Darstellungen nehmen eine optische Einordnung der Ergebnisse mit einem Farbcode vor [Eriksson, *et al.*, 2000]. Bei der zweidimensionalen Darstellung ist die Rede vom „Contour Plot“. Die für die Aktivität und die Stabilität der CPO erhaltenden „Contour Plots“ sind in Abbildung 3.31 gezeigt. Wie erwartet wurde eine höhere Aktivität typischerweise bei hohen Temperaturen und einem pH-Wert zwischen 4 und 5 und die höhere Stabilität bei niedrigen Temperaturen und einem pH-Wert von 4 und 4,8 erzielt.

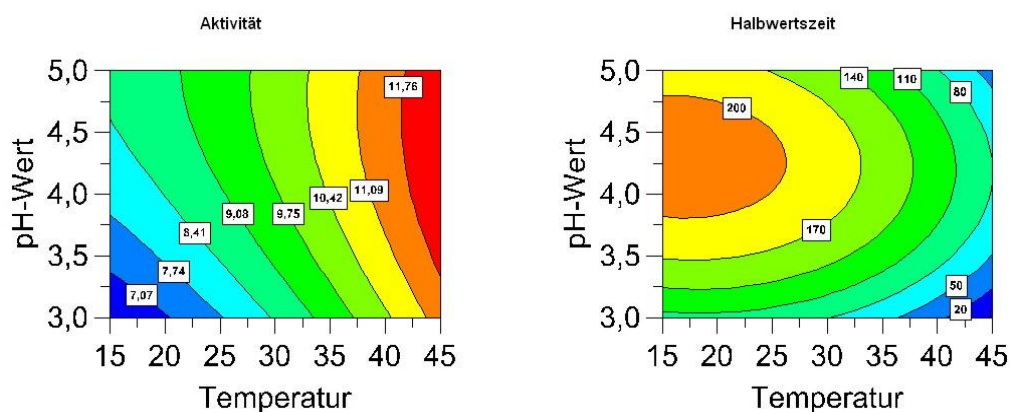


Abbildung 3.31: Der „Contour Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in Citratpuffer in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

Die dreidimensionalen Darstellungen „Surface Plot“ treffen eine Aussage über die Beziehung zwischen den Faktoren und den Zielgrößen und demzufolge über die Anpassung des Modells. Sie dienen zwei grundlegenden Zwecken: Der Vorhersage des Werts der Zielgröße bei jeder Parametereinstellung in der experimentellen Region und der Ermittlung der Parametereinstellung, die dem optimalen Wert entspricht.

Die dreidimensionale Darstellung „Surface Plot“ der Aktivität gibt zu erkennen, dass das Verhältnis zwischen den Faktoren und der Aktivität annähernd linear ist, was dem quadratischen Modell nicht entspricht (Abbildung 3.32). Das erklärt somit den geringen Wert der Modellgültigkeit bei der Aktivität. Grund für diese lineare Form ist, dass das Temperaturoptimum bei einem Temperaturbereich von 15 °C bis 45 °C nicht erreicht wurde.

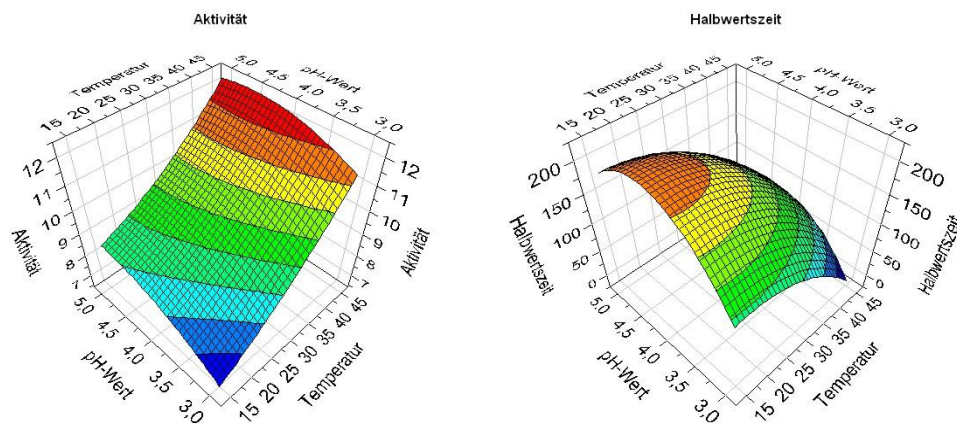


Abbildung 3.32: Der „Surface Plot“ von der Aktivität und Stabilität der CPO in Citratpuffer in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

Im Gegensatz zur Aktivität ist der „Surface Plot“ der Halbwertszeit gekrümmt, was eigentlich bei einem quadratischen Modell zu erwarten ist (Abbildung 3.32). Daher besitzt die Halbwertszeit einen hohen Wert der Modellgültigkeit.

Aus dem „Contour Plot“ bzw. „Surface Plot“ ist nur eine grobe Abschätzung des optimalen Bereichs möglich. Eine genauere Bestimmung kann mit Hilfe der „Sweet Spot“-Analyse erzielt werden. Für eine maximale Aktivität ergab sich im Rahmen der Parametereinstellungen ein optimaler Arbeitsbereich bei einem pH Wert von 4,5 und einer Temperatur von 45 °C. Die optimale Stabilität wurde dagegen bei einer Temperatur von 15 °C und einem pH-Wert zwischen 4,2 und 4,4 erzielt (Abbildung 3.33).

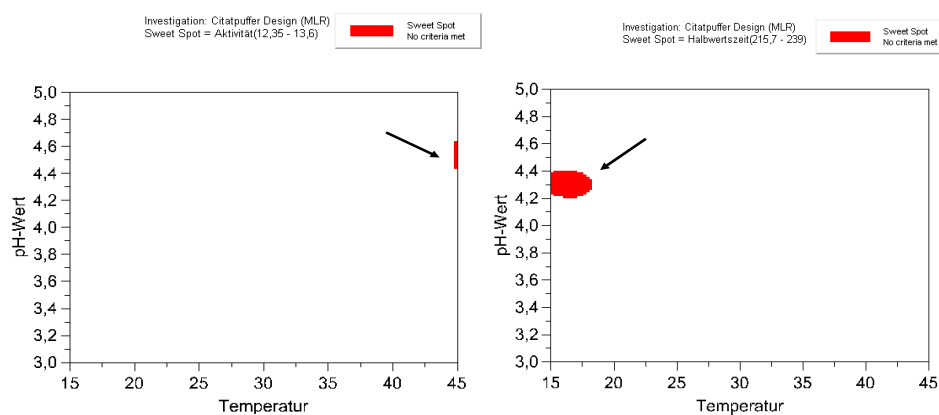


Abbildung 3.33: Die „Sweet Spot“-Analyse für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in Citratpuffer in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

Damit weicht das mittels des DOEs erhaltende pH-Optimum 4,5 leicht von dem mit den klassischen Methoden erhaltenen Wert (4) ab. Ein möglicher Grund dafür ist, dass die Aktivität bei der klassischen Methode bei einem pH Wert von 4 und 5 aber nicht bei 4,5 gemessen wurde. Zudem wurden die Experimente bei der klassischen Methode bei RT durchgeführt. Der Vorteil des DOEs gegenüber der klassischen Methode zeigt sich an dieser Stelle deutlich, da mittels des DOEs ein pH-Optimum statistisch an einem nicht gemessenen Punkt bestimmt werden kann. Die optimale Temperatur lässt sich nicht mit dem anhand der klassischen Methode ermittelten Temperaturoptimum (60 °C) vergleichen, da die Messungen lediglich in einem Temperaturbereich zwischen 15 °C und 45 °C aufgrund der höheren Enzymstabilität in diesem Bereich durchgeführt wurden. Bezüglich der Enzymstabilität zeigte die CPO ihr Maximum bei der klassischen Methode bei einem pH-Wert zwischen 4 und 5, wohingegen hier ein genaueres Optimum ermittelt werden konnte.

Zur Bestimmung einer Parametereinstellung, die eine hohe Aktivität und eine möglichst gute Stabilität erzielt, wurde ebenso der „Sweet Spot“ verwendet [Eriksson, *et al.*, 2000]. Demnach wurde beispielweise bei einer geforderten Aktivität zwischen 11 und 13,6 U/mL sowie einer Halbwertszeit zwischen 133 und 239 Tage (Lagerungsstabilität) der in Abbildung 3.34 dargestellte „Sweet Spot“ erhalten. Der ermittelte Bereich der Parametereinstellungen ist rot unterlegt. Es lässt sich die geforderte Aktivität und Halbwertszeit zum Beispiel bei einer Temperatur von 38 °C und einem pH-Wert von 4,2 erzielen.

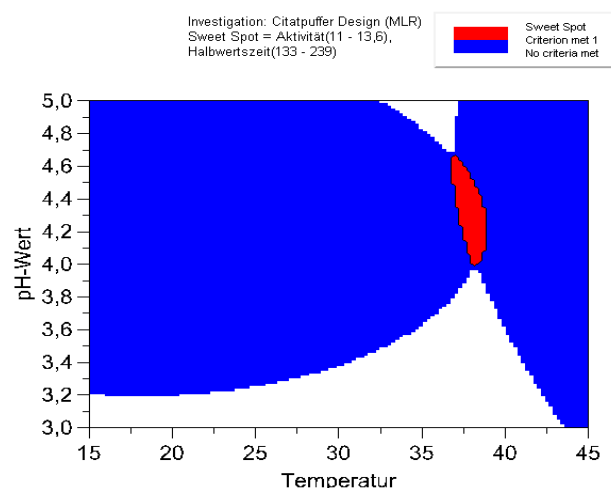


Abbildung 3.34: Die „Sweet Spot“-Analyse für die Aktivität und Stabilität der CPO in Citratpuffer mit einem maximalen geforderten Aktivität und Halbwertszeit in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

Untersuchung der Aktivität der CPO mittels des DOEs in einem Temperaturbereich zwischen 45 °C und 65 °C

Da der vorher untersuchte Temperaturbereich (15 °C–45 °C) das Optimum nicht umfasste, wurde ein weiterer Versuchsplan erstellt, indem 45 °C und 65 °C dem niedrigen bzw. dem hohen Level der Temperatur entsprechen. Die Einstellung des pH-Werts blieb gleich (3-5).

Die Messdaten wurden analog zu den oben aufgeführten Erklärungen analysiert. Die Güte und die Qualität der Messergebnisse wurden wie zuvor dem „Investigation Plot“ entnommen. Mit einem Wert nahe 1 ließen sich die experimentellen Ergebnisse als sehr reproduzierbar einstufen. Darüber hinaus wiesen sowohl R^2 als auch Q^2 sehr hohe Werte mit einer Abweichung von 0,09 auf (Abbildung 3.35). Demzufolge besaß das System eine sehr hohe Aussagekraft und die statistische Auswertung galt als sehr zuverlässig. Mit einem Wert von 0,76 lag die „Model validity“ weit über den mindestens geforderten 0,25. Das bedeutet, dass die Beziehung zwischen den Parametern und der Aktivität nicht mehr linear sondern gekrümmt ist, was im „Surface Plot“ zu erkennen war (Abbildung 3.36).

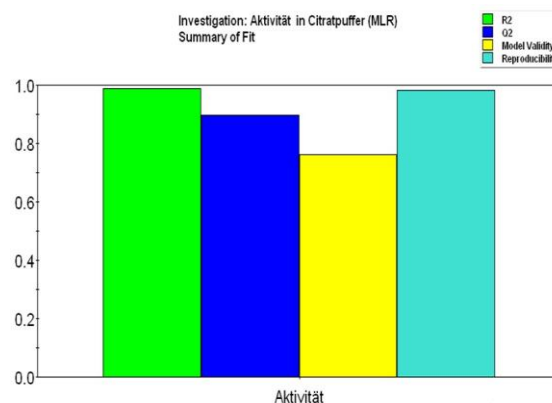


Abbildung 3.35: Der „Investigation Plot“ der Aktivität der CPO in Citratpuffer bei hohen Temperaturen (45 °C – 65 °C).

Die Analyse des „Normal Probability Plot of Residuals“ zeigte, dass es dabei keinen Ausreißer gab. Bei der Verwendung des „Sweet Spots“ wurden ebenso die Parameter-einstellungen für die optimale Aktivität ermittelt. Dabei handelte es sich um eine Temperatur von 59 °C und einen pH-Wert von 4. Demzufolge wich das hier ermittelte Temperatur-optimum lediglich um einen Grad von dem bei der klassischen Methode ermittelten Temperaturoptimum von 60 °C ab. Der optimale pH-Wert stimmte mit dem bei der

klassischen Methode ermittelten Wert überein. Jedoch unterschied sich das bei diesem System bestimmte pH-Optimum von dem bei niedrigen Temperaturen erhaltenen (pH 4,5), was auf die gegenseitige Beeinflussung der Faktoren hinweist. Im „Interaction Plot“ der Aktivität und der Stabilität des ersten Systems wurde bereits festgestellt, dass der Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität und die Stabilität der CPO bei niedrigen Temperaturen sehr hoch ist und sich bei einer Erhöhung der Temperatur verringert.

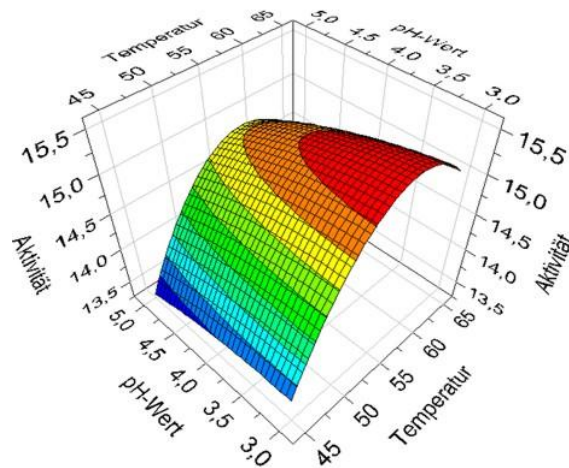


Abbildung 3.36: Der „Surface Plot“ der Aktivität der CPO in Citratpuffer bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C).

Zusammenfassend konnten verschiedene Kombinationen der Faktoren etabliert werden, die eine hohe Aktivität oder Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen beiden Größen erzielen (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: Die durch das DOE erhaltene Kombination von Temperatur und pH für eine optimale Aktivität, Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen beiden Größen in Citratpuffer.

	Temperatur [°C]	pH-Wert [-]
Aktivitätsoptimum bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C)	59	4
Aktivitätsoptimum bei niedrigen Temperaturen (15 °C-45 °C)	45	4,5
Stabilitätsoptimum	15	4,2
Balance zwischen Aktivität und Stabilität	38	4,2

Untersuchung der Katalysatorproduktivität in Citratpuffer

Bei dem Einsatz eines Enzyms in technischen Anwendungen spielt nicht die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion die entscheidende Rolle sondern die Produktivität des Enzyms ($\text{mg}_{\text{Produkt}}/\text{mg}_{\text{Enzym}}$). Um zu ermitteln, für welche durch das DOE erhaltenen Temperatur- und pH-Bedingungen sich eine maximale Katalysatorproduktivität ergibt, wurde diese für die CPO in Form von weiteren Experimenten bestimmt. Die Reaktion erfolgte bei einer Pyrogallol- und H_2O_2 -Konzentration von 10 mM bzw. 4 mM in 1 mL Reaktionsvolumen. Wie die Ergebnisse zeigen (Abbildung 3.37), wurde die maximale Produktivität bzw. maximal gebildete Produktmenge bei einer Temperatur von 59 °C und einem pH-Wert von 4 erzielt. Bei der Parameterkombination, die dem Stabilitätsoptimum der CPO entspricht, wurden lediglich 65 % der maximalen Produktivität erhalten. Dagegen wurden 87 % der Produktivität bei optimalen Aktivitätsbedingungen für den niedrigen Temperaturenbereich ermittelt (45 °C, pH 4,5). Infolgedessen nahm die Katalysatorproduktivität mit einer geringer werdenden Temperatur weiter ab. Der Grund dafür liegt in der Reaktionsgeschwindigkeit und der Inaktivierung des Enzyms durch H_2O_2 oder andere Reaktionsbedingungen. Im Allgemeinen benötigt eine Reaktion bei niedrigen Temperaturen längere Zeit, um die gleiche Produktivität wie bei erhöhten Temperaturen zu erzielen. Jedoch besteht dabei die Möglichkeit, dass das Enzym mit der Zeit durch die Reaktionsbedingungen inaktiviert wird. Im Fall der CPO sorgt die Anwesenheit von H_2O_2 zusätzlich für eine Inaktivierung und somit für eine geringere Produktbildung [Van Deurzen, *et al.*, 1997; Park und Clark, 2006; Valderrama, *et al.*, 2002; Grey, *et al.*, 2008].

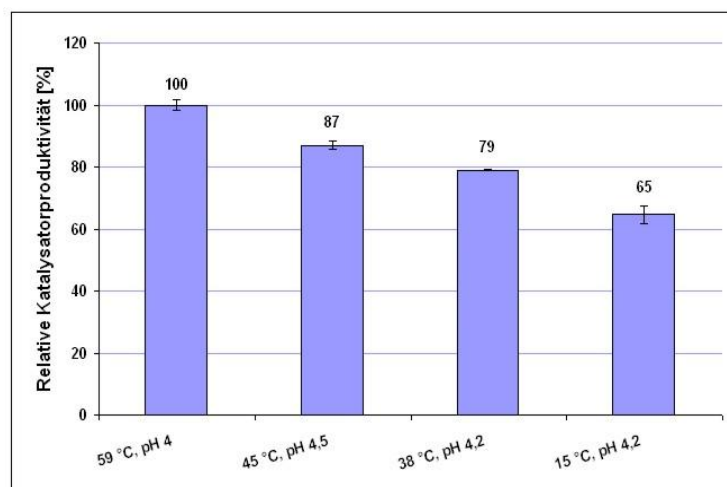


Abbildung 3.37: Die relative CPO-Produktivität bei den durch das DOE erhaltenen Parameterkombinationen für eine optimale Aktivität, Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen beiden Größen in Citratpuffer.

3.4.2 Untersuchung der Aktivität und Stabilität der CPO in Anwesenheit wassermischbarer Lösungsmittel

Die Aktivität sowie die Stabilität der CPO wurden in einem Ansatz, der 20 % Lösungsmittel enthielt, untersucht. Dabei wurde die Aktivität der CPO ebenfalls in einem Temperaturbereich zwischen 15 °C und 45 °C, in dem das Enzym eine höhere Stabilität aufweist, und in einem Temperaturbereich zwischen 45 °C und 65 °C, der das Temperaturoptimum der Peroxidase-Aktivität umfasst, analysiert. Bei den untersuchten Lösungsmitteln handelte es sich um DMSO, Isopropanol, Dioxan, Acetonitril und DMF.

DMSO

Zunächst wurde die Aktivität und Stabilität der CPO zwischen 15 °C und 45 °C ermittelt. Aus dem „Investigation Plot“ ist zu erkennen, dass alle Kennzeichen im Rahmen der Referenzwerte lagen (Abbildung 3.38). Sowohl bei der Aktivität als auch bei der Stabilität besaß das System eine sehr hohe Vorhersagekraft und eine sehr gute Reproduzierbarkeit. Die „Model validity“-Werte (0,59 für die Aktivität und 0,78 für die Halbwertszeit) lagen ebenso weit über den mindestens geforderten 0,25. Darüber hinaus gab es keinen Ausreißer.

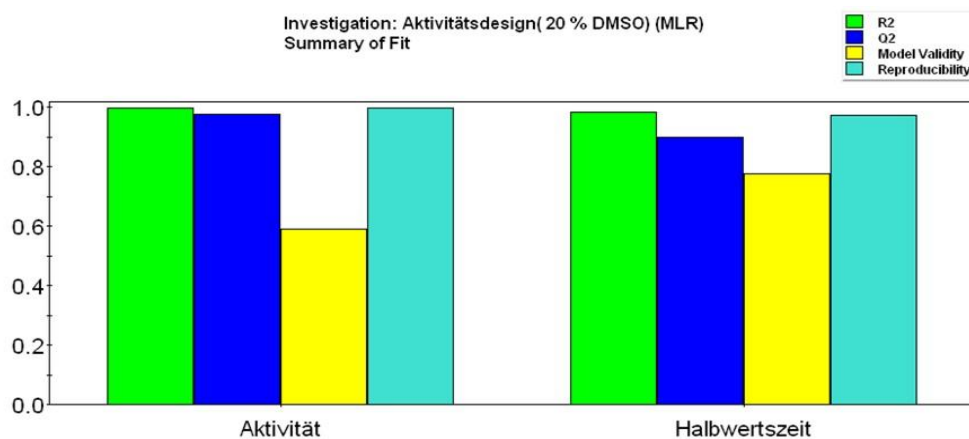


Abbildung 3.38: Der „Investigation Plot“ von der Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % DMSO in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

Die erhaltenen „Contour Plots“ und „Surface Plots“ für die Aktivität und Stabilität der CPO in 20 % DMSO sind in den Abbildungen 3.39 bzw. 3.40 zu sehen. Die optimalen Bedingungen für das Aktivitäts- und das Stabilitätsoptimum im Rahmen der Faktoreneinstellungen wurden

mittels des „Sweet Spots“ ermittelt. Die beste Aktivität wurde dabei bei einer Temperatur von 45 °C und einem pH-Wert von 4,8 erzielt. Das Enzym war dagegen am stabilsten bei einer Parameterkombination von 15 °C und pH 4,2.

Der pH-Wert für das Aktivitätsoptimum unterscheidet sich demnach geringfügig von dem im Citratpuffer erhaltenen pH 4,5. Dennoch wurde die höhere Stabilität der CPO in 20 % DMSO und in Citratpuffer bei den gleichen Bedingungen (15 °C, pH 4,2) erzielt. Mithilfe des „Sweet Spots“ wurde ebenso eine Kombination der Faktoren von 38 °C und pH 4,2 ermittelt, die eine hohe Aktivität und gleichzeitig gute Stabilität bietet.

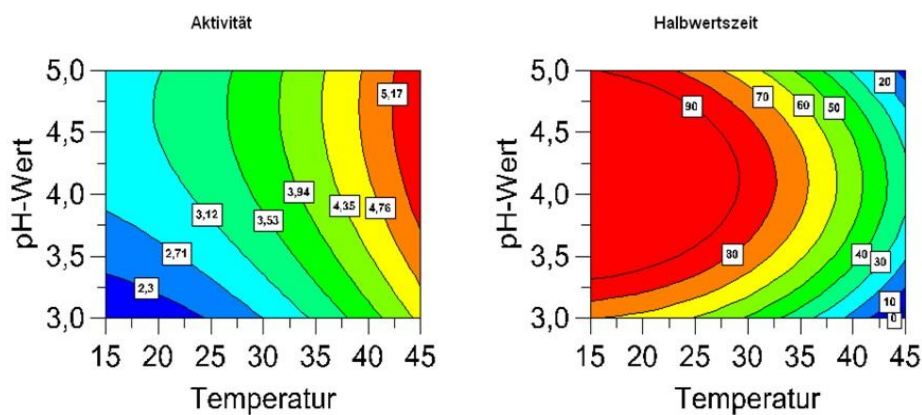


Abbildung 3.39: Der „Contour Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % DMSO in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

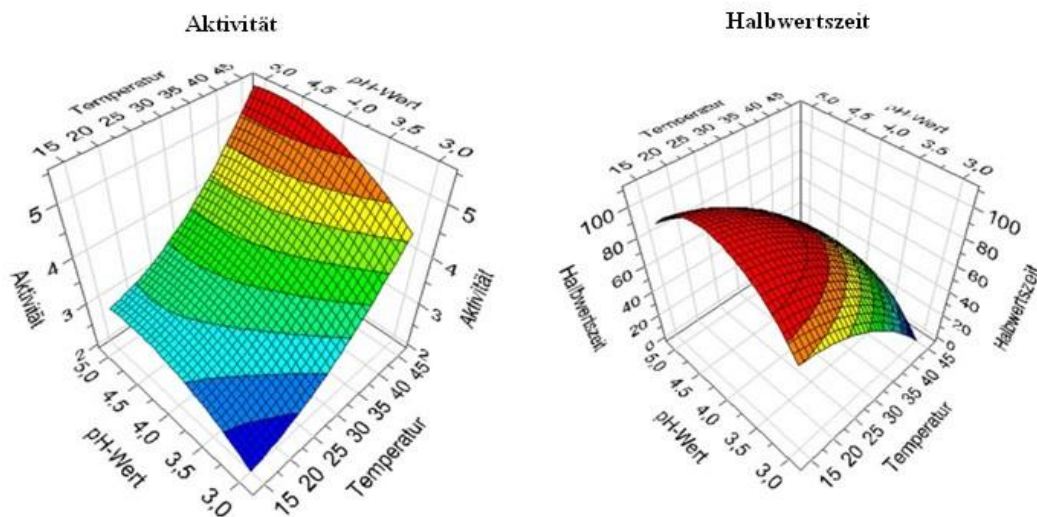


Abbildung 3.40: Der „Surface Plot“ der Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % DMSO in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

Einen Überblick der gegenseitigen Beeinflussung der Parameter (Temperatur, pH-Wert) gibt der „Interaction Plot“ (Abbildung 3.41). Hinsichtlich der Aktivität konnte keine gegenseitige Beeinflussung der Faktoren ermittelt werden, während der Einfluss des pH-Werts auf die Halbwertszeit bei niedrigen Temperaturen größer als bei hohen Temperaturen war.

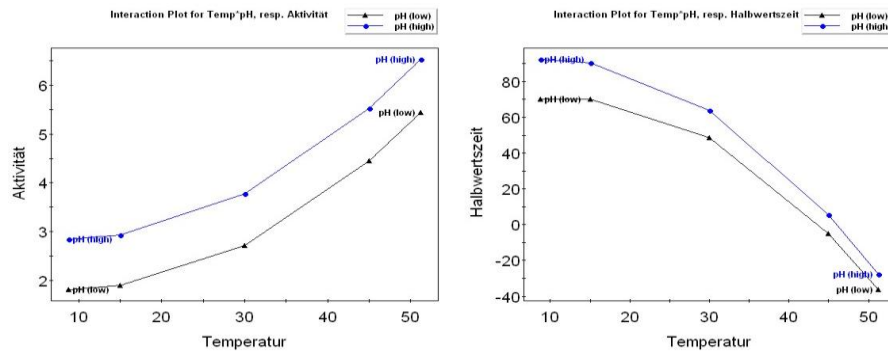


Abbildung 3.41: Der „Interaction Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % DMSO in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

Bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C) wurde ebenfalls ein System mit hoher Vorhersagekraft (0,96), hoher Reproduzierbarkeit (0,98) und einem sehr hohen „Model validity“-Wert von 0,89 erhalten. Des Weiteren wurden keine Ausreißer ermittelt. Der erhaltene „Contour Plot“ und „Surface Plot“ kann der Abbildung 3.42 entnommen werden. Das Aktivitätsoptimum wurde in diesem Rahmen der Parametereinstellungen bei einer Temperatur von 65 °C und bei einem pH-Wert von 3,8 erzielt. Im Vergleich zum Citratpuffer unterschied sich der optimale pH-Wert nur leicht, während das Temperaturoptimum verglichen mit dem in reinem Puffer um 6 °C höher war. Das deutet darauf hin, dass die CPO durch die Zugabe von 20 % DMSO vor einer Temperaturinaktivierung geschützt wird.

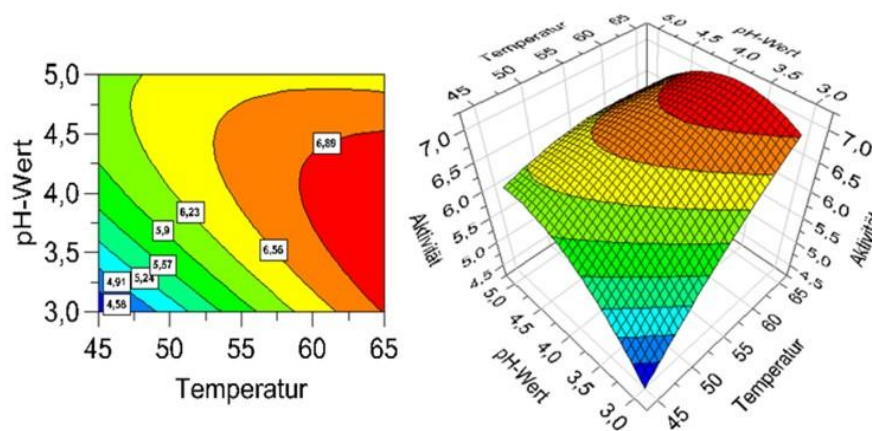


Abbildung 3.42: Der „Contour Plot“ und „Surface Plot“ der Aktivität der CPO in 20 % DMSO bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C).

Demzufolge ließen sich folgende optimale Bedingungen für die Aktivität und Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen den beiden Größen in 20 % DMSO ermitteln (Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8: Die durch das DOE erhaltene Faktorenkombination für eine optimale Aktivität, Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen beiden Größen in 20 % DMSO.

	Temperatur [°C]	pH-Wert [-]
Aktivitätsoptimum bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C)	65	3,8
Aktivitätsoptimum bei niedrigen Temperaturen (15 °C-45 °C)	45	4,8
Stabilitätsoptimum	15	4,2
Balance zwischen Aktivität und Stabilität	38	4,2

Untersuchung der Katalysatorproduktivität in 20 % DMSO

Die Katalysatorproduktivität wurde bei den in Tabelle 3.8 zusammengefassten Parameterkombinationen ermittelt (Abbildung 3.43). Im Gegensatz zum Citratpuffer wurde hierbei die maximale Katalysatorproduktivität bei der Faktorenkombination, die eine maximale Stabilität liefert, erzielt. Dagegen wurde die geringste Katalysatorproduktivität bei der Parametereinstellung (65 °C, pH 3,8) erhalten, die eine maximale Aktivität bei hohen Temperaturen gefördert hat. Da es sich hierbei nicht um die Reaktionsanfangsgeschwindigkeit sondern um die Produktivität handelt, lässt sich sagen, dass die Reaktion bei 65 °C zunächst schnell läuft und dann eine rasche Inaktivierung des Enzyms durch die hohe Temperatur erfolgt. Aus diesem Grund ist die Produktivität bei der Kombination (65 °C, pH 3,8) geringer als bei den anderen. Die beschriebene Enzyminaktivierung trat bei einer Temperatur von 45 °C bzw. 38 °C in einem geringeren Ausmaß ein, wobei die Katalysatorproduktivität dabei 95 bzw. 96 % des maximalen Wertes erreichte. Der pH-Wert spielte hierbei keine entscheidende Rolle.

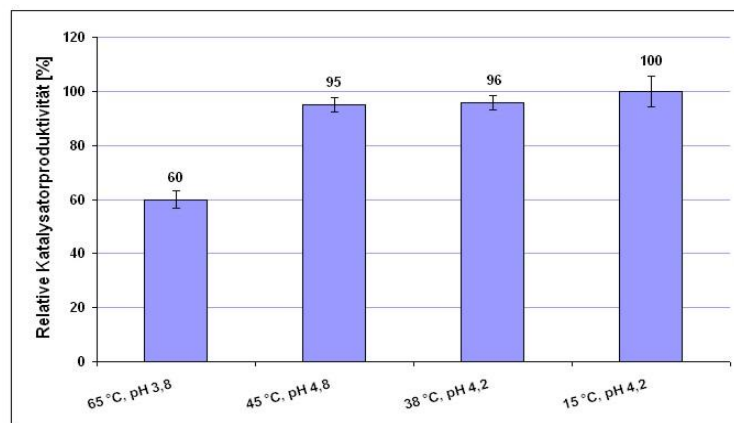


Abbildung 3.43: Die relative CPO-Produktivität bei den durch das DOE erhaltenen Parameterkombinationen für eine optimale Aktivität, Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen beiden Größen in 20 % DSMO.

Isopropanol

Zunächst wurden die Aktivität und Stabilität der CPO bei niedrigen Temperaturen (15 °C-45 °C) ermittelt. Bei dem „Investigation Plot“ der Aktivität befanden sich die Indikatorenwerte innerhalb des Referenzbereichs. Das System zeigte dabei eine hohe Aussagekraft (0,93) und gute Reproduzierbarkeit (0,99) (Abbildung 3.44). Bei der Stabilität besaß das System zwar eine gute Vorhersagekraft und Reproduzierbarkeit, jedoch stimmte der „Model validity“-Wert nicht mit dem Referenzwert überein, was ebenso aus dem „Surface Plot“ zu erkennen ist. Der „Contour Plot“ und der „Surface Plot“ für die Aktivität und Stabilität der CPO sind in den Abbildungen 3.45 und 3.46 gezeigt.

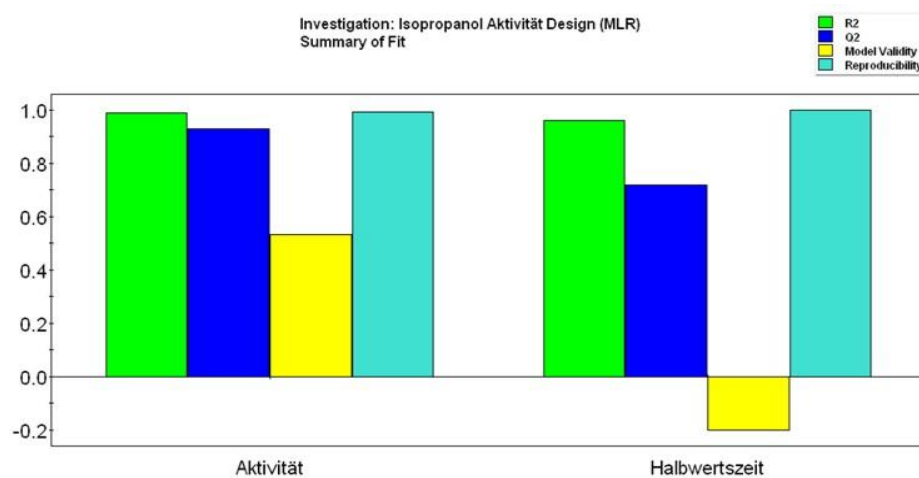


Abbildung 3.44: Der „Investigation Plot“ der Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Isopropanol in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

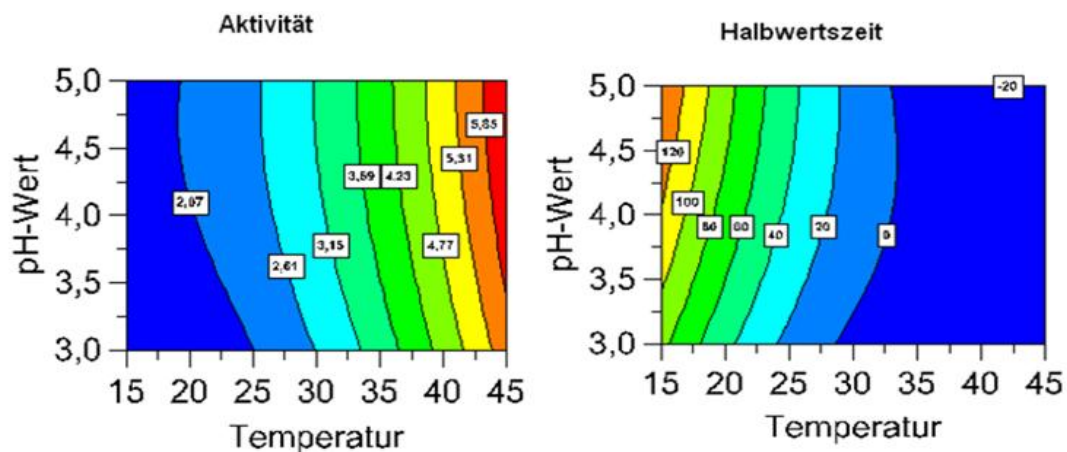


Abbildung 3.45: Der „Contour Plot“ der Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Isopropanol in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

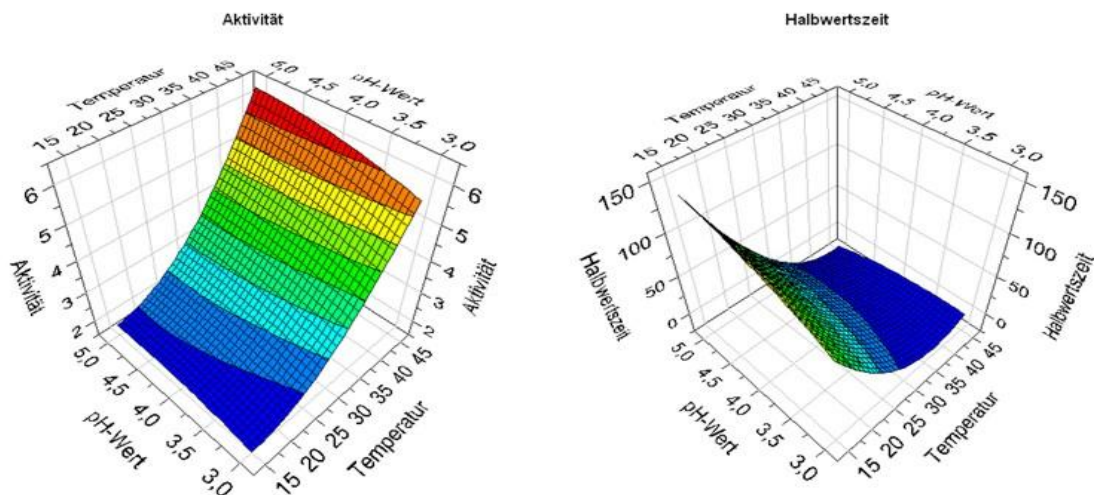


Abbildung 3.46: Der „Surface Plot“ der Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Isopropanol in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

Mithilfe des „Sweet Spots“ wurden die optimalen Bedingungen für die Aktivität und Stabilität der CPO ermittelt. Die höchste Aktivität wurde dabei bei einer Temperatur von 45 °C und einem pH-Wert von 4,8 erzielt, während das Enzym bei einer Parameterkombination von 15 °C und pH 4,8 am stabilsten war.

Wie bereits bei DMSO konnte auch bei Isopropanol keine bedeutende gegenseitige Beeinflussung der Faktoren auf die Aktivität der CPO beobachtet werden. Dagegen war bei der Halbwertszeit eine deutliche gegenseitige Beeinflussung vom pH-Wert und der

Temperatur zu erkennen. Der Einfluss des pH-Wertes auf die Halbwertszeit bei niedrigen Temperaturen war demnach stärker als bei hohen Temperaturen (Abbildung 3.47).

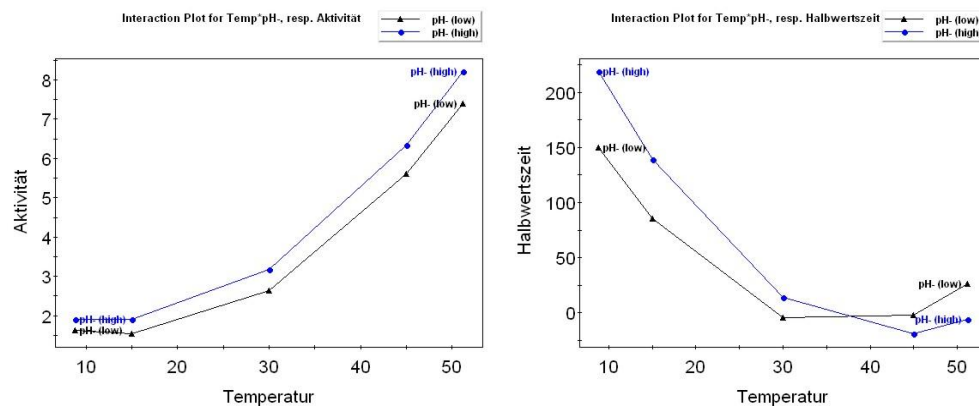


Abbildung 3.47: Der „Interaction Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Isopropanol in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

Bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C) wurde ebenso ein sehr gutes System in 20 % Isopropanol erhalten, indem die vier Kennzeichen des „Investigation Plots“ einen Wert von nahezu 1 besitzen (Abbildung 3.48). Das System zeigte eine hohe Vorhersagekraft (0,94), hohe Reproduzierbarkeit (0,97) und einen hohen „Model validity“-Wert von 0,942. Das Aktivitätsoptimum wurde in diesem Rahmen der Parametereinstellungen bei einer Temperatur von 58 °C und einem pH-Wert von 4 ermittelt.

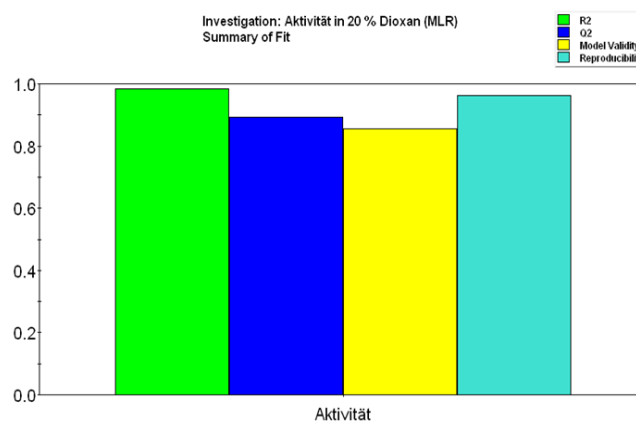


Abbildung 3.48: Der „Investigation Plot“ von der Aktivität der CPO in 20 % Isopropanol bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C).

Die optimalen Bedingungen für die Aktivität und Stabilität der CPO in 20 % Isopropanol sind in Tabelle 3.9 zusammengefasst.

Tabelle 3.9: Die durch das DOE erhaltenen Faktorenkombinationen für eine optimale Aktivität und Stabilität der CPO in 20 % Isopropanol.

	Temperatur [°C]	pH-Wert [-]
Aktivitätsoptimum bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C)	58	4
Aktivitätsoptimum bei niedrigen Temperaturen (15 °C-45 °C)	45	4,8
Stabilitätsoptimum	15	4,8

Untersuchung der Katalysatorproduktivität in 20 % Isopropanol

Die Katalysatorproduktivität wurde bei den Bedingungen für die optimale Aktivität und Stabilität der CPO in 20 % Isopropanol untersucht. Die maximale Produktivität wurde dabei bei der Parameterkombination 58 °C und pH 4 erzielt (Abbildung 3.49). Dagegen wurde die geringste Katalysatorproduktivität bei der Parametereinstellung 45 °C und pH 4,8 erhalten. Grund dafür kann die Inaktivierung des Enzyms während der Reaktion sein. Bei einer Temperatur von 58 °C läuft die Reaktion zunächst sehr schnell ab, im Anschluss wird das Enzym durch die hohe Temperatur inaktiviert. Jedoch führt diese Anfangsreaktionsgeschwindigkeit zu einer höheren Produktbildung als bei einer Temperatur von 45 °C. Bei 15 °C läuft die Reaktion zwar langsam ab, jedoch weist das Enzym bei diesen Bedingungen eine höhere Stabilität auf, woraus sich eine gute Produktivität des Enzyms ergibt.

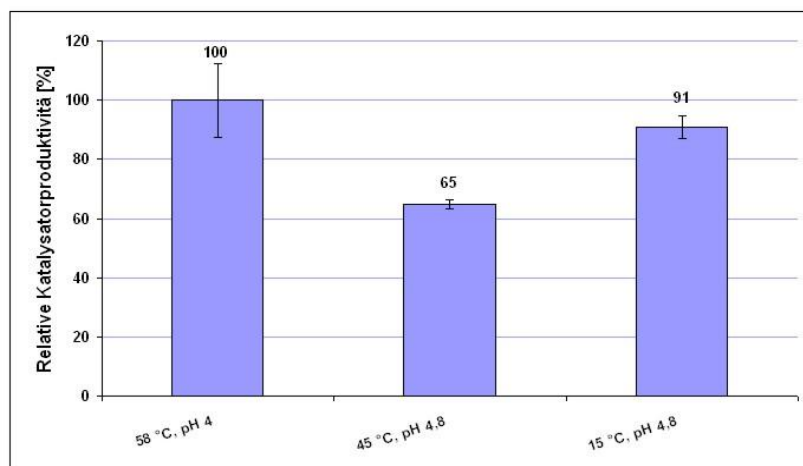


Abbildung 3.49: Die relative CPO-Produktivität bei den durch das DOE erhaltenen Parameterkombinationen für eine optimale Aktivität und Stabilität der CPO in 20 % Isopropanol.

Dioxan

In 20 % Dioxan zeigte das System sowohl bei der Aktivität als auch bei der Stabilität der CPO bei niedrigen Temperaturen (15 °C-45 °C) eine gute Reproduzierbarkeit, jedoch entsprach die Modellgültigkeit nicht dem Referenzwert. Die Vorhersagekraft war bei dem Aktivitätssystem sehr gut im Gegensatz zu der bei der Stabilität.

Die dabei erhaltenen „Contour Plots“ und „Surface Plot“ für die Aktivität und Stabilität der CPO sind in den Abbildungen 3.50 bzw. 3.51 dargestellt. Aus dem „Surface Plot“ ist ersichtlich, dass die Fläche sowohl bei der Aktivität als auch bei der Stabilität nicht gekrümmt ist. Dies erklärt, warum die Modellgültigkeit dem Referenzwert nicht entsprach.

Die optimalen Parameterkombinationen für die Aktivität und die Stabilität der CPO im Rahmen der Faktoreneinstellungen wurden mithilfe des „Sweet Spots“ ermittelt. Somit wurde die optimale Aktivität bei einer Temperatur von 45 °C und einem pH-Wert von 4,2 erzielt. Dagegen war das Enzym bei der Parameterkombination von 15 °C und pH 4,8 am stabilsten. Eine Balance zwischen der Aktivität und der Stabilität der CPO wurde bei einer Temperatur von 32 °C und einem pH-Wert von 4,2 erhalten.

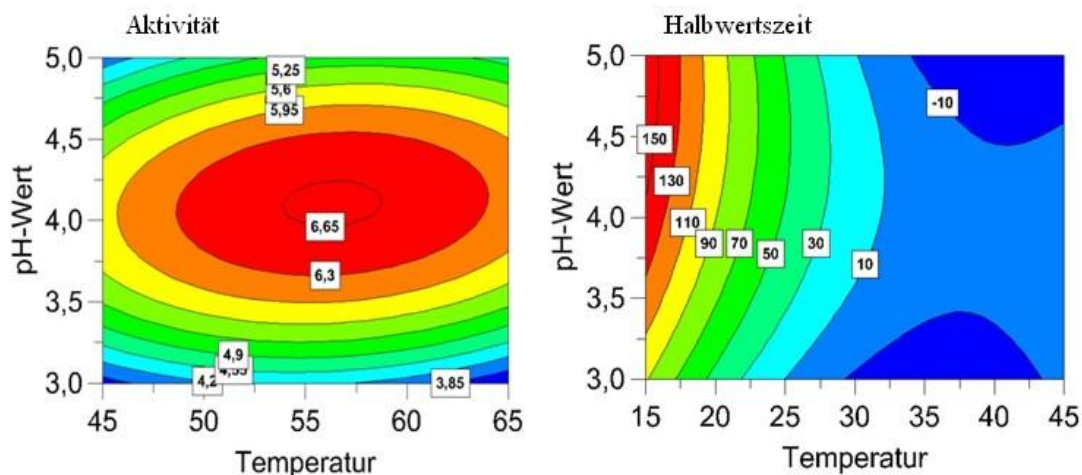


Abbildung 3.50: Der „Contour Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Dioxan in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

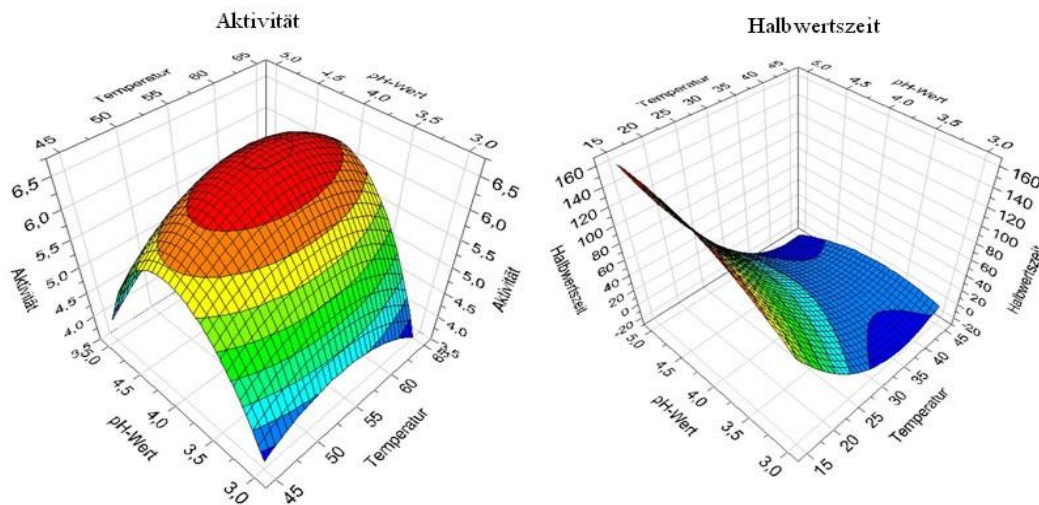


Abbildung 3.51: Der „Surface Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Dioxan in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

Die gegenseitige Beeinflussung der Faktoren war sowohl bei der Aktivität als auch bei der Halbwertszeit zu erkennen (Abbildung 3.52). Im Gegensatz zu der gegenseitigen Beeinflussung der Parameter in Citratpuffer übt der pH-Wert hier bei niedrigen Temperaturen einen geringen Einfluss auf die Aktivität der CPO aus, gewinnt dann mit zunehmender Temperatur jedoch stärker an Bedeutung. Im Gegensatz dazu ist der Einfluss des pH-Werts auf die Halbwertszeit der CPO bei niedrigen Temperaturen größer im Vergleich zu dem bei hohen Temperaturen.

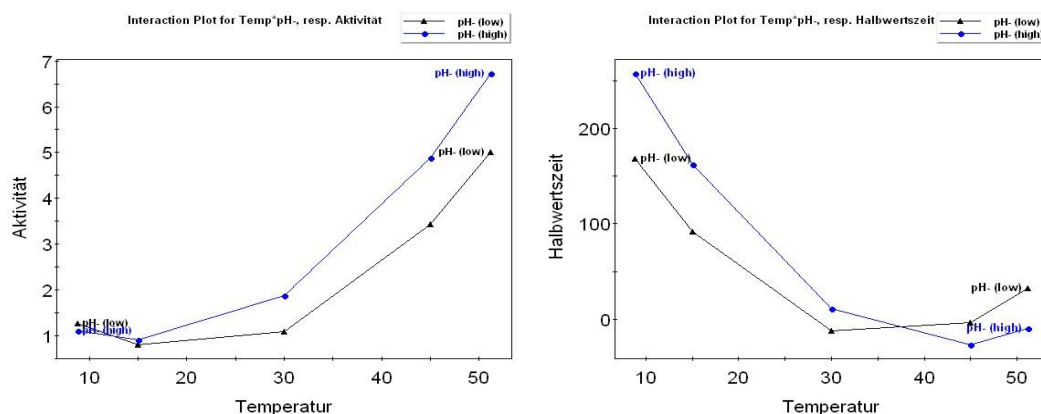


Abbildung 3.52: Der „Interaction Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Dioxan in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

Bei der Untersuchung der Aktivität der CPO in 20 % Dioxan im Bereich hoher Temperaturen (45 °C-65 °C) wurde ein besseres System erhalten, in dem alle Indikatoren des „Investigation

Plots“ im Bereich der Referenzwerte liegen (Abbildung 3.53). Das System zeigte sowohl eine sehr gute Vorhersagekraft (0,9) als auch eine sehr gute Reproduzierbarkeit (0,95). Darüber hinaus war der „Model validity“-Wert sehr hoch (0,85).

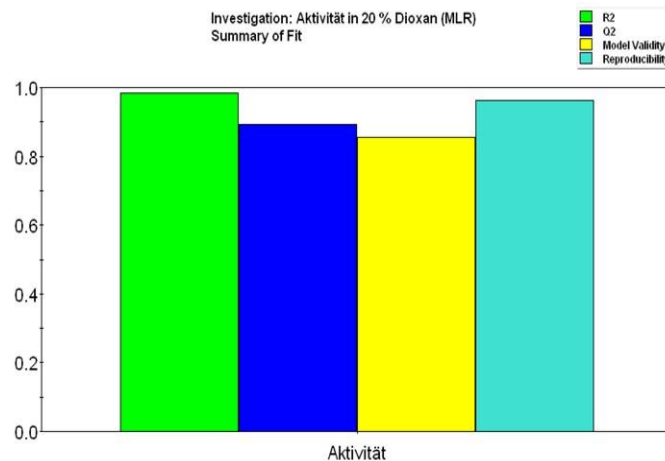


Abbildung 3.53: Der „Investigation Plot“ der Aktivität der CPO in 20 % Dioxan bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C).

Die entsprechenden „Contour und Surface Plots“ sind in der Abbildung 3.54 präsentiert. Bei diesem System wurde die maximale Aktivität der CPO bei einer Temperatur von 56 °C und einem pH-Wert von 4 erreicht. Somit unterscheidet sich die hier erhaltene optimale Temperatur von der in Citratpuffer. Somit führte die Anwesenheit von Dioxan zu einer Reduzierung des Temperaturoptimums um 3 °C.

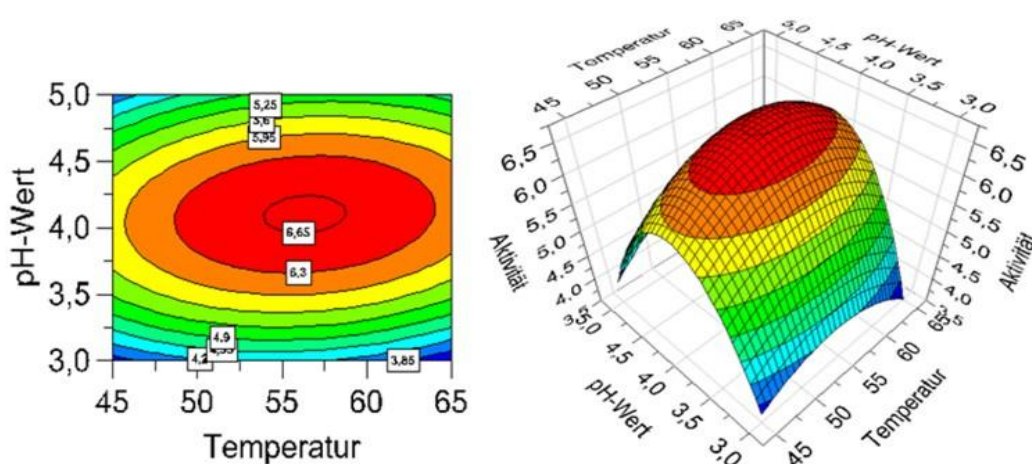


Abbildung 3.54: Der „Contour Plot“ und der „Surface Plot“ der Aktivität der CPO in 20 % Dioxan bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C).

Letztendlich wurden die Faktorenkombinationen für eine optimale Aktivität und Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen beiden Größen in 20 % Dioxan ermittelt (Tabelle 3.10).

Tabelle 3.10: Die durch das DOE erhaltene Faktorenkombination für eine optimale Aktivität, Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen beiden Größen in 20 % Dioxan.

	Temperatur [°C]	pH-Wert [-]
Aktivitätsoptimum bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C)	56	4
Aktivitätsoptimum bei niedrigen Temperaturen (15 °C-45 °C)	45	4,2
Stabilitätsoptimum	15	4,8
Balance zwischen der Aktivität und Stabilität	32	4,2

Untersuchung der Katalysatorproduktivität in 20 % Dioxan

Die Katalysatorproduktivität wurde bei den Parameterkombinationen, die in Tabelle 3.10 gezeigt sind, in 20 % Dioxan untersucht. Dabei wurde die höchste Katalysatorproduktivität bei einer Temperatur von 45 °C und einem pH-Wert von 4,2 erhalten (Abbildung 3.55). Bei der Parameterkombination für eine optimale Aktivität bei hohen Temperaturen (56 °C, pH 4) wurden lediglich 89 % der optimalen Produktivität erhalten. Die geringste Katalysatorproduktivität wurde dagegen bei optimalen Stabilitätsbedingungen erzielt. Obwohl bei 56 °C die maximale Anfangsreaktionsgeschwindigkeit des Enzyms erzielt wurde, ist die Produktivität bei dieser Temperatur geringer als bei 45 °C. Grund dafür ist die schnelle Inaktivierung des Enzyms bei 56 °C.

Die geringste Katalysatorproduktivität bei 15 °C kann nicht auf die thermische Inaktivierung des Enzyms sondern auf eine durch das Lösungsmittel und H₂O₂ hervorgerufene Inaktivierung zurückgeführt werden, da die Reaktion langsam abläuft.

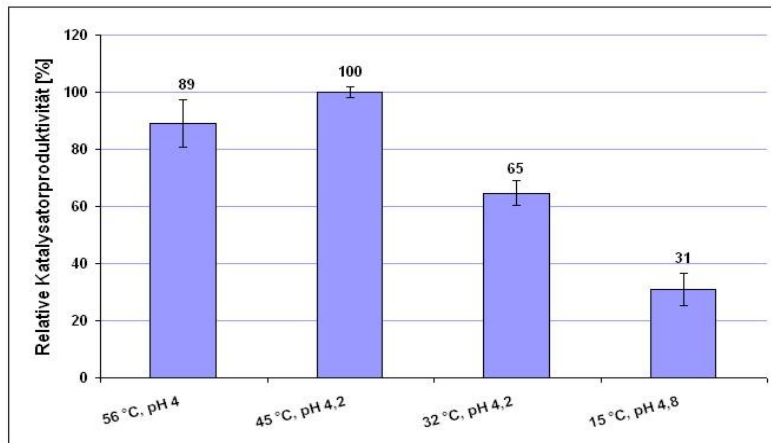


Abbildung 3.55: Die relative CPO-Produktivität bei den durch das DOE erhaltenen Parameterkombinationen für eine optimale Aktivität, Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen beiden Größen in 20 % Dioxan.

Acetonitril

In 20 % Acetonitril zeigte das System sowohl bei der Aktivität als auch bei der Stabilität bei niedrigen Temperaturen (15 °C-45 °C) eine gute Reproduzierbarkeit aber lediglich eine geringe Vorhersagekraft. Darüber hinaus entsprachen die Werte der Modellgültigkeit für die Aktivität sowie für die Stabilität den Referenzwerten nicht. Grund dafür ist, dass das quadratische Modell die Daten nicht anpassen kann. Dies kann man aus der dreidimensionalen Darstellung erkennen (Abbildung 3.56). In der Abbildung 3.57 ist dagegen die „Contour Plots“ der Aktivität und der Stabilität gezeigt.

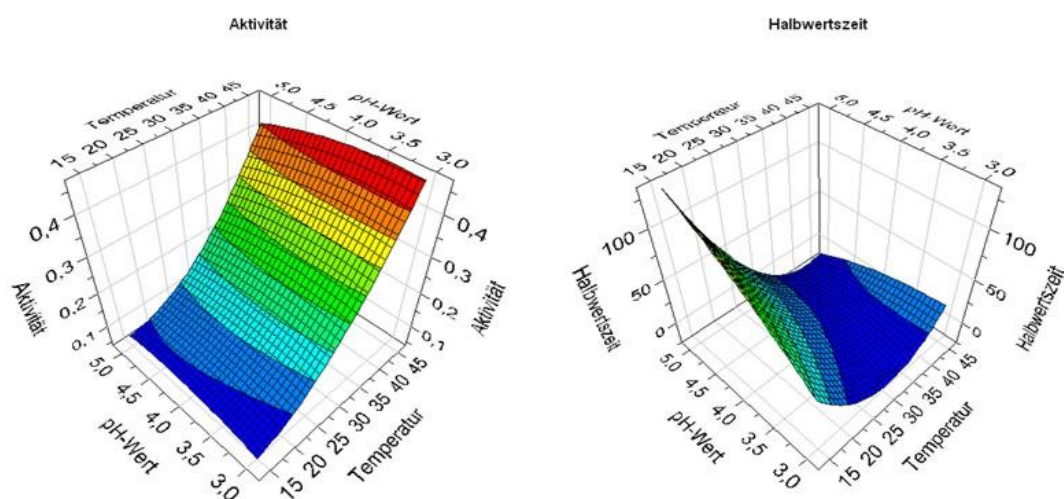


Abbildung 3.56: Der „Surface Plot“ der Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Acetonitril in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

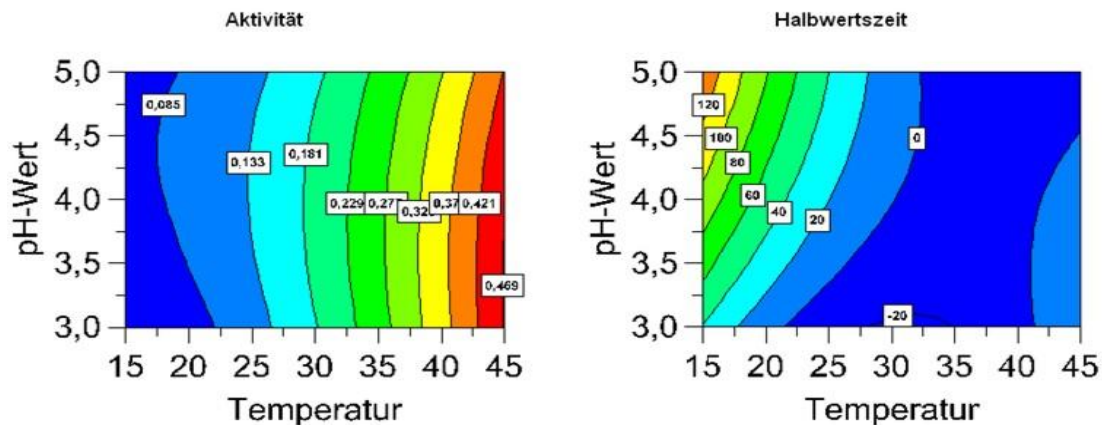


Abbildung 3.57: Der „Contour Plot“ der Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Acetonitril in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

Die optimalen Faktoreinstellungen für die Aktivität und die Stabilität der CPO wurden mittels des „Sweet Spots“ ermittelt. Im Rahmen der eingestellten Parameter wurde die optimale Aktivität bei 45 °C und pH 3,3 erzielt, während die beste Stabilität bei 15 °C und einem pH-Wert von 4,8 erhalten wurde. Eine Balance der Aktivität und Stabilität kann bei der Faktorenkombination von 31 °C und pH 4,5 erlangt werden.

Die gegenseitige Beeinflussung der Parameter in 20 % Acetonitril war bei der Halbwertszeit stärker als bei der Aktivität (Abbildung 3.58). Der pH-Wert zeigte bei niedrigen Temperaturen einen großen Einfluss auf die Halbwertszeit der CPO, welcher mit zunehmenden Temperaturen kleiner wird.

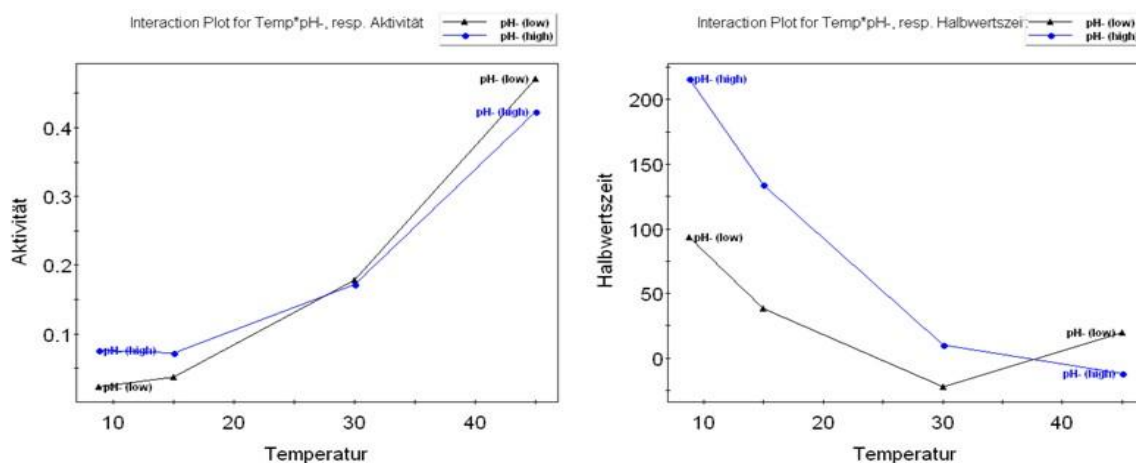


Abbildung 3.58: Der „Interaction Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % Acetonitril in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

Die Untersuchung der Aktivität der CPO bei hohen Temperaturen (45 °C–65 °C) führte zu einer deutlichen Verbesserung der Güte des Systems verglichen mit dem System bei niedrigen Temperaturen (15 °C–45 °C), was dem „Investigation Plot“ entnommen werden kann (Abbildung 3.59). Das System zeigte sowohl eine hohe Vorhersagekraft (0,9) als auch eine gute Reproduzierbarkeit (0,98). Mit einem Wert von 0,82 liegt die Modellgültigkeit ebenso sehr weit über den mindestens geforderten 0,25.

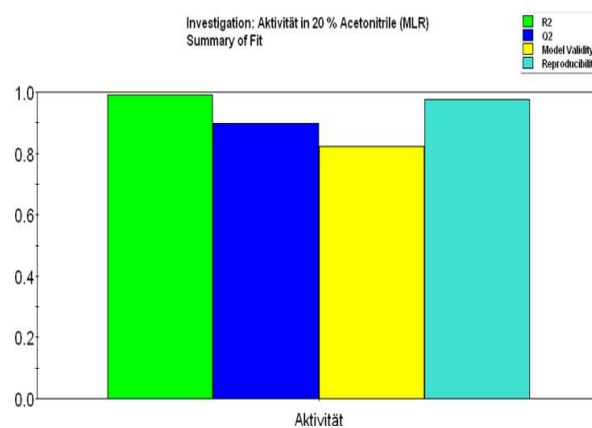


Abbildung 3.59: Der „Investigation Plot“ der Aktivität der CPO in 20 % Acetonitril bei hohen Temperaturen (45 °C–65 °C).

Die in 20 % Acetonitril bei hohen Temperaturen erlangten „Contour Plot“ und „Surface Plot“ sind in Abbildung 3.60 dargestellt.

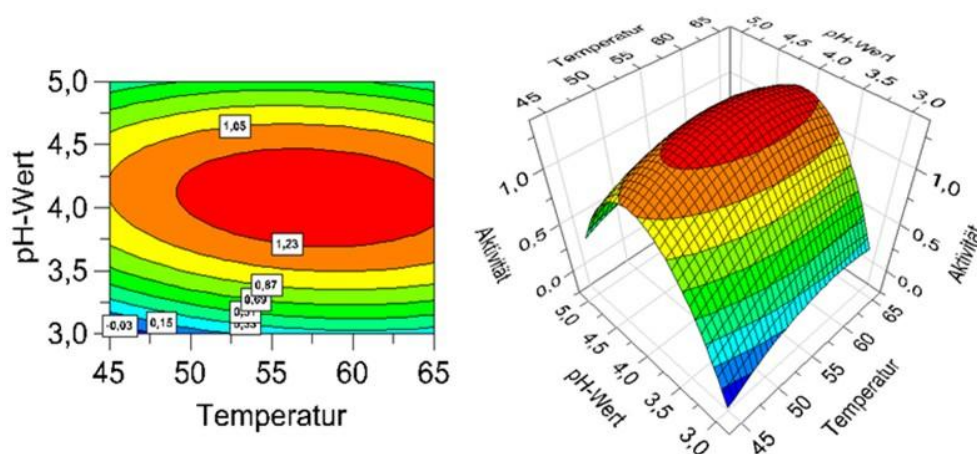


Abbildung 3.60: Der „Contour Plot“ und der „Surface Plot“ der Aktivität der CPO in 20 % Acetonitril bei hohen Temperaturen (45 °C–65 °C).

Die maximale Aktivität der CPO wurde in diesem System bei einer Temperatur von 57 °C und einem pH-Wert von 4 beobachtet. Demzufolge unterscheiden sich die optimalen Bedingungen für eine maximale Aktivität der CPO in 20 % Acetonitril nur geringfügig von den jeweiligen Optima in Citratpuffer. Schließlich wurden die optimalen Bedingungen für eine maximale Aktivität und Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen den beiden Größen in 20 % Acetonitril in der Tabelle 3.11 zusammengefasst.

Tabelle 3.11: Die durch das DOE erhaltene Faktorenkombinationen für eine optimale Aktivität, Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen beiden Größen in 20 % Acetonitril.

	Temperatur [°C]	pH-Wert [-]
Aktivitätsoptimum bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C)	57	4
Aktivitätsoptimum bei niedrigen Temperaturen (15 °C-45 °C)	45	3,3
Stabilitätsoptimum	15	4,8
Balance zwischen der Aktivität und Stabilität	31	4,5

Untersuchung der Katalysatorproduktivität in 20 % Acetonitril

Die Katalysatorproduktivität wurde bei den Parameterkombinationen, die in Tabelle 3.11 gezeigt sind, in 20 % Acetonitril untersucht. Dabei wurde die beste Katalysatorproduktivität bei einer Temperatur von 45 °C und einem pH-Wert von 3,3 erzielt (Abbildung 3.61). Die geringste Katalysatorproduktivität wurde dagegen bei optimalen Stabilitätsbedingungen erhalten. Bei der Parameterkombination für eine maximale Aktivität bei hohen Temperaturen (57 °C, pH 4) wurden lediglich 86 % der optimalen Produktivität erhalten. Die schnelle Inaktivierung des Enzyms bei 57 °C in 20 % Acetonitril ist der Grund für die geringere Katalysatorproduktivität bei dieser Temperatur verglichen mit der bei 45 °C. Die geringste Katalysatorproduktivität bei 15 °C lässt sich nicht auf die Inaktivierung der CPO durch die Temperatur sondern auf die Inaktivierung durch das Lösungsmittel und H₂O₂ zurückführen, da die Reaktion langsamer als bei den anderen Temperaturen abläuft.

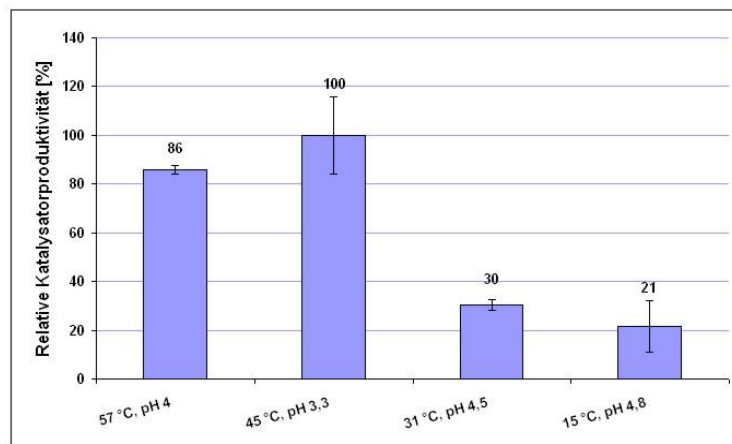


Abbildung 3.61: Die relative CPO-Produktivität bei den durch das DOE erhaltenen Parameterkombinationen für eine optimale Aktivität, Stabilität der CPO bzw. eine Balance zwischen beiden Größen in 20 % Acetonitril.

DMF

In 20 % DMF zeigte das System sowohl bei der Aktivität als auch bei der Stabilität eine gute Reproduzierbarkeit. Die Vorhersagekraft des Systems bei der Stabilität liegt zwar über den Referenzwerten aber der Unterschied R^2 - Q^2 ist um 0,09 größer als der des Referenzbereichs. Des Weiteren ist der Wert der Modellgültigkeit bei der Aktivität größer als der Grenzwert im Gegensatz zum Wert der Stabilität, der unter den geforderten 0,25 liegt. Die „Surface und Contour Plots“ für die Aktivität und Stabilität der CPO in 20 % DMF sind in Abbildung 3.62 bzw. Abbildung 3.63 gezeigt.

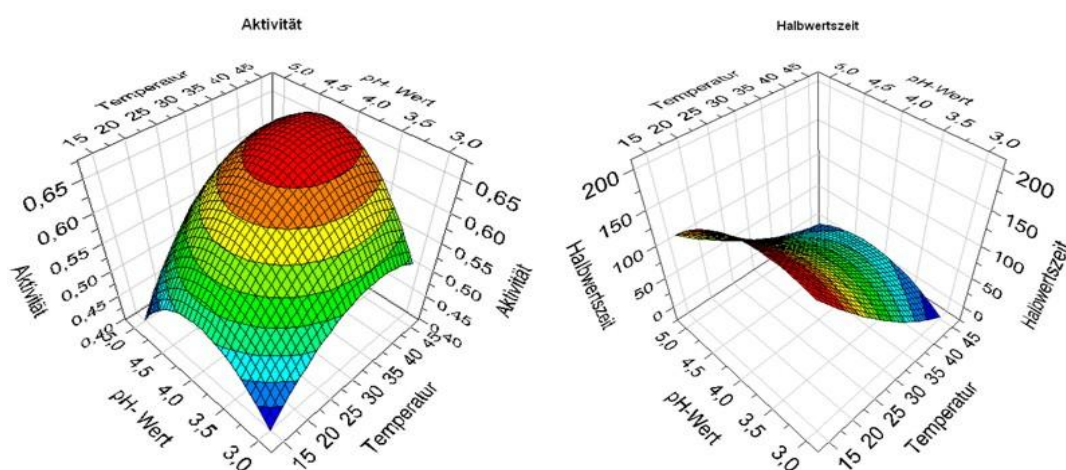


Abbildung 3.62: Der „Surface Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % DMF in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

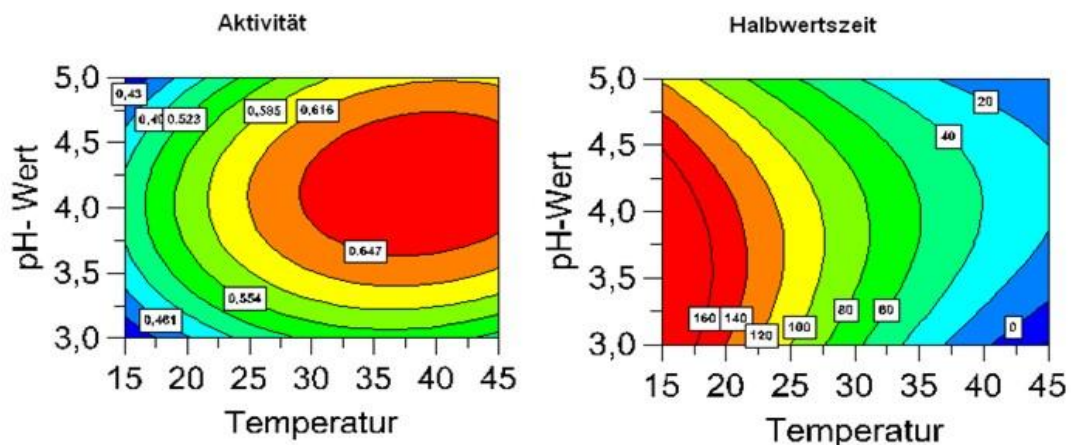


Abbildung 3.63: Der „Contour Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % DMF in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

Der Einfluss des pH-Wertes sowohl auf die Aktivität als auch auf die Halbwertszeit der CPO in 20 % DMF ist bei niedrigen Temperaturen sehr signifikant. Dieser Einfluss verringert sich mit zunehmender Temperatur, was auf die gegenseitige Beeinflussung der Parameter hindeutet (Abbildung 3.64)

Die in 20 % DMF ermittelte maximale Aktivität wurde bei einer Temperatur von 39 °C und einem pH-Wert von 4,2 erzielt, während das Enzym am stabilsten bei 15 °C und pH 4 war. Da die maximale Aktivität in 20 % DMF im Rahmen der niedrigen Temperaturen (15 °C-45 °C) erreicht wurde, bedurfte es keiner Untersuchung der Aktivität bei noch höheren Temperaturen.

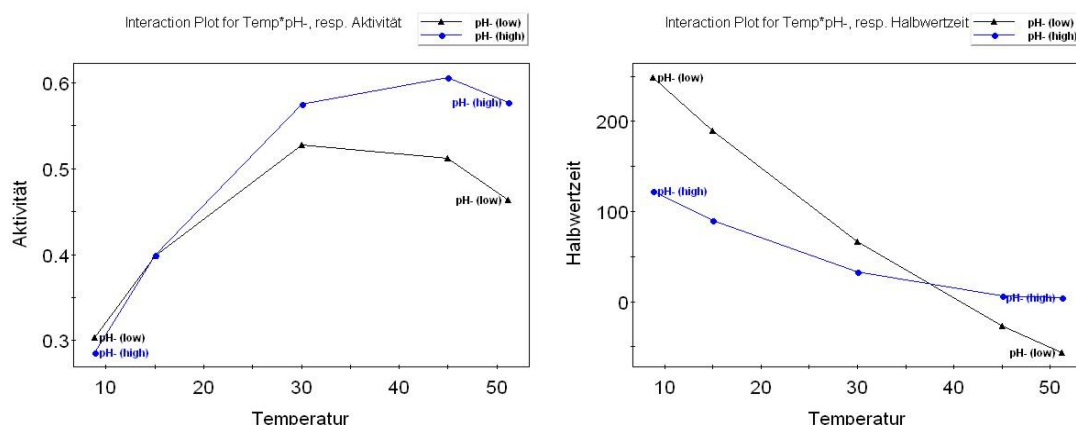


Abbildung 3.64: Der „Interaction Plot“ für die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der CPO in 20 % DMF in einem Temperaturbereich von 15-45 °C.

Untersuchung der Katalysatorproduktivität in 20 % DMF

Die Katalysatorproduktivität wurde bei den Bedingungen für eine maximale Aktivität und Stabilität der CPO untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.65 präsentiert. Die maximale Katalysatorproduktivität wurde dabei bei den Bedingungen für eine maximale Aktivität erzielt. Im Unterschied dazu wurden 74 % der maximalen Produktivität bei der Parameterkombination, bei der das Enzym am stabilsten war, erreicht, was mit der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit und der Inaktivierung des Enzyms während der Reaktion erklärt werden kann.

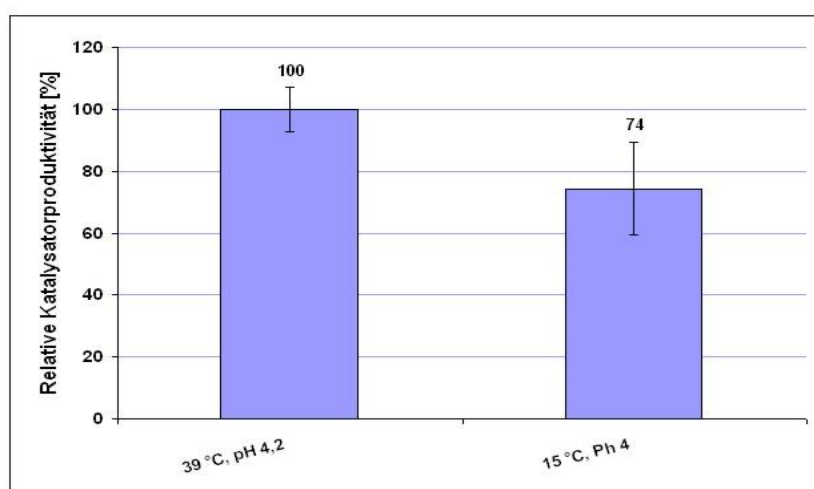


Abbildung 3.65: Die relative CPO-Produktivität bei den durch das DOE erhaltenen Parameterkombinationen für eine optimale Aktivität und Stabilität der CPO in 20 % DMF.

3.4.3 Vergleich der Enzymaktivitäten und -stabilitäten und der gegenseitigen Beeinflussung der Parameter in Puffer mit denen wassermischbaren organischen Lösungsmitteln

Basierend auf den Ergebnissen der einzelnen Versuche des Versuchsplans und ein Vergleich der erhaltenen „Contour plots“ und „Surface Plots“ bei allen untersuchten Medien lässt sich sagen, dass sowohl die maximale Aktivität als auch die maximale Stabilität der CPO in Citratpuffer erzielt wurde. In den untersuchten organischen Lösungsmitteln wurde die maximale Aktivität der CPO in Isopropanol und in DMSO erhalten, wobei die Aktivität in Isopropanol geringfügig größer war als in DMSO. Jedoch zeigte die CPO in DMSO eine

deutlich höhere Stabilität im Vergleich zu der in Isopropanol. Die CPO wies ihre geringste Aktivität und Stabilität in Acetonitril auf. Das Enzym war in Dioxan aktiver als in DMF, wohingegen die Enzymstabilität in DMF größer im Vergleich zu der in Dioxan war.

Ein Vergleich der bei allen untersuchten Lösungsmitteln erhaltenen „Interaction Plots“ zeigt, dass sich die Parameter sowohl bei der Aktivität als auch bei der Stabilität der CPO gegenseitig beeinflussen. Jedoch war diese Beeinflussung bei der Halbwertszeit stärker als bei der Aktivität. Bei niedrigen Temperaturen zeigte der pH-Wert sowohl in Citratpuffer als auch in allen untersuchten organischen Lösungsmitteln einen entscheidenden Einfluss auf die Halbwertszeit der CPO, welcher mit zunehmender Temperatur an Bedeutung verliert. Die gegenseitige Beeinflussung des pH-Wertes und der Temperatur bezüglich der Halbwertszeit war bei den verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedlich stark. Am stärksten war diese Interaktion in Acetonitril, wohingegen sie in DMSO am niedrigsten war. Das bedeutet, dass die Gegenwart von organischen Lösungsmitteln ebenso einen Einfluss auf die gegenseitige Beeinflussung des pH-Wertes und der Temperatur hat.

Im Gegensatz zu der Halbwertszeit, bei der der pH-Wert in allen untersuchten Medien einen entscheidenden Einfluss bei niedrigen Temperaturen gezeigt hat, wurden bei der Aktivität unterschiedliche Einflüsse erhalten. In Citratpuffer, DMF und Acetonitril zeigte der pH-Wert einen großen Einfluss auf die CPO-Aktivität bei niedrigen Temperaturen. Im Gegensatz dazu ist der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität in 20 % Dioxan bei hohen Temperaturen ausgeprägter als bei niedrigen Temperaturen. In DMSO und Isopropanol war die gegenseitige Beeinflussung des pH-Wertes und der Temperatur sehr gering. Diese unterschiedlichen Einflüsse weisen auf eine starke Interaktion zwischen dem pH-Wert, der Temperatur und den organischen Lösungsmitteln in ihren Einflüssen auf die Aktivität und Stabilität der CPO hin.

3.4.4 Vergleich der maximalen Katalysatorproduktivität [$m_{\text{Produkt}}/m_{\text{Enzym}}$] in Puffer mit der in wassermischbaren organischen Lösungsmitteln

Die Katalysatorproduktivität [$m_{\text{Produkt}}/m_{\text{Enzym}}$ ($\text{mg}_{\text{Produkt}}/\text{mg}_{\text{Enzym}}$) am Ende der Reaktion] wurde zunächst sowohl in Citratpuffer als auch in 20 % DMSO, Isopropanol, Dioxan, Acetonitril und DMF bei Faktorenkombinationen für eine optimale Aktivität und Stabilität der CPO

untersucht und das Maximum für jedes Lösungsmittel ermittelt. Hierbei wurden diese Maxima untereinander verglichen (Abbildung 3.66). Dabei wurde die maximale Katalysatorproduktivität mit einem Wert von 805 in Citratpuffer bei 59 °C und einem pH-Wert von 4 erzielt. An zweiter Stelle stand DMSO mit einem Wert von 600, der bei Bedingungen für eine optimale Stabilität (15 °C, pH 4,2) erhalten wurde. Dieser Wert entspricht 75 % der in Citratpuffer erhaltenen Katalysatorproduktivität. Mit einem Wert von 440, der bei 58 °C und pH 4 in 20 % Isopropanol erhalten wurde, ist Isopropanol das Lösungsmittel, das die dritthöchste Katalysatorproduktivität lieferte. Die in Acetonitril und DMF erzielte Katalysatorproduktivität war dagegen am niedrigsten.

Auf diesen Ergebnissen basierend stellt DMSO das ideale wassermischbare organische Lösungsmittel zur Erhöhung der Löslichkeit der eingesetzten Substrate in den CPO-katalysierten Reaktionen dar, da die CPO in 20 % DMSO die höchste Katalysatorproduktivität zeigte. Der Grund dafür ist, dass die CPO in 20 % DMSO sowohl hohe Aktivitäten als auch Stabilitäten verglichen mit anderen Lösungsmitteln aufwies.

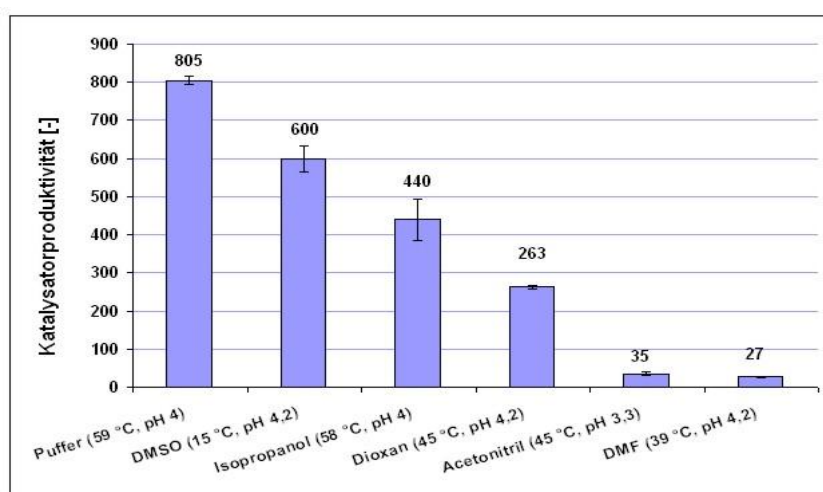


Abbildung 3.66: Vergleich der maximalen in Citratpuffer und in wassermischbaren organischen Lösungsmitteln erzielten Enzymproduktivitäten [$m_{\text{Produkt}}/m_{\text{Enzym}}$] untereinander. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Citratpuffer pH wie angegeben 10 mM Pyrogallol, 4 mM H_2O_2 , Temperatur wie angegeben.

3.4.5 Zusammenfassung

Mittels des „Design of Experiments“ wurden sowohl die Aktivität als auch die Stabilität der CPO in Abhängigkeit von pH-Wert, Temperatur und der Anwesenheit wassermischbarer

Lösungsmittel untersucht. Fünf verschiedene wassermischbare organische Lösungsmittel wurden verwendet, wobei es sich um DMSO, Isopropanol, Dioxan, Acetonitril und DMF handelt. Da die Lösungsmittel einen qualitativen Faktor darstellen und demzufolge die Versuchsplanung zu komplex machen, wurde die Versuchsplanung lediglich aus Temperatur und pH-Wert erstellt und die erhaltenen Versuche in jedem Lösungsmittel sowie in reinem Citratpuffer durchgeführt. Der pH-Wert wurde in einem Bereich zwischen 3 und 5 untersucht, wobei der Nullpunkt einem pH von 4 entspricht. Da das Enzym bei dem Temperaturoptimum der Peroxidase-Aktivität (60 °C) sehr instabil ist, wurde die Aktivität in zwei Temperaturbereichen von 15 °C bis 45 °C und von 45 °C bis 65 °C analysiert, während die Stabilität des Enzyms nur in dem Bereich zwischen 15 und 45 °C untersucht wurde.

Zunächst wurde die Aktivität und Stabilität der CPO bei niedrigen Temperaturen (15 °C-45 °C) untersucht. Sowohl bei der Aktivität als auch bei der Stabilität wurden die besten Ergebnisse in Citratpuffer erzielt, während das Enzym die geringste Aktivität und Stabilität in Acetonitril aufwies. In den untersuchten organischen Lösungsmitteln wurde die maximale Aktivität der CPO in Isopropanol und in DMSO erhalten. Jedoch zeigte die CPO in DMSO eine höhere Stabilität im Vergleich zu der in Isopropanol. Darüber hinaus war das Enzym in Dioxan aktiver als in DMF, wohingegen die Enzymstabilität in DMF höher im Vergleich zu der in Dioxan war. Für jedes einzelne Lösungsmittel wurden die optimalen Parametereinstellungen für das Aktivitäts- und Stabilitätsoptimum der CPO bzw. die Balance zwischen der Aktivität und Stabilität ermittelt.

Des Weiteren wurde die Aktivität der CPO ebenso bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C) untersucht, da der Temperaturbereich zwischen 15 °C und 45 °C das Temperaturoptimum der Peroxidase-Aktivität nicht umfasst. Dabei zeigte das Enzym in Citratpuffer die höchste Aktivität gefolgt von Isopropanol, DMSO und Dioxan. Für jedes Lösungsmittel wurden ebenso die Parameterkombinationen ermittelt, die das Aktivitätsoptimum bei hohen Temperaturen (45 °C-65 °C) erzielen. Dabei liegt der optimale pH-Wert in allen untersuchten Lösungsmitteln bei 4 außer in DMSO bei 3,8. Größere Unterschiede wurden bei dem Temperaturoptimum beobachtet, das einen Bereich zwischen 56 °C bei Dioxan und 65 °C bei DMSO abdeckt. Bei DMF wurde das Temperaturoptimum bereits in einem Temperaturbereich zwischen 15 °C und 45 °C bei 39 °C erreicht.

Sowohl bei der Aktivität als auch bei der Stabilität der CPO beeinflussten sich die betrachteten Parameter gegenseitig. Diese Beeinflussung war bei der Halbwertszeit stärker ausgeprägt als bei der Aktivität. Bei niedrigen Temperaturen zeigte der pH-Wert in allen Medien einen entscheidenden Einfluss auf die Halbwertszeit der CPO, welcher mit zunehmender Temperatur an Bedeutung verlor. Diese gegenseitige Beeinflussung bezüglich der Halbwertszeit war bei den verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedlich stark ausgeprägt. Im Gegensatz zu der Halbwertszeit wurden bei der Aktivität abhängig vom eingesetzten Lösungsmittel unterschiedliche Einflüsse erhalten. In Citratpuffer, DMF und Acetonitril zeigte der pH-Wert bei niedrigen Temperaturen einen entscheidenden Einfluss auf die CPO-Aktivität. Dagegen war die gegenseitige Beeinflussung der Parameter in Dioxan bei hohen Temperaturen stärker im Vergleich zu der bei niedrigen Temperaturen. In DMSO und Isopropanol war die gegenseitige Beeinflussung des pH-Wertes und der Temperatur sehr gering. Diese unterschiedlichen Einflüsse deuten auf eine starke Interaktion zwischen dem pH-Wert, der Temperatur und den organischen Lösungsmitteln in ihren Einflüssen auf die Aktivität und Stabilität der CPO hin.

Letztendlich wurden für den Puffer sowie für jedes Lösungsmittel die unterschiedlichen Parameterkombinationen bestimmt, die das Aktivitätsoptimum bei hohen (45 °C-65 °C) und bei niedrigen Temperaturen (15 °C-45 °C) sowie das Stabilitätsoptimum und eine Balance zwischen der Aktivität und der Stabilität der CPO erzielten. Bei diesen unterschiedlichen Parameterkombinationen wurde die Katalysatorproduktivität im kleinen Maßstab untersucht. Die maximalen in den verschiedenen Lösungsmitteln erzielten Katalysatorproduktivitäten wurden danach untereinander verglichen. Dabei wurde die maximale CPO-Produktivität in Citratpuffer erzielt. Zwischen den untersuchten Lösungsmitteln lieferte DMSO die höchste Katalysatorproduktivität gefolgt von Isopropanol. Dagegen wurde die niedrigste Katalysatorproduktivität in Acetonitril und DMF erhalten.

3.5 Stabilisierung der CPO durch chemische Modifikation mit Methoxypolyethylenglykol (mPEG)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CPO mit mPEG chemisch modifiziert. Der Grund für die Auswahl von mPEG als Reagenz für die chemische Modifizierung ist der stabilisierende Einfluss des PEGs auf die CPO, der sogar ohne Modifizierung eingeleitet werden kann [Spreti, *et al.*, 2004]. Zudem wurde eine chemische Modifizierung der CPO mit mPEG in der Literatur bislang nicht beschrieben.

Um die Quervernetzungsreaktionen zwischen den Enzymmolekülen zu vermeiden, wurde zur PEGylierung der CPO das monofunktionale mPEG 2000 bzw. 5000 verwendet, bei dem eine der terminalen Hydroxylgruppen des unmodifizierten PEGs durch eine Methylethergruppe blockiert ist.

3.5.1 Aktivierung verschiedener Methoxypolyethylenglykols (mPEGs) und die Bestimmung des Modifizierungsgrades

Um eine kovalente Bindung des mPEGs mit den Aminogruppen im Protein zu ermöglichen, muss die Hydroxylgruppe des mPEGs zuerst aktiviert werden. In der Literatur wurde die Aktivierung des PEGs mit verschiedenen Reagenzien wie z.B. p-Nitrophenylchloroformat, 2,4,6-Trichloro-1,3,5-triazine [Hernaiz, *et al.*, 1997] und 1,1-Carbonyldiimidazol [Beauchamp, *et al.*, 1983] beschrieben. Da 2,4,6-Trichloro-1,3,5-triazine sehr toxisch ist und die Modifizierung mit 1,1-Carbonyldiimidazol häufig mit einem Verlust der katalytischen Aktivität verbunden ist, erfolgte die Aktivierung der Hydroxylgruppe des mPEGs in der vorliegenden Arbeit mit p-Nitrophenylchloroformat, das zu einem reaktiven Carbonat umgesetzt wird (Abbildung 3.67).

p-Nitrophenyl-mPEG-carbonat wurde mit ^1H -NMR analysiert. Es wurde eine Auswaage der aktivierten mPEG 5000 von 8,12 g erzielt, was einer Ausbeute von 81,2 % entspricht, wohingegen die Ausbeute am aktivierten mPEG 2000 lediglich 70 % war.

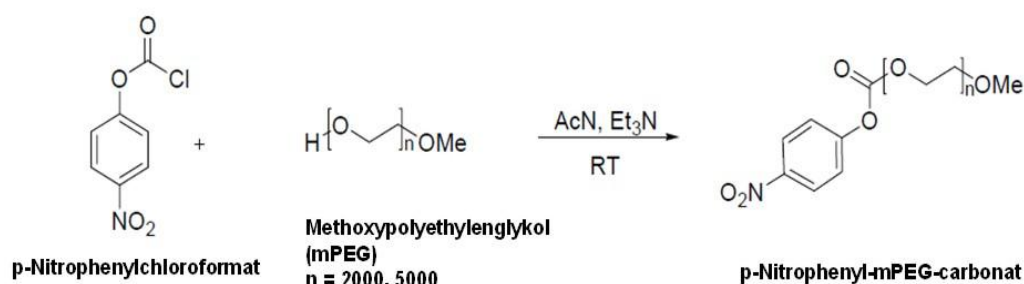


Abbildung 3.67: Reaktionsschema zur Aktivierung von mPEG mit p-Nitrophenylchloroformat.

Die Bestimmung des Aktivierungsgrades erfolgte durch alkalische Hydrolyse des aktivierten mPEGs mittels NaOH unter Freisetzung von mPEG, p-Nitrophenol und Kohlendioxid (Abbildung 3.68). Die Freisetzung des p-Nitrophenols kann photometrisch bei 400 nm verfolgt und seine Konzentration anschließend anhand einer Kalibrierung bestimmt werden. Dabei ergab sich ein Aktivierungsgrad von 70 % für mPEG 2000 und von 55 % für mPEG 5000. Das bedeutet, dass einige mPEG-Moleküle nicht aktiviert worden sind und eine vollständige Aktivierung nicht erreicht werden konnte. Jedoch sollte dieser Aktivierungsgrad für die Modifizierung der CPO ausreichend sein.

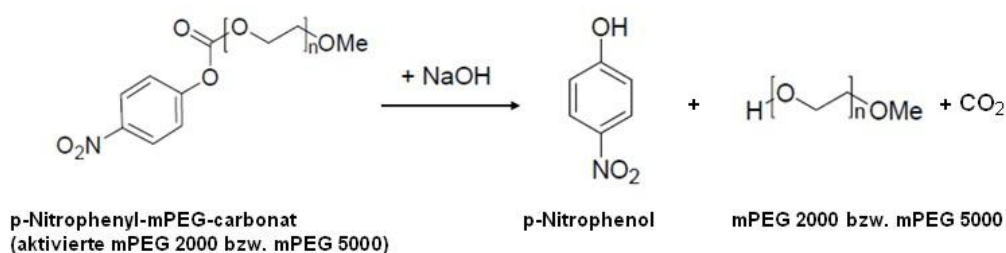


Abbildung 3.68: Alkalische Hydrolyse von p-Nitrophenyl-mPEG-carbonat durch NaOH.

3.5.2 Modifizierung der CPO

Die chemische Modifizierung der Enzyme mittels aktivierten mPEGs erfolgte durch nukleophile Substitution des Amins aus dem Enzym an die Carbonatgruppe des aktivierten mPEGs unter Bildung des stabilen Enzym-mPEG-Carbamat-Komplexes und Abspaltung von p-Nitrophenol (Abbildung 3.69).

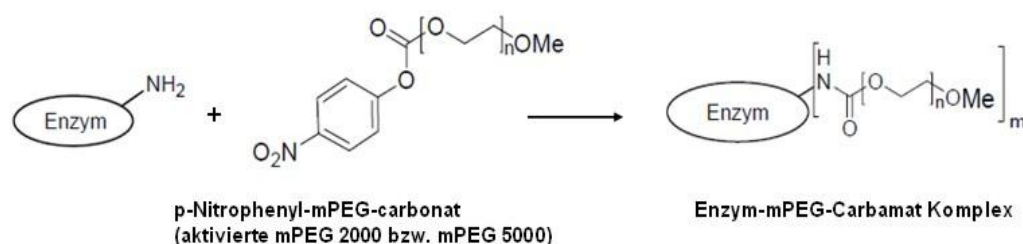


Abbildung 3.69: Reaktionsschema zur Modifizierung von Enzymen mit p-Nitrophenyl-mPEG-carbonat.

Liu und Wang beschrieben bei der chemischen Modifizierung der CPO mit Anhydriden, dass sich fünf Lysinreste daran beteiligen konnten [Liu und Wang, 2007]. Die Reaktivität der zu modifizierenden Aminogruppen ist für den Erfolg der chemischen Modifizierung von großer Bedeutung. Darüber hinaus ist der Verlauf bzw. der Erfolg der Modifizierung von der Temperatur und der Reaktionsdauer abhängig [Means und Feeney, 1990]. Ein weiterer Faktor, der den Modifizierungsgrad stark beeinflusst, ist das Verhältnis von aktiviertem mPEG zu modifiziertem Enzym. Das aktivierte mPEG sollte in einem Überschuss im Verhältnis zum Protein eingesetzt werden, da es zur Hydrolyse der Carbonatbindung kommt [Means und Feeney, 1990]. Letztendlich können geeignete Reaktionsbedingungen nur durch Tests identifiziert werden.

Die chemische Modifizierung der CPO mittels mPEGs erfolgte in einer Enzymkonzentration von 0,88 mg/mL bei den pH-Werten 6, 6,5 und 7, da das Enzym bei höheren pH-Werten unmittelbar inaktiviert wird. Das aktivierte mPEG 2000 bzw. 5000 wurde in einem Überschuss von 1000, 2000, 3000 bzw. 5000 bezogen auf die Proteinmenge zugegeben. Die Modifizierung wurde unter langsamem Rühren bei RT durchgeführt, da die CPO eine sehr hohe Stabilität bei RT aufweist. Der Erfolg der Modifizierung wurde mittels SDS-PAGE analysiert, da die Bindung der mPEG-Moleküle an das Enzym zur Erhöhung des Molekulargewichts des Proteinmonomers führt. Zunächst wurde die Modifizierung mit mPEG 5000 in einem Überschuss von 2000 bzw. 5000 im Verhältnis zur Enzymmenge bei einem pH-Wert von 6 durchgeführt, da die CPO eine hohe Stabilität bei diesem pH-Wert zeigt. Das Ergebnis der SDS-PAGE ist in der Abbildung 3.70 gezeigt. Bei dem Verhältnis 1:2000 ist nach einstündiger Modifizierung zu erkennen, dass die Bande des unmodifizierten Enzyms

schwächer wird, was auf eine Modifizierung des Enzyms hinweist. Jedoch wurde keine deutliche Bande für das modifizierte Enzym erhalten sondern vielmehr ein „Schmier“ im Bereich zwischen 43 und 50 kDa, was auf eine inhomogene Modifizierung hindeutet. Auch nach einer Modifizierungsdauer von vier Stunden konnte keine deutliche Bande erhalten werden. Dagegen ist es bei einem mPEG-Überschuss von 5000 nach einer Stunde eine Bande zu erkennen, die dem modifizierten Enzym entspricht. Diese Bande besitzt ein Molekulargewicht von ungefähr 48 kDa, was darauf hindeutet, dass dabei lediglich ein einzelner Lysinrest pro Enzymmolekül modifiziert wurde, da die CPO ein Molekulargewicht von 42 kDa besitzt. Im Verlauf der Modifizierung wird diese Bande stärker, dennoch ist sie diffus. Nach einer vierstündigen Reaktionsdauer ergibt sich noch eine weitere jedoch schwache Bande bei 55 kDa. Das bedeutet, dass ein weiterer Lysinrest dabei modifiziert wurde. Infolgedessen konnte sowohl bei einem mPEG-Überschuss von 2000 als auch von 5000 ein gewisser Proteinteil modifiziert werden. Dieser modifizierte Teil ist bei dem Verhältnis 1:5000 größer im Vergleich zu dem jeweiligen bei 1:2000, was aus dem Verhältnis der Bande des unmodifizierten Enzyms zur Bande des nativen Enzyms vor der Modifizierung zu erkennen ist.

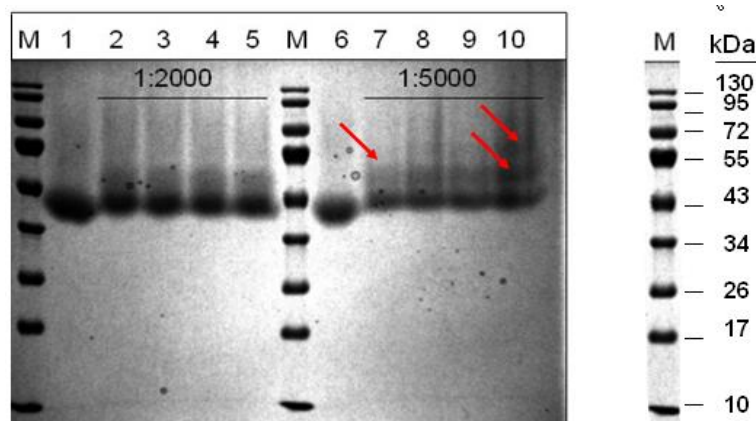


Abbildung 3.70: SDS-Gel nach der Modifizierung der CPO mit mPEG 5000 bei pH 6 und bei zwei verschiedenen Enzym:mPEG Verhältnissen (1:2000 und 1:5000). 1: native unmodifizierte CPO, 2-5: CPO-Modifizierung bei einem Verhältnis von 1:2000 nach 1, 2, 3 und 4 Stunden 6: native unmodifizierte CPO, 7-10: CPO-Modifizierung bei einem Verhältnis von 1:2000 nach 1, 2, 3 und 4 Stunden.

Die Untersuchung der Enzymaktivität nach der Modifizierung zeigte, dass es bei einem mPEG Überschuss von 2000 lediglich zu einem geringfügigen bis hin zu keinem Aktivitätsverlust kam. Im Unterschied dazu verlor das Enzym bei einem mPEG Überschuss

von 5000 ungefähr 25 % seiner Aktivität bereits nach einer Stunde Reaktionsdauer. Grund dafür ist eventuell, dass lediglich die Anwesenheit des mPEGs bis zu einer bestimmten Konzentration (ohne die chemische Modifizierung) einen stabilisierenden Einfluss auf die CPO hat [Spreti, *et al.*, 2004]. Dass mehr Enzym bei dem mPEG-Überschuss von 5000 als beim 2000 modifiziert wird, könnte ebenso eine Rolle spielen.

Aufgrund der lediglich schwachen Modifizierung der CPO mit mPEG 5000 bei pH 6 bei einem Enzym:mPEG Verhältnis von 1:2000 und des bedeutenden Aktivitätsverlustes bei einem mPEG Überschuss von 5000 erfolgte die Modifizierung im Nachhinein bei einem höheren pH-Wert (6,5) und bei zwei Enzym:mPEG 5000 Verhältnissen (1:2000 und 1:3000). Sowohl bei dem Verhältnis 1:2000 als auch bei 1:3000 waren nach einer einstündigen Modifizierung zwei Banden zu erkennen (Abbildung 3.71). Die erste Bande ist klar und ausgeprägt und besitzt ein Molekulargewicht von ungefähr 48 kDa, was darauf hindeutet, dass dabei lediglich ein einzelner Lysinrest pro Enzymmolekül modifiziert wurde, da die CPO ein Molekulargewicht von 42 kDa besitzt. Auf der anderen Seite war die zweite Bande sehr schwach verglichen mit der ersten Bande. Jedoch war sie bei dem mPEG-Überschuss von 3000 stärker als bei 2000 und wurde im Verlauf der Reaktion intensiver. Anhand des Protein-Ladders ergibt sich für diese Bande ein Molekulargewicht von ungefähr 55 kDa, was darauf hinweist, dass zwei mPEG 5000 Moleküle an das Enzymmolekül gebunden haben.

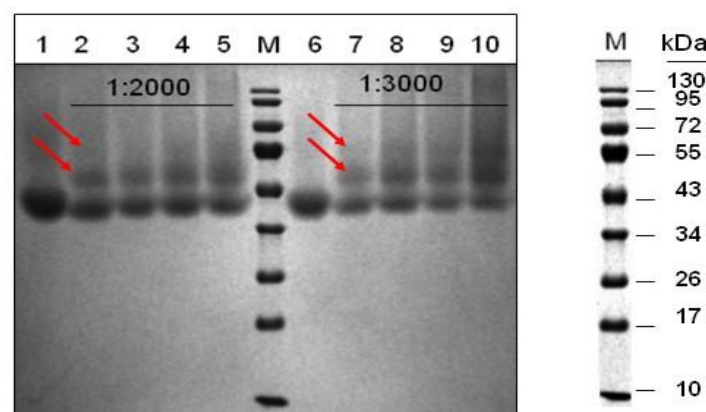


Abbildung 3.71: SDS-Gel nach der Modifizierung der CPO mit mPEG 5000 bei pH 6,5 und bei zwei verschiedenen Enzym:mPEG Verhältnissen (1:2000 und 1:3000). 1: native unmodifizierte CPO, 2-5: CPO-Modifizierung bei einem Verhältnis von 1:2000 nach 1, 2, 3 und 4 Stunden 6: native unmodifizierte CPO, 7-10: CPO-Modifizierung bei einem Verhältnis von 1:3000 nach 1, 2, 3 und 4 Stunden.

Nach einstündiger Reaktionsdauer ergab sich bei einem mPEG-Überschuss von 2000 eine Restaktivität von $95,7 \pm 10 \%$. Im Gegensatz dazu verlor das Enzym 29 % seiner Aktivität innerhalb der ersten Stunde bei einem Enzym:mPEG Verhältnis von 1:3000.

Wenn die Modifizierung der CPO mittels mPEG 5000 bei pH 7 erfolgte, ergaben sich ebenso verschieden starke Banden für das modifizierte Enzym, jedoch unter starkem Verlust der Enzymaktivität, da die CPO bei diesem pH-Wert eine geringe Stabilität aufweist. Darüber hinaus führte die Modifizierung der CPO mittels mPEG 2000 bei den verschiedenen pH-Werten und den unterschiedlichen Enzym:mPEG Verhältnissen zur Bildung von einem „Schmier“ unmittelbar über der Bande der unmodifizierten CPO (Daten nicht gezeigt).

Eine effizientere Modifizierung der CPO unter Erhalt ihrer maximalen Aktivität konnte demzufolge mittels mPEG 5000 bei einem Verhältnis des Enzyms zu mPEG von 1:2000 und einem pH-Wert von 6,5 für eine Stunde erzielt werden. Demzufolge wurden diese Bedingungen für die spätere CPO-Modifizierung festgelegt, um anschließend die Aktivität und die Stabilität der modifizierten CPO in Abhängigkeit von Temperatur und wassermischbaren organischen Lösungsmitteln zu untersuchen.

Zur Entfernung von während der Modifizierung freigesetztem p-Nitrophenol und nicht reagiertem mPEG aus dem Reaktionsansatz wurde eine Dialyse durchgeführt. Dazu diente eine Dialysemembran mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa. Dialysiert wurde gegen das 200-fache Volumen Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 5) für 24 Stunden bei 4 °C. Ein Vergleich der Enzymaktivität vor und nach der Dialyse zeigte, dass die Dialyse keinen Aktivitätsverlust zufolge hat.

3.5.3 Untersuchung der Aktivität des modifizierten Enzyms

Die Aktivität des modifizierten Enzyms wurde sowohl in reinem Citratpuffer als auch in wassermischbaren organischen Lösungsmitteln untersucht, die dem Reaktionsmedium zu einem Anteil von 20 % (v/v) zugesetzt wurden. Dabei handelte es sich um DMSO, Isopropanol, Dioxan, Acetonitril und DMF. Zunächst wurde die Aktivität bei 45 °C, jedoch bei verschiedenen pH-Werten, je nach Lösungsmittel anhand der Ergebnisse des DOEs,

untersucht (siehe Tabelle 2.4). Die Ergebnisse der Messungen wurden mit denen der nativen CPO verglichen. Die Aktivität des modifizierten Enzyms war entweder gleich oder lediglich geringfügig weniger als die des nativen Enzyms (Abbildung 3.72). Die Aktivität der modifizierten CPO in Puffer war mit 58 U/mL etwas geringer verglichen mit dem nativen Enzym (62 U/mL). Dieser Unterschied liegt jedoch im Bereich der Standardabweichung. In 20 % DMSO, Dioxan und DMF ergab für die native und modifizierte CPO etwa die gleiche Aktivität. Lediglich in Isopropanol zeigte die modifizierte CPO eine deutlich geringere Aktivität im Vergleich zu der bei der nativen. Auch bei hohen Temperaturen ergab sich für die native CPO eine etwas höhere Aktivität als für das modifizierte Enzym. Kurz gefasst wurde die Aktivität der CPO durch die chemische Modifizierung nur geringfügig beeinflusst.

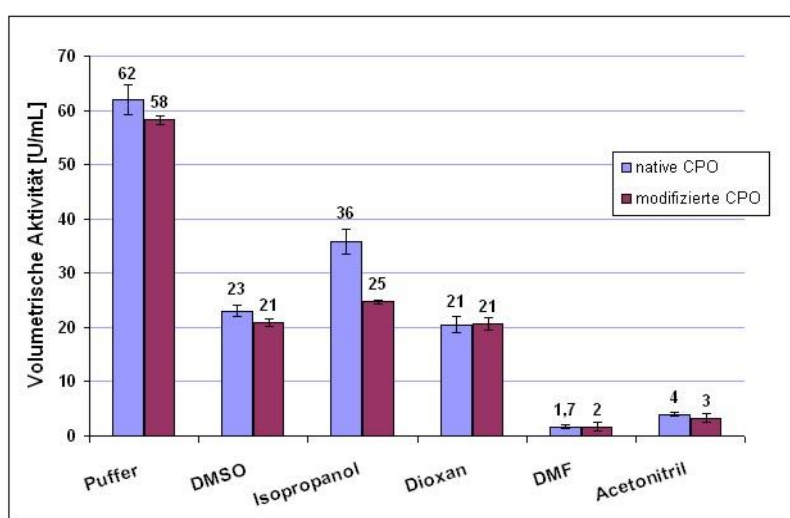


Abbildung 3.72: Vergleich der Aktivität der modifizierten CPO mit der der nativen CPO in den verschiedenen Medien bei 45 °C. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Natriumcitratpuffer (pH ändert sich nach jedem Lösungsmittel, siehe Tabelle 2.4), 10 mM Pyrogallol, 4 mM H₂O₂, 45 °C, Lösungsmittel wie angegeben, Lösungsmittelanteil 20 %.

La Rotte Hernandez *et al.* beschrieben die reduktive Alkylierung, Amidierung und die Quervernetzung der CPO mittels Glutardialdehyds. Dabei ergaben sich Restaktivitäten von 80 % bei der reduktiven Arylierung und Amidierung bzw. 70 % bei der Quervernetzung [La Rotte Hernandez *et al.*, 2005]. Die chemische Modifizierung der CPO mit Anhydriden führte zu einer Verbesserung der katalytischen Effizienz der CPO in wässrigem Puffer um 12-26 % bei der Sulfoxidation und um 7-53 % bei der Phenoloxidation in Abhängigkeit vom eingesetzten Anhydrid [Liu und Wang, 2007].

3.5.4 Untersuchung der Stabilität des modifizierten Enzyms

3.5.4.1 Temperaturstabilität

Zur Untersuchung der Temperaturstabilität wurde sowohl das modifizierte als auch das native Enzym in Citratpuffer bei 45 °C für 3 Tage inkubiert und anschließend die Restaktivität bestimmt. Dabei ergab sich für die modifizierte CPO eine Restaktivität von $93 \pm 2 \%$, wohingegen diese bei der nativen CPO $79 \pm 2 \%$ betrug. Somit führte die PEGylierung der CPO mittels mPEGs 5000 zu einer 1,18-fachen Erhöhung der Temperaturstabilität. Diese Ergebnisse stimmen mit Literaturdaten überein, welche die Erhöhung der Temperaturstabilität vieler Enzyme mittels der chemischen Modifizierung mit PEG beschrieben. In dieser Hinsicht konnte zum Beispiel die Temperaturstabilität der *Turnip* Peroxidase durch die chemische Modifizierung mit mPEG um ein 4-faches gesteigert werden [Quintanilla-Guerrero *et al.*, 2008]. Darüber hinaus konnte die „Melting Temperatur T_m “ der *Myceliophthora thermophila* Laccase durch die PEGylierung um 2 °C erhöht werden [Lopez-Gruz *et al.*, 2006]. Während das native Cytochrom c seine gesamte Aktivität nach einer 3-stündigen Inkubation bei 80°C verlor, erhielt die PEGylierte Form 60 % ihrer Aktivität [Garcia-Arellano, *et al.*, 2002]. Der stabilisierende Effekt der PEGylierung auf die Enzyme wurde auf den amphiphilen Charakter der PEG-Ketten zurückgeführt [Katre, 1993; Inada, *et al.* 1990; DeSantis und Jones, 1999]. Zum einen bildet sich durch eine starke Hydratisierung im hydrophilen Bereich der PEG-Ketten eine stabilisierte Hydrathülle aus, was dabei hilft, die Enzymstruktur aufrechtzuerhalten. Zum anderen interagieren hydrophobe PEG-Bereiche mit hydrophoben Gruppen an der Proteinoberfläche unter Verringerung der Flexibilität des Proteins. Diese Sets von Interaktionen bewirken eine Struktur ähnlich wie eine Hülle bzw. ein Mantel, in der PEG die Proteinoberfläche aufwickelt, was zu einer konservierteren Struktur rund um das Häm führt. Der allgemeine Einfluss dieser Interaktion ist somit die Reduzierung der Entfaltungsrates des aktiven Zentrums, was die Erhöhung der Proteinstabilität zufolge hat [Quintanilla-Guerrero *et al.*, 2008; Lopez-Gruz *et al.*, 2006, Garcia-Arellano, *et al.*, 2002]. Darüber hinaus führt die chemische Modifizierung der Aminogruppen des Enzyms zu einer Neutralisierung der positiven Ladung der Lysinreste unter Reduzierung der Ladungsrepulsion innerhalb der Polypeptidkette. Infolgedessen tritt eine Stabilisierung des Enzyms auf [Liu und Wang, 2007; Quintanilla-Guerrero *et al.*, 2008]. Liu und Wang beschrieben ebenso die Stabilisierung der

CPO gegenüber hohen Temperaturen durch die chemische Modifizierung mittels Anhydriden, wobei die Stabilität des modifizierten Enzyms im Vergleich zur nativen CPO um ein 1 bis 2-faches erhöht wurde [Liu und Wang, 2007]. Durch die reduktive Alkylierung, Amidierung und Quervernetzung der CPO konnte ebenso eine Erhöhung der Temperaturstabilität erzielt werden. Die modifizierte CPO zeigte nach einer zweistündigen Inkubation bei 40 °C bzw. 60 °C eine 2- bzw. 8-fache Erhöhung der Temperaturstabilität, [La Rotta Hernandez, *et al.*, 2005].

Zur Bewertung der durch die PEGylierung erzielten Erhöhung der Temperaturstabilität der CPO wurden die Ergebnisse nicht nur mit den durch eine chemische Modifizierung hervorgerufenen Stabilisierungsergebnissen verglichen sondern auch mit den durch andere Methoden wie die Immobilisierung erzielten Stabilisierung verglichen. Oft führte die Immobilisierung der CPO zwar zur Erhöhung der Temperaturstabilität jedoch gleichzeitig auch zu einem starken Aktivitätsverlust. Zum Beispiel zeigten die „Cross-linked crystals“ der CPO eine bis um ein 9-faches erhöhte Temperaturstabilität im Vergleich zur nativen CPO, wenn sie bei 60 °C für eine Stunde inkubiert wurden, wohingegen sich die katalytische Effizienz um ein 191-faches verringerte [Ayala, *et al.*, 2002]. Des Weiteren konnte die Halbwertszeit der CPO durch die kovalente Immobilisierung an magnetische Perlen bei 50 °C bzw. 60 °C um ein 1,9- bzw. 1,3-faches erhöht werden. Die katalytische Effizienz der immobilisierten CPO hingegen verringerte sich in diesem Zusammenhang jedoch auch um ein 7-faches verglichen mit nativem Enzym [Bayramoglu, *et al.*, 2008]. Darüber hinaus konnte eine Verdopplung der Halbwertszeit der CPO bei 45 °C durch die Immobilisierung an mesoporöse Materialien wie AL-MCM-41 erzielt werden [Terres, *et al.*, 2007], während die Immobilisierung der CPO an SBA-16 keine Verbesserung der Stabilität gegenüber hohen Temperaturen zur Folge hatte [Aburto, *et al.*, 2005]. Die Immobilisierung der CPO an Aminopropyl-Glas führte ebenso zu keiner Stabilisierung des Enzyms gegenüber der Temperatur [Kadima und Pikard 1990]. Auch durch die Bindung der CPO an Sol-Gel-Glas mit Porengrößen von 50 und 100 Å erfolgte keine Stabilisierung des Enzyms gegenüber der Temperatur, wohingegen Poren mit einer Größe von 200 Å zu einer 10-fachen Erhöhung der Enzymstabilität nach dreistündiger Inkubation bei 40 °C jedoch zu keiner Stabilisierung des Enzyms bei 50 °C führten [Borole, *et al.*, 2004].

Die Temperaurstabilität der CPO ließ sich ebenso durch die Zugabe von Additiven erhöhen. Zum Beispiel führte die Zugabe von PEG 200 und Trehalose zur Erhöhung der CPO-Stabilität bei 50 °C ein um 20- bzw. 7-faches. Jedoch beziehen sich diese Ergebnisse nicht auf die Halbwertszeit der CPO sondern auf den Zeitpunkt, an dem sie ihre Aktivität bereits vollständig verloren hat [Zhi, *et al.*, 2007]. Betrachtet man hingegen den Zeitpunkt, an dem das Enzym die Hälfte seiner Aktivität verloren hat, erzielte diese Methode eine nur 3- bis 4-fache Stabilisierung.

Durch die chemische Modifizierung der CPO mit mPEG wurde die Temperaturstabilität zwar lediglich um ein 1,18-faches erhöht, jedoch wurde kein bedeutender Aktivitätsverlust im Vergleich zur Immobilisierung beobachtet. Der Aktivitätsunterschied zwischen der nativen und der modifizierten CPO lag dabei im Bereich der Standardabweichung. Im Gegensatz zur Stabilisierung durch Additive erfolgte bei der Stabilisierung durch die PEGylierung keine Verunreinigung des Produkts mit den Additiven. Darüber hinaus führt die chemische Modifizierung der CPO mit mPEG nicht nur zur Erhöhung der Stabilität sondern auch zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit verschiedener Substrate aufgrund des amphiphilen Charakters von mPEG. Auf diesen Ergebnissen basierend stellt die chemische Modifizierung mit mPEG somit eine interessante Methode zur Stabilisierung der CPO für ihren Einsatz in technisch-synthetischen Anwendungen dar.

3.5.4.2 Toleranz gegenüber wassermischbaren organischen Lösungsmitteln

Nicht nur in Citratpuffer sondern auch in wassermischbaren organischen Lösungsmitteln konnte eine Stabilisierung der CPO durch die PEGylierung erzielt werden. Auf diese Weise konnte die Halbwertszeit der CPO in allen untersuchten Lösungsmitteln mit Ausnahme von Dioxan, in dem die Halbwertszeit etwa gleich blieb, um ein mindestens 5-faches im Vergleich zur nativen CPO erhöht werden (Tabelle 3.12). Zum Beispiel konnte die Halbwertszeit der CPO in 20 % DMSO von $17,7 \pm 3,1$ h auf $125 \pm 12,3$ h erhöht werden, was einer 7-fachen Stabilisierung der CPO entspricht. In 20 % Isopropanol konnte ebenso eine 6,6-fache Stabilisierung erzielt werden, da die Halbwertszeit von 0,3 h auf 2 h erhöht wurde. Auch in 20 % Acetonitril ergab sich eine Stabilitätserhöhung um ein 5-faches, da sich die Halbwertszeit von 0,04 h auf 0,2 h erhöhte. Die maximale Stabilisierung konnte in 20 % DMF

erzielt werden, in dem die Halbwertszeit der CPO von 0,84 h auf 14,6 h zunahm, was einer Stabilisierung um ein 17-faches entspricht.

Tabelle 3.12: Die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der nativen und modifizierten CPO in 20 % wassermischbaren Lösungsmitteln bei 45 °C.

Lösungsmittel	Halbwertszeit ($t_{1/2}$) [h]	
	native CPO	modifizierte CPO
DMSO	17,7 ± 3,1	125 ± 12,3
Isopropanol	0,30 ± 0,02	2 ± 0,04
Dioxan	0,54 ± 0,02	0,5 ± 0,04
Acetonitril	0,04 ± 0	0,2 ± 0,01
DMF	0,84 ± 0,04	14,6 ± 1,9

Die Gründe für die erhöhte Stabilität der modifizierten CPO in organischen Lösungsmitteln im Vergleich zum nativen Enzym liegen ebenso in der Abschirmung der Proteinoberfläche durch die mPEG-Moleküle und in der Stabilisierung der Hydrathülle durch die hydrophilen Bereiche der PEG-Ketten begründet. Ein weiterer Grund für die Stabilisierung der modifizierten CPO liegt in der geringeren Flexibilität der Proteine aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Gruppen der Proteinoberfläche und den hydrophoben Bereichen des PEGs. Diese Ergebnisse stimmen mit Literaturdaten überein, die ebenso eine Stabilisierung einiger Enzyme gegenüber organischen Lösungsmitteln durch eine PEGylierung beschrieben [Quintanilla-Guerrero *et al.*, 2008; Lopez-Gruz *et al.*, 2006].

Quintanilla-Guerrero *et al* beschrieben eine Stabilisierung der *Turnip* Peroxidase in 30 % (v/v) Methanol bzw. DMF, da das mit mPEG modifizierte Enzym nach einstündiger Inkubation in dem entsprechenden Lösungsmittel eine um ein 1,6- bzw. 5-faches erhöhte Restaktivität im Vergleich zur nativen *Turnip* Peroxidase zeigte. Die mit mPEG modifizierte *Myceliophthora thermophila* Laccase zeigte in 30 % Methanol, Ethanol, Propanol und Acetonitril eine 2- bis 3-fach kleinere Inaktivierungskonstante im Vergleich zum unmodifizierten Enzym und demzufolge eine erhöhte Toleranz gegenüber wassermischbaren organischen Lösungsmitteln [Lopez-Gruz *et al.*, 2006]. Somit ist die durch die PEGylierung

der CPO erzielte Erhöhung der Toleranz gegenüber wassermischbaren organischen Lösungsmitteln höher als bei anderen Enzymen, da durch die Modifizierung der CPO mit mPEG eine bis zu 17-fache Stabilisierung erzielt werden konnte.

Eine Verbesserung der Toleranz der CPO gegenüber DMF konnte ebenso durch die chemische Modifizierung der CPO mit Anhydriden erzielt werden. Während die native CPO ihre gesamte Aktivität nach einer einstündigen Inkubation in 30 % DMF verlor, erhielt die mit Anhydriden modifizierte CPO 70-90 % ihrer Peroxidase-Aktivität und 55-65 % der Aktivität bezüglich der Sulfoxidation [Liu und Wang, 2007]. Darüber hinaus wurde ebenso eine Stabilisierung der CPO in *tert*-Butanol durch die reduktive Alkylierung, Amidierung und die Quervernetzung beschrieben. Die modifizierte CPO war in 20 % bzw. 60 % *tert*-Butanol um ein 1,2- bzw. 1,3-faches stabiler im Vergleich zur nativen Form [La Rotta Hernandez, *et al.*, 2005].

Eine Stabilisierung der CPO gegenüber wassermischbaren organischen Lösungsmitteln durch andere Stabilisierungsmethoden wurde in der Literatur nur selten beschrieben. Borole *et al.* erhielten eine Stabilisierung der CPO gegenüber Acetonitril durch die Bindung der CPO an Sol-Gel-Glas. Jedoch wurden keine konkreten Angaben über die Stärke der Stabilisierung im Vergleich zum nativen Enzym gemacht [Borole, *et al.*, 2004]

Letztendlich konnte die Toleranz der CPO gegenüber wassermischbaren Lösungsmitteln durch die chemische Modifizierung mit mPEG 5000 im Vergleich zu anderen Methoden stark erhöht werden, was für den technischen Einsatz der CPO von großem Vorteil ist.

3.5.5 Zusammenfassung

Um die Quervernetzungsreaktionen zwischen den Enzymmolekülen auszuschließen, erfolgte die chemische Modifizierung der CPO mit monofunktionalem mPEG 2000 bzw. 5000, die mit p-Nitrophenylchloroformat aktiviert wurden. Dabei ergab sich ein Aktivierungsgrad von 70 % bzw. 55 % für mPEG 2000 bzw. mPEG 5000. Die PEGylierung der CPO mit mPEG wurde unter dem Einfluss verschiedener Parameter wie dem Molekulargewicht des mPEGs, dem pH-Wert während der Modifizierung und dem Enzym:mPEG-Verhältnis untersucht. Dabei

wurde eine effiziente Modifizierung der CPO unter Erhalt ihrer maximalen Aktivität mittels mPEGs 5000 bei einem pH-Wert von 6,5 und einem molaren Überschuss des mPEGs 5000 von 2000 in Bezug auf das Enzym erzielt. Demzufolge wurden diese Parameter für die weitere Untersuchung der Aktivität und Stabilität des modifizierten Enzyms beibehalten. Unter diesen Bedingungen ergab sich eine relative Aktivität von 95,7 %. Im SDS-Gel wurden neben der Bande des unmodifizierten Enzyms noch zwei weitere Banden erhalten, die dem modifizierten Enzym entsprechen. Die erste Bande besitzt ein Molekulargewicht von ungefähr 48 kDa, während die zweite schwächer ausgeprägt ist und im Bereich von 55 kDa liegt. Im Allgemeinen wurde lediglich ein Teil des eingesetzten Enzyms modifiziert, eine gesamte Modifizierung wurde unter den untersuchten Bedingungen nicht erzielt.

Die Modifizierung hatte lediglich einen geringen Einfluss auf die Aktivität der CPO in wassermischbaren organischen Lösungsmitteln. Im Gegensatz dazu wurde die Stabilität der CPO durch die PEGlierung stark erhöht. In diesem Zusammenhang konnte die Temperaturstabilität der CPO um ein 1,18-faches gesteigert werden, während die Toleranz der CPO gegenüber wassermischbaren organischen Lösungsmitteln mindestens um ein 5-faches erhöht wurde. Die beste Stabilisierung konnte gegenüber DMF erzielt werden, wobei die modifizierte CPO um ein 17-faches stabilisiert werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Modifizierung der CPO mit mPEG 5000 eine erhöhte Temperaturstabilität der CPO und eine starke Erhöhung der Toleranz gegenüber wassermischbaren organischen Lösungsmitteln unter Erhalt der maximalen Aktivität erreicht werden konnte. Nicht nur die Stabilität sondern auch die Löslichkeit der CPO in hydrophoben Lösungsmitteln kann durch die PEGlierung aufgrund des amphiphilen Charakters des PEGs verbessert werden, was normalerweise die Erhöhung der katalytischen Effizienz bei der Umsetzung von hydrophoben Substraten zur Folge hat. Alternative in der Literatur beschriebene Stabilisierungsmethoden führten zwar zur Erhöhung der Temperaturstabilität der CPO aber auch zu einem starken Verlust der Enzymaktivität. Daher stellt die PEGylierung der CPO eine interessante Methode für die Stabilisierung der CPO für den Einsatz in synthetisch-technischen Bereichen dar.

4 Zusammenfassung

Die Chloroperoxidase aus *Caldariomyces fumago* (CPO) stellt industriell auf Grund ihres breiten Spektrums an Reaktionen, die für technische Anwendungen von Bedeutung sind, ein sehr interessantes und vielseitiges Enzym dar. Jedoch ist ihr Einsatz in technischen Prozessen weiterhin begrenzt. Gründe dafür sind die hohen Kosten des gereinigten Enzymspräparats aufgrund der mühsamen und zeitaufwendigen Isolierung aufgrund des schwer zu entfernenden Pilzpigments, die geringe Stabilität der CPO sowie die geringe Löslichkeit vieler Substrate in rein wässrigen Systemen. Demzufolge ist der Bedarf an der Entwicklung einer neuen schnell durchführbaren Isolierungsmethode mit einer ausreichenden Enzymreinheit sehr groß. Darüber hinaus ist eine Stabilisierung der CPO unerlässlich. Zur Verbesserung der Löslichkeit hydrophober Substrate bietet sich die Verwendung alternativer Reaktionsmedien wie zum Beispiel wassermischbare organische Lösungsmittel-Puffer Systeme an. Aus diesem Grund ist eine Stabilisierung der CPO gegen die Inaktivierung durch organische Lösungsmittel ebenso unerlässlich. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb zum einen eine neue Isolierungsmethode der CPO entwickelt und zum anderen die CPO umfangreich bezüglich ihrer Aktivität und Stabilität charakterisiert und darauf basierend stabilisiert.

Die Aufreinigung der CPO bzw. die Entfernung des gelatinösen Pilzpigments des *C. fumago* Rohextrakts konnte mittels der Extraktion im wässrigen Zweiphasensystem einfach und innerhalb von 30 Minuten erzielt werden. Hierbei erfolgte die Extraktion in zwei Schritten. In dem ersten Schritt konnte das schwarze Pigment durch die Extraktion in einem Polymer/Polymer wässrigen Zweiphasensystem entfernt werden, während der zweite Schritt der Rückextraktion des Enzyms aus der Polymer-Phase mittels eines Polymer/Salz Systems diente. Die besseren Ergebnisse wurde durch die Extraktion in einem PEG 4000/PPG 1200 System gefolgt von einer Rückextraktion des Enzyms in einem PEG 4000/Ammoniumsulfat System erzielt. Dadurch erreicht die spezifische Aktivität den maximalen in der Literatur angegebenen Wert (2200 U/mg) unter Erhalt von 100 % der Ausgangsaktivität. Für den Einsatz in technischen Prozessen besitzt die CPO nach diesen Schritten einen hinreichenden Reinheitsgrad. Eine anschließende Anionenaustauschchromatographie konnte die spezifische Aktivität des Enzyms auf 2900 U/mg erhöhen.

Anschließend wurde die Halogenase-, Monooxygenase- und Peroxidase-Aktivität der CPO in Abhängigkeit von verschiedenen isolierten Einflussgrößen wie z.B. dem pH-Wert und der Substratkonzentration reproduziert. Darüber hinaus wurde der Einfluss weiterer Parameter wie z.B. die Temperatur und die Anwesenheit wassermischbarer Lösungsmittel auf die verschiedenen CPO-Aktivitäten untersucht. In Bezug auf den pH-Wert besitzt die CPO zweifache Reaktivität. Die eine (z.B. die Monooxygenase- und Peroxidase-Aktivität) erfolgt bei der neutralen bzw. leicht negativen Form des Enzyms, wohingegen die andere Reaktivität (die Halogenase-Aktivität) bei einem pH-Wert, der unterhalb dem isoelektrischen Punkt der CPO liegt, erfolgt. Das Enzym zeigt seine maximale Halogenase-Aktivität bei einer Temperatur von 40 °C im Vergleich zu 60 °C für die Peroxidase- und Monooxygenase-Aktivität. Bei allen untersuchten Reaktionen wurde das Enzym mittels H_2O_2 inaktiviert. Wassermischbare organische Lösungsmittel zeigten unterschiedliche Einflüsse auf die Enzymaktivitäten. Dabei wurde die Sulfoxidation von Thioanisol weniger stark beeinflusst als die Halogenierungsreaktion und die Oxidation von Pyrogallol

Neben der Aktivität wurde ebenso die Lagerungsstabilität der CPO hinsichtlich ihrer Monooxygenase- und Peroxidase-Aktivität in Abhängigkeit von verschiedenen isolierten Einflüssen untersucht und miteinander verglichen. Die CPO war über einen breiten pH-Bereich stabil und besaß ebenso bei Temperaturen bis zu 40 °C eine sehr hohe Stabilität. Im Gegensatz dazu zeigte das Enzym eine hohe Instabilität in der Anwesenheit von H_2O_2 . Diese Inaktivierung ist von der H_2O_2 -Konzentration abhängig. Die wassermischbaren Lösungsmittel haben unterschiedliche Einflüsse auf die Enzymstabilität gezeigt. Das Enzym war in Isopropanol und Dioxan am stabilsten, wohingegen THF zu einer starken Inaktivierung des Enzyms führte. Dabei ergab sich kein Zusammenhang zwischen der Polarität des Lösungsmittels und seinem inaktivierenden Einfluss.

Die Aktivität und Stabilität der CPO wurden unter Berücksichtigung der gegenseitigen Beeinflussung verschiedener Einflussgrößen (pH-Wert, Temperatur und die Anwesenheit wassermischbarer Lösungsmittel) mittels Factorial Designs untersucht. Bei den untersuchten Lösungsmitteln handelt es sich um DMSO, Isopropanol, Dioxan, Acetonitril und DMF. Sowohl bei der Aktivität als auch bei der Stabilität wurden die besseren Ergebnisse in Citratpuffer erzielt. Zwischen den untersuchten organischen Lösungsmitteln wurden die

besseren Resultate in Isopropanol und in DMSO erhalten. Letztendlich wurden sowohl für den Puffer als auch für jedes Lösungsmittel die unterschiedlichen Faktorenkombinationen bestimmt, die das Aktivitätsoptimum, das Stabilitätsoptimum der CPO sowie eine Balance zwischen der Aktivität und der Stabilität erzielen. Bei diesen unterschiedlichen Parameterkombinationen wurde die Katalysatorproduktivität im kleinen Maßstab untersucht. Die maximalen bei den verschiedenen Lösungsmitteln erzielten Katalysatorproduktivitäten wurden danach untereinander verglichen. Im Allgemeinen wurde die maximale Produktivität der CPO im Citratpuffer erzielt. Zwischen den untersuchten Lösungsmitteln lieferte DMSO die höchste Katalysatorproduktivität gefolgt von Isopropanol. Dagegen wurde die niedrigste Katalysatorproduktivität in Acetonitril und DMF erhalten. Sowohl bei der Aktivität als auch bei der Stabilität der CPO beeinflussten sich die Parameter gegenseitig. Diese Beeinflussung war bei der Halbwertszeit stärker ausgeprägt als bei der Aktivität. Bei der Halbwertszeit war zudem der Einfluss des pH-Wertes bei niedrigen Temperaturen stärker im Vergleich zu dem bei hohen Temperaturen. Diese Beeinflussung war bei den verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedlich stark. Im Gegensatz zu der Halbwertszeit wurden bei der Aktivität unterschiedliche Einflüsse abhängig vom Lösungsmittel erhalten. Diese unterschiedlichen Einflüsse deuten auf eine starke Interaktion zwischen dem pH-Wert, der Temperatur und organischen Lösungsmitteln in ihren Einflüssen auf die Aktivität und Stabilität der CPO hin.

Durch die chemische Modifizierung der freien Aminogruppen der CPO mit mPEG 5000 wurde die Aktivität des Enzyms sowohl in Citratpuffer als auch in wassermischbaren organischen Lösungsmitteln lediglich geringfügig beeinflusst. Die gelelektrophoretische Analyse ergab, dass maximal zwei Lysinreste pro Enzymmolekül modifiziert werden, was für eine Stabilisierung der CPO ausreicht. In dieser Hinsicht wurde die Temperaturstabilität der CPO um ein 1,18-faches verbessert. Darüber hinaus konnte die Toleranz der CPO gegenüber wassermischbaren organischen Lösungsmitteln um ein mindestens 5-faches erhöht werden. Die beste Stabilisierung konnte gegenüber DMF erzielt werden, wobei die modifizierte CPO eine um das 17-fache erhöhte Halbwertszeit verglichen mit der jeweiligen des nativen Enzyms zeigt. Daher stellt die PEGylierung der CPO eine interessante Methode für die Stabilisierung der CPO für ihren Einsatz in synthetisch-technischen Anwendungen dar.

5 Literaturverzeichnis

- Aburto, J., Ayala, M., Bustos-Jaimes, I., Montiel, C., Terres, E., Dominguez, J. M., Torres, E. (2005): Stability and catalytic properties of chloroperoxidase immobilized on SBA-16 mesoporous materials. *Micropor Mesopor Mat* 83: 193-200.
- Adam, W., Lazarus, M., Saha-Möller, C. R., Weichold, O., Hoch, U., Härting, D., Schreier, P. (1999): Biotransformation with Peroxidase. *Advances in Biochemical Engineering* vol. 63.
- Adamczak, M., Krishna, S. H. (2004): Strategies for Improving Enzymes for efficient Biocatalysis. *Food Technol. Biotechnol.* 42: 251-264.
- Aehle, W. (2007): *Enzymes in Industry: production and Application*. Wiley-VCH, Weinheim ISBN 978-3-527-31689-2.
- Albertsson, P. A., Cajarville, A., Brooks, D. E., Tjerneld, F. (1987): Partition of Proteins in aqueous polymer two-phase systems and the effect of molecular weight of the polymer. *Biochimica et Biophysica Acta* 926: 87-93.
- Allenmark, S. G., Andersson, M. A. (1996): Chloroperoxidase-catalyzed asymmetric synthesis of series of aromatic cyclic sulfoxides. *Tetrahedron* 1089-1094.
- Andersson, M., Andersson, M. M., Adlercreutz, P. (2000): Stabilisation of Chloroperoxidase toward peroxide dependent inactivation. *Biocatalysis and Biotransformation* 18: 457-469.
- Andersson, M., Samra, B. K., Holmberg, H., Adlercreutz, P. (1999): Use of celite-immobilised chloroperoxidase in predominantly organic media. *Biocatal Biotransformation* 17: 293-303.
- Antov, M. G., Pericin, D. M., Pejin, S. N. (2004): Pectinase partitioning in aqueous two-phase systems: an integration of the system poly(ethylene glycol)/crude dextran and Poly(ethylene glycol)/ammonium sulphate. *J Serbian Chem Soc* 69: 299-307.
- Aoun, S., Chebli, C., Baloulene, M. (1998): Noncovalent immobilization of chloroperoxidase onto talc: Catalytic properties of a new biocatalyst. *Enzyme Microb Tech* 23: 380-385.

- Arnold, F. H. (1996): Directed evolution: Creating biocatalysts for the future. *Chemical Engineering Science* 51: 5091-5102.
- Ayala, M.; Horjales, E.; Pickard, M. A.; Vazquez-Duhalt, R. (2002): Cross-linked crystals of chloroperoxidase. *Biochem Bioph Res Co* , 295: 828-831.
- Ayala, M., Robledo, N., Lopez-Munguia, A., Vazquez-Duhalt, R. (2000): Substrate Specificity and Ionization Potential in Chloroperoxidase-Catalyzed Oxidation of Diesel Fuel. *Environ. Sci. Technol.* 34:2804-2809.
- Bakker, M., van de Velde, F., van Ranwijk, F., Sheldon, R. A. (2000): Highly efficient immobilization of glycosylated enzymes into polyurethane foams. *Biotechnol Bioeng* 70: 342-348.
- Basri, M., Ampon, K., Yunus, W. M. Z., Razak, C. N. A., Salleh, A. B. (1992): Amidination of Lipase with Hydrophobic Imidoesters. *J Am Oil Chem Soc* 69:579-583.
- Bayramoglu, G., Kiralp, S., Yilmaz, M., Toppare, L., Arica, M. Y. (2008): Covalent immobilization of chloroperoxidase onto magnetic beads: Catalytic properties and stability. *Biochem Eng J* 38: 180-188.
- Beauchamp, C. O., Gonias, S. L., Menapace, D. P., Pizzo, S. V. (1983): A new procedure for the synthesis of polyethylene glycol-protein adducts; effects on function, receptor recognition, and clearance of superoxide dismutase, lactoferrin, and alpha 2-macroglobulin. *Anal Biochem* 131: 25-33.
- Bhalchandra, K. V., Suthar, H. K., Kasture, S. , Nene S. (2006): Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueous two-phase system. *Biochem Eng J* 28: 161-166.
- Bommarius, A. S., Riebel, B. R. (2004): *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim. ISBN: 3-527-30344-8.
- Bornscheuer, U. T., Pohl, M. (2001): Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current Opinion in Chemical Biology* 5: 137-143.
- Borole, A., Dai, S., Cheng, C. L., Rodriguez, M., Davison, B. H. (2004): Performance of chloroperoxidase stabilization in mesoporous sol-gel glass using in situ glucose oxidase peroxide generation. *Appl Biochem Biotech* 113: 273-285.

- Cao, L. (2005): Introduction: Immobilized Enzymes: past, present and prospects. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application und Design. ISBN 3-527-31232-3.
- Carmichael, R. D., Jones, A., Pickard, M. A. (1986): Semicontinuous and Continuous Production of Chloroperoxidase by *Caldariomyces-Fumago* Immobilized in K-Carrageenan. Appl Environ Microb 51:276-280.
- Carmichael, R. D., Pickard, M. A. (1989): Continuous and Batch-Production of Chloroperoxidase by Mycelial Pellets of *Caldariomyces-Fumago* in an Airlift Fermenter. Appl Environ Microb 55: 17-20.
- Carrea, G., Riva, S. (2000): Properties and synthetic Applications of enzymes in organic Solvents. Angew. Chem. Int. Ed. 39: 2226-2254.
- Carrea, G., Riva, S. (2008): Organic synthesis with enzymes in non-aqueous media. Wiley-VCH Weinheim ISBN: 978-3-527-31846-9.
- Chalker, J. M., Bernardes, G. J. L., Lin, Y. A., Davis, B. G. (2009): Chemical modification of proteins at cysteine: Opportunities in Chemistry and Biology. Chem. Asian J. 4: 630-640.
- Colonna, S., Gaggero, N., Carrea, G., Pasta, P. (1997): A new enzymatic enantioselective synthesis of dialkyl sulfoxides catalysed by monooxygenases. Chem Commun 439-440.
- Colonna, S., Gaggero, N., Casella, L., Carrea, G., Pasta, P. (1992): Chloroperoxidase and hydrogen peroxide: an efficient system for enzymatic enantioselective sulfoxidations. Tetrahedron 95-106.
- Colonna, S., Gaggero, N., Manfredi, A., Casella, L., Gullotti, M., Carrea, G., Pasta, P. (1990): Enantioselective Oxidations of Sulfides Catalyzed by Chloroperoxidase. Biochemistry-Us 29:10465-10468.
- Crankshaw, M. W., Grant, G. A. (1996): Modification of Cysteine. Current Protocols in Protein Science. 15.1.1-15.1.18.

- Da Silva, M. E., Franco, T. T. (2000): Purification of *soybean* peroxidase (Glycine max) by metal affinity partitioning in aqueous two-phase systems. *J Chromatogr B* 743:287-294.
- Davis, B. G. (2003). Chemical modification of biocatalysts. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 379-386.
- DeSantis, G. and J. B. Jones (1999). Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 324-330.
- Dexter, A. F., Lakner, F. J., Campbell, R. A., Hager, L. P. (1995): Highly Enantioselective Epoxidation of 1,1-Disubstituted Alkenes Catalyzed by Chloroperoxidase. *J Am Chem Soc* 117: 6412-6413.
- Diamond, A. D., Hsu, J.T. (1992): Aqueous two-phase systems for Biomolecule Separation. *Advance in Biochemical Engineering, Biotechnology* 47: 89-135.
- Diamond, A. D., Hsu, J.T. (1990): Protein partitioning in PEG/Dextran aqueous two-phase systems. *AIChE Journal* 36: 1017-1024.
- Doerge, D. R., Corbett, M. D. (1999): Peroxygenation mechanism for chloroperoxidase-catalyzed N-oxidation of arylamines. *Chem Res Toxicol* 4: 556-560.
- Dordick, J., S. (1989): Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 11: 194-211.
- Eijsink, V. G. H., Bjork, A., Gaseidnes, S., Sirevag, R., Synstad, B., Van den Burg, B., Vriend, G. (2004): Rational engineering of enzyme stability. *Journal of Biotechnology* 113: 105-120.
- Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Wikström, C., Wold, S. (2000): Design of Experiments: Principles and Applications. Umetrics Academy. ISBN: 91-973730-0-1
- Faber, K. (2004): Biotransformations in organic chemistry. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg ISBN: 3-540-20097-5
- Fágáin, C. O. (1995). Understanding and increasing protein stability. *Biochim Biophys Acta* 1252: 1-14.

- Fernández, M., Fragoso, A., Cao, R., Villalonga, R. (2005): Stabilization of α -Chemotrypsin by chemical modification with monoamine cyclodextrin. *Process Biochemistry* 40: 2091-2094.
- Fu, H., Kondo, H., Ichikawa, Y., Look, G. C., Wong, C. H. (1992): Chloroperoxidase-catalyzed asymmetric synthesis: enantioselective reactions of chiral hydroperoxides with sulfides and bromohydroxylation of glycals. *J Org Chem* 57:7265-7274.
- Gaertner, H. F., Puigserver, A. J. (1992): Increased activity and stability of poly (ethylene glycol)-modified trypsin. *Enzyme Microb. Technol.* 14:150-155.
- Garcia-Arellano, H., Valderrama, B., Saab-Rincon, G., Vazquez-Duhalt, R. (2002): High temperature biocatalysis by chemically modified cytochrome C. *Bioconjug Chem* 13: 1336-1344.
- Gianfreda, L., Scarfi, M. R. (1991): Enzyme Stabilization - State-of-the-Art. *Molecular and Cellular Biochemistry* 100: 97-128.
- Glazer, A. N. (1970): Specific chemical modification of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 39: 101-130.
- Gonzalez-Vergara, E., Ales, D. C., Goff, H. M. (1985): A simple, rapid, high yield isolation and purification procedure for chloroperoxidase isoenzymes. *Prep Biochem Biotechnol* 15:335-348.
- Grey, C. E., Rundbäck, F., Adlercreutz, P. (2008): Improved operational stability of Chloroperoxidase through use of antioxidants. *Journal of Biotechnology* 135: 196-201.
- Hager, L. P., Lakner, F. J., Basavapathruni, A (1998): Chiral aynthos via chloroperoxidase catalysis. *J Mol Catal B: Enzymatic* 5:95-101.
- Hallenberg, P. F., Hager, L. P. (1978): Purification of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *Methods Enzymol* 9, 52: 521-529.
- Hartmeier, W. (1986): Immobilisierte Biokatalysatoren: Eine Einführung. Springer-Verlag, Berlin ISBN: 3-540-16335-2.
- Hatti-Kaul, R. (2001): Aqueous two-phase systems. *Molecular Biotechnologie* 19: 269-277.

- Hernáiz, M. J., Sanchez-Montero, J. M., Sinisterra, J. V. (1997): Influence of the nature of modifier in the enzymatic activity of chemical modified semipurified lipase from *Candida rugosa*. *Biotechnol Bioeng* 55: 252-60.
- Hernáiz, M. J., Sánchez-Montero, J. M., Sinisterra, J. V. (1999): Modification of purified lipase from *Candida rugosa* with polyethylene glycol: A systematic Study. *Enzyme and Microbial Technology* 24: 181-190.
- Hilterhaus, L., Liese, A. (2007): Building Blocks. *Adv Biochem Engin/ Biotechnol* 105: 133-173.
- Hofrichter, M., Ullrich, R. (2006): Heme-thiolate haloperoxidase: Versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. *Appl Microbiol Biotechnol* 71: 276-288.
- Hu, S., Hager, L. P. (1999): Highly enantioselective propargylic hydroxylations catalyzed by chloroperoxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 872-873.
- Hu, S., Hager, L. P. (1999): Asymmetric epoxidation of functionalized cis-olefins catalyzed by chloroperoxidase. *Tetrahedron Lett* 40:1641-1644.
- Hudson, S., Cooney, J., Hodnett, B. K., Magner, E. (2007): Chloroperoxidase on periodic mesoporous organosilanes: Immobilization and reuse. *Chem Mater* 19: 2049-2055.
- Hueter, J., Cooney, CL. (1974): Enzyme catalysis in the presence of nonaqueous solvents using chloroperoxidase. *J. Biotechnol Bioeng.* 16: 1045-1053.
- Inada, Y., Matsushima, A., Kodera, Y., Nishimura, H. (1990): Polyethylene Glycol (PEG)-conjugates: Application to biomedical and biotechnological processes. *Journal of Bioactive and Compatible polymers* 5 :343-364.
- Illanes, A. (1999): Stability of Biocatalysts. *EJB: Electronic Journal of Biotechnology* 2.
- Kadima, T. A., Pickard, M. A.(1990): Immobilization of Chloroperoxidase on Aminopropyl-Glass. *Appl Environ Microb* 56: 3473-3477.
- Katre, N. V. (1993): The conjugation of proteins with polyethylene-glycol and other polymers - altering properties of proteins to enhance their therapeutic potential. *Advanced Drug Delivery Reviews* 10: 91-114.

- Khajeh, K., Naderi-Manesh, H., Ranjbar, B., Moosavi-Movahedi, A., Nemat-Gorgani, M. (2001): Chemical modification of lysine residues in *Bacillus* α -amylase: effect on activity and Stability. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 543-549.
- Khmelnitsky, Y., L., Mozhaev, V., V., Belova, A., B., Sergeeva, M., V., Martinek, K. (1991): Denaturation capacity: a new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis. *Eur. Biochem.* 198: 31-41.
- Khmelnitsky, Y., L., Belova, A., B., Levashov, A., V., Mozhaev, V., V. (1991): Relationship between surface hydrophilicity of a protein and its stability against denaturation by organic solvents. *Federation of European Biochemical Societies. Volume 284*: 267-269
- Kiljunen, E., Kanerva, L. T. (2000): Chloroperoxidase-catalysed oxidation of alcohols to aldehydes. *J Mol Catal B: Enzymatic* 163-172.
- Kirk, O., Borchert, T. V., Fuglsang, C. C. (2002): Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 345-531.
- Klibanov, A. M. (1983): Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Adv Appl Microbiol* 29: 1-28.
- Klibanov, A. M. (1979): Enzyme Stabilization by Immobilization. *Analytical Biochemistry* 93: 1-25.
- Klibanov, A. M. (2001): Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409: 241-246
- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Simpson, B. K., Kishimura, H. (2005): Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. *Proc Biochem* 40: 3061-3067.
- Kobayashi, S., Nakano, M., Kimura, T., Schaap, A. P. (1987): On the Mechanism of the Peroxidase-Catalyzed Oxygen-Transfer Reaction. *Biochemistry-Us* 26: 5019-5022.
- Koeller, M., K., Wong, C. (2001): Enzymes for chemical synthesis. *Nature* 409: 232-240.
- Lakner, F. J., Hager, L. P. (1997): Chloroperoxidase-mediated asymmetric epoxidation. Synthesis of (R)-dimethyl 2-methylaziridine-1,2-dicarboxylate a potential α -methylamino acid synthon. *Tetrahedron: Asymmetry* 8:3547-3550.

- Lakner, F. J., Hager, L. P. (1996): Chloroperoxidase as enantioselective epoxidation catalyst: An efficient synthesis of (R)-(-)-Mevalonolactone. J. Org. Chem. 61: 3923-3925.
- Lanne, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. (1987): Rules for optimization of Biocatalysis in organic solvents. Biotechnology and Bioengineering: 81-87
- La Rotta Hernandez, C. E., D'Elia, E., Bon, E. P. S. (2007): Chloroperoxidase mediated oxidation of chlorinated phenols using electrogenerated hydrogen peroxide. Electronic Journal of Biotechnology 10, ISSN: 0717-3458.
- La Rotta Hernandez, C. E., Lütz, S., Liese, A., Bon, E. P. S. (2005): Activity und Stability of *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase modified by reductive alkylation, amidation and cross-linking. Enzyme and Microbial Technology 37: 582-588
- Liese, A., Filho, M. V. (1999): Production of fine chemicals using biocatalysis. Current Opinion in Biotechnology 10: 595-603
- Liese, A., Seelbach, K. Wandrey, C. (2000): Industrial Biotransformations, Weinheim: VCH-Wiley.
- Lima, Á. S., Alegre, R. M. , Meirelles, AJA (2002): Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. Carbohydr Pol 50: 63-68.
- Littlechild, J. (1999): Haloperoxidase and their role in biotransformation reactions. Current Opinion in Chemical Biology 3:28-34.
- Liu, J. Z., Song, H. Y., Weng, L. P., Ji, L. N. (2002): Increased thermostability and phenol removal efficiency by chemical modified horseradish peroxidase. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 18: 225-232.
- Liu, J. Z., Wang, M (2007): Improvement of activity and stability of chloroperoxidase by chemical modification. BMC Biotechnology 7: 23.
- Lopez-Cruz, J. I., Viniegra-Gonzalez, G., Hernandez-Arana, A. (2006): Thermostability of native and pegylated *Myceliophthora thermophila* laccase in aqueous and mixed solvents. Bioconjug Chem 17: 1093-8.
- Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998): Bioanalytik. Berlin: Spektrum akademischer Verlag GmbH Heidelberg; p.17-18.

- Loughlin, W. A., Hawkes, D. B. (2000): Effect of organic solvents on a chloroperoxidase biotransformation. *Bioresource Technology* 71: 167-172.
- Luanghiran, S., Harinnasut, P., Thongpan, A., Proomboon, A., Ratanapo, S. (2004): Partial purification of *mulberry* (*Morus rotundiloba*) peroxidase using aqueous two-phase extraction coupled with ion-exchange and gel-filtration chromatography. *Kasetsart J Nat Sci* 38:501-509.
- Lütz, S., Steckhan, E., Liese, A. (2004): First asymmetric electroenzymatic oxidation catalyzed by a peroxidase. *Electrochem Commun* 6: 583-587.
- Lyer, P. V., Ananthanarayan, L. (2008): Enzyme stability and stabilization- Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry* 43: 1019-1032.
- Manoj, K. M., Hager, L. P. (2001): Utilization of peroxide and its relevance in oxygen insertion reactions catalyzed by chloroperoxidase. *Bba-Protein Struct M* 1547: 408-417.
- Manoj, K. M., Hager, L. P. (2008): Chloroperoxidase, a Janus Enzyme. *Biochemistry* 47: 2997-3003.
- Manoj, K. M., Gyan, X. Y., Rai, G. P., Hager, L. P. (1999): A kinetic epoxidation assay for Chloroperoxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266: 301-303.
- Manoj, K. M., Lakner, F. J., Hager, L. P. (2000): Epoxidation of indene by chloroperoxidase. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic* 9:107-111.
- Marquez-Rocha, F. J., Pica-Granados, Y., Sandoval-Villasana, A. M., Vazquez-Duhalt, R. (1997): Determination of Genotoxicity Using Chloroperoxidase- Mediated Model of PAH-DNA Addukt Formation. *Bull.Environ.Contam.Toxicol.* 59: 788-795
- Matsuyama, H., Taguchi, R., Ikezawa, H. (1991): Phospholipase D modified with a polyethylene glycol derivative. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 39: 743-746.
- Mattiasson, B. (1983): Application of aqueous two-phase systems in Biotechnology. *Trends in Biotechnology* 1.
- Mazzola, P. G., Lopes, A. M., Hasmann, F. A., Jozala, A. F., Penna, T. CV., Magalhaes, P. O., Rangel-Yagui, C. O., Pessoa, A. (2008): Liquid-Liquid extraction of

- biomolecules: An Overview and Update of the main Techniques. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 83: 143-157
- Means, G. E., Feeney, R. E. (1990): Chemical modification of proteins: History and Applications. Bioconjugate Chem. 1: 2-12
- Miller, V. P., Tschirretguth, R. A., Demontellano, P. R. O. (1995): Chloroperoxidase-Catalyzed Benzylic Hydroxylation. Arch Biochem Biophys 319: 333-340.
- Miranda, M. V., Cascone, O. (1997): Partition of *horseradisch* peroxidase in aqueous two-phase systems containing polyvinylpyrrolidone. Biosep 7:25-30.
- Mogollon, L., Rodriguez, R., Larrota, W., Ortiz, C., Torres, R. (1998): Biocatalytic removal of Nickel and Vanadium from Petroporphyrins and Asphaltenes. Applied Biochemistry und Biotechnology 765 70-72.
- Morris, D. R., Hager, L. P. (1966): Chloroperoxidase 1 - Isolation and properties of crystalline glycoprotein. J Biol Chem 8:241.
- Murphy, C. D. (2003): New frontiers in biological halogenation. Journal of Applied Microbiology 94:539-548
- Narayanan, R., Zhu, G. Y., Wang, P. (2007): Stabilization of interface-binding chloroperoxidase for interfacial biotransformation. J Biotechnol 128: 86-92.
- O'Brien, A. H., Smith, A. T., Fágáin, C. (2003): Effect of phthalic Anhydride modification on horseradish Peroxidase stability and activity. Biotechnology and Bioengineering 81 no. 2.
- Ortiz-Bermúdez, P., Srebotnik, E., Hammel, K.E., (2003): Chlorination and Cleavage of Liginin Structur by Fungal Chloroperoxidases. Applied and environmental Microbiology 69:5015-5018
- Osterath, B., Rao, N., Lütz, S., Liese, A. (2007): Techinsche Anwendungen von Enzymen. Chem. Unserer Zeit 41: 324-333
- Park, J. B., Clark, D. S. (2006): Deactivation mechanismus of chloroperoxidase during Biotransformation. Biotechnologie und Bioengineering. DOI 10.1200/bit.
- Patel, R. N. (2001): Enzymatic synthesis of chiral intermediates for Omapatrilat, an antihypertensive drug. Biomolecular Engineering 17: 167-182.

- Patel, R. N. (2001): Enzymatic synthesis of chiral intermediates for drug development. Adv. Synth. Catal. 343 No. 6-7.
- Patel, R. N. (2002): Microbial /Enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. Enzyme and Microbial Technology 31: 804-826.
- Pezzotti, F., Therisod, M. (2007): Enantioselective oxidation of thioanisole with an alcohol oxidase/peroxidase bienzymatic system. Tetrahedron: Asymmetry 18: 701-704
- Pickard M. A. (1981): A defined growth medium for the production of chloroperoxidase by *Caldariomyces fumago*. Can J Microbiol 27:129-1305.
- Pickard M. A., Kadima, T. A., Carmichael, R. D. (1991): Chloroperoxidase, a peroxidase with potential. J Ind Microbiol 7: 235-242.
- Quintanilla-Guerrero, F., Duarte-Vazquez, M. A. Garcia-Almendarez, B. E., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R., Regalado, C. (2008): Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized *turnip* peroxidase. Bioresour Technol 99: 8605-8611.
- Quintanilla-Guerrero, F., Duarte-Vazquez, M. A., Tinoco, R., Gomez-Suarez, M., Garcia-Almendarez, B. E., Vazquez-Duhalt, R., Regalado, C. (2008): Chemical modification of *turnip* peroxidase with methoxypolyethylene glycol enhances activity and stability for phenol removal using the immobilized enzyme. J Agric Food Chem 56: 8058-8065.
- Rahimpour, F., Baharvand, A. R. (2009): Phase Equilibrium in Aqueous Two-phase Systems containing Poly(propylene glycol) and Sodium Citrate at different pH. World Academy of Science, Engineering and Technology 59.
- Ribeiro, M. Z., Silva, D. P., Vitolo, M., Roberto, I. C., Pessoa-Jr, A. (2007): Partial purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase by aqueous two-phase poly(ethyleneglycol)/phosphate systems. Brazilian J Microbiol 38:78-83.
- Rodriguez-Martinez, J. A., Rivera-Rivera, I., Sola, R. J., Griebenow, K. (2009): Enzymatic activity and thermal stability of PEG-alpha-chymotrypsin conjugates. Biotechnol Lett 31: 883-887
- Rodriguez-Martinez, J. A., Sola, R. J., Castillo, B., Cintron-Colon, H. R., Rivera-Rivera, I., Barletta, G., Griebenow, K. (2008): Stabilization of alpha-Chymotrypsin Upon

- PEGylation Correlates With Reduced Structural Dynamics. *Biotechnol Bioeng* 101:1142-1149.
- Ruttloff, H. (1994): Industrielle Enzyme. Behr's-Verlag, Hamburg ISBN 3-86022-126-4.
- Ryan, O., Symth, M. R., Fágáin, C. Ó (1994): Thermostabilized chemical derivatives of *horseradish* Peroxidase. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 501-505
- Sangeetha, K., Abraham T. E., (2006): Chemical modification of papain for use in alkaline medium. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 38: 171-177.
- Santhanam, L., Dordick, J. S. (2002): Chloroperoxidase-catalyzed epoxidation of styrene in aqueous and nonaqueous media. *Biocatal Biotransfor* 20: 265-274.
- Schindler, J., Nothwang, H. G. (2006): Aqueous polymer polymer two-phase Systems: Effective tools for plasma membrane proteomics. *Proteomics* 6: 5409-5417.
- Schmid. R. D. (1979): Stabilized soluble Enzyme. Department of Biotechnology. Germany.
- Schulze, B., Wubbolts, M. G. (1999): Biocataysis for industrial production of fine chemicals. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 609-615
- Seelbach, K., van Deurzen, M. P. J., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A., Kragl, U. (1997): Improvement of the total turnover number and space-time yield for chloroperoxidase catalyzed oxidation. *Biotechnol Bioeng* 55: 283-288.
- Sheldon, R. A. (2007): Enzyme immobilization: The quest for Optimum Performance. *Adv. Synth. Catal.* 349: 1289-1307.
- Sirinivas, N. D., Barhate, R. S., Raghavarao, KSMS. (2002): Aqueous two-phase extraction in combination with ultrafiltration for downstream processing of *Ipomoea* peroxidase. *J Food Eng* 54:1-6.
- Spreti, N., Germani, R., Incani, A., Savelli, G. (2004): Stabilization of chloroperoxidase by polyethylene glycol in aqueous media: Kinetic studies and synthetic application. *Biotechnol. Progr.* 20:96-101.
- Straathof, JJ. A., Panke, S., Schmid, A. (2002): The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology* 13:548-556.

- Sundaramoorthy, M., Turner, J., Poulos, T. L. (1995): The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid. *Current Biology* vol 3. no 12.
- Sundaramoorthy, M.; Turner, J.; Poulos, T. L. (1998): Stereochemistry of the chloroperoxidase active site: crystallographic and molecular-modeling studies. *Chem Biol* 5: 461-473.
- Sylvestre, J., Chautard, H., Cedrone, F., Delcourt, M. (2006): Directed Evolution of Biocatalysts. *Organic Process Research and Development* 10: 562-571.
- Teotia, S., Gupta, M. N. (2004): Purification of phospholipase D by two-phase affinity extraction. *J Chromatogr A* 1025:297-301.
- Terrès, E., Montiel, M., Le Borgne, S., Torres, E. (2007): Immobilization of chloroperoxidase on mesoporous materials for oxidation of 4,6-dimethyldibenzothiophene, a recalcitrant organic sulfur compound present in Petroleum fractions. *Biotechnol Lett* DOI 10.1007/s10529-007-9512-5.
- Thomas, J. A., Morris, D. R., Hager, L. P. (1970): Chloroperoxidase: Classical peroxidatic, catalytic, and halogenating forms of the enzymes. *The Journal of biological Chemistry* 245 no. 12.
- Thomas, J. A., Morris, D. R., Hager, L. P., (1970): Chloroperoxidase .8. Formation of Peroxide and Halide Complexes and Their Relation to Mechanism of Halogenation Reaction. *J Biol Chem* 245: 3135-&.
- Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R. (1998): Chemical modification of cytochrome C improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons 22: 8-12.
- Torres, E., Bustos-Jaimes, I., Le Borgne, S. (2003): Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental* 46: 1-15
- Tyler, J., Simurdiak, R. S., Zhao, H. (2006): Biocatalysis. *Encyclopedia of Chemical Processing* DOI: 10.1081/ E-ECHP-120017565.
- Valderrama, B., Ayala, M., Vazquez-Duhalt, R. (2002): Suicide Inactivation of Peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry und Biology* 9: 555-565.

- Vandertol-Vanier, H. A., Vazquez-Duhalt, R., Tinoco, R., Pickard, M. A. (2002): Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of *Coriolopsis gallica* laccase. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29: 214-20.
- Van Deurzen M. P. J. (1996): Selective Oxidation catalysed by Chloroperoxidase. Dissertation Technische Universität Delft.
- Van Deurzen, M. P., Remkes, I. J., Van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. (1997): Chloroperoxidase catalyzed oxidation in t-butyl alcohol/water mixture. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 117: 329-337
- Van Deurzen, M. P., Van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. (1996): Synthesis of substituted oxindoles by chloroperoxidase catalyzed oxidation of indoles. *J Mol Catal B: Enzymatic* 2:33-42.
- Van Deurzen, M. P.S., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A. (1996): Synthesis of substituted Oxindoles by chloroperoxidase catalyzed oxidation of indol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2: 33-42
- Van Deurzen, M. P.S., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A. (1997): Chloroperoxidase-catalyzed oxidation of 5-hydroxymethylfurfural. *J. Carbohydrate Chemistry* 16: 299-309.
- Van Deurzen, M. P.S., Seelbach, K., Van Rantwijk, F., Kragl, U., Sheldon, R.A. (1997): Chloroperoxidase: Use of a hydrogen peroxide-stat for controlling reactions and improving enzyme Performance. *Biocatalysis and Biotransformation* 15:1-16.
- Van de Velde, F., Bakker, M., Van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. (2001): Chloroperoxidase-catalyzed enantioselective oxidation in hydrophobic media. *Biotec Bioeng* 5:72.
- Van de Velde, F., Lourenco, N. D., Bakker, M., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. (2000): Improved operational stability of peroxidases by coimmobilization with glucose oxidase. *Biotechnol Bioeng* 69: 286-291.
- Van de Velde, F., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A. (1999): Selective Oxidation with molecular oxygen, catalyzed by chloroperoxidase in the presence of a reductant. *Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic* 6: 453-461.

- Van Ranwijk, F., Sheldon, R. A. (2000): Selective Oxygen transfer catalyzed by heme peroxidases: synthetic and mechanistic aspects. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 554-564.
- Vargas, R. R., Bechara, E. J. H., Marzorati, L., Wladislaw, B. (1999): Asymmetric sulfoxidation of a beta-carbonyl sulfide series by chloroperoxidase. *Tetrahedron-Asymmetry* 10, 3219-3227.
- Veronese, F. M., Monfardini, C., Caliceti, P., Schiavon, O., Scrawen, M. D., Beer, D. (1996): Improvement of pharmacokinetic, immunological and stability properties of asparaginase by conjugation to linear and branched monomethoxy poly(ethylene glycol). *J Control Release* 40: 199-209.
- Villalonga, R., Fernandez, M., Fragoso, A., Cao, R., Mariniello, L., Porta, R., (2003). Thermal stabilization of trypsin by enzymic modification with beta-cyclodextrin derivatives. *Biotechnol Appl Biochem* 38: 53-59.
- Villalonga, R., Tachibana, S., Cao, R., Ramirez, H. L., Asano, Y. (2006): Supramolecular-mediated thermostabilization of phenylalanine dehydrogenase modified with β -cyclodextrin derivatives. *Biochemical Engineering Journal* 30: 62-32.
- Vinogradov, A. A., Kudryashova, E. V., Grinberg, V. Y., Grinberg, N. V., Burova, T. V., Levashov, A. V. (2001): The chemical modification of alpha-chymotrypsin with both hydrophobic and hydrophilic compounds stabilizes the enzyme against denaturation in water-organic media. *Protein Eng* 14: 683-689.
- Yang, Z., Domach, M., Auger, R., Yang, F. X., Russell, A. J. (1996): Polyethylene glycol-induced stabilization of subtilisin." *Enzyme and Microbial Technology* 18: 82-89.
- Zacks, A. (2001): Industrial biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* 5: 130-136
- Zhang, L. H., Bai, C. H., Wang, Y. S., Jiang, Y. C., Hu, M. C., Li, S. N., Zhai, Q. G. (2009): Improvement of chloroperoxidase stability by covalent immobilization on chitosan membranes. *Biotechnol Lett* 31: 1269-1272.
- Zhi, L. F.; Jiang, Y. C.; Wang, Y. S.; Hu, M. C.; Li, S. N.; Ma, Y. J. (2007): Effects of additives on the thermostability of chloroperoxidase. *Biotechnol Progr*, 23:729-733.

- Zhu, G. Y., Wang, P. (2005): Novel interface-binding chloroperoxidase for interfacial epoxidation of styrene. J Biotechnol 117: 195-202.

Lebenslauf:**Persönliche Daten:**

Name, Vorname:	Yazbik, Valantina
Geburtsort:	Jabla, Lattakia
Geburtsdatum:	18.03.1980
Familienstand:	ledig
Nationalität:	Syrisch

Ausbildung:

1996-1997	Abitur (Lattakia, Syrien)
1997-2001	Hauptstudium der Biology an der Tishreen Universität, Lattakia
2001-2002	Diplom in Wasserökologie an der Tishreen Universität, Lattakia
2003-2005	Wissenschaftliche Mitarbeitein an der Aleppo Universität, Aleppo
2006-2010	Promotion an der TU Berlin am Lehrstuhl für Technische Chemie in der AG Enzymtechnologie (bei Prof. Dr. M. Ansorge-Schumacher)